



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Doctorado en Ciencias en Biotecnología

**Efecto de la Germinación y la Simulación de
Digestión Gastrointestinal *in vitro* Sobre la
Actividad Antioxidante y Anti-inflamatoria de
Compuestos Bioactivos de Amaranto
(*Amaranthus hypochondriacus*)**

T E S I S

que presenta

MC Eslim Suguey Sandoval Sicairos

como requisito para
obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en
Biotecnología de Alimentos**

Director

**Dr Jorge Milán Carrillo
Dr Alvaro Montoya Rodríguez**

Culiacán Rosales, Sinaloa, México

Julio 2020

Presentación

El presente trabajo titulado “Efecto de la Germinación y la Simulación de Digestión Gastrointestinal *in vitro* Sobre la Actividad Antioxidante y Anti-inflamatoria de Compuestos Bioactivos de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)” se desarrolló en el “Laboratorio de Alimentos Nutracéuticos”, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Como Directores de Tesis participaron los C Dr Jorge Milán Carrillo y Dr Álvaro Montoya Rodríguez. Lo(a)s C Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez, Dra Ada Keila Milán Noris y Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno fungieron como Asesores Académicos y Miembros de H Comité Tutorial. La alumna MC Eslim Sughey Sandoval Sicairos recibió como “Beca Nacional para Estudios de Posgrado” (Doctorado), por cuatro años, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). El proyecto recibió financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) 2015/186.

Agradecimientos

A **DIOS** por ser mi fuerza, mi vara y callado, mi motivo, mi motor, por darme el existir y una vida llena de bendiciones, ¡te amo!

A mi Director de Tesis Dr Jorge Milán Carrillo por confiar en mí y aceptarme en su equipo de trabajo. Por su amistad, enseñanzas y apoyo incondicional tanto profesional como personal, infinitamente. Gracias Doctor.

A mi Director de Tesis Dr Alvaro Montoya Rodríguez por guiarme y por todas las enseñanzas transmitidas en todo este tiempo para la realización de este trabajo de investigación. Sobre todo por la amistad y consejos cuando los necesitaba. Por todo, ¡Muchas gracias Alvarini!

A mi Asesor(a)s Académico(a)s Dra Ada Keila Milán Noris, Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez, Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno por su orientación y enseñanza en la realización de gran parte de este proyecto. Sobre todo por tu amistad y apoyo durante tantos años. ¡Muchas gracias!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la “Beca Nacional para Estudios de Doctorado”. Una gran ayuda para realizar mis estudios doctorales y concluir satisfactoriamente el trabajo de tesis.

Al Programa Regional de Posgrado en Biotecnología y los maestros que lo conforman. En especial a los investigadores del “Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales”: Dra Mora Rochín, Dra León López, Dr Sánchez Magaña, Dr Guitérrez Dorado, Dra Perales Sánchez. Agradezco sus consejos y amistad durante todos estos años. ¡Muchas gracias!

Agradezco el apoyo brindado por los investigadores Dra León Sicaños, Dr Garzón Tiznado por facilitarme equipo e infraestructura para el desarrollo con éxito de algunas metodologías. Gracias:

Mi agradecimiento a Dr López Valenzuela, Dra Pineda Hidalgo, Dra Salazar Salas, de “Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular” por apoyarme con asesorías y facilitarme infraestructura y equipo.

Al Dr Diego Armando Luna Vital por su apoyo técnico en la caracterización de péptidos.

A mis amigos y compañeros del “Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales”, en el cual se realizaron la mayoría de los experimentos, en especial a mis amigos Evelin, Oscar, Carolina, Carlos, Jeanett, por su amistad, enseñanzas y apoyo incondicional durante todos estos años. ¡Muchas gracias!, ¡los quiero mucho!

A toda mi familia, principalmente a mi mamá Marisela Sicaños por su amor y apoyo, gracias por ser mi todo mami, te amo. A mis hermanas Sobeyda y Cecilia por su apoyo y cariño. A mis sobrinos Francisco Rafael, Efraín Alexis, Elías Karim y el que viene en camino por ser mi motivo y alegría. A mis cuñados Karim y Genaro por su apoyo. A todos mis tíos (Efraín, Trinita, Julieta, Beatriz, Mario, bueno a todos para que no se sienta ninguno). A mis abuelos Francisco, Ramona, Juanita y Vicente que los quiero mucho, muchas gracias. Agradezco de manera especial a mis tíos Efraín y Trinita por todo el apoyo brindado, por el hogar, por los alimentos, por los consejos, por las desveladas, en fin absolutamente por toda la ayuda durante estos años.

A mis ángeles: mi Papá Rafael Sandoval Zazueta, mi Abuelo/Papá Francisco “Quito Sandoval” y mi Abuela Juanita (QEPD) por estar siempre cuidándome y guiándome por el buen camino. Muchas gracias por quedarse siempre conmigo. Los amo con todo mi corazón.

A todos mis amigos que siempre me apoyaron y me dieron una palabra de aliento, me escucharon, me dieron un consejo y sobre todo soportaron mi mal humor cuando estaba estresada. Muchas gracias a Lupita, Evelia, Keila, América, Daniela, Socorro, Sergio, Annete, Feliznando, Grizel, Netza, Amelia, Gaby, Astrid, Jocelyn, Claudia, Fidel, Cindy, Favian, Ofelia, Paty por motivarme a la superación constante, por confiar y creer en mí siempre, por acercarme a Dios, por soportarme y tolerarme.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
A AMARANTO	7
1 Origen	7
2 Taxonomía	8
3 Descripción botánica	9
4 Estructura del grano	11
a Epispermo	12
b Endospermo	12
c Embrión	12
d Perispermo	14
5 Usos y consumo del amaranto	14
6 Estadísticas de producción	16
7 Composición química	16
a Proteína	19
b Grasas	21
c Fibra	22
d Carbohidratos	22
8 Compuestos fenólicos en el grano de amaranto	23
9 Procesamiento del grano de amaranto	23
a Cocción	25

b	Tostado	25
c	Reventado	26
d	Micronización	27
e	Nixtamalización	27
f	Extrusión	27
g	Germinación	28
B	GERMINACIÓN	29
1	Descripción del bioproceso	30
a	Imbibición	30
b	Iniciación del metabolismo activo del embrión	31
2	Factores que influyen sobre la germinación	31
a	Tiempo de cosecha	31
b	Remojo	32
c	Temperatura / tiempo de germinación	32
d	Inhibidores microbianos	34
e	Estrés osmótico	34
3	Cambios en composición nutricional y nutracéutica durante la germinación	34
C	HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS	35
1	Enzimas de la digestión gastrointestinal	39
2	Procesamiento	41
D	PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL AMARANTO	41
1	Actividad antioxidante	42
2	Efecto hipocolesterolemizante	43
3	Actividad anti-diabética	44
4	Actividad anti-aterosclerótica	44
5	Actividad anti-cancerígena	45

6	Actividad anti-hipertensiva	46
7	Actividad anti-Inflamatoria	46
IV JUSTIFICACIÓN		49
V HIPÓTESIS		50
VI OBJETIVOS		51
A	OBJETIVO GENERAL	51
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
VII MATERIALES Y MÉTODOS		53
A	MATERIALES	53
B	MÉTODOS	53
1	Obtención de harina de amaranto germinado (GAF)	53
2	Obtención del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado (GAFPC)	56
3	Digestión gastrointestinal simulada <i>in vitro</i>	57
4	Extracción total de proteínas de las harinas sin digerir	58
5	Medición de proteína soluble (DC-Protein Assay)	58
6	SDS-PAGE	59
7	Grado de hidrólisis	60
8	Fraccionamiento de péptidos	60
9	Preparación de extractos metanólicos	61
10	Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)	61
11	Medición de la actividad antioxidante	62
12	Índice de recuperación (IR)	63
13	Índice de bioaccesibilidad (IB)	63
14	Actividad residual (AR)	63
15	Actividad anti-inflamatoria	64
a	Viabilidad celular	64
b	Medición de óxido nítrico (NO)	65
16	Caracterización de péptidos mediante MALDI-TOF acoplado a masas (MS/MS)	65
a	Identificación de la actividad biológica	66

17	Análisis estadístico	66
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
A	EFFECTO DE LA GERMINACIÓN DE AMARANTO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	68
1	Proteína soluble (PS)	68
2	Compuestos fenólicos totales (CFT)	68
3	Actividad antioxidante (AAOX)	70
B	EFFECTO DE LA GERMINACIÓN Y DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN GÁSTRICA E INTESTINAL SIMULADA EN AMARANTO SOBRE EL PERFIL DE PROTEÍNAS, GRADO DE HIDRÓLISIS, CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	70
1	Perfil de proteínas por SDS-PAGE	70
2	Grado de hidrólisis (GH)	73
3	Proteína soluble (PS)	73
4	Compuestos fenólicos totales (CFT)	76
5	Actividad antioxidante (AAOX)	78
C	EFFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE LOS DIGERIDOS Y FRACCIONES PEPTÍDICAS DE LA HARINA DE AMARANTO GERMINADO.	80
1	Viabilidad celular	80
2	Actividad anti-inflamatoria	80
D	EFFECTO DEL FRACCIONAMIENTO EN DIGERIDOS GASTROINTESTINALES DE HARINA DE AMARANTO GERMINADO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	85
1	Proteína soluble (PS)	85
2	Compuestos fenólicos totales (CFT)	85
3	Actividad antioxidante (AAOX)	85
E	CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE PÉPTIDOS LIBERADOS MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>in vitro</i> DE LA HARINA DE AMARANTO GERMINADO.	87
F	EFFECTO DE LA GERMINACIÓN, CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y SIMULACIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE PROTEÍNAS, CONTENIDO Y BIOACCESIBILIDAD DE	

PROTEÍNA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.	93
1 Perfil proteínico por SDS-PAGE	93
2 Proteína soluble (PS)	95
3 Compuestos fenólicos totales (CFT)	97
4 Actividad antioxidante (AAOX)	98
5 Bioaccesibilidad	99
G EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE LOS PÉPTIDOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS LIBERADOS MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>in vitro</i> DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO DE AMARANTO GERMINADO.	102
1 Viabilidad celular	102
2 Actividad anti-inflamatoria	102
H CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS PÉPTIDOS, LIBERADOS MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>in vitro</i> DEL CONCENTRADO PROTEÍNICO DE AMARANTO GERMINADO.	107
IX CONCLUSIONES	116
X BIBLIOGRAFÍA	118
ABREVIATURAS	144

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág
1	Producción nacional de amaranto en México	17
2	Composición química (%bs) del grano de amaranto	18
3	Comparación entre la composición química del amaranto con algunos cereales	20
4	Principales compuestos fenólicos reportados en granos de amaranto sin procesar	24
5	Efecto de la germinación sobre el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de granos de amaranto	36
6	Efecto de la germinación sobre el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en harina de amaranto	69
7	Contenido de proteína soluble a diferente tiempo de digestión de las harinas de amaranto sin procesar y germinado	75
8	Contenido de compuestos fenólicos totales a diferente tiempo de digestión de las harinas de amaranto sin procesar y germinado	77
9	Actividad antioxidante a diferente tiempo de digestión de las harinas de amaranto sin procesar y germinado	79
10	Efecto del fraccionamiento de digeridos gastrointestinales de amaranto germinado en el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante	86
11	Péptidos bioactivos identificados por MS/MS en las fracciones (F ₁ -F ₃), colectadas de la digestión gastrointestinal de harina de amaranto germinado lavada	88

12	Propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados en las fracciones (F ₁ -F ₃), colectadas de la digestión gastrointestinal de harina de amaranto germinado lavada	91
13	Efecto de la germinación, concentración de proteínas y digestión, sobre el contenido de proteína soluble, fenólicos totales y actividad antioxidante	96
14	Índices de recuperación, bioaccesibilidad y actividad residual en proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente <i>in vitro</i>	101
15	Péptidos bioactivos identificados por MS/MS en las fracciones F1 y F2 del digerido del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado, soluble e insoluble	109
16	Propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados en las fracciones F1 y F2 del digerido del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado, soluble e insoluble	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág
1	Características botánicas del amaranto	10
2	Estructura del grano de amaranto	13
3	Usos de la planta de amaranto	15
4	Diagrama experimental general	54
5	Diagrama de obtención de harina de amaranto germinado	55
6	Perfil proteínico (SDS-PAGE) de harina de amaranto sin procesar (A) y germinado(B), así como sus digeridos	71
7	Grado de hidrólisis de los digeridos de harina de amaranto sin procesar y germinado	74
8	Actividad anti-inflamatoria de péptidos de harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente <i>in vitro</i> a diferentes tiempos de digestión (GAD).	81
9	Actividad anti-inflamatoria de péptidos de harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente <i>in vitro</i> y su fracciones (GAD 90, GADW 90, F ₁ , F ₂ y F ₃)	83
10	Estructura de los péptidos identificados en las fracciones F ₁ , F ₂ y F ₃ de la harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente <i>in vitro</i> lavada (GADW 90)	92
11	Perfil proteínico (SDS-PAGE) de harina de amaranto sin procesar, germinado, concentrado proteínico y sus digeridos insoluble y soluble	94
12	Efecto anti-inflamatorio de los péptidos del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido	103
13	Efecto anti-inflamatorio de los compuestos fenólicos de la	105

harina de amaranto sin procesar, germinado,
concentrado proteínico de harina de amaranto germinado
y sus digeridos insoluble y soluble

- | | | |
|----|--|-----|
| 14 | Estructura de los péptidos identificados en las fracciones F1 y F2 del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido insoluble | 113 |
| 15 | Estructura de los péptidos identificados en las fracciones F1 y F2 del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido soluble | 114 |

I RESUMEN

El grano de amaranto (*Amaranthus* spp.) se han vuelto esencial para la salud y nutrición humana debido a la presencia de compuestos bioactivos que han mostrado algunas actividades biológicas. El proceso de germinación produce cambios significativos en las características bioquímicas de los granos de amaranto, además, su digestión gastrointestinal simulada podría conducir a la modificación de los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante. El objetivo de este estudio fue evaluar la liberación de péptidos y compuestos fenólicos con actividad antioxidante y anti-inflamatoria mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* en harina y concentrado proteínico de amaranto germinado. La harina de amaranto germinado (GAF) exhibió aumentos en el contenido de proteína soluble (PS), compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante (AAOX) en un 37.5 %, 17.2 % y 54.3 %, respectivamente, en comparación con la harina de amaranto sin procesar (UAF). En el perfil proteínico, los digeridos de UAF (UAD) y GAF (GAD) exhibieron bandas de bajo peso molecular (<10KDa). UAD y GAD presentaron el mayor grado de hidrólisis o digestión a los 205 minutos de tiempo de digestión gastrointestinal simulada (pepsina más pancreatina) con 73.4% y 60.3 %, respectivamente. UAD y GAD liberaron significativamente PS y CFT después de la digestión gastrointestinal (hasta 205 min), lo que condujo a una mejora notable de la AAOX en comparación con UAF y GAF. UAD y GAD presentaron la mejor AAOX a los 270 min de digestión gastrointestinal con 983.1 y 1304.9 μmol equivalentes de trolox /mg de PS, respectivamente. El perfil proteínico mostró que la harina de amaranto germinado digerida con pepsina 180 min + pancreatina 90 min (GAD 90) presentó una digestión completa de proteínas (péptidos <10 KDa). Todas las muestras presentaron un efecto anti-inflamatorio sobre los macrófagos RAW 264.7 inducidos con lipopolisacárido (LPS). GAD 90 mostró un efecto anti-inflamatorio y antioxidante con sinergia entre los péptidos y los compuestos fenólicos. F₂ (3-10 KDa) fue la

fracción que presentó el mayor contenido de PS y AAOX con respecto a las otras fracciones. F₂ mostró un mejor efecto anti-inflamatorio que GAD 90 pero no mejor AAOX. Las once secuencias de péptidos identificados en las fracciones F₁₋₃ se han asociado con actividades biológicas como anti-inflamatorios, antioxidantes, dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), entre otros. La PS incrementó significativamente después de la concentración de proteínas (490.5 %) y la digestión gastrointestinal simulada con pepsina 90min+pancreatina 60min (558.7%) de GAF; se observó la modificación del perfil de proteínas después de la concentración de proteínas y la digestión gastrointestinal simulada, observándose la producción de péptidos de tamaño <10 kDa. Los CFT y la AAOX también incrementaron después de la concentración de proteínas (224.8 y 262.1 %, respectivamente) y la digestión gastrointestinal simulada (2465.3 y 551.1 %, respectivamente) de GAF. De manera general, todos los tratamientos del concentrado proteínico digerido insoluble y soluble (GAFPC in y out) así como sus fracciones F1 y F2 presentaron porcentajes de inhibición de óxido nítrico (NO) en un rango de 40-87 % con dosis de 0.25-1 mg/mL y los CFT de UAF, GAF, GAFPC, GAFPC in y GAFPC out presentaron un rango de porcentaje de inhibición de NO de 42-80 % a dosis de 0.25 mg/mL. Las secuencias de péptidos identificadas en las fracciones F1 y F2 de GAFPC in y out, además del efecto antioxidante y anti-inflamatorio se ha reportado que presentan actividades biológicas como inhibidores de la enzima DPP-IV, ECA, antitrombóticos, entre otros. De manera general el proceso de germinación en conjunto con la concentración de proteínas más la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* mejora el potencial del amaranto como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales con potencial actividad antioxidante y anti-inflamatoria.

ABSTRACT

Amaranth (*Amaranthus* spp.) grains have become essential for human health and nutrition due to the presence of bioactive compounds that have shown some biological activities. Germination process produces significant changes in the biochemical characteristics of amaranth grains, and their simulated gastrointestinal digestion could lead to modification of bioactive compounds and antioxidant capacity. The aim of this study was to evaluate the release of peptides and phenolic compounds with antioxidant and anti-inflammatory activity by simulating *in vitro* gastrointestinal digestion in flour and protein concentrate of germinated amaranth. Germinated amaranth flour (GAF) exhibited increases in the content of soluble protein (SP), total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AOX) by 37.5%, 17.2% y 54.3%, respectively, compared with ungerminated amaranth flour (UAF). In SDS-PAGE, both digested of UAF (UAD) and GAF (GAD) exhibited low molecular weight bands (<10kDa). The highest degree of hydrolysis (or digestion) in both digested, UAD and GAD, was observed at 205 min of sequential gastrointestinal digestion (pepsin+pancreatin) time by 73.4% and 60.3%, respectively. UAD and GAD, released significantly SP and TPC after sequential gastrointestinal digestion (up 205 min), which led to a remarkable improvement of AOX when compared to non-digested amaranth samples. The UAD and GAD had the best AOX at 270 min of gastrointestinal digestion with 983.1 and 1304.9 $\mu\text{mol TE/mg SP}$, respectively. SDS-PAGE showed that germinated amaranth flour digested with pepsin 180 min+pancreatin 90min (GAD 90) presented a complete digestion of proteins (peptides <10 KDa). All samples showed anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. GAD 90 showed anti-inflammatory and AOX with a synergy effect among the peptides and phenolics. F₂ (3-10 KDa) was the fraction that presented the major SP content and AOX than other fractions. F₂ showed better anti-inflammatory effect than GAD 90 but not AOX. The eleven sequences of identified peptides in

fractions F₁₋₃ have been associated with biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, among others.

The SP content increased significantly after protein concentration (490.5%) and simulated gastrointestinal digestion with 90min pepsin + 60min pancreatin (558.7%) of GAF; SDS-PAGE shows the modification of the protein profile after protein concentration and simulated gastrointestinal digestion, observing the production of peptides of molecular mass <10 KDa. TPC and AOX also increased after protein concentration (224.8 and 262.1%, respectively) and simulated gastrointestinal digestion (2465.3 and 551.1%, respectively) of GAF. In general, all treatments of the digested protein concentrate (GAFPC in and out) as well as its F1 and F2 fractions presented percentages of nitric oxide (NO) inhibition ranged from 40 % to 87 % with doses of 0.25-1 mg/mL and the TPC of UAF, GAF, GAFPC, GAFPC in and GAFPC out presented a range of NO inhibition percentage of 42-80 % at a dose of 0.25 mg/mL. The peptide sequences identified in the F1 and F2 fractions of GAFPC in and out, in addition to the antioxidant and anti-inflammatory effect, have been reported to present biological activities as inhibitors of the enzyme DPP-IV, ACE, antithrombotic, among others. In general, the germination process together with the concentration of proteins plus *in vitro* gastrointestinal digestion improves the potential of amaranth as an ingredient in the development of functional foods with potential antioxidant and anti-inflammatory activity.

II INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria ha estado estudiando los aspectos relacionados con los componentes presentes en los alimentos que promueven una vida saludable, tal es el caso de los compuestos fenólicos, así como también de los biopéptidos, los cuales forman parte de las proteínas de los alimentos. En la actualidad existen evidencias de que algunos factores dietarios pueden desempeñar un papel importante en la protección de la salud, ya que existe una estrecha relación entre la dieta y las enfermedades crónicas. El consumo de cereales integrales y pseudocereales puede ayudar a reducir el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas. El grano de amaranto es un pseudocereal que ha resurgido en los últimos años debido a sus características nutricionales y agronómicas (Khandaker y col, 2010; Velarde-Salcedo y col, 2013). Una razón por la que ha incrementado el interés por el cultivo de amaranto, es que proporciona proteína (13-19%) de buena calidad (con buen balance de aminoácidos esenciales), fibra dietaria (14%) y lípidos (5-13%) ricos en ácidos grasos insaturados. Asimismo, el amaranto contiene niveles adecuados de micronutrientes como vitaminas y minerales; posee cantidades significativas de componentes bioactivos como saponinas, fitoesteroles, antocianinas, flavonoides y polifenoles (Rastogi y Shukla, 2013). Todas estas características hacen del amaranto un alimento importante para la dieta humana, destacando la utilización de las semillas, con las cuales se puede obtener harina para la elaboración de alimentos (Borneo y Aguirre, 2008). Existen diferentes procesos tecnológicos que se han utilizado para procesar el amaranto tales como nixtamalización, micronización, reventado, tostado, extrusión y germinación. El proceso de germinación ha sido ampliamente recomendado como una forma efectiva para mejorar la calidad de los cereales, las leguminosas y los pseudocereales. Durante este bioproceso, el cual utiliza el grano integral, algunos compuestos con actividad antioxidante se incrementan (Hübner y col, 2013). Dichos compuestos están relacionados con la protección en contra del

estrés oxidativo, por lo que el consumo en la dieta de productos germinados, puede ser muy importante para reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas al estrés oxidativo (Pasko y col, 2009; Silva y col, 2013), como la inflamación, la cual es una respuesta protectora con una reacción tisular compleja ante diversas fuentes. Existen dos estados de la inflamación: aguda y crónica (Weiss, 2008). La inflamación aguda es la etapa inicial de la inflamación y persiste solo por un corto tiempo. Si la inflamación dura un periodo de tiempo mayor, inicia el estado de inflamación crónica. Este tipo de inflamación puede predisponer al huésped a varias enfermedades crónicas como enfermedades del corazón, cáncer, diabetes, aterosclerosis y obesidad (Moore y col, 2010). Nuestro grupo de trabajo evaluó el efecto del proceso de germinación sobre la capacidad antioxidante del grano de amaranto, concluyendo que la germinación es una estrategia efectiva para incrementar la capacidad antioxidante (Perales-Sánchez y col, 2014). Sin embargo, a pesar de las propiedades importantes que aporta el proceso de germinación al grano de amaranto, no hay reportes acerca del efecto de la germinación sobre el potencial efecto anti-inflamatorio de hidrolizados de harina de amaranto germinado en un modelo inflamatorio de células inducidas con lipopolisacárido (LPS).

El objetivo general de este proyecto fue evaluar la liberación de péptidos y compuestos fenólicos con actividad antioxidante y anti-inflamatoria mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* en harina y concentrado proteínico de amaranto germinado.

III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A AMARANTO

1 Origen

El amaranto (*Amaranthus spp*) es una especie nativa de México, Guatemala y de la región andina de América del Sur, incluyendo Argentina, Bolivia y Perú (Montoya-Rodríguez y col, 2015a; FAO, 2020). Es un cultivo ancestral que se domesticó en América hace más de 5000 años, era base en la alimentación de las civilizaciones precolombinas como la Azteca, Inca y Maya (Iturbe y Gispert, 1994; Tironi y Añón, 2010; Pavlik, 2012; Montoya- Rodríguez y col, 2015b; Mota y col, 2016). Se estima que los aztecas producían de 15 a 20,000 toneladas por año. Su importancia en las culturas prehispánicas era debido a su poder nutricional, siendo una fuente importante de proteínas; se consumía como verdura y grano reventado. También se asociaba con los ritos religiosos, a los dioses y a la visión cósmica de estas culturas, además, era muy apreciado por su poder curativo. Con los granos del amaranto se preparaba una harina que se mezclaba con miel de maguey para formar una masa llamada *tzoalli*, con la que se elaboraban figuras e imágenes de deidades utilizadas en diferentes cultos (algunas fuentes mencionan que esta masa contenía también sangre de niños o adultos sacrificados) (Perales-Sánchez y col, 2016).

Sin embargo, cuando los españoles llegaron a América durante la Conquista, uno de los medios para dominar a las culturas Maya y Azteca fue la imposición de la religión cristiana, obligándolos a abandonar la propia; debido a que el amaranto o *huautli* estaba relacionado con rituales religiosos los españoles ordenaron su destrucción, prohibieron su cultivo y consumo por razones religiosas y políticas, eliminando así al amaranto de la dieta indígena, ignorando por completo sus cualidades nutricionales (Paredes-López y col, 2006; Spetter y Thompson, 2007; Rastogi y Shukla, 2013; Mota y col, 2016). La cultura del cultivo y consumo del amaranto casi desaparecen, afortunadamente el arraigo

de las costumbres en los pueblos fue muy fuerte y no permitieron que el cultivo y consumo de este pseudocereal desapareciera (Perales-Sánchez y col, 2016). El cultivo de amaranto ha resurgido en las últimas dos décadas debido a sus características agronómicas y nutricionales (Velarde-Salcedo y col, 2013). Actualmente se está retornando a su explotación en varios países latinos debido entre otros factores a su excelente calidad nutricional, y a su amplio rango de adaptación a ambientes desfavorables para otros cultivos (Caselato-Souza y Amaya-Farfán, 2012; Mota y col, 2016). El amaranto es una planta dicotiledónea C4, lo que significa que pierde menos agua por transpiración y usa más eficientemente el dióxido de carbono (Délano-Frier y col, 2011). Su importancia agronómica es debido a que es un cultivo de rápido crecimiento, es tolerante a condiciones de sequía (requiere poca cantidad de agua para su crecimiento), salinidad, alcalinidad o acidez del suelo, pudiendo incluso crecer en suelos pobres en nutrientes y cultivarse en cualquier época del año a diferentes condiciones de altura. Estas características hacen al amaranto un cultivo alternativo, el cual puede cultivarse en lugares donde los cultivos convencionales no pueden crecer. (Avanza y col, 2005; Wrigley y col, 2016). En otros continentes es muy relevante el cultivo de este pseudocereal, ya sea para la alimentación humana o animal (Caselato-Souza y Amaya-Farfán, 2012; Velarde-Salcedo y col, 2013; Rastogi y Shukla; 2013; Wrigley y col, 2016; Mota y col, 2016).

2 Taxonomía

El amaranto pertenece a la orden *Caryophyllales* de la familia de las Amarantáceas, género *Amaranthus*. La familia *Amaranthaceae* tiene más de 70 géneros con más de 800 especies (Grobelnik-Mlakar y col, 2009; Montoya-Rodríguez y col, 2015; FAO, 2020). Las principales especies de amaranto son *Amaranthus hypochondriacus* (originario de México), *Amaranthus caudatus* (originario de Perú) y *Amaranthus cruentus* (originario de México y Guatemala) (Milán-Carrillo y col, 2012b; López-Mejía y col, 2014). La principal especie

cultivada en México es la especie *Amaranthus hypochondriacus*, la cual era utilizada por los Aztecas como alimento ya que pensaban que les proporcionaba fuerza. Dentro de las especies más conocidas del género *Amaranthus* se encuentran las siguientes: a) *Amaranthus caudatus* L. cuyos sinónimos son: *Amaranthus edulis* Spegazzini, *Amaranthus mantegazzianus* Passerini.; b) *Amaranthus hypochondriacus* L. cuyos sinónimos son: *Amaranthus leucocarpus* S, Wats y *Amaranthus flavus* L.; c) *Amaranthus cruentus* L. cuyo sinónimo es *Amaranthus paniculatus* L.; d) *Amaranthus hybridus* L., cuyo sinónimo sería *Amaranthus quitensis* S.; e) *Amaranthus tricolor* L. cuyos sinónimos serían *Amaranthus gangeticus* L., *Amaranthus tristis* L., *Amaranthus mangostanus* L. y *Amaranthus melancholicus* L. f) *Amaranthus blitum* L. sinónimo de *Amaranthus lividus* L.; g) *Amaranthus dubius* L. y h) *Amaranthus virides* L., sinónimo de *Amaranthus gracilis* Desf. Taxonómicamente aún existen discrepancias y alguna confusión debido a la semejanza entre ellos, amplia distribución geográfica y criterios de los taxónomos; el género tiene amplia dispersión y distribución en el mundo, encontrándola en México, Estados Unidos, Guatemala, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina, India, Pakistán, Sri Lanka, Nepal, Birmania, Afganistán, Irán, China, Nigeria, Uganda, Malasia, Indonesia, etc. El amaranto es una especie anual, herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias (Montoya-Rodríguez, 2015).

3 Descripción botánica

La planta de amaranto es de cultivo anual y puede alcanzar de 0.5 a 4 metros de altura (**Fig. 1**). Posee un solo eje central aunque su raíz es pivotante con abundante ramificación y múltiples raicillas delgadas, que se extienden después que el tallo comienza a ramificarse, facilitando la absorción de agua y nutrientes, la raíz principal sirve de sostén a la planta (Mazón y col, 2003). Su tallo es cilíndrico y anguloso con gruesas estrías longitudinales que dan una apariencia acanalada, cuyo grosor disminuye de la base al ápice, presenta

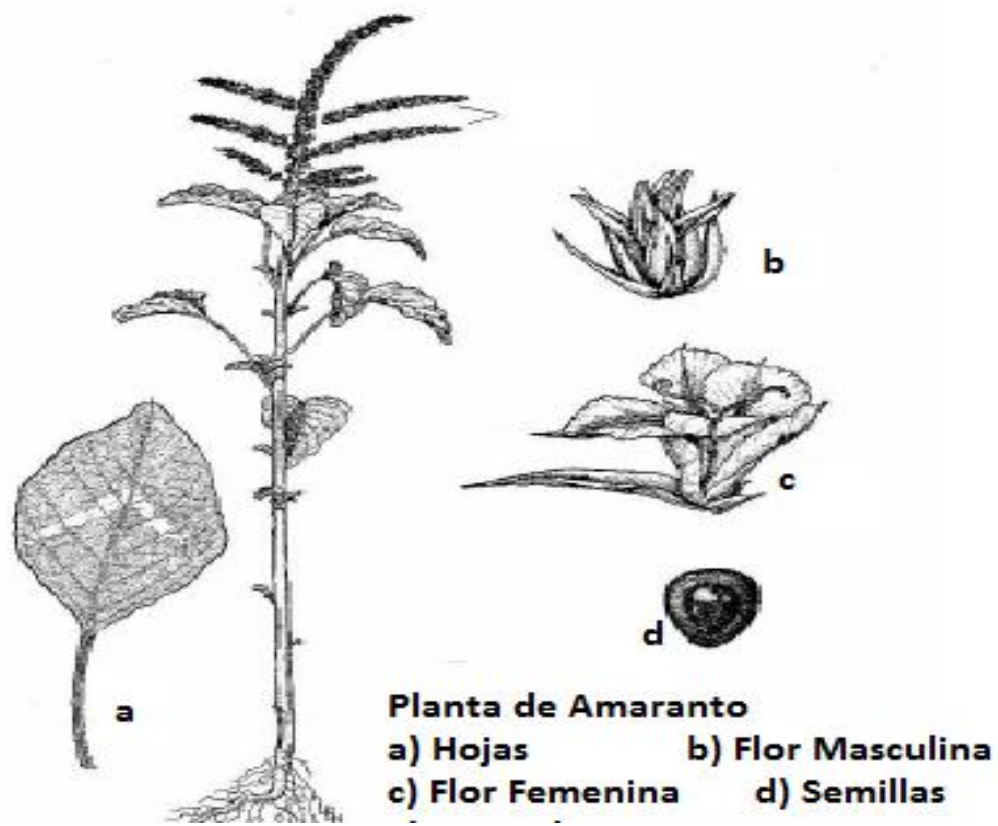


Fig. 1. Características botánicas del amaranto.

Montoya-Rodríguez (2015)

distintas coloraciones generalmente coinciden con el color de la hojas (Sumar, 1982). Las raíces primarias llegan a tomar consistencia leñosa que anclan a la planta firmemente. Posee hojas pecioladas, anchas, de formas ovales, elípticas, alternadas y abundantes de color verde brillante o purpuras cuyo tamaño disminuye de la base al ápice, presentando tamaños variables de 6.5 a 15 cm (Wrigley y col, 2016). Su inflorescencia corresponde a panojas amarantiformes o glomeruladas muy vistosas, terminales o axilares, que pueden variar de erectos hasta decumbentes, con colores desde amarillo, anaranjado, café, rojo, rosado, hasta el púrpura; el tamaño varía de 0.5-0.9 m pudiendo presentar diversas formas incluso figuras caprichosas y muy elegante (Iturbe y Gispert, 1994; Repo-Carrazco y col, 2003). El fruto es una capsula pequeña que corresponde a un pixidio unilocular, que al madurar se abre transversalmente, dejando caer la parte superior llamada opérculo, para poner al descubierto la parte inferior llamada urna, donde se encuentra la semilla o grano (Brenner, 1991).

4 Estructura del grano

Los granos son pequeños, lenticulares o globosos, lisos, brillantes de 1-1.5 mm de diámetro y pesan alrededor de 0.6 a 3 mg/grano, son de colores blancos, amarillentos, dorados, rojos, rosados, púrpuras y negros; el número de semillas puede variar de 1,000 a 3,000 por gramo (Nieto, 1990; Berghofer y Scoenlecher, 2002; Wrigley y col, 2016). Entre las características externas más evidentes del grano, aparte del color, sobresale el tamaño, el grano de amaranto se encuentra entre los granos comestibles más pequeños, razón por la cual es probable que su producción como grano sea limitada a pesar de las importantes características agronómicas y nutrimentales que posee (Bresanni, 1995). Un aspecto de mucho interés por su relación con la composición química, nutrimental y procesamiento del grano, es su estructura física. En el grano se distinguen cuatro partes importantes: el epispermo que es la cubierta seminal, constituida por una capa de células muy finas; el endospermo es la

segunda capa; el embrión formado por los cotiledones que es la parte más rica en proteínas; y el perispermo rico en almidones (Irving y col, 1981) (**Fig. 2**).

a Epispermo

Esta es una capa o cubierta compuesta de células muy finas. La cubierta seminal o epispermo se forma a partir de los tegumentos del óvulo. En el epispermo se observan comúnmente dos capas, la externa o testa, derivada del tegumento externo y la interna o tegmen, derivada del tegumento interno del óvulo y/o de la nucela (Perales-Sánchez y col, 2016).

b Endospermo

Puede estar constituido por un tejido vacuolado y de membranas delgadas sin sustancias de reserva. En este caso el endospermo es utilizado parcial o completamente para desarrollo del embrión. En muchas plantas, el endospermo se diferencia como tejido de reserva para ser consumido durante la germinación. El material comúnmente almacenado es el almidón, pero pueden almacenarse otros carbohidratos como polisacáridos y hemicelulosa, o como aceites y proteína (Arellano y col, 2007).

c Embrión

Se localiza en el centro o núcleo de la semilla, a partir del cual se puede desarrollar una nueva planta. En el amaranto, el embrión está formado por los cotiledones y es la parte más rica en proteínas (Irving y col, 1981).

1) Cotiledones

Los cotiledones pueden almacenar reservas alimenticias y/o utilizarlas. Como parte del embrión, el cotiledón es un tejido vivo ya que dispone de todo el aparato enzimático necesario para promover la degradación y el transporte de sus propias sustancias de reserva, pasando a nutrir el crecimiento del eje embrionario en el proceso de germinación (Arellano y col, 2007).

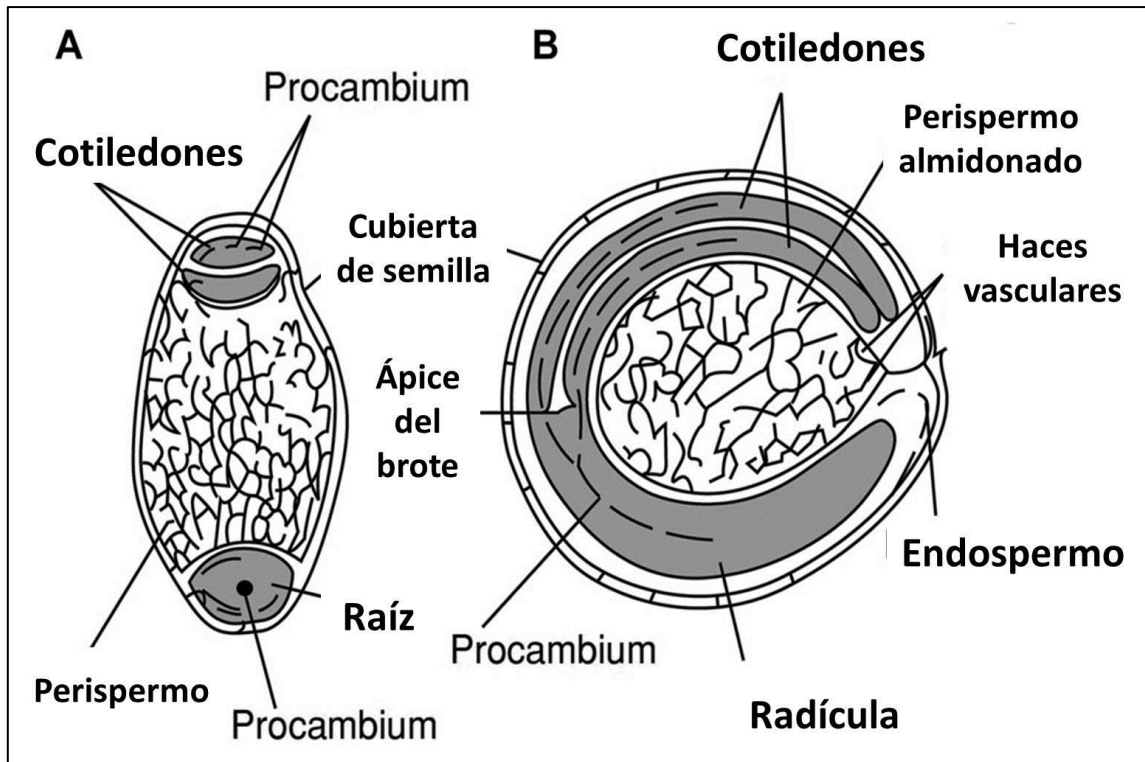


Fig. 2. Estructura del grano de amaranto. **A:** sección transversal; **B:** sección longitudinal

Irving y col (1981)

d Perispermo

Es la capa más interna, esta parte se caracteriza por a su alto contenido de almidón (Nieto, 1990; Arellano y col, 2007). Este es un tejido nucelar que se presenta en semillas de Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Polygonaceae. También se define al perispermo como tejido de reserva en las semillas dicotiledóneas procedente de la nucela y que puede ser el único tejido nutricio de éstas (Perales-Sánchez y col, 2016).

El amaranto, al igual que los cereales, contiene cantidades importantes de almidón, con la diferencia de que en los pseudocereales se encuentra almacenado en la perispermo en lugar del endospermo. Además, en los cereales el embrión se localiza dentro del endospermo, mientras que en los pseudocereales el embrión rodea al perispermo (Becerra, 2000; Perales-Sánchez y col, 2016).

5 Usos y consumo del amaranto

Desde tiempos pasados se le ha dado a la planta de amaranto diferentes usos y aprovechamientos, ya que este puede ser utilizado tanto en la alimentación humana como animal (Lino-Pérez y col, 2007; Wrigley y col, 2016). Para la alimentación humana se puede consumir como grano entero, reventado, tostado y de otras muchas formas más (Monteros y col, 1994). En la **Fig. 3** se muestra un diagrama con los principales usos que se le da a la planta de amaranto. Además, el amaranto tiene una serie de aplicaciones que va desde dulces artesanales, granola, harinas integrales, alimentos extrudidos (frituras), panificados, pastas; hasta productos sofisticados como: aceites comestibles, papillas para bebés, concentrados proteínicos, barras energéticas y alimentos nutracéuticos especiales para enfermos que padecen diabetes o cáncer (Lino-Pérez, 2007). En México son muy comunes los dulces a manera de turrónes que no son otra cosa que amaranto reventado mezclado con miel y solidificado en moldes (Monteros y col, 1994; Montoya-Rodríguez y col, 2015; Wrigley y col, 2016). Existe un potencial continuo para el desarrollo de nuevos productos

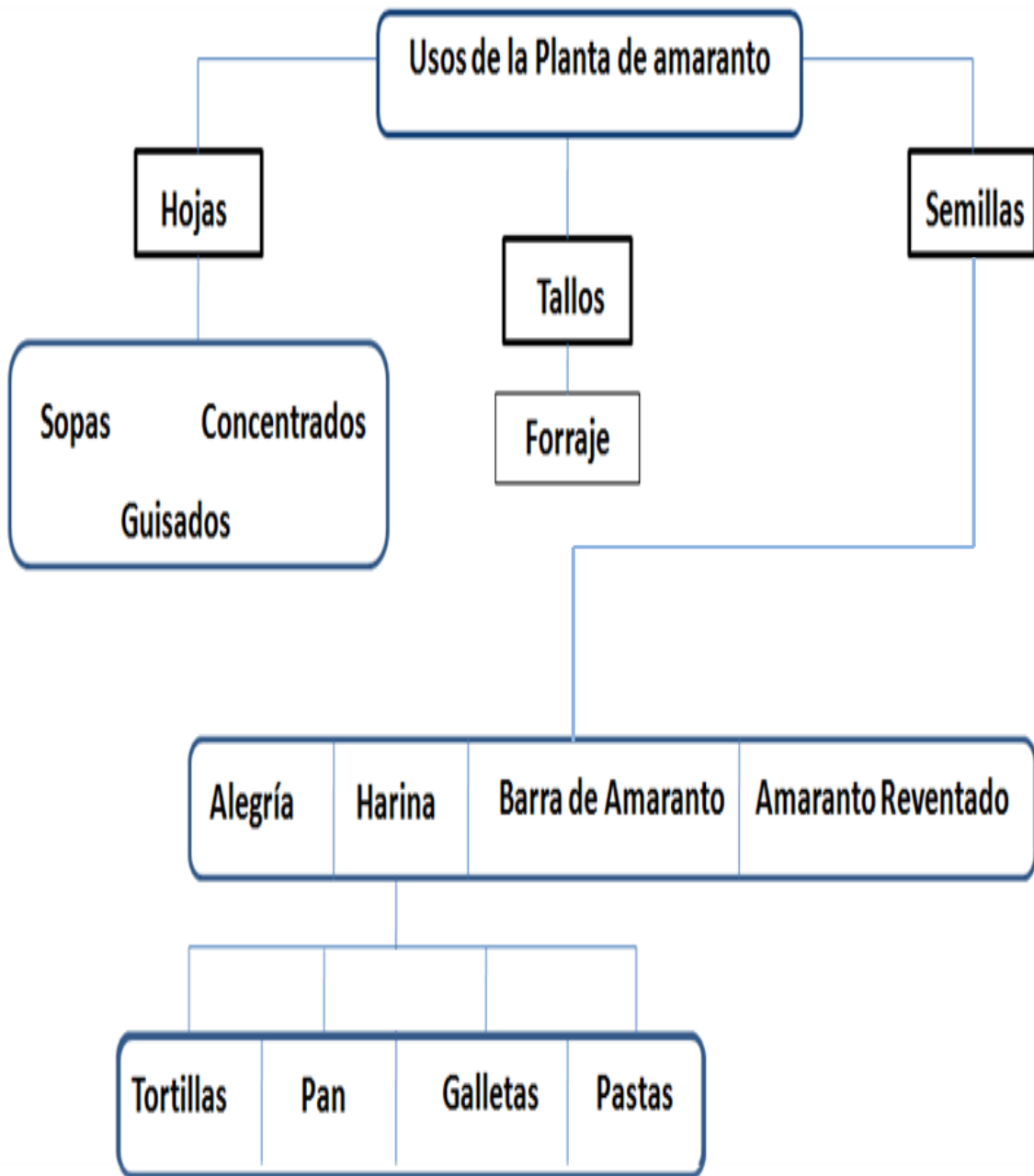


Fig. 3. Usos de la planta de amaranto
Lino-Pérez (2007)

hechos de amaranto, en base a las propiedades de las diversas fracciones del grano de amaranto y dependiendo de los requerimientos físicos, nutricionales y sensoriales de productos específicos (Wrigley y col, 2016).

6 Estadísticas de producción

En las últimas décadas el cultivo del amaranto se ha difundido de manera exponencial en varios países del mundo, actualmente, el amaranto se cultiva en muchos países de América, Asia y África (Czaplicki y col, 2012). Algunos autores (Servín-Hernández y col, 2009; Santiago y col, 2014; Wrigley y col, 2016), reportan que los principales países productores de grano de amaranto son China, India, Kenya, México, Nepal, Perú, Estados Unidos y Rusia. Sin embargo, la FAO no presenta datos de la producción de este grano en sus registros, por lo que es incierto el conocimiento de los principales países productores de este grano en el mundo.

El grano de amaranto es poco sembrado en el estado de Sinaloa, solo hay reportes de siembra traspatio y en algunas zonas serranas. Sin embargo, los principales productores nacionales se encuentran en el centro del país, siendo el estado de Puebla el principal productor a nivel nacional aportando el 45.8 % de la producción de amaranto. En el **Cuadro 1** se muestra la producción de amaranto en México en el año 2018 (SAGARPA-SIAP, 2020).

7 Composición química

El **Cuadro 2** muestra la composición química del grano de amaranto de acuerdo a lo reportado por la FAO en el 2020, haciendo una referencia a Nieto (1990).

En la actualidad, los niveles de nutrición de la gran mayoría de la población a nivel mundial son de insuficiencia y no cubren los mínimos requerimientos nutricionales. El amaranto fue uno de los pilares en la nutrición de las culturas prehispánicas y actualmente se conserva la tradición de producción y consumo en algunas regiones del país (Hernández y Herrerías, 1998; Sánchez-Olarte y

Cuadro 1. Producción nacional de amaranto en México en el año 2018

Estado	Producción (toneladas)
Puebla	5, 125
Tlaxcala	999
México	707
Cd. De México	152
Oaxaca	125
Morelos	8
NACIONAL	7, 115

SAGARPA-SIAP (2020)

Cuadro 2. Composición química (% bs) del grano de amaranto

Característica	Contenido¹	Promedio²
Proteína	12 - 19	16.53
Carbohidratos	71.8	65.98
Lípidos	6.1 – 8.1	4.52
Fibra	3.5 – 5.0	10.38
Cenizas	3.0 – 3.3	2.59

¹Nieto (1990) y FAO (2020)

²Mendonca (2005)

col, 2015). Además, ese mismo Cuadro presenta la composición química del amaranto de acuerdo a lo reportado por Mendonca y col. (2005). En el estudio que ellos hicieron evaluaron las características químicas de harinas instantáneas de amaranto usadas en nuevos productos extrudidos. Cabe señalar que las diferencias presentes en los datos para la misma característica se pueden deber principalmente a que en el trabajo de Mendonca y col. (2005) aplicaron el proceso de extrusión y sus resultados son en harina de amaranto extrudido, mientras que los de Nieto (1990) son en amaranto crudo. La composición química del grano de amaranto es superior a la de todos los cereales tanto en proteína como en grasas, cenizas y minerales (Ellis y col, 1989). Existe una variación en la composición química del grano de amaranto dependiendo de la especie de amaranto y de las condiciones de cultivo, así como el área geográfica (Bressani, 1989).

En el **Cuadro 3**, se muestra la composición química del amaranto y de algunos cereales importantes en nutrición humana.

a Proteína

Los granos de amaranto contienen una alta calidad de proteína (12-19% bs) con un excelente balance de aminoácidos esenciales (Tironi y Añón, 2010; Orsini-Delgado y col, 2011; Caselato-Souza y Amaya-Farfán, 2012; Rastogi y Shukla, 2013; Montoya-Rodríguez y col, 2015; Mota y col, 2016). Las proteínas del grano de amaranto tienen alta digestibilidad (90%), son ricas en lisina (4.9-6.1 g Lisina/100g de proteína) un aminoácido limitante en cereales; también son una buena fuente de triptófano y aminoácidos que contienen azufre (limitados en otros granos) (Tandang-Silva y col, 2012; Montoya-Rodríguez y col, 2015). Las proteínas del amaranto se encuentran en el embrión (65%) y solo el 35% en el perispermo, mientras que en otros granos son encontradas en el endospermo y son pobres en aminoácidos esenciales (Gobelnik-Mlakar y col, 2010). En amaranto también se encuentran concentraciones altas de histidina y arginina, los cuales son aminoácidos esenciales para niños.

Cuadro 3. Comparación entre la composición química del amaranto y algunos cereales

Composición^a	Amaranto	Maíz	Trigo	Arroz
Proteínas	12.5-19.0 ^b	8.9-12.9 ^d	9.1-14.0 ^c	7.5-8.7 ^d
Carbohidratos	58-70.0	67.7-80.2	76.1	71.2-75.4
Lípidos	5.4-9.0	3.9-5.7	1.8-3.4	1.9-2.1
Fibra	1.9-5.8	2.1-2.6	2.3-2.6	0.9-2.6
Cenizas	2.6-4.4	1.7	1.8	7.2

^a Porcentaje en base seca, ^b N x 5.85, ^c N x 5.7, ^d N x 6.25

Cai y col. (2004)

Estas características hacen al amaranto un alimento muy importante para la nutrición infantil (Grobelnik-Mlakar y col, 2010). Los aminoácidos limitantes en amaranto son leucina, isoleucina y valina, sin embargo, esto no es un problema serio, ya que estos están en exceso en la mayoría de granos (Grobelnik-Mlakar y col, 2009). Asimismo, este pseudocereal se considera libre de gluten, por lo que es recomendado como alternativa potencial para individuos con enfermedad celiaca (Repo-Carrasco y col, 2003; Wrigley y col, 2016). Existen varias formas para clasificar a las proteínas de la semilla de amaranto; según su morfología, función biológica, composición química y solubilidad; en base a esta última se han dividido en cuatro tipos: Albuminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en soluciones de hidróxido de sodio) (Segura-Nieto y col, 1994). Las principales proteínas de almacenamiento en amaranto se componen sobre todo de globulinas y albúminas y contienen muy pocas cantidades de glutelinas (Silva-Sánchez y col, 2008; Álvarez-Jubete y col, 2010a; Rastogi y Shukla, 2013). Es posible complementar la calidad nutricional de los cereales con amaranto, y así, la lisina excedente ayudará a asimilar elementos que por falta de lisina se hubieran desaprovechado, logrando una importante mejoría en la nutrición (Hernández y Herrerías, 1998; FAO, 2020). La composición de aminoácidos es una de las características que hacen a la semilla de amaranto un alimento superior al resto de los cereales.

b Grasas

El contenido de lípidos varía entre un 7 y un 8 % en base seca, siendo la mayoría lípidos insaturados, como el ácido linoleico (Álvarez-Jubete y col, 2010a). En las últimas décadas algunas fracciones lipídicas han cobrado gran importancia por la actividad benéfica para el organismo (Czerwinski y col, 2004; Martirosyan y col, 2007). El contenido de lípidos de la mayoría de las especies cultivables de amaranto es aproximadamente de 5.4- 9 %, superior al contenido de los granos de los cereales e inferior al de la soya. La fracción lipídica del

grano de amaranto está compuesta por triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos, fosfolípidos, escualeno, fitoesteroles y tocoferoles (Czaplicki y col, 2012; Oгородowska y col, 2014). El contenido de lípidos se encuentra principalmente en el germen del grano de amaranto. El escualeno es un precursor biosintético para los esteroides, un excelente ingrediente en cosméticos, aceite para la piel, y lubricante que se obtiene comúnmente de animales como la ballena y el tiburón. Se ha reportado que el consumo de escualeno está relacionado con la reducción de incidencia de cáncer (Wrigley y col, 2016).

c Fibras

La fibra dietaria, soluble o insoluble, se caracteriza por tener efectos benéficos en la salud humana. El contenido de fibra del amaranto se encuentra dentro del rango de los cereales y muestra una gran variación entre las diferentes especies (Bressani y col, 1990). El contenido de fibra al igual que la composición química, en general depende de la variedad de amaranto. Para *Amaranthus hypochondriacus*, Iturbide y Gispert (1994) reportaron un valor de fibra cruda de 4.94 %. Becker y col. (1981) reportaron un valor similar para *Amaranthus hypochondriacus*; ellos reportaron un rango de 3.2 a 5.8 % de fibra cruda. Milán-Carrillo y col. (2012a) reportaron porcentajes de fibra dietaria total de 13.91 % y 14.62 % para harina de amaranto no procesada y harina de amaranto extrudida, respectivamente, con buenos niveles de ambas fracciones de fibra: soluble e insoluble. La fibra es un componente nutricional indispensable para el metabolismo y la digestión regular sana, y como protección contra muchas enfermedades. Estos valores están dentro del rango de valores (3.5-5.0 %) reportados por la FAO (2020).

d Carbohidratos

El almidón es el carbohidrato más abundante en la semilla de amaranto y corresponde aproximadamente al 69% de su peso total en seco (Wrigley y col,

2016). El contenido de amilosa en el almidón de amaranto es considerablemente menos que en el del trigo lo cual trae como consecuencia diferencias marcadas en cuanto a su propiedades fisicoquímicas. Okuno y Sakagauchi (1981) reportaron que los gránulos de almidón en *Amaranthus hypochondriacus* están constituidos casi al 100 % por amilopectina. Comparado con el almidón de trigo, el almidón de *Amaranthus hypochondriacus* presenta un bajo poder de hinchamiento, una gran solubilidad, viscosidad amilográfica alta y una temperatura de gelatinización alta (Wrigley y col, 2016).

8 Compuestos fenólicos en el grano de amaranto

Diferentes estudios han evidenciado el potencial de los compuestos fenólicos como agentes contra las enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo mediante una serie de acciones que incluyen actividades antioxidante, anti-inflamatoria, anti-hipertensiva y anti-esclerótica (Paucar-Menancho y col, 2017). Varios estudios han identificado la presencia de polifenoles en especies de *Amaranthus* (**Cuadro 4**), encontrándose taninos, antocianinas, ácidos fenólicos (ácido protocatecuico, vanílico, 4-hydroxibenzóico, siríngico, p-cumárico, caféico y ferúlico) y flavonoides (rutina, isoquercetina y nicotiflorina) (Czerwinski y col, 2004; Gorinstein y col, 2008; De la Rosa y col, 2009; Steffensen y col, 2011; Venskutonis y Kraujalis, 2013). Los ácidos fenólicos son los compuestos más abundantes encontrados en el grano de amaranto y se encuentran en forma libre y ligada. Las formas libres de los fenólicos ácidos representan del 7 % a 61 % de la cantidad total de los compuestos fenólicos del grano (Paucar-Menancho y col, 2017).

9 Procesamiento del grano de amaranto

A lo largo de la historia del hombre se han desarrollado diferentes tecnologías para el procesamiento de cereales, pseudocereales y leguminosas, para su consumo como alimento, que van desde las más sencillas y antiguas

Cuadro 4. Principales compuestos fenólicos reportados en granos de *Amaranthus* ssp. sin procesar

Compuesto	Cantidad	Referencia
Ácidos fenólicos		
Ácido galístico	5.26 mg/100 g bs	Li y col 2015
Ácido 2-4 dihidrobenzóico	4.68 mg/100 g bs	Li y col 2015
Ácido ferúlico	0.39 mg/100 g bs	Li y col 2015
Ácido elágico	28.85 mg/100 g bs	Gorinstein y col 2008
Ácido siríngico	3.12 mg/100 g bs	Li y col 2015
	0.08 mg/100 g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
		Paucar-Menacho y col 2017
Ácido vanílico	0.379 mg/100 g bs	
	0.15-0.18 mg/100 g bs	Barba de la Rosa y col 2009
Ácido p-hidrobenzóico	0.17-0.22 mg/100g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
		Paucar-Menacho y col 2017
Ácido p-cumárico	0.032 mg/100 g bs	
	0.12 mg/100 g bs	Gorinstein y col 2008
		Gorinstein y col 2008
Ácido caféico	0.65 mg/100 g bs	Paucar-Menacho y col 2017
	0.73 µg /g bs	
Ácido protocatecuico hexosido	0.056 mg/100 g bs	Paucar-Menacho y col 2017
Flavonoides		
Nicotiflorina	0.48-0.72 mg /100 g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
Isoquercetina	0.03-0.05 mg /100 g bs	Venskutonis y Kraujalis 2013
Kaempferol 3 rutinosido	6.94 mg/100 g bs	Li y col 2015
		Li y col 2015
	7.49 mg/100 g bs	
Rutina	0.4-1.02 mg/100 g bs	Barba de la Rosa y col 2009
	7.0 mg/100 g bs	Kalinova y Dadakova 2009
Quercetin-3-Rutinosido	0.215 mg/100 g bs	Paucar-Menacho y col 2017
Antocianinas		
	91 mg/ 100 g bs	Gorinstein y col 2007
	35.33 mg/ 100 g bs	López y col 2011
Taninos		
	0.60% peso seco	Gorinstein y col 2008

(cocción simple, tostado) hasta las más recientes y novedosas (extrusión, microondas, impulsos electromagnéticos, entre otras). A partir del redescubrimiento de la semilla de amaranto, ocurrido a mediados del siglo XX, se ha iniciado una intensa búsqueda de alternativas adecuadas para desarrollar alimentos elaborados a partir de este pseudocereal, que posean las mejores características nutricionales, nutracéuticas y de aceptabilidad (Perales-Sánchez y col, 2016). Existen diversas tecnologías para el procesamiento del grano de amaranto entre las que se incluyen cocción húmeda, tostado, reventado, micronización, nixtamalización, extrusión y germinación (Pasko y col, 2009; Milán-Carrillo y col, 2012a; Montoya-Rodríguez, 2015; Perales-Sánchez y col, 2016).

a Cocción

Uno de los primeros y más antiguos procesos para el consumo de las semillas de amaranto como alimento fue la cocción en agua; ya sea en su modalidad presurizada o a presión atmosférica, el cual continua siendo importante hoy en día, ya que es el proceso utilizado comúnmente para la preparación casera del atole de amaranto. El conocimiento de los cambios en las propiedades fisicoquímicas del amaranto, inducidos durante la cocción en agua, es de suma importancia para la producción de alimentos y desarrollo de procesos (Perales-Sánchez y col, 2016).

b Tostado

El proceso de tostado consiste en colocar un alimento al fuego para que este tome color, es decir, se expone el alimento al calor para que lentamente se caliente por dentro y que su exterior se dore pero sin quemarse. El proceso de tostado, algunas veces referido como secado, algún tipo de alimento ya sea de leguminosa o de otro grano, en el cual todas las semillas son expuestas a un calor seco (Coskuner y Karababa, 2004). En ocasiones el grano de amaranto crudo es procesado mediante el tostado, esto es exponiendo el grano a

temperaturas altas previo a molerlo para convertirlo en harina. Este proceso produce un incremento en la calidad de la proteína así como en la digestibilidad de la misma en comparación con el grano crudo. Sin embargo, este incremento es menor al que presenta el amaranto reventado (Bressani y col, 1992).

c Reventado

Es el método de procesamiento más común de transformación de amaranto para el consumo humano. En México, el dulce tradicional llamado “*Alegría*” se elabora mediante este método (Bressani y col, 1992). El reventado no solo le da estructura al amaranto sino también le confiere sabor único y especial, además de que incrementa su volumen en un 150%. Con estas características que le confiere el proceso de reventado al grano de amaranto, lo hace más atractivo y funcional. Algunos investigadores (Pant, 1985; Tovar y col, 1989; Bressani, 1989; Bressani y col, 1992) han reportado que el proceso de reventado disminuye la calidad de la proteína debido a la reducción de algunos aminoácidos esenciales como la lisina. Gamel y col. (2005) evaluaron el efecto de diversos tratamientos (entre ellos reventado) en la composición química de semillas de dos especies de amaranto: almidón y proteínas. El proceso de reventado que utilizaron consistió en calentar el amaranto en un plato a una temperatura de 180°C por 10 segundos hasta que el amaranto reventó. Ellos reportaron que el proceso de reventado fue el que afectó mayormente las propiedades físicas y químicas tanto de las proteínas como del almidón, reduciendo así la calidad nutricional de la proteína del grano de amaranto (Bressani y col, 1992). Diversos estudios se han enfocado en reducir la pérdida de calidad de la proteína por este método, sin embargo es necesario optimizar la temperatura de reventado del grano, así como el tiempo de exposición del grano a dicha temperatura.

d Micronización

Para el proceso de cocción por microondas primeramente se coloca el grano en remojo y luego se somete a cocción por microondas durante 10 minutos. Los granos cocidos se deshidratan (Mores y col, 1992).

Bressani y Rodas-Mendoza (2006), reportaron que el proceso de cocción por microondas en grano de amaranto incrementó la calidad nutritiva del grano con respecto al grano crudo (en un 12%).

e Nixtamalización

Este proceso, conocido como tratamiento térmico alcalino, se utiliza en la elaboración de muchos productos a base de maíz como tortillas, chips, y totopos (Milán-Carrillo y col, 2004). El grano de amaranto procesado por nixtamalización permite su uso como suplemento al maíz nixtamalizado para producir tortillas y otros productos (Bressani y Rodas-Mendoza, 2006).

Bressani y Rodas-Mendoza (2006), no observaron cambios significativos en la composición química del grano de amaranto, solo se atribuyó los pequeños cambios, en cuanto a variaciones mínimas de gramos, a la diferencia en el contenido de humedad. En este mismo estudio se reportó que el proceso de nixtamalización no afecta la calidad de la proteína. Con esta información se puede tomar en cuenta este proceso para ser utilizado en la elaboración de productos a partir de amaranto.

f Extrusión

La tecnología de extrusión es un proceso continuo que combina corte mecánico y calor para obtener productos plastificados y reestructurados con nuevas formas y texturas. El fundamento del proceso es combinar las operaciones de transferencia de calor, amasado y presión en una sola, lo que produce cambios significativos en la textura de cereales y leguminosas. Los materiales sometidos a este proceso, en general, sufren transformaciones químicas, estructurales y nutricionales como desnaturalización parcial de

proteínas, oxidación de lípidos, degradación de vitaminas y fitoquímicos, aumento en la biodisponibilidad de minerales, incremento en fibra dietaria soluble y gelatinización parcial del almidón. La calidad de los productos obtenidos depende del tipo de extrusor y de las condiciones de su operación así como de las características de materia prima (Milán-Carrillo y col, 2002; Camire, 2003; Zhao y col, 2011; Aguayo-Rojas y col, 2012; Montoya-Rodríguez, 2015).

g Germinación

La germinación es uno de los procesos más antiguos para la obtención de alimentos. El proceso de germinación consiste en la reanudación de la actividad metabólica de la semilla y el crecimiento activo de los tejidos del embrión, lo que resulta en la ruptura de la cubierta seminal y la emergencia de una plántula. En orden secuencial, la germinación involucra rehidratación, utilización de las sustancias de reservas (proteínas, carbohidratos y lípidos) y formación de estructuras (membranas, paredes celulares), además de la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, ácidos orgánicos y azúcares, para generar nuevas células y tejidos durante el crecimiento que permitirán a la plántula asumir un modo autótrofo de existencia. La germinación ofrece numerosas ventajas, requiere inversión económica baja, tiene rendimientos altos, se obtienen productos de valor biológico y digestibilidad proteínica altos (Colmenares y Bressani, 1990; Murphy y Thompson, 1988; Kermode, 1990; King, 1991; Legaria-Solano y col, 2000; Barrón-Yáñez y col, 2009).

Los cambios en nutrimentos, valor nutricional, niveles y perfiles de fitoquímicos y propiedades nutracéuticas que ocurren durante la germinación dependen del tipo de grano y de las condiciones de germinación empleadas (Barrón-Yáñez y col, 2009; Paucar-Menacho y col, 2010; Botero-Omary y col, 2012). Entre las variables que tienen un mayor efecto sobre el proceso de germinación se incluyen tiempo de remojo, temperatura y tiempo de germinación, tipo y proporción de agentes desinfectantes, así como también el

tiempo de cosecha del grano (Mora-Escobedo y col, 1991; Alvarez-Jubete y col, 2010a; Paucar-Menacho y col, 2010).

B GERMINACIÓN

La formación de una semilla y su germinación constituyen fenómenos adaptativos únicos en el ciclo de vida de las plantas superiores. Involucran el desarrollo del embrión y median varios procesos fisiológicos para asegurar la supervivencia de la planta en la próxima generación. Durante la formación de la semilla se acumulan las sustancias de reserva (proteínas, carbohidratos y lípidos), aunado a un incremento en los niveles de ácido abscísico durante la embriogénesis intermedia y la pérdida del contenido de agua durante la embriogénesis tardía. Una vez formada, en la gran mayoría de las especies, la semilla pasa a un estado de desecación y posteriormente de latencia hasta el momento de la germinación (Legaria-Solano y col, 2000).

La germinación consiste en la reanudación de la actividad metabólica y el crecimiento activo de los tejidos del embrión, lo que resulta en la ruptura de la cubierta de la semilla y la emergencia de una plántula. En orden secuencial, la germinación involucra la rehidratación, la utilización de las reservas y la formación de las estructuras de síntesis que permitirán a la plántula asumir un modo autótrofo de existencia (Kermode, 1990; King, 1991). En términos bioquímicos la germinación es el resultado de procesos catabólicos y anabólicos contrastantes. Los primeros ocurren en los órganos de almacenamiento (endospermo en plantas monocotiledóneas y cotiledones en dicotiledóneas) y consisten en la degradación y movilización de las macromoléculas de reserva. Los segundos se efectúan en los ejes embrionarios e incluyen la síntesis de macromoléculas, componentes estructurales como membranas y paredes celulares, para generar nuevas células y tejidos durante el crecimiento (Kermode, 1990). Las semillas son el resultado de la reproducción sexual de las especies vegetales, contienen un embrión capaz de desarrollarse en una planta semejante a la que les dio origen, por lo que poseen

toda la infraestructura que permite este desarrollo, así como sustancias de reserva que garanticen el aporte inicial de los nutrimentos requeridos por dicho embrión en el inicio del crecimiento (Legaria-Solano y col, 2000).

1 Descripción del bioproceso

a Imbibición

Son varios los eventos que ocurren durante este bioproceso, el inicio se da con la captación de agua por la semilla (imbibición) (Robbins y col, 1974; Bradford, 1990). La rehidratación de la semilla es una de las fases bioquímicamente cruciales durante el proceso de germinación. La captación de agua generalmente es un proceso trifásico que se caracteriza por un periodo inicial de ganancia en peso, seguido de una fase estacionaria con un subsecuente incremento que coincide con el crecimiento de la radícula. Este proceso se puede llevar a cabo en algunas horas hasta varios días (Meredith y Pomeranz, 1985; Fincher, 1989).

La cantidad de agua absorbida por la semilla está en función directa de su tamaño, de la permeabilidad de la cubierta, cantidad y disponibilidad de agua y composición química. El agua se absorbe a través de los orificios naturales en la cubierta, difundándose a lo largo de los tejidos; esto ocasiona un incremento en el volumen de las células y de la semilla. Los cuerpos proteínicos del endospermo sufren alargamiento e hinchamiento. De los componentes del endospermo las proteínas son las que absorben agua en mayor proporción (Chavan y Kadam, 1989).

Es evidente que una máxima absorción de agua es deseable, sin embargo; una absorción excesiva puede romper la cubierta de la semilla y afectar la germinación puesto que las sustancias celulares van hacia el exterior ocasionando: 1) pérdidas de reservas, 2) pérdida de la compartimentalización con mezclas indeseables de sustancias (por ejemplo, energía celular en forma

de ATP que puede ser degradado por ATPasa) y 3) estímulo a la actividad de patógenos del ambiente (Chavan y Kadam, 1989).

b Iniciación del metabolismo activo del embrión

Después de que la semilla ha captado el agua suficiente, el embrión se transforma y la plúmula y radícula empiezan a emerger; en esta etapa probablemente hay síntesis y activación enzimática, degradación de inhibidores y cambios profundos en la estructura de la semilla, así como su composición. Existe un incremento en los niveles de metabolitos intermediarios y enzimas, asociados con la producción de energía, particularmente el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Esto se ve reflejado por el aumento en la velocidad de intercambio gaseoso (Duffus y Slaughter, 1980; Chavan y Kadam, 1989).

2 Factores que influyen sobre la germinación

La mayoría de las semillas que el hombre utiliza para su alimentación se han germinado. Existen variaciones en los métodos, condiciones empleadas y porcentajes de germinación obtenidos durante este tratamiento. Para obtener máximos beneficios nutricionales, se debe tener en cuenta el tiempo de remojo, el tipo y proporción de agentes desinfectantes, la temperatura y el tiempo de germinación, así como también el tiempo de cosecha del grano a utilizar y la presencia de estrés osmótico en la semilla. El material a germinar se limpia, se escoge y se eliminan granos rotos e infestados. Solo se someten a germinación granos sanos.

a Tiempo de cosecha

González-Castañeda y col (2005) estudiaron el efecto del tiempo de cosecha sobre la capacidad germinativa del grano de amaranto (*A. hypochondriacus*). Como condiciones de germinación aplicaron temperatura y tiempo de 35°C y 30, 60 y 90 días, respectivamente. Observaron que el porcentaje de germinación de las semillas disminuía significativamente conforme aumentaba el tiempo de cosecha. Ellos obtuvieron porcentajes de

germinación de 71.2 %, 65.5 % y 60.1% para 30, 60 y 90 días de tiempo de cosecha, respectivamente.

b Remojo

Se han sugerido diferentes métodos para estudiar los cambios durante la germinación. Estos métodos recomiendan un remojo antes del tratamiento, en una relación aproximada de 1:3 (semilla/agua p/v), hasta que la semilla no absorba más agua. El tiempo de remojo depende del peso de la semilla y en menor grado del tamaño de la misma, así como de la permeabilidad de la capa externa y de la temperatura de remojo (Mora-Escobedo y col, 1991).

c Temperatura / tiempo de germinación

La temperatura a la cual se germina es otro parámetro importante, se considera una temperatura adecuada aquella que da mejores rendimientos en corto tiempo, siendo ésta dependiente del tipo de semilla. Se reportan temperaturas que van desde 21°C hasta 33°C (Paredes-López y Mora-Escobedo; 1989; Mora-Escobedo y col, 1991).

Paucar-Menacho y col. (2010) estudiaron el efecto del tiempo y la temperatura de germinación sobre la concentración de proteína soluble, Lunasina, Bowman-Birk inhibitor (BBI), lectinas, saponinas e isoflavonas en semillas de soya cultivar BRS133. Las semillas se limpiaron con hipoclorito de sodio (100 mg / kg) por diez min, se enjuagaron tres veces con agua destilada y se mantuvieron a temperatura del cuarto por ocho horas. La germinación se llevó a cabo en cámaras de germinación utilizando lotes de 500 g de semillas. Los efectos de las variaciones en tiempo y temperatura de germinación sobre compuestos bioactivos se evaluaron utilizando, como herramienta de optimización, la metodología de superficie de respuesta; utilizaron un diseño compuesto central rotatable que generó 22 tratamientos (tiempo=12-72 h; temperatura=18-32 °C). Las semillas germinadas se congelaron a -30 °C durante 4 h, se liofilizaron y, finalmente, se molturaron para producir harinas de

soya germinada. La germinación de semillas de soya a 25 °C causó un incremento de 62% en la concentración de Lunasina y decrementos de 59 % y 70 % en contenido de lectinas y actividad de lipoxigenasa, respectivamente. Un incremento óptimo en la concentración de 69 isoflavonas agliconas se observó a temperatura y tiempo de germinación de 30 °C y 63 h, respectivamente. Además, se observó un incremento significativo (+32 %) en la concentración de saponinas cuando se utilizaron temperaturas y tiempos de germinación de 25°C y 42 h, respectivamente. Bains y col (2014) optimizaron el tiempo de germinación y los tratamientos térmicos posteriores con el propósito de incrementar la disponibilidad de hierro proveniente de germinados de leguminosas (frijol mungo, garbanzo y frijol caupí).

Los granos se germinaron por tres periodos de tiempo seguidos por cocción de los germinados mediante dos métodos de cocción (cocción a presión, microondas). 100 gramos de semillas crudas de frijol mungo, garbanzo y frijol caupí se remojaron por 10, 12 y 8 h antes de ser sometidos a germinación (25 °C/HR=70 %) por tres periodos de tiempo: frijol mungo: 12, 16 y 20 h, garbanzo: 36, 48 y 60 h, frijol caupí: 16, 20 y 24 h. Lotes de 250 g de germinados de cada leguminosa se sujetaron a dos tratamientos hidrotérmicos: cocción a presión (15 lb) y cocción en microondas (800 W). Los tiempos de cocción para frijol mungo y frijol caupí fueron de 1 y 7 min para cocción a presión y cocción en microondas, respectivamente, mientras que para garbanzo los tiempos fueron de 5 y 15 min para los dos tratamientos mencionados. Las muestras procesadas (germinadas + cocción) se secaron en estufa con aire caliente a 60°C y posteriormente se molturaron para obtener harinas finas (pasaron a través de malla de 5 mm); se guardaron en bolsas de polietileno y se almacenaron (20°C / HR=60°C) para su análisis. El estudio concluyó que los periodos de germinación más largos (frijol mungo 20 h, garbanzo 60 h, frijol caupí 24 h) seguido por cocción a presión por tiempo optimizado (frijol mungo 1

min; garbanzo 5 min, frijol caupí 1 min) fueron apropiados para obtener la mayor biodisponibilidad de hierro.

d Inhibidores microbianos

Para inhibir el crecimiento microbiano durante la germinación se han utilizado diferentes agentes desinfectantes: Hipoclorito de sodio (Mora-Escobedo y col, 1991; Dueñas y col, 2009; Paucar-Menacho y col, 2010; Benítez y col, 2013), formaldehído (Elmalik y col, 1986), mezcla de formaldehído-metanol (Gómez-Ortiz, 1982), alcohol etílico al 70% y CaCl_2 al 3% (Colmenares y Bressani, 1990; Gamel y col, 2006a,b, 2007).

e Estrés osmótico

La exposición de las semillas a concentraciones altas de cloruro de sodio (NaCl) u otros agentes osmóticos puede bloquear su habilidad germinativa al inducir cambios en actividades metabólicas asociadas a diferentes fases del proceso de germinación (Bewley, 1997; Garcíarrubio y col, 1997).

La respuesta de la germinación de semillas de amaranto y crecimiento de plántulas a estrés de salinidad es dependiente del genotipo, tipo y concentración de sal y el parámetro medido. Se ha evidenciado la presencia de diferencias genotípicas en la tolerancia a la salinidad durante la germinación; se ha observado la estimulación de la germinación a 25 mM de NaCl fue observado en *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, mientras 25 mM de Na_2SO_4 estimularon la germinación en *A. hybridus* y *A. dubius*. El incremento de las concentraciones de sal retrasaron y disminuyeron la germinación (Omami, 2005).

3 Cambios en composición nutricional y nutracéutica durante la germinación

La germinación de pseudocereales como el amaranto, produce cambios en el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, polifenoles, antinutrientes y actividad antioxidante. En diversos estudios se han

reportado resultados contrastantes, estas diferencias son atribuidas principalmente al tipo de grano, especie, variaciones en prácticas de remojo, tiempos y temperaturas de germinación y métodos de secado de los germinados (**Cuadro 5**) (Botero-Omary y col, 2012; Perales-Sánchez y col, 2016).

Además de cambios en la composición nutricional, nuestro grupo de trabajo evaluó el efecto de la optimización del proceso de germinación sobre el contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides, potencial actividad antioxidante, hipoglucémica y antihipertensiva del grano de amaranto, concluyendo que el proceso de germinación optimizado resultó ser una estrategia efectiva para incrementar el contenido de fenólicos totales, flavonoides, actividad antioxidante, hipoglucémica y antihipertensiva del grano de amaranto (Perales-Sánchez y col, 2014; Argüelles-López, 2020).

C HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS

La hidrólisis proteínica es un procesamiento que se ha aplicado a diversos alimentos; este consiste en la rotura del enlace peptídico y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos o biológicos. Los primeros incluyen la hidrólisis mediante el tratamiento con ácidos o bases. En la actualidad, se evita el uso de la hidrólisis química debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos, se forman D-aminoácidos y compuestos tóxicos como Lisinoalanina (Montoya-Rodríguez, 2015). Por otro lado, los métodos biológicos son aquellos que utilizan una proteasa para romper los enlaces peptídicos. Estos métodos se realizan en condiciones más suaves de pH y temperatura que van a reducir la formación de compuestos indeseables (Vioque y Millán, 2005). La propiedad fundamental de un hidrolizado, que va a determinar en gran medida las restantes características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la

Cuadro 5. Efecto de la germinación sobre el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos de granos de amaranto.

Material	Condiciones de germinación	Proteína	Lípidos	Carbohidratos
A. <i>hypochondriacus</i> (1)	Remojo: 25°C/10 min Germinación: 35°C / 24-72 h Secado: 45°C	Disminución de 6% a las 24h de germinación. A las 72 h de germinación incrementos en proteína cruda y verdadera de 41 y 22%, respectivamente, al comparar grano germinado con grano crudo.	Disminución	Incremento del 21 % en el contenido de fibra cruda.
A. <i>hypochondriacus</i> <i>A. cruentus</i> , <i>A. caudatus</i> (2)	Remojo: 25°C/5h Germinación: 35°C / 0, 24, 48, 72 h Secado:40°C/ 18 h			*Azúcares reductores totales incrementaron con tiempo de germinación,*Rafinosa y estaquirosa no se detectaron después de 48 y 24 h germinación, *No se observaron cambios en fibra cruda *Incremento almidón dañado 62-113%

<p><i>A. caudatus</i> <i>A. cruentus</i> (3)</p>	<p>Remojo: 25°C/ 5h Germinación: 32°C/48 h Secado:30,60 y 90°C</p>	<p>Disminución de 2 y 3% en proteína cruda y de 31 y 19% en proteína verdadera</p>	<p>La fracción lipídica disminuyó. El contenido de fosfolípidos aumentó. La cantidad de ácidos grasos (Palmítico, Oleico, Linoleico) y de escualeno no se vieron afectados por el proceso</p>	<p>A todas combinaciones Germinación/Temperatura de secado se observaron disminuciones en el contenido de almidón de ambas especies</p>
<p><i>A. hypochondriacus</i> (4)</p>	<p>Remojo: 25°C/6h Germinación: 30°C / 78 h Secado:50°C/ 8h</p>	<p>Incrementó 29.05 % la proteína cruda</p>	<p>Disminución del 30.2 %</p>	<p>Incremento del 123% en fibra dietaria total</p>

A. <i>hypochondriacus</i> (5)	Remojo: 25°C/6h Germinación: 30°C / 78 h Secado:50°C/ 8h	Incremento del 28.76% en proteína cruda	Disminución del 28.53%	Incrementó el contenido de fibra dietaria total y fibra dietaria insoluble en 65.34 y 208.52%, respectivamente. Disminuyó el contenido de fibra dietaria soluble en 24.3%
-------------------------------------	---	---	---------------------------	--

(1)Paredes-López y Mora Escobedo (1989), (2) Colmeranes y Bressani (1990), (3) Gamel y col. (2005) (2007), (4) Perales-Sanchez y col. (2014), (5) Argüelles-López (2020).

proteína original. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, es decir, concentración de sustrato, relación enzima/sustrato y tiempo de incubación y condiciones fisicoquímicas como son el pH y temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la actividad de la enzima, es decir su actividad específica y tipo de actividad (Adler-Nissen, 1979; Torruco-Uco y col, 2008).

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde un punto de vista funcional como nutricional, ya que determinan las propiedades físicas y organolépticas de muchos alimentos y constituyen un aporte nutricional importante, representando una fuente de energía, nitrógeno y aminoácidos esenciales (Vioque y Millán 2005). Los hidrolizados proteínicos buscan explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen animal y vegetal para ser usados como suplemento proteínico en la dieta y para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos (Udenigwe y Aluko, 2012; Vilcacundo y col, 2017). Estos se utilizan como parte de los suplementos alimenticios debido a su elevada solubilidad, permitiendo su utilización en alimentos líquidos. Los sectores de la población a los que van dirigidos estos alimentos son diversos, siendo utilizados principalmente por aquellos que necesitan un sobreaporte proteínico, por ejemplo para alimentación de personas de la tercera edad, alimentación enteral y parenteral y la nutrición deportiva, sobre todo en ejercicios de resistencia; otra aplicación importante de los hidrolizados proteínicos es la producción de hidrolizados hipoalergénicos (Vioque y Millán 2005).

1 Enzimas de la digestión gastrointestinal

El cuerpo humano produce diferentes enzimas gastrointestinales siendo las principales enzimas digestivas la pepsina, tripsina y quimiotripsina. La pepsina, así como la tripsina y quimiotripsina, es una de las principales enzimas degradadoras de proteínas (o enzimas proteolíticas) en el sistema digestivo. Durante el proceso de digestión, estas enzimas, las cuales son especializadas

en el rompimiento de los enlaces entre los tipos de aminoácidos, colaborando con la rotura de las proteínas en sus componentes (péptidos y aminoácidos libres) los cuales pueden ser inmediatamente absorbidos por la mucosa intestinal y pasados hacia el sistema circulatorio. La pepsina es una enzima gástrica que es más eficiente en el rompimiento de enlaces de péptidos hidrofóbicos, y preferentemente, aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, triptófano y tirosina (Fruton, 2002; Segura-Campos y col. 2010). La tripsina es producida en el páncreas en su forma inactiva, tripsinógeno. La tripsina rompe las cadenas de péptidos principalmente en el grupo carboxilo de los aminoácidos lisina y arginina, excepto cuando alguno de los dos es seguido por prolina (Rawlings y Barret, 1994). De igual forma, la quimiotripsina es también una enzima digestiva que se encuentra en el jugo pancreático, actuando en el duodeno donde lleva a cabo la proteólisis, rompiendo las proteínas y polipéptidos (Wilcox, 1970). Por otro lado, existen enzimas comerciales como la pancreatina (mezcla de enzimas proteasas, amilasas y lipasas) y la alcalasa. La alcalasa pertenece a las proteasas de grupo de serina que inicia el ataque nucleofílico en el enlace peptídico (amida) a través del residuo de serina en el sitio activo esta enzima puede ser obtenida de ciertos tipos de bacteria de suelo, por ejemplo, *Bacillus amyloliquefaciens*, el cual es producido en grandes cantidades (Ottesen y Svends, 1970).

Además de la generación de péptidos bioactivos a partir de la hidrólisis proteínica, se ha observado que la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* con pepsina y pancreatina genera la liberación de compuestos fenólicos que se encuentran unidos a macromoléculas tales como proteínas o carbohidratos (Mtolo y col, 2017; Sandoval-Sicairos y col, 2020). Por el contrario, los compuestos fenólicos pueden ser afectados negativamente debido a los cambios en el pH, sobre todo el alcalino, disminuyendo su detección al modificar su estructura o ser degradados (Sancho y col, 2015).

2 Procesamiento

La tecnología utilizada para liberar los péptidos bioactivos de los alimentos depende de muchos factores, incluyendo el método usado, los péptidos bioactivos de interés a ser liberados, y el potencial uso de los péptidos. Algunos métodos incluyen la hidrólisis química, el cual utiliza ácido para romper las proteínas de gran tamaño; la fermentación, la cual libera péptidos bioactivos después de la aplicación de cultivo de microorganismos en los productos alimenticios (Wang y De Mejía 2005; Montoya-Rodríguez y col, 2014a,b). Otra tecnología alternativa es la extrusión. Esta tecnología, es una tecnología de alta temperatura en tiempo corto, con una desnaturalización parcial de las proteínas; es usada para producir harinas pre-cocidas con alto valor nutricional (Milán-Carrillo y col. 2006). Montoya-Rodríguez y col. (2014a) reportaron que el proceso de extrusión provocó la hidrólisis de proteínas, dando como resultado, la presencia de aminoácidos libres y pequeños péptidos con actividad biológica. A pesar de que los mecanismos completos de absorción y la biodisponibilidad de péptidos específicos están aún bajo investigación, existe suficiente evidencia científica para concluir que los péptidos bioactivos de alimentos están biodisponibles y pueden ser absorbidos en el cuerpo (González de Mejía y col. 2012).

D PROPIEDADES NUTRACÉUTICAS DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL AMARANTO

El amaranto ha recibido mayor atención desde una perspectiva nutracéutica, debido al creciente conocimiento de sus propiedades que promueven la salud (Rastogi y Shukla, 2013). Los alimentos nutracéuticos son aquellos alimentos que al ser consumidos con regularidad ejercen un efecto específico en la salud más allá de sus beneficios nutricionales (Espín y col, 2007; Pasko y col, 2009). El consumo de granos integrales (cereales, leguminosas), se ha asociado con la reducción en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas (diabetes, cáncer, enfermedades

cardiovasculares, aterosclerosis y obesidad). Esto se atribuye a la presencia de fitoquímicos en este tipo de alimentos, tales como saponinas, fitoesteroles, antocianinas, flavonoides, taninos, fibra dietaria, carotenoides, vitaminas E y C, entre otros (Rastogi y Shukla, 2013). A estos fitoquímicos se les han atribuido propiedades nutraceuticas (hipoglucemiantes, reductores de niveles de colesterol y triglicéridos séricos, inmunoestimulantes, antimutágenos, anticarcinógenos y antioxidantes) (Shi y col, 2002; Liu, 2004; Pasko y col, 2009; Montoya-Rodríguez y col, 2015). Otros nutraceuticos del amaranto son los péptidos bioactivos, los cuales son pequeñas cadenas peptídicas compuestas de 2 a 15 residuos de aminoácidos, estos son liberados de las proteínas cuando son hidrolizadas durante el procesamiento de alimentos y en la digestión gastrointestinal (enzimática). Los péptidos bioactivos se han aislado de diferentes fuentes, tanto animales como vegetales. Dentro de las fuentes de origen vegetal se han usado gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol, garbanzo, maíz, arroz y amaranto. Estos péptidos han presentado diversas actividades biológicas como antioxidantes, hipocolesterolemiantes, antimicrobianos, anticariogénicos, anti-trombóticos, anti-cancerígenos, inmonomoduladores, anti-inflamatorios, anti-hipertensivos y antidiabéticos (Lipkin y col, 2005; Torruco-Uco y col, 2008; Tironi y Añón, 2010; Velarde-Salcedo y col, 2013).

1 Actividad antioxidante

Diversos estudios han demostrado que los principales compuestos bioactivos que otorgan actividad antioxidante al amaranto son los polifenoles y los péptidos. Barba de la Rosa y col. (2009) evaluaron diferentes cultivares de amaranto e identificaron algunos polifenoles como isoquercitina y rutina; asimismo identificaron ácidos fenólicos. Estos compuestos mostraron actividad antioxidante. López-Mejía y col. (2014) evaluaron la actividad antioxidante de extractos de hojas y extractos de semillas de amaranto, concluyendo que ambos tejidos muestran actividad antioxidante, la cual no solo es atribuida a los

compuestos fenólicos. En nuestro grupo de trabajo, Argüelles-López (2020) observó que la germinación de *Amaranthus hypocondriacus* incrementó el contenido de compuestos fenólicos libres y ligados y que estos provocaron un incremento en la actividad antioxidante. También en nuestro grupo de trabajo, en la evaluación de la actividad biológica de los hidrolizados de harina de amaranto extrudido, se observó capacidad antioxidante, atribuible a los péptidos encontrados en los hidrolizados, los cuales estaban constituidos principalmente por estos aminoácidos que poseen actividad antioxidante (Montoya-Rodríguez y col, 2014a). Asimismo, Tiengo y col. (2009) reportaron que el amaranto es rico en aminoácidos que contienen azufre y aromáticos, los cuales poseen actividad antioxidante. Orsini-Delgado y col. (2016) al hidrolizar *Amaranthus mantegazzianus* simulando digestión gastrointestinal, obtuvieron péptidos con actividad antioxidante. Vilcacundo y col. (2019) también identificaron péptidos con actividad antioxidante después de la digestión gastrointestinal *in vitro* de *amarantus caudatus*.

2 Efecto hipocolesterolemiante

Plate y Areas (2002) reportaron que el consumo de amaranto extrudido reduce los niveles de colesterol LDL y colesterol total en conejos hipercolesterolémicos y sugirieron que el amaranto extrudido puede ser una opción alternativa en la prevención de enfermedades del corazón. Mendonca y col. (2009) reportaron que aislados de proteína de amaranto muestran una reducción del colesterol total en plasma en hámsteres alimentados con los aislados proteínicos de amaranto. Existen diferentes hipótesis para explicar el efecto hipocolesterolemiante del amaranto; una de ellas se refiere al contenido de fibra y posiblemente al perfil de aminoácidos de las proteínas (Berger y col, 2003; Mendonca y col, 2009). La fibra reduce la absorción de colesterol en el intestino, disminuyendo los niveles de colesterol en sangre (Pavlik, 2012). En nuestro grupo de trabajo se evaluó el contenido de fibra dietaria total en harina de amaranto extrudida, encontrando buenos niveles de fibra dietaria de ambas

fracciones (soluble e insoluble), concluyendo que el proceso de extrusión no afecta significativamente el contenido de fibra (Milán-Carillo y col, 2012a).

3 Actividad anti-diabética

El efecto del amaranto en la reducción de los niveles de glucosa en sangre aun no es muy estudiado. Sin embargo existen algunos estudios que muestran propiedades anti-diabéticas en el amaranto. Conforti y col. (2005) reportaron actividad anti-diabética en 2 variedades de amaranto vía inhibición de la enzima α -amilasa. Velarde-Salcedo y col. (2013) reportaron una inhibición *in vitro* de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) con péptidos derivados de proteínas de amaranto. DPP-IV es una enzima que desactiva hormonas (incretinas) involucradas en la secreción de insulina. Vilcacundo y col. (2019) al hidrolizar *A. caudatus* observaron que se liberaban péptidos con actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV. En nuestro grupo de trabajo, Argüelles-López (2020) observó que la germinación de *Amaranthus hypocondriacus* incrementó el contenido de compuestos fenólicos libres y ligados y que estos presentaron actividad hipoglucemiante *in vitro* con inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa.

4 Actividad anti-aterosclerótica

El alto contenido de fibra en amaranto, podría ser una de las posibles vías para reducir el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, específicamente aterosclerosis. Nuevas investigaciones resaltan el importante rol del escualeno presente en el amaranto. La inhibición de la enzima escualeno mono-oxigenasa da como resultado una reducción en la síntesis de colesterol. Esta enzima ha sido identificada como reguladora importante del colesterol, el cual es el responsable de la aparición de aterosclerosis (Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012). La aterosclerosis es considerada como una enfermedad progresiva que envuelve un proceso inflamatorio previo. En nuestro grupo de trabajo se reportaron que péptidos presentes en hidrolizados de harina de

amaranto extrudido presentan actividad anti-inflamatoria vía inhibición de la señalización de la ruta de NF- κ B en células humanas THP-1 inducidas con LPS, por lo que estos péptidos podrían ayudar a reducir la expresión de factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (Montoya-Rodríguez y col, 2014a). Kabiri y col. (2010) reportaron un efecto anti-aterosclerótico del amaranto en conejos hipercolesterolémicos vía reducción de niveles de LDL, triglicéridos y ox-LDL. ox-LDL es la principal molécula involucrada en el desarrollo de aterosclerosis. Su principal receptor es LOX-1, el cual está localizado en la superficie de células endoteliales en las arterias coronarias en humanos. En nuestro grupo de trabajo se evaluó el efecto de los hidrolizados de pepsina/pancreatina de harina de amaranto extrudida en células humanas THP-1 inducidas con LPS, encontrando una importante inhibición de marcadores pro-ateroscleróticos vía reducción de la expresión de proteínas asociadas a la ruta de señalización de LOX-1 (Montoya-Rodríguez y col, 2014b).

5 Actividad anti-cancerígena

Algunas especies de amaranto como *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* han mostrado un efecto anti-tumor (Yu y col, 2001; Barrio y Añón, 2010). Maldonado-Cervantes y col. (2010) reportaron que el péptido homólogo de lunasina en amaranto es eficiente como péptido cáncer-preventivo. La inflamación en algunos casos puede producir una situación crónica desencadenando enfermedades degenerativas como cáncer. En nuestro grupo de trabajo, como ya se mencionó anteriormente, se evaluó el efecto anti-inflamatorio de hidrolizados de harina de amaranto extrudido en células humanas THP-1 inducidas con LPS. Los hidrolizados mostraron un efecto anti-inflamatorio vía reducción de la activación de la señalización de la ruta de NF- κ B. Por lo que la harina de amaranto puede ayudar a prevenir los factores de riesgo para la aparición de cáncer (Montoya-Rodríguez y col, 2014a).

6 Actividad anti-hipertensiva

La actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), es la principal actividad biológica evaluada en amaranto (Caselato-Sousa y Amaya-Farfán, 2012). Fritz y col. (2011) reportaron que hidrolizados de proteína de semilla de amaranto presentan actividad anti-hipertensiva *in vitro* e *in vivo*, vía inhibición de la enzima ECA. En nuestro grupo de trabajo, Argüelles-López (2020) observó que la germinación de *Amaranthus hypocondriacus* incrementó el contenido de compuestos fenólicos libres y ligados y que estos presentaron un efecto anti-hipertensivo inhibiendo la enzima convertidora de angiotensina. Barba de la Rosa y col. (2010) reportaron que la digestión trípica de glutelinas de amaranto induce la producción de óxido nítrico endotelial vía inhibición de la enzima ECA. Quiroga y col. (2012) reportaron que la fracción 7S de globulinas presenta una actividad inhibitoria de la ECA similar a la que presenta la fracción 11S. Tovar-Pérez y col. (2009) y Tiengo y col. (2009), también reportaron una actividad inhibitoria de la ECA de proteínas de amaranto. En nuestro equipo de trabajo Argüelles-López (2020), evaluó el efecto de la germinación de amaranto sobre la actividad anti-hipertensiva con extractos de compuestos fenólicos a dosis de 50, 150, 250 y 500 mg/kg a tiempos de 1.5, 3, 4.5 y 6 h de tratamiento y observó una disminución significativa de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas a las 6 h de estudio para la mayoría de las dosis estudiadas.

7 Actividad anti-Inflamatoria

La inflamación es una respuesta protectora con una reacción tisular compleja ante diversas fuentes (estrés oxidativo, infecciones microbianas y virales, exposición a los alérgenos, radiación, químicos tóxicos, enfermedades autoinmunes y crónicas, traumatismos, obesidad, consumo de alcohol y tabaco, dieta alta en calorías). Existen dos estados de la inflamación: aguda y crónica. La inflamación aguda es la etapa inicial de la inflamación, influida a través de la activación del sistema inmune. Este tipo de inflamación persiste solo por un

corto tiempo y es usualmente benéfica para el huésped, siendo la primera respuesta adaptativa que se desencadena para combatir la infección y la lesión del tejido. La invasión de patógenos en las células es a menudo detectada por receptores de reconocimiento, expresados principalmente por células que participan en la respuesta inmune innata (macrófagos, fibroblastos, leucocitos y neutrófilos). Estas células liberan mediadores químicos tales como citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno, que permiten el reclutamiento de leucocitos en el área de la lesión o infección y da lugar a la eliminación de patógenos y/o reparación de daño de los tejidos, iniciando la respuesta inmune adaptativa (Weiss 2008). La generación de mediadores inflamatorios podría activar cascadas de vías de señalización que se transmiten a factores de transcripción como NF- κ B, el cual está involucrado en el desarrollo del proceso inflamatorio (Libby 2002; Weiss 2008). Si la inflamación dura un periodo de tiempo mayor, inicia el estado de inflamación crónica. Esta es una respuesta prolongada desregulada y mal adaptada que involucra una inflamación activa persistente, destrucción del tejido, además de fallar en la reparación del daño. Este tipo de inflamación puede predisponer al huésped a varias enfermedades crónico-degenerativas tales como enfermedades del corazón, cáncer, diabetes, artritis, obesidad y aterosclerosis (García-Barreno, 2008; Dia y col, 2009; Moore y col 2010; Galland 2010; Oseguera-Toledo y col, 2011; Cam y de Mejía, 2012; Husain y col, 2015; Maruyama y col, 2016).

Diversos estudios han demostrado que compuestos bioactivos en alimentos inhiben la activación de la señalización de la ruta NF- κ B, inhibiendo la producción de varias citocinas pro-inflamatorias en modelos inflamatorios inducidas por LPS y otros estímulos (Tunon y col, 2009; Reuter y col, 2010; Montoya-Rodríguez y col, 2014a; Montoya-Rodríguez y col, 2014b; Montoya-Rodríguez y González de Mejía, 2015; Montoya-Rodríguez y col, 2015a; Moronta y col, 2016; González-Montoya y col, 2018; Milán-Noris y col, 2018).

En nuestro grupo de trabajo, utilizando hidrolizados de pepsina/pancreatina a partir de harina de amaranto extrudido, se observó una inhibición de los biomarcadores más importantes, involucrados en el proceso de inflamación y de aterosclerosis (Montoya-Rodríguez y col, 2014a; Montoya-Rodríguez y col, 2014b; Montoya-Rodríguez y González de Mejía, 2015; Montoya-Rodríguez y col, 2015a). Debido a que el amaranto posee un valor nutricional alto, a sus interesantes propiedades nutraceuticas y su potencial actividad antioxidante y anti-inflamatoria, el grano de amaranto presenta una buena alternativa en orden de incrementar su uso en dietas destinadas a la nutrición humana. Para alcanzar este objetivo, se requiere una mayor investigación para el desarrollo de nuevos productos. Asimismo, el diseño de alimentos funcionales a base de amaranto, está abriendo nuevas perspectivas con relación al desarrollo de nuevas tecnologías de procesamiento que preserven su potencial saludable y la aceptabilidad de los productos del consumidor.

IV JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe una tendencia clara y creciente hacia la demanda de alimentos que aporten un beneficio extra en la salud, ya sea a través de la prevención o el tratamiento de determinados padecimientos, tales como la hipertensión arterial, cáncer, diabetes, aterosclerosis, inflamación, entre otras. El amaranto es una buena fuente de compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos y péptidos, los cuales presentan actividades biológicas. La germinación incrementa el contenido de compuestos fenólicos y de proteínas, así como la biodisponibilidad de estas. La simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* puede liberar compuestos fenólicos y péptidos en la harina y concentrado proteínico de amaranto germinado. En este sentido, el planteamiento del presente proyecto es ofertar un ingrediente funcional y/o nutracéutico a partir de harina de amaranto germinado con valor agregado a la salud, e introducirlo en una estrategia alimentaria que ayude en la prevención y control de las principales enfermedades que han incrementado su incidencia a nivel mundial en años recientes, como lo son las enfermedades crónicas no transmisibles.

V HIPÓTESIS

El proceso de germinación y la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* liberan compuestos bioactivos que incrementan la potencial actividad antioxidante y anti-inflamatoria de granos de amaranto.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este proyecto fue evaluar la liberación de péptidos y compuestos fenólicos con actividad antioxidante y anti-inflamatoria mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* en harina y concentrado proteínico de amaranto germinado.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la germinación de amaranto sobre el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante.
2. Evaluar el efecto de la germinación y del tiempo de digestión gástrica e intestinal simulada en amaranto sobre el perfil de proteínas, grado de hidrólisis, contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales, y actividad antioxidante.
3. Evaluar el efecto anti-inflamatorio de los digeridos y fracciones peptídicas de la harina de amaranto germinado.
4. Analizar el efecto del fraccionamiento de los digeridos gastrointestinales de la harina de amaranto germinado sobre el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante.
5. Caracterizar las secuencias de los péptidos liberados de la harina de amaranto germinado mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*.
6. Evaluar el efecto de la germinación, concentración de proteínas y simulación de digestión gastrointestinal sobre el perfil de proteínas, el contenido y bioaccesibilidad de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante.
7. Determinar el efecto anti-inflamatorio de los péptidos y compuestos fenólicos liberados mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* del concentrado proteínico de amaranto germinado.

8. Caracterizar las secuencias de los péptidos liberados mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* del concentrado proteínico de amaranto germinado.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizó grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) color crema con buenas características agronómicas, el cual fue sembrado y cosechado durante el 2016 en Temoac, Morelos, México. El grano se limpió y almacenó en recipientes herméticos en refrigeración (5-10°C) hasta su utilización. También se utilizaron macrófagos de línea celular RAW 264.7 de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) y medio “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) suplementado con D-Glucosa (4.5 g/L), L-glutamina, y piruvato de sodio (110 mg/L) de Gibco™ (Grand Island, New York). Suero fetal bovino de biowest. Estreptomocina/penicilina de Cellgro (Manassas, VA, USA). Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline (DPBS Gibco™) sin calcio ni magnesio de Gibco® (Grand Island, New York). Ácido fosfórico, nitrito de sodio, sulfanilamida, N-1-(naphthyl) ethlenediamina-diHCl y lipopolisacárido (LPS de *Escherichia coli* O55:B5) de Sigma-Aldrich (St. Louis MO).

B MÉTODOS

La parte experimental del proyecto consistió en dos etapas de acuerdo al diagrama de proyecto de la **Fig. 4**. La etapa 1 consistió en obtener los péptidos y compuestos fenólicos mediante la simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* de harina de amaranto germinado, así como evaluar su actividad antioxidante y anti-inflamatoria. En la etapa 2 se realizó un concentrado proteínico de la harina de amaranto germinado, el cual se digirió simulando la digestión gastrointestinal para obtener péptidos y compuestos fenólicos para evaluar también su actividad antioxidante y anti-inflamatoria.

1 Obtención de harina de amaranto germinado (GAF)

Para la obtención de GAF (**Fig. 5**) se aplicó la metodología reportada por Perales-Sánchez y col, 2014. Lotes de 100 g de granos de amaranto, limpios y sin defecto, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (1000 ppm)

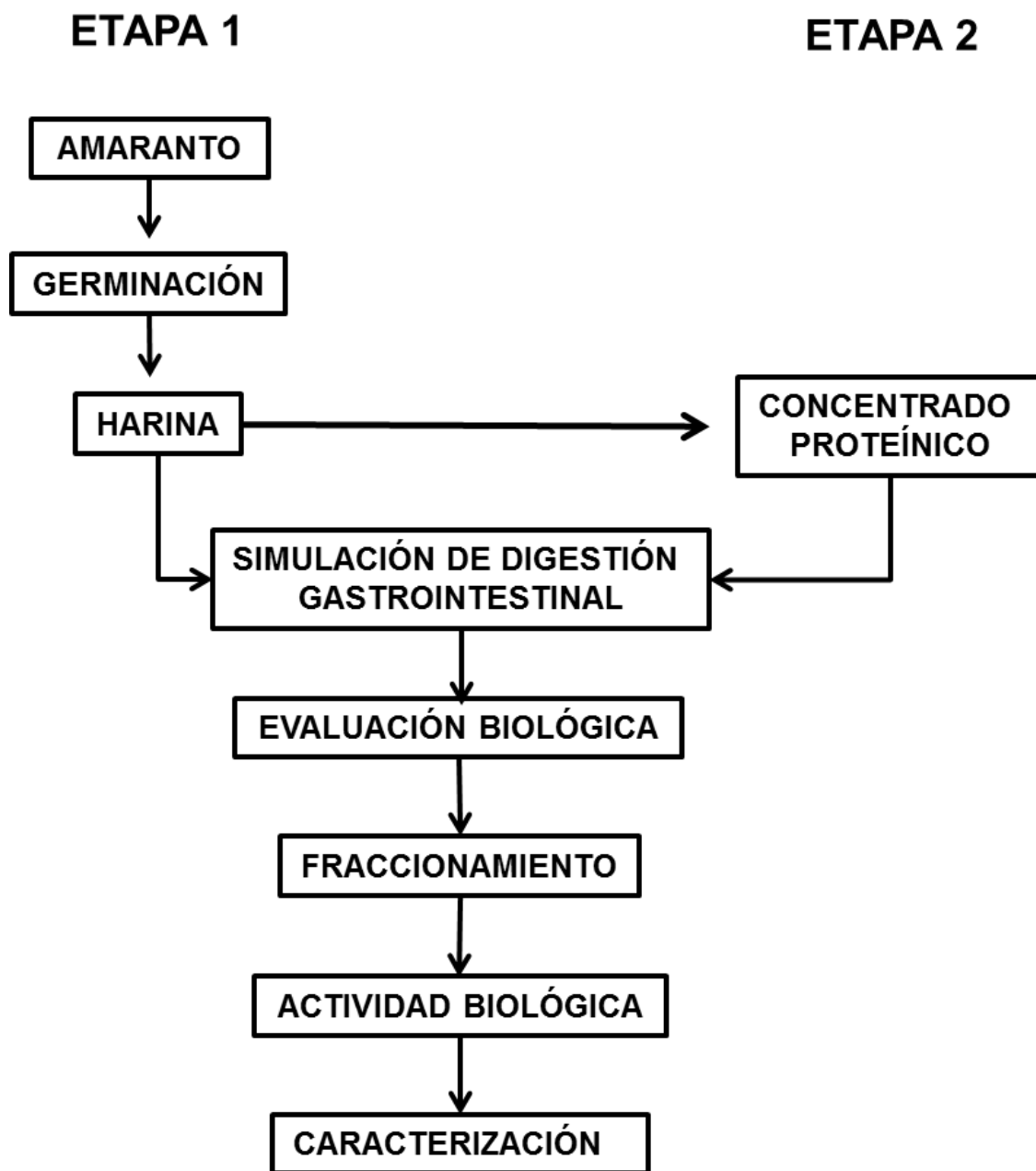


Fig. 4. Diagrama experimental general.

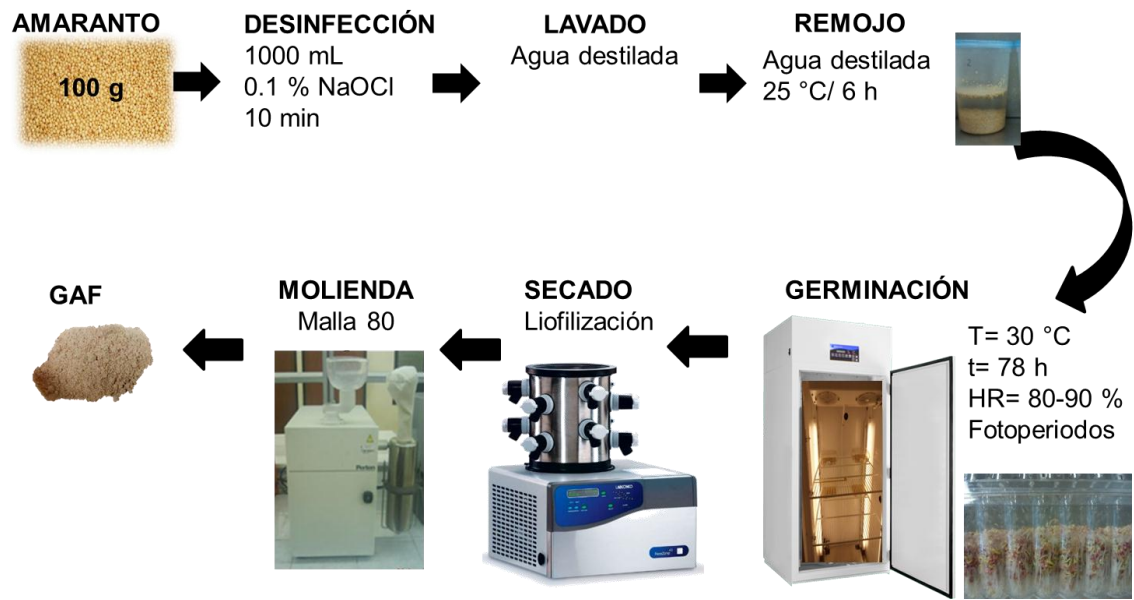


Fig. 5. Diagrama de obtención de harina de amaranto germinado (GAF)

por 10 min, esto para desinfectar y eliminar cualquier contaminante que pudiera traer en la superficie del grano. Después, los granos desinfectados fueron retirados de la solución, se lavaron con agua purificada para eliminar el cloro residual, y se dejaron en remojo por 6 h en agua destilada. Posteriormente, el agua de remojo se decantó y el exceso de agua superficial se removió con papel absorbente; los granos se colocaron homogéneamente en una cama de algodón y tela de gasa, previamente humectadas con una solución a 200 ppm de hipoclorito de sodio, para mantener humedad alta constante y evitar el crecimiento de microorganismos en los germinados. Después las camas de algodón con los granos tratados fueron colocadas en una cámara de germinación empleando fotoperiodos de luz/oscuridad (12h:12h) durante el tiempo de germinación empleado. Las condiciones de operación del germinador fueron: temperatura de germinación (TG), 30 °C y tiempo de germinación (tG), 78 h; Los germinados se colectaron en bolsas de polietileno, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron. El material obtenido se sometió a molienda (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp, Boulder, CO, EUA) hasta pasar a través de malla 80 (0.180 mm), la harina de amaranto germinado se empacó en bolsas de polietileno y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

2 Obtención del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado (GAFPC)

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Moronta y col. (2016) con algunas modificaciones. Primeramente se desgrasó la GAF con hexano (1:10 p/v) en agitación a 500 rpm durante 4 h; se dejó secar la harina desgrasada durante toda la noche a temperatura ambiente. La harina desgrasada fue suspendida en agua destilada (1:10 p/v); la extracción de proteínas se llevó a cabo ajustando el pH a 9 usando una solución de NaOH 1M y agitando a 500 rpm continuamente durante 1 h; posteriormente se centrifugó a 10000 \times g / 20 min / 4 °C; El sobrenadante se colectó y al precipitado se le realizó de nuevo la extracción con las mismas condiciones, se mezclaron

ambos sobrenadantes y se le realizó la precipitación de proteínas ajustando el pH a 5 con una solución de HCl 1M agitando a 500 rpm durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 10000 \times g / 20 min / 4 °C. El precipitado se colectó y liofilizó, posteriormente se guardó a -20 °C hasta su uso.

3 Digestión gastrointestinal simulada *in vitro*

La simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* para UAF, GAF y GAFPC se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de Megías y col. (2009) y Montoya-Rodríguez y col. (2014a) con algunas modificaciones.

Para las muestras UAF y GAF se evaluaron diferentes tiempos de digestión gástrica (pepsina) e intestinal (pancreatina). Primeramente la muestra se suspendió en agua (1:20 p/v), se ajustó a 37 °C y pH 2. Después se digirió con pepsina [EC 3.4.23.1, \geq 250 unidades/mg; enzima/sustrato, 1:20 (p/p)] durante 3 h. La digestión gástrica se detuvo incrementando el pH a 7.5 para iniciar una subsecuente digestión intestinal con pancreatina [4x USP; enzima/sustrato, 1:20 (p/p); pH 7.5] a 37 °C durante 3 h. La digestión se detuvo bajando el pH a 4 y calentando a 75 °C durante 20 minutos, posteriormente los digeridos se centrifugaron a 20000 \times g durante 20 minutos a 4 °C. Para determinar grado de hidrólisis (digestión), se tomaron alícuotas a los 10, 25, 60, 90, 120 y 180 min durante la digestión de UAF y GAF con ambas enzimas. Los digeridos de UAF y GAF (UAD y GAD, respectivamente) se filtraron para eliminar sales y posteriormente se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

La muestra GAFPC fue digerida como se mencionó anteriormente para UAF y GAF, solo que el tiempo de digestión fue diferente, para GAFPC el tiempo de digestión gástrica fue de 90 min y el de digestión intestinal fue de 60 min, posteriormente se detuvo la digestión bajando el pH a 4 y calentando a 75 °C durante 20 minutos, después el digerido se centrifugó a 20000 \times g durante 20 minutos a 4 °C, obteniendo de esta manera los digeridos de la fracción insoluble

(GAFPC in) o pellet y la fracción soluble (GAFPC out) o sobrenadante, la cual se filtró para eliminación de sales y posteriormente ambos digeridos se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

4 Extracción total de proteínas de las harinas sin digerir

Se realizó de acuerdo a lo reportado por Montoya-Rodríguez y col. (2014a) con algunas modificaciones. El extracto de proteína se preparó usando una solución de buffer fosfato salino (PBS) a un pH de 7.4, en una relación de 50 mg de harina en 1 mL de buffer. Una vez agregado el buffer a la harina, se agitó en un vortex para homogeneizar la muestra. Antes de iniciar la extracción, se preparó el baño ultrasónico a 40°C. Una vez estable la temperatura del baño, se procedió a la extracción de proteínas colocando las muestras en el baño ultrasónico durante 70 minutos a 40°C, mezclando cada 10 minutos en un vortex. La mezcla se centrifugó a 13000g durante 20 minutos a 4°C, se colectaron los sobrenadantes y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso. Todas las fracciones se obtuvieron por triplicado.

5 Medición de proteína soluble (DC-Protein Assay)

La proteína soluble total se determinó mediante el DC-Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) para microplacas. Este es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteína. La cantidad de proteína soluble se calculó utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino. La preparación de la curva estándar se realizó de la siguiente forma: 15 mg de albúmina de suero bovino se disolvieron en 10 mL de PBS (1500 µg/mL) y se hicieron 7 diluciones posteriores hasta 10 µg/mL. La curva estándar se realizó el mismo día de la medición para obtener mejores resultados y se preparó con el mismo PBS con el que se preparó la muestra. Antes de cargar la muestra en la microplaca, se realizó una dilución 1:20 para bajar la concentración de la proteína y así no tener problemas en la medición. Una vez realizada la curva

estándar y las diluciones se procedió a llenar la placa de la siguiente forma: se agregaron 5 μ L de cada uno de los puntos de la curva estándar y 5 μ L de la muestra en una microplaca (transparente) limpia y seca. Posterior a esto se agregaron 25 μ L de reactivo A (solución de tartrato de cobre alcalino) y 200 μ L de reactivo B (reactivo folin diluido) (Bio Rad 500-0116). Después de agregar los reactivos, se dejó en reposo durante 15 minutos y posteriormente se midió su absorbancia en un espectrofotómetro a 690 nm.

Esta reacción se basa en la interacción de los aminoácidos aromáticos con los reactivos A y B. Altos niveles de aminoácidos aromáticos nos indican mayor contenido de proteína soluble. El color de la muestra cambia de claro a azul, un color azul más intenso indica mayor contenido de proteína soluble.

6 SDS-PAGE

Las muestras se diluyeron en buffer Laemmli (Bio-Rad Laboratories) con 5%- β -mercaptoetanol y se pusieron en ebullición durante 5 minutos previos a cargarlas en el gel de separación.

El ensayo fue llevado a cabo a temperatura ambiente por el método de Laemmli (1970). Las bandas de los extractos de proteína de amaranto se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando geles de 15 % de poliacrilamida (Bio-Rad) con un contenido de 10 % de SDS y 10 % de APS en la etapa 1; geles Mini PROTEAN[®] TAGX[™] (Bio-Rad) se utilizaron en la etapa 2. Se utilizó el estándar de peso molecular de proteínas Dual color (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo a 110 Voltios durante 120 minutos en una solución fijadora de 10 % de Buffer Tris Glicina y 90 % de agua. Después los geles se removieron y se les agregó una solución de azul de Coomassie R250 (Coomassie brilliant blue R250 1.25 g, agua desionizada 200 mL, metanol 250 mL, ácido acético glacial 50 mL) durante toda la noche para teñir las bandas, posteriormente se lavaron con una solución para desteñir (agua destilada 670 mL, metanol 290 mL, ácido acético glacial 40 mL y ácido tricloroacético 35 g)

durante 2 h y la imagen se obtuvo utilizando el sistema de imagen Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System de Bio-Rad.

7 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) o de digestión se determinó midiendo el contenido total de nitrógeno (N) soluble en ácido tricloroacético (TCA) al 10 % de acuerdo a lo reportado por Hoyle y Merritt (1994). Se tomaron 5 mL de los digeridos y se mezclaron con 5 mL del TCA al 20 %, se homogeneizó y posteriormente se centrifugó a 10, 000 RPM, por 20 minutos a 10 °C; se recuperó el sobrenadante y se le determinó el N soluble en el TCA por el método de Kjeldahl. El grado de hidrólisis se calculó mediante la ecuación:

$$\%GH = \frac{\text{N soluble en TCA de la muestra}}{\text{N total de la muestra}} * 100$$

8 Fraccionamiento de péptidos

El digerido GAD 90 liofilizado fue lavado con metanol al 80 % (1:20 p/v), sonificado durante 10 min y centrifugado a 20000 xg/ 20 min/ 4 °C; al precipitado se le realizó el mismo procedimiento 4 veces (con la finalidad de remover los compuestos fenólicos de la muestra), el residuo se liofilizó y se obtuvo así el digerido de GAD 90 lavado sin fenólicos (GADW 90); esta muestra se mezcló con PBS (50 mg muestra/mL), posteriormente se sonicó durante 25 min y se colocó en un filtro Amicon® Ultra-15 10K (10000 MWCO) para ultrafiltración con centrifuga; se centrifugó a 4000 xg/25 °C/ 145 min para obtener un corte molecular de 10 KDa, la parte que no atravesó el filtro se le llamó Fracción F₁ (>10 KDa); la parte que pasó el filtro se colocó en un filtro Amicon® Ultra-15 3K (3000 MWCO) y se centrifugó a 4000 xg/ 25 °C/ 40 min; la parte que no atravesó el filtro se le llamo fracción F₂ (10-3 KDa) y la parte que atravesó el filtro se le llamó fracción F₃ (<3 KDa).

En el caso de los digeridos GAFPC in y GAFPC out, cada una de ellas se homogeneizó con PBS como se describió anteriormente y se siguió el mismo

procedimiento, solo que se pasó únicamente por el filtro Amicon® Ultra-15 10K (10000 MWCO) para filtración con centrífuga y la parte que no atravesó el filtro se le llamó F1 (>10 KDa) y la que atravesó el filtro se le llamó F2 (< 10KDa) para ambas muestras.

9 Preparación de extractos metanólicos

Se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Milán-Noris y col. (2018). Primeramente se pesaron 50 mg de harina o digeridos de amaranto y se mezclaron con 1 mL de metanol al 80 %, posteriormente se sonicaron 15 min y después se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y al precipitado se le repitió la extracción; se mezclaron ambos sobrenadantes y se concentró hasta sequedad a presión reducida y una temperatura de 45 °C; finalmente el residuo resultante fue reconstituido con 1 mL de metanol al 80 % para su uso.

10 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)

Se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y col. (1999). Este método consiste en mezclar ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico que se reduce, por la acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno en un medio altamente básico (carbonato de sodio al 7 %). Los polifenoles son fácilmente oxidables en medio básico, formando O_2 , los productos de oxidación reaccionan con el molibdato formando óxido de molibdeno, este compuesto puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia UV/visible debido a que absorbe a una longitud de 750 nm. Primeramente se colocaron 20 μ L de la curva/muestra en una placa limpia y seca, posteriormente se añadieron 180 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 50 μ L de carbonato de sodio al 7%. Posteriormente la placa se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos y una vez finalizado el tiempo se tomó la lectura a 750 nm. La cuantificación se llevó a cabo utilizando

una curva de ácido gálico y los resultados se expresaron como mg Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por 100 g de muestra.

11 Medición de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante hidrofílica total de las muestras de amaranto se evaluó utilizando el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Ou y col, 2001).

El ensayo ORAC determinó la inhibición antioxidante del radical peroxilo al romper cadenas de actividad antioxidante formadas por la transferencia de átomos de hidrógeno (Ou y col, 2001; Mora-Rochín y col, 2010). Está basado en el grado de inhibición de la fluoresceína (FL) como sustrato de oxidación y como agente oxidante el generador de radicales libres peroxilo inducido por descomposición térmica del compuesto 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorado (AAPH). La solución de FL (1.2mM) se preparó pesando 39.87 mg de FL, disueltos en 100 mL de buffer fosfato salino (PBS) (75 mM, pH 7.4), posteriormente se almacenó en condiciones de refrigeración en ausencia de luz. A partir de la muestra de FL se preparó una solución diluida (10 μ M). La solución utilizada en este ensayo (0.1 μ M) se preparó diariamente, para lo cual se tomaron 0.25 mL de la solución diluida y se le agregaron 25 mL de PBS. La solución de AAPH (200mM) se preparó tomando 207 mg de AAPH mezclándolos con 5 mL de PBS. El estándar utilizado fue 1mM de solución Trolox (análogo de vitamina E), la cual se preparó en PBS. Se tomaron 25 μ L de muestra del extracto fenólico las cuales se diluyeron en 75 mM de PBS, fueron transferidas a las celdas del espectrofotómetro (Synergy TM HT Multidetecion, Biotek, Inc., VT), donde se les adicionó 150 μ L de FL y 25 μ L de AAPH se mezclaron e incubaron a 37 °C durante 30 min, la determinación de la fluorescencia se realizó en intervalos de 2 min durante 60 min (485 nm para absorción y 538 nm para emisión). Los valores obtenidos tanto para la muestras como para el control se determinaron obteniendo el área bajo la curva. Los valores se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox (ET)/100 g de

muestra seca y como micromoles equivalentes de trolox (ET)/mg de proteína soluble.

12 Índice de recuperación (IR)

El porcentaje de recuperación muestra la cantidad de compuesto presente en el digerido completo (Soluble + insoluble) después de la digestión gastrointestinal del alimento probado. Se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación reportada por Ortega y col. (2011):

$$\% \text{ Índice de Recuperación} = (A/B) \times 100$$

Dónde: A es el contenido total del compuesto analizado en el digerido completo (Soluble + insoluble) y B es el contenido total del compuesto en la muestra antes de digerir.

13 Índice de bioaccesibilidad (IB)

La bioaccesibilidad es definida como el porcentaje de compuesto que es solubilizado en la fracción soluble después de la digestión gastrointestinal. Este índice define la proporción del compuesto que podría llegar disponible para absorción en la circulación sistémica. Se calcula con la siguiente ecuación de acuerdo a lo reportado por Ortega y col. (2011):

$$\% \text{ Índice de Bioaccesibilidad} = (S/A) \times 100$$

Dónde: S es el contenido del compuesto en la fracción soluble después de la digestión gastrointestinal y A es el contenido total del compuesto en el digerido (Soluble + insoluble) después de la digestión gastrointestinal.

14 Actividad residual (AR)

El porcentaje de actividad residual se calcula para evaluar la estabilidad de la actividad antioxidante a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* con la siguiente ecuación de acuerdo a lo reportado por Ketnawa y col. (2020):

$$\% \text{ Actividad Residual} = (A/C) \times 100$$

Dónde: A es la actividad antioxidante cuantificada en la fracción digerida a cada tiempo de digestión y C es la actividad antioxidante cuantificada en el alimento probado sin digerir y expresado en las mismas unidades.

15 Actividad anti-inflamatoria

La línea celular RAW 264.7 de células de ratón fueron crecidas en medio DMEM con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de penicilina / estreptomina e incubadas a 37 °C en 5 % CO₂ (Milán-Noris y col, 2018). El cambio de medio de cultivo se realizó cada 2 días.

Las células fueron agregadas en una densidad de 5×10^4 células/pozo en una placa de 96 pozos y después de una completa adhesión, fueron tratadas con las harinas y digeridos de amaranto sin procesar y germinado a concentraciones de 0.25 a 1.00 mg/mL durante 24 h. Las muestras fueron previamente esterilizadas por filtración. Para estimular inflamación, las células se trataron con 1 µg/mL de lipopolisacárido LPS disuelto en medio de crecimiento. Las células control utilizadas fueron células con medio-LPS (control positivo) y células solo con medio (control negativo). Finalmente, transcurrido un periodo de 24 h de exposición a dicho tratamiento, diversas alícuotas del medio fueron guardadas en congelación (-20 °C) para futuras evaluaciones de marcadores pro-inflamatorios.

a Viabilidad celular

La viabilidad de las células RAW 264.7 se llevó a cabo con el ensayo de proliferación celular (CellTiter® 96 Aqueous One Solution) utilizando el compuesto tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS), y el reactivo fenazina de ethosulfato (PES) (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos con una densidad de 5×10^4 células/pozo y se incubó durante 24 h a 37 °C, 5 % CO₂. Después de la completa adhesión de las células a la placa, se removió el medio de crecimiento y se trataron las células con los

tratamientos estériles disueltos en medio de cultivo completo a una concentración máxima de 1.00 y 3 mg/mL (0.5 mg/mL para los extractos metanólicos). Las células tratadas con medio de cultivo completo sirvieron como control. Después de 24 h de tratamiento, se midió la viabilidad celular removiendo el medio de crecimiento, se adicionaron 100 μ L de medio de crecimiento y 20 μ L de reactivo MTS. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C en 5 % CO₂ y la absorbancia fue leída a 490 nm, utilizando un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Los resultados se expresaron como porcentaje de células viables con respecto a las células tratadas sólo con medio de cultivo.

b Medición de óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es un producto celular liberado por macrófagos después de una estimulación inflamatoria. Es rápidamente oxidado a nitrito o nitrato por el oxígeno. La producción de nitrito se midió mediante la reacción de Griess de acuerdo a lo reportado por Martínez-Villaluenga y col. (2009). Se colocaron 100 μ L de medio recolectado de las células tratadas y controles (+ y -) más 100 μ L de reactivo de Griess (1 % sulfanilamida y 0.1 % N-1-(naftil) etilendiamina - diHCl en 2.5 % H₃PO₄) en una placa de 96 pozos. Se incubó durante 10 minutos a 25 °C y la absorbancia fue leída a 550 nm utilizando un lector de microplacas. La absorbancia fue linealmente proporcional a la concentración de nitrito en la muestra. El NO fue calculado utilizando una curva de nitrito de sodio (0-10 μ g/mL) como estándar.

16 Caracterización de péptidos mediante MALDI-TOF acoplado a masas (MS/MS)

Una vez obtenidos los digeridos se procedió a liofilizarlos para un mejor manejo y una mayor vida útil. Los péptidos de amaranto producidos al final de la digestión gastrointestinal simulada con pepsina y pancreatina fueron analizados mediante cromatografía líquida de alto rendimiento - ionización por electro spray

- espectrometría de masas (HPLC – ESI – MS) utilizando un espectrómetro de masas Q-ToF Ultima (Waters, Milford, MA, EE. UU.) en el edificio de química y proteínas de la Universidad de Illinois, campus Urbana-Champaign. Se usó un sistema de gradiente (A: 95% de agua, 5% de acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico; B: 95% de acetonitrilo, 5% de agua y 0.1% de ácido fórmico). El volumen de inyección fue de 15 μ L y las muestras se pasaron a través de una longitud de onda del detector PDA a 280 nm. Los resultados se analizaron en el software MassLynx V4.1 (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.) y se identificó la secuencia de aminoácidos en función de las mediciones de masa precisas y la fragmentación en tándem de MS.

a Identificación de la actividad biológica

Una vez identificadas las secuencias de los péptidos, la identificación de secuencias bioactivas de los péptidos se llevó a cabo utilizando la base de datos de péptidos BIOPEP <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep> y su estructura se obtuvo utilizando la herramienta bioinformática PepDraw <http://pepdraw.com>

17 Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo en al menos tres réplicas independientes. Los datos se reportan como medias \pm la desviación estándar.

El análisis estadístico de los objetivos específicos 1 y 2 se llevó a cabo mediante el software Statgraphics centurión XVI. Los datos se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con un valor $p \leq 0.05$, donde el grupo de medias se comparó mediante la prueba de Fisher por la diferencia mínima significativa (LSD), considerando diferencia estadísticamente significativa con un valor $p < 0.05$. Los coeficientes de correlación se obtuvieron por análisis multivariante ($p < 0.05$) por el software JMP 14 de SAS Institute (Cary, NC, USA).

Para los objetivos específicos 3-8, los datos se analizaron por ANOVA comparando las medias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$), utilizando el software JMP 14 de SAS Institute (Cary, NC, USA).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A EFECTO DE LA GERMINACIÓN DE AMARANTO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

1 Proteína soluble (PS)

El contenido de PS de los granos de amaranto incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) después del bioproceso de germinación; el valor de PS llegó a un máximo de 4.4 mg PS/mL, el cual fue 37.5 % mayor que la concentración inicial del amaranto sin germinar (**Cuadro 6**). Vernaza y col. (2012) y De Souza-Rocha y col. (2014) también observaron un incremento en el contenido de PS en germinados de soya y frijol *cowpea*, respectivamente. Los cambios en PS podrían estar relacionados a la proteólisis y síntesis de proteínas, ya que durante el estado inicial de la germinación, algunas enzimas son activadas a través de varios mecanismos bioquímicos; las endopeptidasas degradan proteínas de almacenamiento para proveer aminoácidos libres necesarios para la síntesis de nuevas proteínas y tejidos, mientras que otras proteínas pueden ser hidrolizadas por proteasas (De Souza-Rocha y col, 2014).

2 Compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de CFT del amaranto germinado se muestra en el **Cuadro 6**. El contenido de CFT en la harina de amaranto sin procesar fue de 23.3 mg EAG/100 g bs. En la harina de amaranto germinado el contenido de CFT incrementó significativamente ($p < 0.05$) un 17.2 %, con respecto a la harina de amaranto sin procesar. Durante la germinación de amaranto se han observado incrementos significativos en el contenido de compuestos fenólicos (Perales-Sánchez y col, 2014; Zhang y col, 2015). El incremento en el contenido de compuestos fenólicos durante la germinación de amaranto podría ser debido a la biosíntesis de nuevos fitoquímicos a través del incremento de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés) durante el estado inicial

Cuadro 6. Efecto de la germinación sobre el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en harina de amaranto.

Variable de respuesta	UAF	GAF
Proteína soluble ¹	3.3±0.3 ^b	4.4±0.4 ^a
Compuestos Fenólicos Totales ²	23.3±1.2 ^b	27.3±1.8 ^a
Actividad antioxidante ³	415.9±34.7 ^b	641.6±60.7 ^a

UAF: Harina de amaranto sin procesar; GAF: harina de amaranto germinado; ¹: mg de proteína soluble/mL; ²: mg equivalentes de ácido gálico/100 g base seca; ³: μmol equivalentes de trolox (ET)/mg de proteína soluble. Los resultados se expresan como medias ± la desviación estándar. Medias con letras diferentes en el mismo renglón indican diferencia significativa (p<0.05).

de la germinación (Guardado-Félix y col, 2017).

3 Actividad antioxidante (AAOX)

En el **Cuadro 6** se muestra la actividad antioxidante de la harina de amaranto sin procesar y germinado. En la harina de amaranto germinado se observó el valor más alto (641.6 $\mu\text{mol ET/mg PS}$) de ORAC; el cual presentó un incremento del 54.3 % comparado con la harina de amaranto sin procesar. Nuestros resultados concuerdan con otros estudios que también muestran un incremento en la actividad antioxidante después de la germinación de amaranto y otras semillas (Perales-Sánchez y col, 2014; Ou y col, 2001; Guardado-Félix y col, 2017). El incremento de la actividad antioxidante después del proceso de germinación ha sido relacionado a la liberación de compuestos fenólicos de la pared celular, interacción proteína-almidón (Acosta-Estrada y col, 2014) o biosíntesis de fenólicos por la actividad de PAL (Guardado-Félix y col, 2017). Además la presencia de péptidos o aminoácidos libres, en particular, aromáticos o con azufre, podrían mostrar actividad antioxidante en las harinas (Vernaza y col, 2012).

B EFECTO DE LA GERMINACIÓN Y DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN GÁSTRICA E INTESTINAL SIMULADA EN AMARANTO SOBRE EL PERFIL DE PROTEÍNAS, GRADO DE HIDRÓLISIS, CONTENIDO DE PROTEÍNA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

A las harinas de amaranto sin procesar y germinado se les realizó una digestión enzimática simulando la digestión gastrointestinal usando pepsina y pancreatina. Esto fue hecho para obtener resultados cercanos a la realidad cuando los alimentos son ingeridos.

1 Perfil de proteínas por SDS-PAGE

En la **Fig. 6** se presenta el perfil electroforético de proteínas de harinas

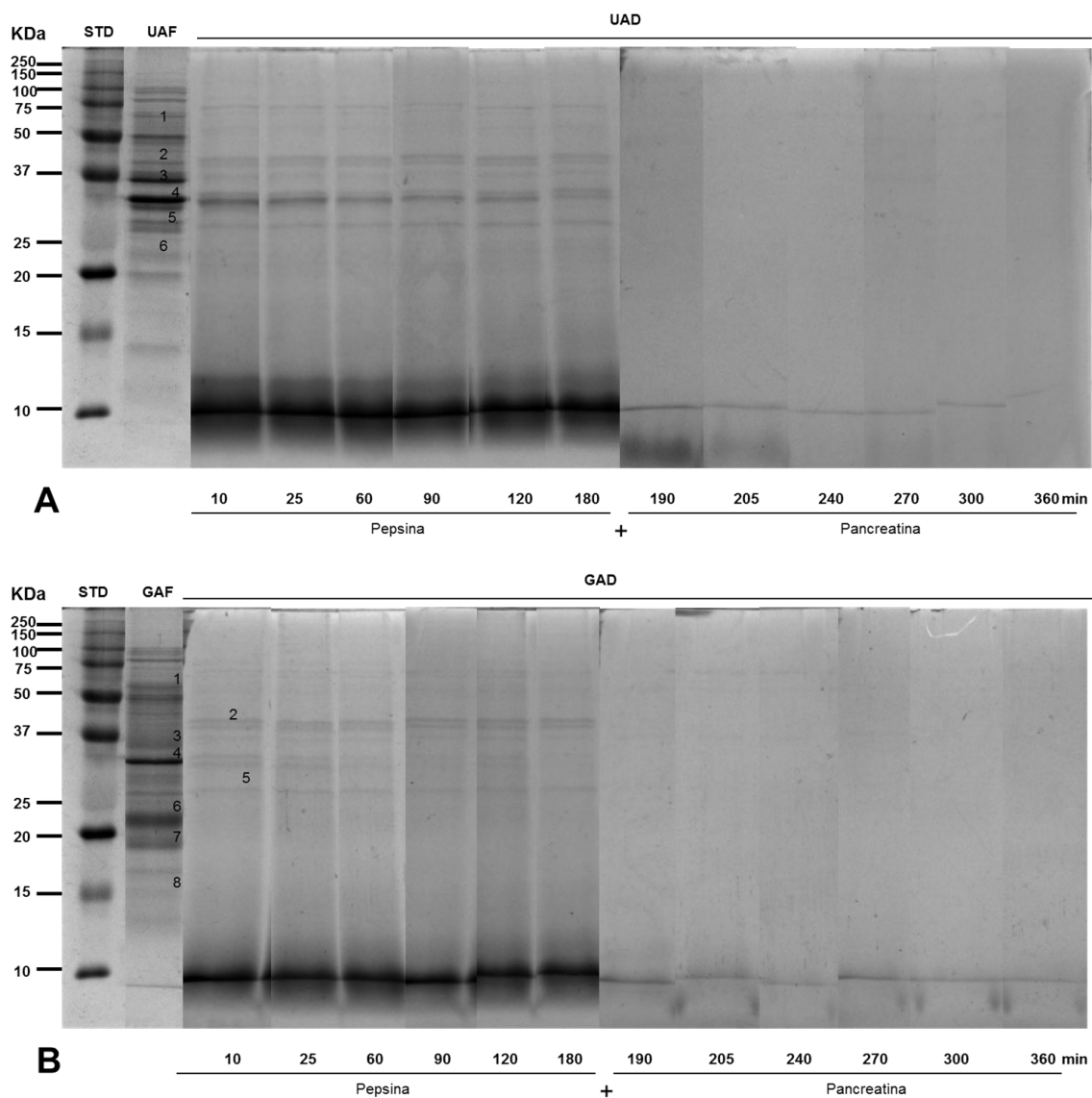


Fig. 6. Perfil de proteínas (SDS-PAGE) de harinas de amaranto sin procesar (A) y germinado (B), así como sus digeridos (digestión secuencial con pepsina + pancreatina hasta 360 min). 1: Globulina 11S; 2: Glutelina; 3: Amarantina A1; 4: Globulina 7S; 5: Albúmina; 6: Prosistemina; 7: Dedos de Zinc RING; 8: Superóxido dismutasa [Cu-Zn]. STD: Estándar de peso molecular de proteínas Dual color. UAF: Harina de amaranto sin procesar; GAF: Harina de amaranto germinado; UAD: Harina de amaranto sin procesar digerida; GAD: Harina de amaranto germinado digerida.

de amaranto sin procesar (**A**), germinado (**B**) y sus digeridos. Como se observa en la **Fig. 6A** la UAF presentó bandas de proteínas entre 15 y 100 KDa, las cuales pudieran corresponder por su peso a componentes de las albúminas, globulinas y fracciones de glutelinas (Tironi y Añón, 2010; Orsini-Delgado y col, 2011). El perfil proteínico de UAF fue similar al reportado previamente por Silva-Sánchez y col. (2008). También el SDS-PAGE mostró un débil rompimiento de proteínas como resultado del proceso de germinación. Algunas bandas de proteínas alrededor de 100, 75 y 50 KDa comenzaron a degradarse durante el proceso y mostraron una reducción en la intensidad de sus bandas, tales como amarantina A1 (32 KDa) y albúmina (28 KDa). Aphalo y col. (2015) observaron en SDS-PAGE una alta proporción de generación de péptidos (<10 KDa) como un indicador de la proteólisis que tuvo lugar durante el proceso de germinación. El proceso de germinación cambio el perfil de proteínas en la harina de amaranto, observándose poco detectables las albúminas de amaranto, así como la fracción 7S. Esto pudiera deberse a que durante el proceso de germinación se presentó una producción de péptidos de masa molecular pequeña, debido al fraccionamiento de las proteínas.

En cuanto a los digeridos UAD y GAD, la expresión de las bandas de proteínas alrededor de 15 a 100 KDa desapareció completamente después de la digestión (pepsina/pancreatina a 270 min), mostrando bandas de proteínas alrededor de 10 KDa, las cuales fueron las más intensas para ambos digeridos. La desaparición de las bandas de alto peso molecular y la presencia de bandas de peso molecular menor a 10 KDa en ambos digeridos (UAD y GAD) sugiere que la digestión fue extensiva, y subsecuentemente, que péptidos con actividad biológica podrían estar presentes. Nuestro estudio reveló que la digestión (pepsina 180 min/pancreatina 270 min) incrementó el porcentaje de péptidos de masa molecular < 10 KDa, con respecto a las harinas de amaranto sin digerir.

2 Grado de hidrólisis (GH)

El grado de hidrólisis es un método utilizado para medir el porcentaje de hidrólisis o digestión de las proteínas, el cual podría impactar en el tamaño molecular y la composición de aminoácidos de los péptidos, así como también la actividad biológica del hidrolizado proteínico o digerido (Jamdar y col, 2010). En el presente estudio, la digestión de UAF y GAF fue llevada a cabo por tratamiento con pepsina por 180 min, seguida por tratamiento secuencial con pancreatina por 180 min (**Fig. 7**), como fue reportado anteriormente por Montoya-Rodríguez y col. (2014a). Los digeridos UAD y GAD presentaron los valores de GH más altos a los 205 min del tiempo de digestión secuencial con 73.4 % y 60.3 %, respectivamente (**Fig. 7**). Basado en los resultados después de 205 min de digestión, el GH de ambos digeridos (UAD y GAD) alcanzó la meseta, confirmando que la digestión había sido completada, indicando que el tamaño de péptidos era pequeño. El porcentaje de GH de ambos digeridos mostró la misma tendencia a incrementar conforme transcurría el tiempo de digestión, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre 205 a 360 min (**Fig. 7**).

El mayor grado de hidrólisis fue obtenido en los digeridos de UAD en comparación con los hidrolizados de GAD, esto pudiera deberse a que en la UAF haya proteínas complejas o de mayor tamaño comparado con las de GAF.

3 Proteína soluble (PS)

La PS de ambos digeridos (UAD y GAD) se muestra en el **Cuadro 7**. Los valores de PS de ambos digeridos incrementaron significativamente ($p < 0.05$) durante la digestión gastrointestinal simulada (pepsina + pancreatina). Montoya-Rodríguez y col. (2014a), reportaron que la hidrólisis enzimática de *A. hypochondriacus* sin procesar incrementó la PS 75 % después de 360 min de la hidrólisis con pepsina/pancreatina. Apoyándonos en la **Fig. 6**, el incremento en la concentración de PS después de la digestión podría ser debido a la generación de péptidos con masa molecular pequeña

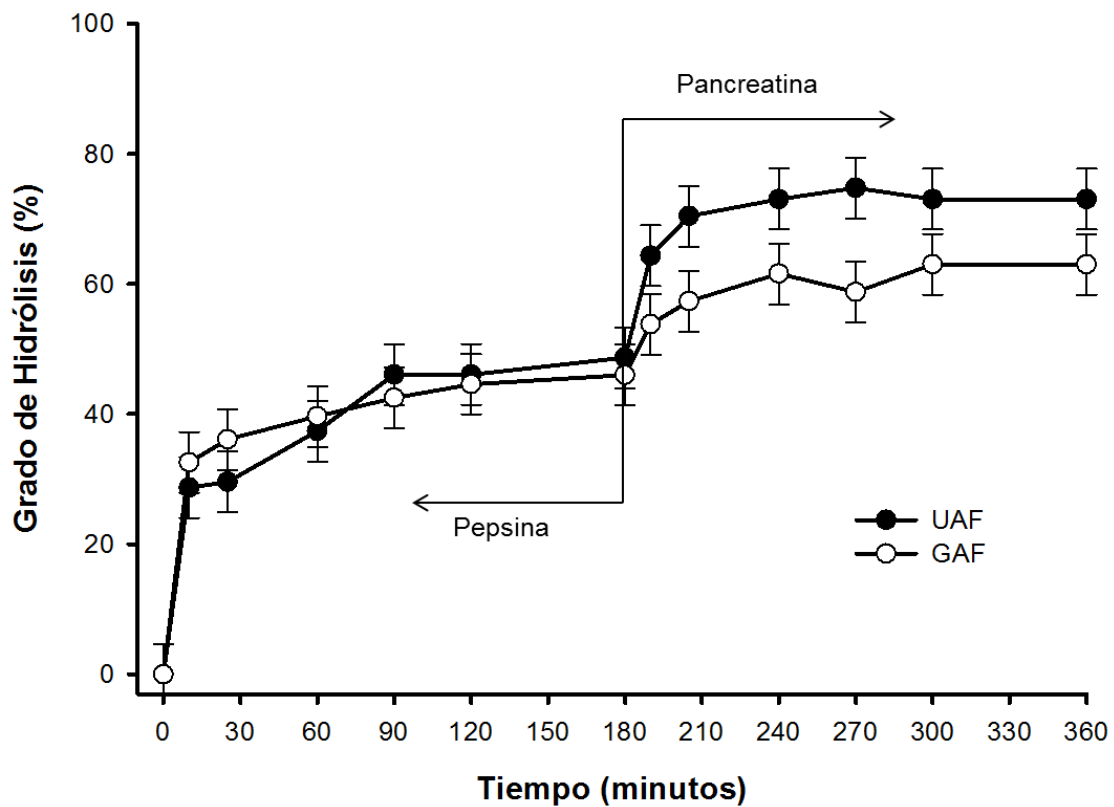


Fig. 7. Grado de hidrólisis de los digeridos de harina de amaranto sin procesar (UAF) y germinado (GAF). La digestión gástrica fue llevada a cabo con pepsina de 10 a 180 min, seguida de la digestión intestinal con pancreatina de 190 a 360 min. Las barras verticales indican LSD= 4.67 % ($p < 0.05$).

Cuadro 7. Contenido de proteína soluble a diferente tiempo de digestión de las harinas de amaranto sin procesar y germinado.

Digestión	Tiempo de digestión (min)	Proteína Soluble (mg PS/mL)	
		UAD	GAD
Gástrica (pepsina)	10	3.2±0.2 ^f _B	4.5±0.1 ^f _A
	25	3.4±0.2 ^f _B	4.7±0.1 ^e _A
	60	3.8±0.1 ^e _B	5.2±0.1 ^d _A
	90	4.3±0.1 ^d _B	5.3±0.2 ^d _A
	120	4.5±0.1 ^c _B	5.7±0.1 ^c _A
	180	5.2±0.2 ^b _B	6.0±0.2 ^b _A
Intestinal (pepsina + Pancreatina)	190	5.3±0.1 ^b _B	6.1±0.1 ^b _A
	205	5.5±0.1 ^a _B	6.3±0.1 ^a _A
	240	5.4±0.3 ^a _B	6.2±0.1 ^{ab} _A
	270	5.4±0.2 ^{ab} _B	6.1±0.3 ^{ab} _A
	300	5.3±0.1 ^{ab} _B	6.0±0.3 ^{ab} _A
	360	5.3±0.1 ^{ab} _B	5.9±0.3 ^{ab} _A

UAD: harina de amaranto sin procesar digerida; GAD: harina de amaranto germinado digerida; PS: proteína soluble. Los valores son medias ± desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes en un renglón indican diferencia significativa por germinación ($p < 0.05$). Letras minúsculas diferentes en una columna indican diferencia significativa por tiempo de digestión ($p < 0.05$).

(Silva-Sánchez y col, 2008; Montoya-Rodríguez y col, 2014a). Los digeridos UAD y GAD presentaron los valores más altos de PS a los 205 min de la digestión gastrointestinal simulada con 5.5 y 6.3 mg PS/mL, respectivamente. Estos valores fueron 70.2 % y 41.3 % más altos comparados con las harinas de amaranto sin digerir. Después de ese punto, los valores de PS en la digestión secuencial (205-360 min) no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$). Esto podría ser debido a que la digestión o hidrólisis de la proteína había sido completada a los 205 min de acuerdo a los valores de GH de ambos digeridos (Fig. 7).

4 Compuestos fenólicos totales (CFT)

El Cuadro 8 muestra las concentraciones de compuestos fenólicos totales en UAD y GAD durante la digestión gastrointestinal simulada. Los valores de CFT de ambos digeridos incrementaron significativamente ($p<0.05$) a través de la digestión con pepsina (0-180 min), seguido por una disminución significativa ($p<0.05$) durante la digestión con pancreatina (190-360 min). Los valores más altos de CFT para UAD y GAD fueron 346.1 y 426.3 mg EAG/100g BS, respectivamente. Estos valores fueron 14.9 y 15.5 veces mayor que el de las harinas de amaranto sin digerir. Es importante resaltar que el proceso de germinación en conjunto con la digestión gástrica con pepsina generó el mayor contenido de CFT, lo cual sugiere que estos procesos son una excelente combinación para aplicarlos al grano de amaranto. Pazzinato y col. (2013), reportaron que los CFT en *Amaranthus cruentus* presentaron un incremento significativo después de la digestión enzimática. La liberación de compuestos fenólicos durante la digestión enzimática está asociada con el tipo de compuestos fenólicos en la muestras. En los cereales, la mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran libres (insolubles) o ligados a otras moléculas, tales como proteínas, almidón y fibra (Acosta-Estrada y col, 2014).

Cuadro 8. Contenido de compuestos fenólicos totales a diferente tiempo de digestión de las harinas de amaranto sin procesar y germinado.

Digestión	Tiempo de digestión (min)	CFT (mg EAG/100 g bs)	
		UAD	GAD
Gástrica (pepsina)	10	193.3±4.8 ^f _B	349.2±6.1 ^{cd} _A
	25	213.4±3.3 ^e _B	368.8±6.7 ^c _A
	60	266.9±3.6 ^d _B	398.1±9.2 ^b _A
	90	298.1±3.2 ^c _B	409.9±8.2 ^{ab} _A
	120	325.3±6.0 ^b _B	420.2±7.6 ^a _A
	180	346.1±1.7 ^a _B	426.3±9.7 ^a _A
Intestinal (pepsina + Pancreatina)	190	172.7±8.9 ^g _B	335.5±5.9 ^d _A
	205	178.7±5.5 ^g _B	337.5±9.3 ^d _A
	240	171.8±2.7 ^g _B	279.1±3.6 ^e _A
	270	155.7±7.4 ^h _B	267.5±2.2 ^e _A
	300	153.2±3.6 ^h _B	262.7±7.1 ^e _A
	360	176.9±6.2 ^g _B	268.4±4.6 ^e _A

UAD: harina de amaranto sin procesar digerida; GAD: harina de amaranto germinado digerida; CFT: compuestos fenólicos totales; bs: base seca. Los valores son medias ± desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes en un renglón indican diferencia significativa por germinación ($p < 0.05$). Letras minúsculas diferentes en una columna indican diferencia significativa por tiempo de digestión ($p < 0.05$).

5 Actividad antioxidante (AAOX)

La actividad antioxidante (AAOX) de ambos digeridos UAD y GAD se presenta en el **Cuadro 9**. En los diferentes tiempos de digestión, los digeridos de GAD presentaron mayor AAOX que la de los digeridos de UAD. La AAOX de ambos digeridos incrementó significativamente ($p < 0.05$) durante la digestión gástrica e intestinal (pepsina + pancreatina). A los 270 min se alcanzaron los valores máximos de AAOX, sin embargo después de este tiempo y hasta el final de la digestión (270-360 min), los valores de AAOX no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Los digeridos UAD y GAD mostraron la mejor AAOX a los 270 min de digestión con valores de 983.1 y 1304.9 $\mu\text{mol ET/mg PS}$, respectivamente. Estos valores fueron 136.4 % y 103.4 % mayores comparados con las harinas de amaranto sin digerir. Investigaciones han demostrado que los digeridos de proteínas de alimentos, tales como amaranto, frijol y soja poseen AAOX significativas (Perales-Sánchez y col, 2014; López-Barrios y col 2016; Vernaza y col, 2012; Guan y col, 2018). Estas propiedades antioxidantes se podrían atribuir a la acción sinérgica de los polifenoles y péptidos liberados por la digestión gastrointestinal simulada (Jamdar y col, 2010). A medida que incrementó el grado de hidrólisis, aumentó también la actividad antioxidante de ambos digeridos (UAD y GAD). Esto pudiera deberse a la acción sinérgica de los polifenoles y péptidos que se van generando durante la digestión. Estos últimos presentan diferentes características antioxidantes (Gallegos-Tintoré y col, 2013), la cual está determinada por su composición de aminoácidos. Los aminoácidos más reactivos son los que contienen azufre (metionina y cisteína), aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) e histidina, la cual es atribuida a su anillo de imidazol. Cualquiera de estos aminoácidos puede estar al principio, en el medio o al final en la secuencia del péptido. La mayoría de los péptidos reportados en la literatura, que presentan actividad antioxidante, tienen una masa molecular de entre 500 y 1800 Da (Gallegos-Tintoré y col, 2013). En este estudio se encontraron péptidos con masa molecular similar. Los péptidos

Cuadro 9. Actividad antioxidante a diferente tiempo de digestión de las harinas de amaranto sin procesar y germinado.

Digestión	Tiempo de digestión (min)	AAOX ($\mu\text{mol ET/mg PS}$)	
		UAD	GAD
Gástrica (pepsina)	10	463.3 \pm 35.7 ^f _B	720.5 \pm 70.9 ^a _A
	25	590.5 \pm 42.1 ^{de} _B	742.2 \pm 75.7 ^e _A
	60	633.6 \pm 25.4 ^d _B	737.9 \pm 66.0 ^e _A
	90	616.2 \pm 30.8 ^d _B	824.5 \pm 58.2 ^d _A
	120	630.8 \pm 20.0 ^d _B	813.9 \pm 84.2 ^d _A
	180	627.5 \pm 35.5 ^d _B	731.9 \pm 19.9 ^e _A
Intestinal (pepsina + Pancreatina)	190	551.9 \pm 39.9 ^e _B	910.8 \pm 53.8 ^c _A
	205	795.6 \pm 50.2 ^c _B	916.3 \pm 73.9 ^c _A
	240	878.9 \pm 88.5 ^b _B	1156.9 \pm 93.7 ^b _A
	270	983.1 \pm 38.1 ^a _B	1304.9 \pm 86.9 ^a _A
	300	937.0 \pm 65.3 ^a _B	1211.4 \pm 99.0 ^{ab} _A
	360	973.9 \pm 78.6 ^a _B	1246.4 \pm 45.9 ^{ab} _A

UAD: harina de amaranto sin procesar digerida; GAD: harina de amaranto germinado digerida; AAOX: actividad antioxidante. Los valores son medias \pm desviación estándar. Letras mayúsculas diferentes en un renglón indican diferencia significativa por germinación ($p < 0.05$). Letras minúsculas diferentes en una columna indican diferencia significativa por tiempo de digestión ($p < 0.05$).

actúan como antioxidantes ya que ceden electrones a los radicales libres para evitar que esos radicales interactúen con otras moléculas presentes (Ruiz-Ruiz y col, 2013). Aunque la AAOX mostró una correlación positiva con la PS sin procesar ($r=0.7032$, $p=0.0107$) y germinado ($r=0.6204$, $p=0.0314$) y una correlación negativa con CFT en datos germinados ($r=-0.8985$, $p<0.0001$), nuestros resultados mostraron que la germinación de amaranto en combinación con la digestión gástrica e intestinal con pepsina y pancreatina, respectivamente, podría ser usado para producir ingredientes funcionales que contengan una alta AAOX.

C EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE LOS DIGERIDOS Y FRACCIONES PEPTÍDICAS DE LA HARINA DE AMARANTO GERMINADO.

1 Viabilidad celular

Los digeridos de harina de amaranto germinado (GAD 90), así como el lavado (GADW 90) y sus fracciones (F_1 , F_2 y F_3) fueron evaluados para citotoxicidad a la concentración más alta probada de 3 y 1 mg/mL, respectivamente. Ninguna de las muestras redujo la viabilidad celular por debajo del 90 % con respecto al control. Por lo tanto estas muestras se consideraron no citotóxicas a las concentraciones probadas (datos no mostrados).

2 Actividad anti-inflamatoria

Durante el proceso de inflamación, la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) es la responsable de producir grandes cantidades de óxido nítrico (NO) a niveles de concentraciones micromolares (μM), lo que a su vez puede provocar daño tisular en el sitio de la inflamación, disfunción de órganos y tumorigénesis relacionada con el proceso de inflamación (Conforti y Menichi, 2011). Por lo tanto el NO es determinado como un biomarcador de inflamación en células de macrófagos RAW 264.7 inducidas con LPS. La **Fig. 8** muestra el efecto de la harina de amaranto germinado

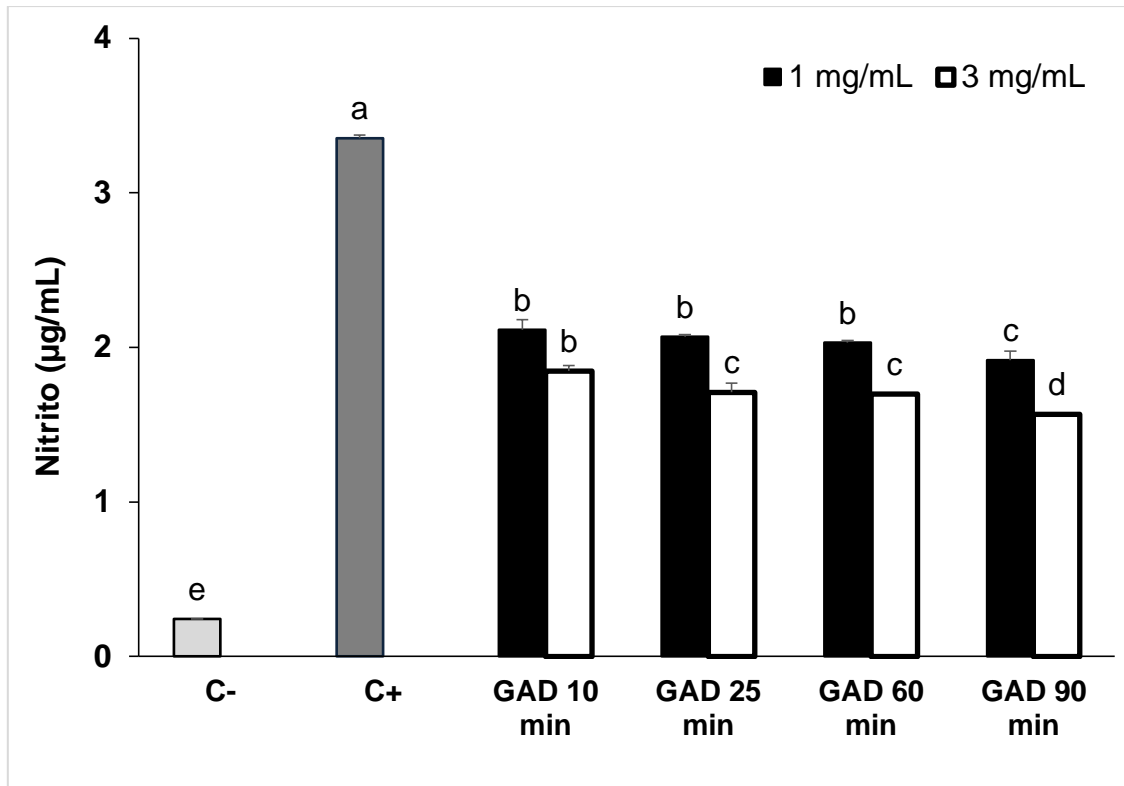


Fig. 8. Actividad anti-inflamatoria de péptidos de harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente *in vitro* a diferentes tiempos de digestión (GAD). Las células de macrófagos RAW 264.7 fueron tratadas con las muestras y posteriormente la respuesta inflamatoria fue inducida con 1 µg/mL LPS por 24 h. Las medias con letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El control positivo (C+) fueron células tratadas con LPS y el control negativo (C-) fueron células sin tratar con LPS.

digerida gastrointestinalmente *in vitro* a diferentes tiempos de digestión (GAD) en la producción de NO, en macrófagos estimulados con LPS. El LPS estimuló significativamente ($p < 0.05$) la producción de NO en los macrófagos de 0.24 (C-) a 3.35 $\mu\text{g/mL}$ (C+). Los macrófagos tratados con 1mg/mL de GAD a los tiempos 10, 25, 60 y 90 min redujeron significativamente ($p < 0.05$) la producción de NO (2.11, 2.07, 2.03 y 1.92 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) con respecto al control positivo (3.35 $\mu\text{g/mL}$) un 39 a 42 %. En el caso de los macrófagos tratados con 3 mg/mL de GAD a los tiempos 10, 25, 60 y 90 min, la producción de NO fue reducida significativamente ($p < 0.05$) con respecto al control positivo (44-53 %), presentando valores de 1.85, 1.71, 1.70, 1.57 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El tratamiento GAD 90 mostró un mayor efecto anti-inflamatorio ($p < 0.05$) en comparación con sus contrapartes GAD. Similar a lo informado anteriormente, esta muestra también mostró una mayor AAOX con una correlación positiva con el contenido de proteína soluble (Sandoval-Sicairos y col, 2020). En consecuencia, podría inferirse que GAD 90 contiene una mayor cantidad de péptidos que sus contrapartes. Sin embargo, durante la digestión también se liberaron compuestos fenólicos (Sandoval-Sicairos y col, 2020), por lo que los efectos biológicos podrían ser una sinergia entre los compuestos fenólicos y los péptidos. Para observar únicamente el efecto antioxidante y anti-inflamatorio de los péptidos de amaranto, los compuestos fenólicos se eliminaron de GAD 90 con una solución de metanol; después de eso, la muestra se fraccionó por ultrafiltración con membranas de 10 y 3 KDa para obtener las fracciones F₁, F₂ y F₃.

La **Fig. 9** muestra el efecto anti-inflamatorio *in vitro* de péptidos de GAD 90, GADW 90 y sus fracciones. La producción de NO se redujo significativamente ($p < 0.05$) en todas las muestras de amaranto en comparación con C+. Como se observa en la **Fig. 9**, las muestras de amaranto no tienen un efecto de respuesta a la dosis a las concentraciones evaluadas. Las diferencias entre los tratamientos fueron difíciles de observar a la dosis de 0.25 mg/mL, en

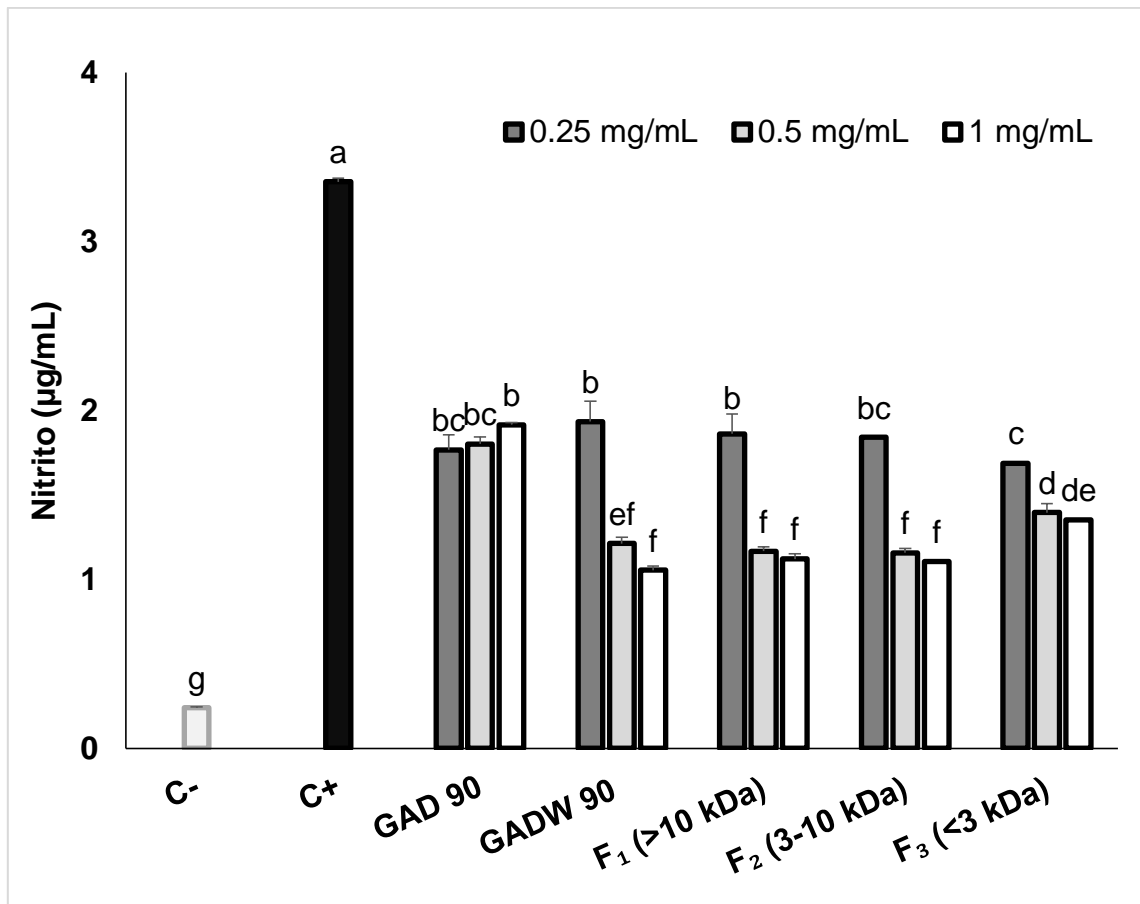


Fig. 9. Actividad anti-inflamatoria *in vitro* de péptidos de harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente GAD 90 y sus fracciones. Células de macrófagos RAW 264.7 fueron tratadas con muestras por 24 h y la respuesta inflamatoria fue inducida con 1 µg/mL de LPS por 24 h. Los valores representan las medias ± la desviación estándar de 6 réplicas (n=6). Medias con letras diferentes por cada dosis indica diferencia significativa (p<0.05). GAD: Harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente *in vitro*. GADW: Harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente *in vitro* lavada. El control positivo (C+) fueron células tratadas con LPS y el control negativo (C-) fueron células sin tratar con LPS.

contraste con las dosis de 0.5 o 1 mg/mL. Aunque F₁ y F₂ mostraron el mismo efecto a 1 y 0.5 mg/mL las muestras GADW 90, F₁ y F₂ (a 0.5 mg/mL) fueron las más eficaces para reducir ($p < 0.05$) la producción de NO en comparación con GAD 90. Esos resultados indican que los péptidos en amaranto tienen un mejor efecto anti-inflamatorio que su sinergia con compuestos fenólicos. Montoya-Rodríguez y col. (2015) observaron que los péptidos puros de la harina de amaranto extrudida tenían una mejor actividad biológica en comparación con otros estudios en los que esos péptidos estaban en un entorno sinérgico con otros compuestos. Además, la digestión de otros granos germinados necesita dosis más altas para obtener resultados anti-inflamatorios similares en macrófagos estimulados por LPS (González-Montoya y col, 2018; Milán-Noris y col, 2018). La reducción en la producción de NO podría deberse a la capacidad de los péptidos de amaranto formados durante la digestión para inhibir la expresión de enzimas responsables de su síntesis (iNOS y COX-2). Se presentaron resultados similares en hidrolizados de pepsina / pancreatina de amaranto sin procesar y extrudidos que redujeron la respuesta inflamatoria de los macrófagos humanos y de ratón estimulados con LPS, este efecto anti-inflamatorio puede explicarse por la capacidad de los péptidos presentes en los hidrolizados de amaranto para inhibir la señalización de la vía del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la expresión de iNOS y COX-2 (Montoya-Rodríguez y col, 2014a). Además, Moronta y col. (2016) informaron un posible efecto anti-inflamatorio de los péptidos de amaranto en las células epiteliales del colon, en el que su mecanismo podría estar relacionado con la modulación de la ruta NF- κ B.

D EFECTO DEL FRACCIONAMIENTO EN DIGERIDOS GASTROINTESTINALES DE HARINA DE AMARANTO GERMINADO SOBRE EL CONTENIDO DE PROTEINA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

1 Proteína soluble (PS)

En el **Cuadro 10** se presentan los valores de PS del digerido de harina de amaranto germinado digerido 180 min con pepsina + 90 min con pancreatina (GAD 90) y el lavado con metanol 80 % para retirar compuestos fenólicos (GADW 90); así como sus 3 fracciones F_1 (>10 KDa), F_2 (3-10 KDa) y F_3 (<3 KDa). Primeramente GAD 90 presentó un valor de PS de 130.78 mg/g y después del lavado GADW 90 presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) de 53.95 % con un valor de 60.22 mg/g, tal disminución podría ser debido al efecto del lavado con la solución de metanol al 80 %, en el cual se pudieron perder proteínas solubles. Las fracciones F_1 , F_2 y F_3 presentaron valores de 83.28, 129.34 y 70.34 mg/g, respectivamente. F_2 fue la fracción con mayor cantidad ($p < 0.05$) de PS con respecto a F_1 y F_3 ; sin embargo no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con GAD 90.

2 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Como se mencionó anteriormente el GADW 90 fue lavado con una solución de metanol al 80 % para remover los compuestos fenólicos como podemos observar en el **Cuadro 10**, donde el GAD 90 presenta un contenido de compuestos fenólicos de 374.23 mg EAG/100 g y después del lavado no se detectaron compuestos fenólicos en GADW 90 ni sus fracciones, lo cual nos indica que la solución metanólica efectivamente removi6 a trazas los CFT en las muestras consecuentes.

3 Actividad antioxidante (AAOX)

En cuanto a la AAOX (**Cuadro 10**), GAD 90 presentó la mayor actividad antioxidante estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con un valor de 74.00 mmol

Cuadro 10. Efecto del fraccionamiento de digeridos gastrointestinales de amaranto germinado en el contenido de proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante.

Muestra	PS (mg/g)	CFT (mg EAG/ 100 g)	AAOX (mmol ET/ 100 g)
GAD 90	130.78 ± 4.57 ^a	374.23 ± 28.13	74.00 ± 0.69 ^a
GADW 90	60.22 ± 5.28 ^c	<LDQ	13.60 ± 0.69 ^d
F ₁ (>10 KDa)	83.28 ± 4.17 ^b	<LDQ	16.26 ± 0.92 ^c
F ₂ (3-10 KDa)	129.34 ± 7.31 ^a	<LDQ	33.60 ± 0.80 ^b
F ₃ (<3 KDa)	70.34 ± 0.64 ^{bc}	<LDQ	14.40 ± 0.40 ^{cd}

GAD 90: Harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente (pepsina 180 min + pancreatina 90 min); GADW 90: Harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente (pepsina 180 min + pancreatina 90 min) y lavada. PS: Proteína soluble. CFT: Compuestos fenólicos totales. AAOX: Actividad antioxidante. EAG: Equivalentes de ácido gálico. ET: Equivalentes de trolox. <LDQ: Límite de cuantificación menor que 5 µg/mL. Los valores representan las medias ± la desviación estándar de 3 réplicas (n=3). Medias con letras diferentes por columna indican diferencia significativa (p<0.05).

ET/100g con respecto a GADW 90 y sus fracciones. La mayor AAOX de GAD 90 pudiera deberse a un efecto sinérgico entre péptidos y compuestos fenólicos, en comparación con la muestra lavada y sus fracciones. Con respecto a las fracciones, F₂ mostró la mayor eliminación de radicales peroxilo ($p < 0.05$) con un valor ORAC de 33.60 mmol ET/100g, en comparación con sus contrapartes (F₁ y F₃), lo que indica que su AAOX puede estar relacionada no solo con la mayor cantidad de PS sino también con las secuencias de los péptidos que confieren efecto antioxidante. La AAOX de los péptidos no solo está relacionada con su tamaño, sino también con su composición de aminoácidos, estructura y carácter hidrofóbico, que determina su mecanismo y eficiencia (Gallego y col, 2017; Vilcacundo y col, 2019). Algunos estudios han mostrado que los péptidos antioxidantes pueden ser eliminadores de radicales libres, quelantes de metales o inhibidores de la peroxidación lipídica (Orsini-Delgado y col, 2016; Gallego y col, 2017; Vilcacundo y col, 2019).

E CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE PÉPTIDOS LIBERADOS MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro* DE LA HARINA DE AMARANTO GERMINADO.

El perfil de péptidos en las fracciones de amaranto que contribuyen con su efecto anti-inflamatorio y antioxidante se presenta en el **Cuadro 11**. Además de las características anti-inflamatorias y antioxidantes de los péptidos de amaranto en el presente trabajo, algunas secuencias de estos péptidos se han asociado con actividades biológicas como inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa III (DPP-III), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), neuropéptido, estimulante de absorción de glucosa, entre otros (**Cuadro 11**). En investigaciones anteriores, la presencia de glutamina (Q) o poliglutamina en la

Cuadro 11. Péptidos bioactivos identificados por MS/MS en las fracciones (F₁-F₃), colectadas de la digestión gastrointestinal de harina de amaranto germinado (GADW 90).

Muestra	Secuencia peptídica	PM (Da)	Secuencia Bioactiva	Actividad*
F ₁	SPSS	376.15	SP, PS	Inhibidor de DPP-IV
	QDMK	520.23	QD, MK	Inhibidor de DPP-IV
	RFQDQHQ	957.44	RF, FQ	Inhibidor de ECA
			FQ, QD, QH	Inhibidor de DPP-IV
	AITGQVPRR	996.58	AI, TG, GQ, VP, PR, RR TG, QV, VP, RR GQ PR, RR	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Neuropéptido Inhibidor de DPP-III
F ₂	ISYNY	658.29	SY, YN	Inhibidor de ECA
			SY, YN	Inhibidor de DPP-IV
	GRFREF	810.41	GR, FR, RF	Inhibidor de ECA
			RF, FR	Inhibidor de DPP-III
			FR	Inhibidor de DPP-IV
	DIFAM	595.26	EF IF FA FA	Inhibidor de CaMPDE Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-III Inhibidor de DPP-IV
F ₃	PQQEHSGEHQ	1175.49	PQ, SG, GE PQ, QQ, QE, EH, HS, GE GE	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III
	GLLVSLIS	800.49	GL GL, LL, SL, LI LL, LV, LI	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Estimulante de absorción de glucosa

SEPGF	535.22	SE	Estimulante de liberación de sustancia vasoactiva
		EP, PF	Inhibidor de DPP-IV
		PF	Inhibidor de DPP-III
		FG	Inhibidor de ECA
SPSS	376.15	SP, PS	Inhibidor de DPP-IV

*La identificación de péptidos bioactivos se realizó usando la base de datos biopep: <http://www.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep> ECA: Enzima convertidora de angiotensina. DPP-IV: Dipeptidil peptidasa IV. DPP-III. Dipeptidil peptidasa III. CaMPDE: Fosfodiéster nucleótido cíclico dependiente de calmodulina.

secuencia de péptidos de trigo, soja y garbanzo, ha sido atribuido a su efecto anti-inflamatorio en los macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, reduciendo la producción de mediadores pro-inflamatorios a través de mecanismos que involucran la inhibición de la activación del factor NF- κ B (Lozano-Ojalvo y col, 2017; González-Montoya y col, 2018; Milán-Noris y col, 2018); en este estudio, las secuencias de péptidos de amaranto: QDMK, RFQDQHQ, AITGQVPRR y PQQEHSGEHQ, mostraron de 1 a 3 residuos de glutamina (**Cuadro 12**). Hay péptidos que suprimen la activación de los macrófagos inducida por LPS a través de la interacción con el propio LPS y la neutralización de su acción. Los péptidos antimicrobianos de defensa del huésped, que generalmente son pequeños (comúnmente 12-50 aminoácidos) catiónicos (carga neta de +2 a +7) y, con frecuencia, bastante hidrófobos y anfipáticos, interactúan con la superficie cargada negativamente del LPS suprimiendo así la liberación desencadenada de citoquinas pro-inflamatorias de macrófagos (López-Abarrategui y col, 2013; Lozano-Ojalvo y col, 2017); este podría ser el caso de los péptidos con carga positiva AITGQVPRR y GRFREF identificados en las fracciones F₁ y F₂ respectivamente (**Cuadro 12**). La actividad antioxidante de los péptidos de amaranto está determinada por su composición de aminoácidos. Según estudios previos, los aminoácidos con mayor AAOX son aquellos que contienen azufre (metionina y cisteína), aminoácidos aromáticos (triptófano y fenilalanina) e histidina, debido a su anillo de imidazol (Gallegos-Tintoré y col, 2013; Montoya-Rodríguez y col, 2014a).

El **Cuadro 12** muestra las propiedades fisicoquímicas de los principales péptidos encontrados en fracciones (F₁-F₃) de harina de amaranto germinada digerida (GADW 90) usando la herramienta PepDraw, que incluye secuencia de aminoácidos, masa molecular, carga neta, punto isoeléctrico e hidrofobicidad, también la estructura de estos péptidos se muestran en la **Fig. 10**. La mayoría de los péptidos antioxidantes reportados en la literatura, tienen una masa molecular entre 500 y 1800 Da (Gallegos-Tintoré y col, 2013; Vilcacundo y col,

Cuadro 12. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados en las fracciones (F₁-F₃) colectados de la digestión gastrointestinal de harina de amaranto germinado (GADW 90) usando la herramienta bioinformática PepDraw.

Fracción	Secuencia	Masa molecular (Daltons)	Punto isoeléctrico	Carga neta	Hidrofobicidad (Kcal/mol)
F ₁	SPSS	376.15	5.38	0	+9.42
	QDMK	520.23	6.47	0	+14.44
	RFQDQHQ	957.44	7.52	0	+16.28
	AITGQVPRR	996.58	12.49	+2	+12.75
F ₂	ISYNY	658.29	5.43	0	+6.67
	GRFREF	810.41	10.98	+1	+12.88
	DIFAM	595.26	3.02	-1	+8.54
F ₃	PQQEHSGEHQ	1175.49	5.06	-2	+23.88
	GLLVSLIS	800.49	5.46	0	+4.64
	SEPFQ	535.22	3.21	-1	+11.57
	SPSS	376.15	5.38	0	+9.42

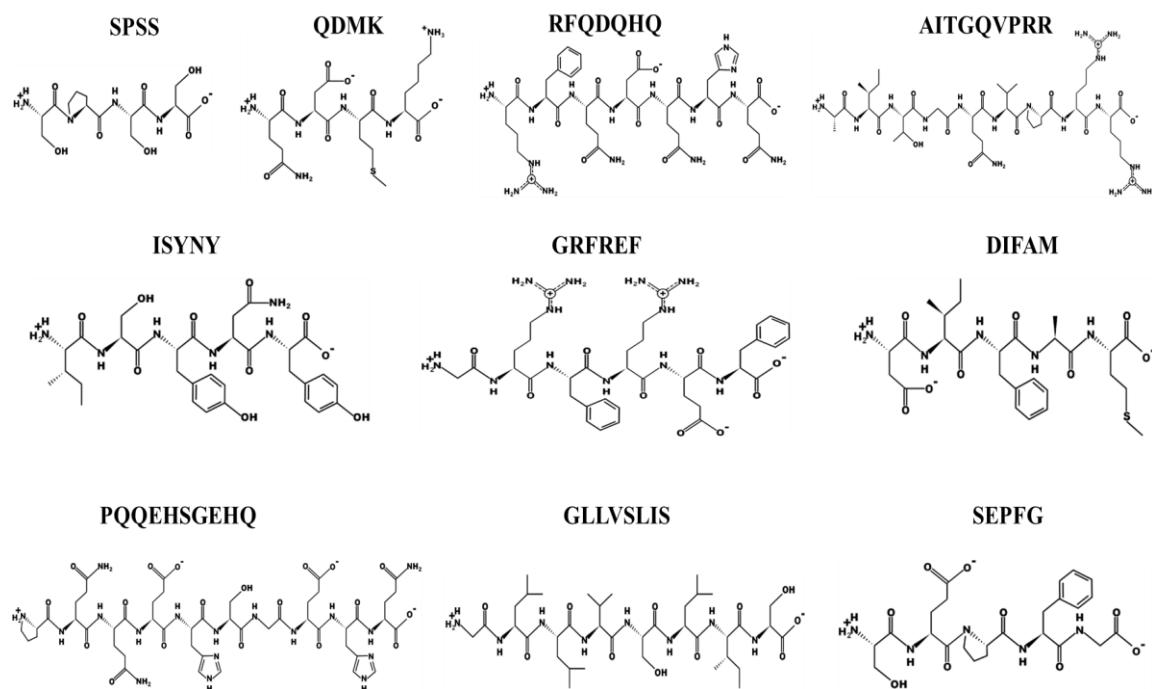


Fig. 10. Estructura de los péptidos identificados en las fracciones (F₁-F₃; ver cuadro 11) colectados de la digestión gastrointestinal de harina de amaranto germinado (GADW 90), usando la herramienta bioinformática PepDraw.

2019), similar al tamaño de los péptidos de amaranto en este estudio (**Cuadro 12**). Algunas secuencias de péptidos en esta investigación (RFQDQHQ, PQQEHSGEHQ y SEPFG) estaban dentro de las secuencias de péptidos previamente reportadas en *Amaranthus* spp con actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anti-trombótica (Montoya-Rodríguez y col, 2014a; Orsini-Delgado y col, 2016; Sabbione y col, 2016). También se ha reportado que los aminoácidos hidrofóbicos voluminosos en la región C-terminal, los aminoácidos polares / cargados en la posición C1, así como la baja propiedad electrónica en las posiciones N1, N2, contribuyen a la actividad antioxidante (Li y col, 2013; Vilcacundo y col, 2019). En este estudio, los péptidos que contienen aminoácidos voluminosos, y principalmente los péptidos que contienen tirosina (ISYNY) y fenilalanina (GRFREF) en la región C-terminal (**Fig. 10**), podrían contribuir con la mayor AAOX observada en los péptidos F₂; Además, también hay secuencias peptídicas con aminoácidos polares / cargados en la posición C1 (**Cuadro 12**).

F EFECTO DE LA GERMINACIÓN, CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS Y SIMULACIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE PROTEÍNAS, CONTENIDO Y BIOACCESIBILIDAD DE PROTEÍNA SOLUBLE, COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

1 Perfil proteínico por SDS-PAGE

En la **Fig. 11** se presenta el perfil proteínico de la harina de amaranto sin procesar (UAF), germinado (GAF), concentrado proteínico (GAFPC) y los digeridos del concentrado proteínico mediante simulación de digestión gastrointestinal *in vitro* con pepsina 90 min + pancreatina 60 min (GAFPC in y GAFPC out). En la **Fig. 11** se puede observar un patrón de bandeo diferente en GAF por efecto de la germinación con respecto a UAF como se discutió anteriormente (Sandoval-Sicairos y col, 2020). En GAFPC se observan las

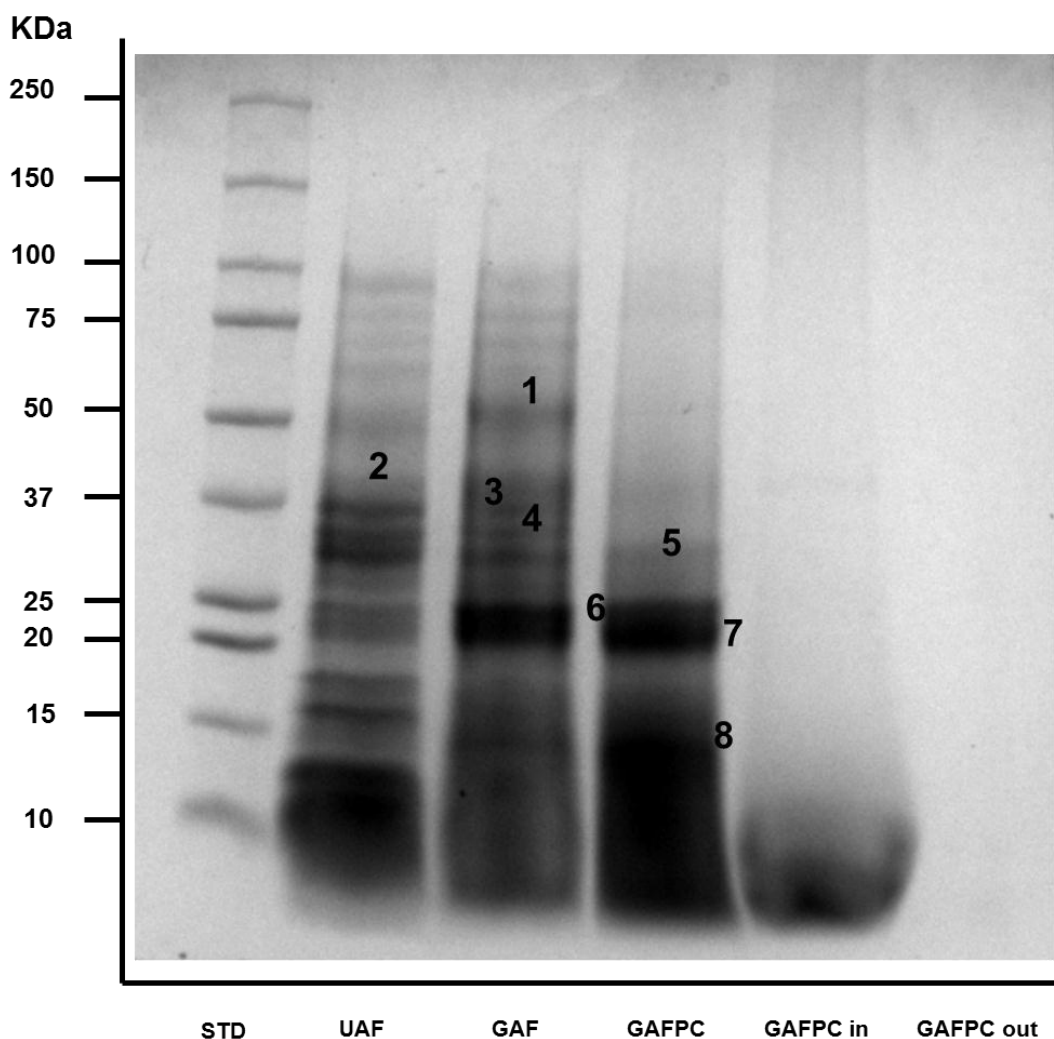


Fig. 11. Perfil proteínico electroforético (SDS-PAGE) de harina de amaranto sin procesar, germinado, concentrado proteínico e hidrolizados de concentrado proteínico mediante hidrólisis secuencial con pepsina 90 min + pancreatina 60 min. 1: Globulina 11S; 2: Glutelina; 3: Amarantina A1; 4: Globulina 7S; 5: Albúmina; 6: Prosistemina; 7: Dedos de Zinc RING; 8: Superóxido dismutasa [Cu-Zn]. STD: Estándar de peso molecular. UAF: Harina de amaranto sin procesar. GAF: Harina de amaranto germinado. GAFPC: Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado. GAFPC in: Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido (Insoluble). GAFPC out: Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido (Soluble).

bandas más concentradas entre <10 a 28 KDa, dentro de las cuales pudieran corresponder por sus pesos moleculares a albúminas, prosistemia, dedos de zinc RING y superóxido dismutasa [Cu-Zn] (Montoya-Rodríguez y col, 2015a). La digestión gastrointestinal simulada provocó que desaparecieran las bandas de alto peso molecular observándose la aparición de péptidos de tamaño menor a 10 KDa en GAFPC in y la desaparición completa de bandas en GAFPC out, lo cual podría ser debido a que la digestión fue completa y se obtuvieron péptidos mucho menor a 10 KDa lo cual sugiere que estas muestras podrían presentar potencial actividad antioxidante y anti-inflamatoria, ya que de acuerdo a estudios realizados por Vilcacundo y col. (2019) los péptidos pequeños (<5KDa) fueron los que presentaron mejor efecto antioxidante, así como los péptidos identificados por Montoya-Rodríguez y col. (2014a), también presentaron pesos moleculares pequeños en un rango de 527 a 2064 Da y mostraron un efecto antioxidante y anti-inflamatorio.

2 Proteína soluble (PS)

La germinación no presentó efecto significativo ($p>0.05$) en el contenido de PS ya que como podemos observar en el **Cuadro 13**, GAF presentó un valor de 92.8 mg/g y UAF 82.4 mg/g; sin embargo, cuando se realizó la concentración de proteínas de la harina de amaranto germinado (GAFPC), se incrementó significativamente ($p<0.05$) 490.5 % el contenido de PS (5.9 veces más) con respecto a GAF. Después de la digestión gastrointestinal simulada se presentó un incremento significativo ($p<0.05$) de PS en la fracción soluble del digerido (GAFPC out) con un valor de 611.3 mg/g, el cual fue 11.55 % mayor que el valor de GAFPC y 558.72 % mayor que el valor de GAF. La fracción insoluble del digerido (GAFPC in) presentó un valor de PS de 493.0 mg/g, el cual, presentó una disminución significativa ($p<0.05$) en el contenido de PS, con respecto al concentrado proteínico (GAFPC) y a la fracción soluble del digerido (GAFPC out), sin embargo presentó un incremento estadísticamente significativo ($p<0.05$) con respecto al de las harinas de amaranto sin digerir

Cuadro 13. Efecto de la germinación, concentración de proteínas y digestión, sobre el contenido de proteína soluble, fenólicos totales y actividad antioxidante.

Muestra	PS (mg/g)	CFT (mg EAG/100 g)	AAOX (mmol ET/100 g)
UAF	82.4±0.7 ^d	21.2±1.1 ^d	12.5±0.2 ^e
GAF	92.8±1.3 ^d	26.2±0.7 ^d	34.6±0.4 ^d
GAFPC	548.0±21.7 ^b	85.1±1.4 ^c	125.3±3.0 ^c
GAFPC in	493.0±8.6 ^c	373.0±7.9 ^b	216.0±4.0 ^b
GAFPC out	611.3±2.8 ^a	672.1±6.3 ^a	225.3±2.3 ^a

UAF: Harina de amaranto sin procesar. GAF: Harina de amaranto germinado. GAFPC: Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado. GAFPC in: Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido (Insoluble). GAFPC out: Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido (Soluble). EAG: Equivalentes de ácido gálico. ET: Equivalentes de Trolox. Los valores indican las medias ± la desviación estándar. Letras diferentes por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

(UAF y GAF). El incremento en la concentración de PS después de la digestión gastrointestinal simulada podría deberse a la generación de péptidos con masa molecular pequeña (Montoya-Rodríguez y col, 2014; Sandoval-Sicairos y col, 2020); en la **Fig. 11** se puede observar que efectivamente después de la digestión se observa la desaparición de las bandas de alto peso molecular, apreciándose una digestión completa. Diversos estudios han demostrado que después de la digestión de concentrados proteínicos de amaranto se incrementa la cantidad de PS. Tironi y Añón (2010) al hidrolizar concentrado proteínico de *A. mantegazzianus* observaron un incremento de 31.98 % de PS; Moronta y col. (2016), también observaron un incremento de PS de 38.60 % después de hidrolizar un concentrado proteínico de *A. hypochondriacus*.

3 Compuestos fenólicos totales (CFT)

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) incrementó un 23.58 % debido a la germinación como podemos observar en el **Cuadro 13**, sin embargo, UAF y GAF no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de CFT con valores de 21.2 y 26.2 mg EAG/100 g, respectivamente. Cuando se realizó la concentración de proteínas por precipitación isoeléctrica en GAF se presentó un incremento significativo ($p < 0.05$) de CFT con un valor de 85.1 mg EAG/ 100 g para GAFPC, es decir, un incremento del 224.80 % con respecto a GAF. Después de la digestión gastrointestinal simulada de GAFPC, se incrementó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de CFT 689.77 % en el digerido GAFPC out (soluble), presentando un valor de 672.1 mg EAG/100 g. Cabe destacar que la concentración de proteínas de la harina germinada en conjunto con la digestión gastrointestinal simulada produjeron un incremento de 2465.26 % de los CFT. El mayor contenido ($p < 0.05$) de CFT lo presentó GAFPC out, lo cual podría ser debido a la liberación de estos compuestos fitoquímicos de las proteínas por efecto de la digestión gastrointestinal simulada. Algunos autores atribuyen el incremento a la liberación de fitoquímicos debido a la acción proteolítica de las enzimas durante la germinación y la acción extensiva

de la enzima durante la hidrólisis o digestión, ya que esta puede modificar las uniones macronutrientes–fenólicos resultando en la liberación de estos compuestos (Acosta-Estrada y col, 2014; Sangsukiam y Duangmal, 2017; Pellegrini y col, 2017; Sandoval-Sicairos y col, 2020).

4 Actividad antioxidante (AAOX)

En el **Cuadro 13** podemos observar que el proceso de germinación produjo un incremento significativo ($p < 0.05$) de 176.8 % en la AAOX, con respecto a UAF. Tal incremento pudo ser debido a la producción de péptidos con AAOX por efecto de la proteólisis misma del efecto de germinación, así como también a la síntesis o liberación de compuestos fenólicos que pudieron generarse para el desarrollo de la nueva plántula por el efecto mismo de germinación y la liberación de estos compuestos que pudieron estar interaccionando con otros componentes como proteínas y fibra presentes en el grano; ya que se sabe que estos compuestos presentan actividad antioxidante (Perales-Sánchez y col, 2014; Sandoval-Sicairos y col, 2020). GAFPC presentó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante con un valor de 125.3 mmol ET/100g, es decir 262.13 % (3.62 veces) mayor que el de GAF. Después de la digestión gastrointestinal simulada se incrementó la AAOX de GAFPC in (insoluble) y GAFPC out (soluble) 1.72 y 1.79 veces más, respectivamente en comparación con GAFPC; mientras que con respecto a GAF, los digeridos GAFPC in y GAFPC out incrementaron 6.24 y 6.51 veces más, respectivamente. Es decir, la concentración de proteínas de la harina de amaranto germinado más la digestión gastrointestinal simulada provocaron un incremento del 551.15 % en la eliminación de radicales peróxido para GAFPC out. El incremento en la AAOX después de la digestión puede ser debido a un efecto sinérgico de la liberación de compuestos fenólicos y la generación de péptidos durante la digestión; estos últimos presentan diferentes características antioxidantes (Gallegos-Tintoré y col, 2013), la cual está determinada por su composición de aminoácidos. Además la AAOX mostró correlación positiva con

PS ($r=0.9116$, $p=0.0312$) y CFT ($r=0.8845$, $p=0.0463$) por lo que esta actividad está relacionada con el contenido de ambos compuestos bioactivos.

La mayor AAOX de GAFPC out podría ser debido a la relación no solo de la mayor cantidad de PS y CFT, sino también con las secuencias peptídicas que confieren efecto antioxidante. Algunos estudios han demostrado que el mecanismo y eficiencia de los péptidos antioxidantes está determinado no solo por su tamaño, sino también por la composición de sus aminoácidos, su estructura y carácter hidrofóbico (Gallego y col, 2017; Vilcacundo y col, 2019).

Orsini-Delgado y col. (2016); Gallego y col. (2017) y Vilcacundo y col. (2019), mostraron en sus investigaciones que la forma en que actúan los péptidos antioxidantes es eliminando radicales libres, quelando metales o inhibiendo la peroxidación lipídica.

5 Bioaccesibilidad

La digestibilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes son estudiadas para obtener información acerca de los factores que pueden influenciar en la absorción de nutrientes. La biodisponibilidad es definida como la cantidad de un nutriente ingerido que se absorbe y está disponible para funciones fisiológicas, depende de la digestión, la liberación de la matriz alimentaria, la absorción por las células intestinales y el transporte a las células del cuerpo. A su vez, la bioaccesibilidad es la cantidad de un nutriente ingerido que está potencialmente disponible para la absorción, por lo que depende solo de la digestión y la liberación de la matriz alimentaria (Ortega y col, 2011; Coehlo y col, 2018; Ketnawa y col, 2020). La absorción intestinal de nutrientes y compuestos bioactivos (por ejemplo, compuestos fenólicos y péptidos) ocurre en diferentes cantidades y depende de la matriz alimentaria. Cuando alcanzan el torrente sanguíneo, los metabolitos de estos compuestos se unen a las proteínas plasmáticas (por ejemplo, la albúmina), que transportan estas sustancias (Halliwell y col, 2005; Coehlo y col, 2018).

Después de la digestión gastrointestinal simulada de GAFPC se presentó el 201.6 % de recuperación del contenido de PS (**Cuadro 14**) en el digerido total (GAFPC in + out), esta cantidad de PS presentó un 55.3 % de bioaccesibilidad, es decir el porcentaje de péptidos que podrían absorberse en la circulación sistémica (Ortega y col, 2011; Ketnawa y col, 2020). El índice de recuperación de CFT (**Cuadro 14**) después de la digestión gastrointestinal de GAFPC fue de 1227.3 %, lo cual indica la cantidad de CFT presentes en el digerido completo (GAFPC in + out), de estos CFT liberados el 64.3 % podrían llegar a estar disponibles para absorción en la circulación sistémica. Después de la digestión gastrointestinal simulada de GAFPC se obtuvo un índice de recuperación (**Cuadro 14**) de 352.1 % en la AAOX y el 51.0 % de bioaccesibilidad, además la estabilidad de la AAOX durante el proceso de digestión fue de 179.8 %. De manera general, la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* liberó los péptidos y compuestos fenólicos presentes en la matriz del concentrado proteínico de amaranto germinado, favoreciendo que estos incrementaran la actividad antioxidante y anti-inflamatoria, mostrando una buena recuperación y bioaccesibilidad de estos compuestos bioactivos, lo cual indica que estos compuestos están disponibles para la absorción. Otros estudios han simulado la digestión gastrointestinal observando que los digeridos de amaranto aumentaron la capacidad de eliminación de radicales peróxido, radicales hidroxilo y peroxinitrito (Orsini-Delgado y col, 2016; Sandoval-Sicairos y col, 2020). Sabbione y col. (2016), evaluaron la actividad antitrombótica potencial de aislados de proteína de amaranto sometidos a digestión gastrointestinal simulada. Observando que una fracción de la proteína de amaranto obtenida por tratamiento enzimático mostró una mayor actividad antitrombótica que la proteína original de amaranto. Además, se estudió la absorción *in vitro* a través del epitelio intestinal (es decir, células Caco-2-TC7) de esta fracción de proteína activa y se observó que algunos péptidos pueden atravesar la monocapa celular.

Cuadro 14. Índices de recuperación y bioaccesibilidad en proteína soluble, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido gastrointestinalmente *in vitro*, así como la actividad residual de la actividad antioxidante.

Variable	IR %	IB %	AR %
Proteína soluble	201.6±5.9	55.3±0.3	N.A
Compuestos fenólicos totales	1227.3±3.9	64.31±0.2	N.A
Actividad antioxidante	352.19±3.53	51.0±0.2	179.8±2.5

IR: Índice de recuperación. IB: Índice de bioaccesibilidad. AR: Actividad residual. N.A: No aplica.

G EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE LOS PÉPTIDOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS LIBERADOS MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro* DEL CONCENTRADO PROTEÍNICÓ DE AMARANTO GERMINADO.

1 Viabilidad celular

La harina de amaranto sin procesar (UAF), germinado (GAF), concentrado proteínico de harina de amaranto germinado (GAFPC), y los concentrados proteínicos de harina de amaranto digerido insoluble y soluble (GAFPC in y GAFPC out, respectivamente) fueron evaluadas para citotoxicidad a la concentración más alta probada de 1mg/mL para el efecto de los péptidos y 0.5 mg/mL para el efecto de los extractos metanólicos. Ninguna de las muestras para efecto de los péptidos redujo la viabilidad celular por debajo del 80 % con respecto al control, por lo tanto estas muestras no se consideraron citotóxicas a la concentración de 1 mg/mL. Para efecto de los fenólicos ninguna muestra presentó viabilidad celular por debajo del 94 % con respecto al control (0.5 mg/mL).

2 Actividad anti-inflamatoria

En la **Fig. 12** se muestra el efecto anti-inflamatorio de los péptidos de los digeridos de GAFPC insoluble y soluble (GAFPC in y GAFPC out, respectivamente), así como sus fracciones F1 (>10 KDa) y F2 (<10 KDa). De manera general todos los tratamientos de GAFPC in y GAFPC out presentaron porcentajes de inhibición muy buenos en un rango de 40.00 a 87.03 % con dosis de 0.25 a 1 mg/mL. El tratamiento que presentó el mayor porcentaje de inhibición en la producción de NO estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos y a las diferentes dosis, fue la fracción F1 de GAFPC in con valores de inhibición de 54.90, 64.93 y 87.03 % para las dosis 0.25, 0.5 y 1 mg/mL, respectivamente. El tratamiento Digerido de GAFPC in le sigue en mejor porcentaje de inhibición al F1 de GAFPC in con valores de

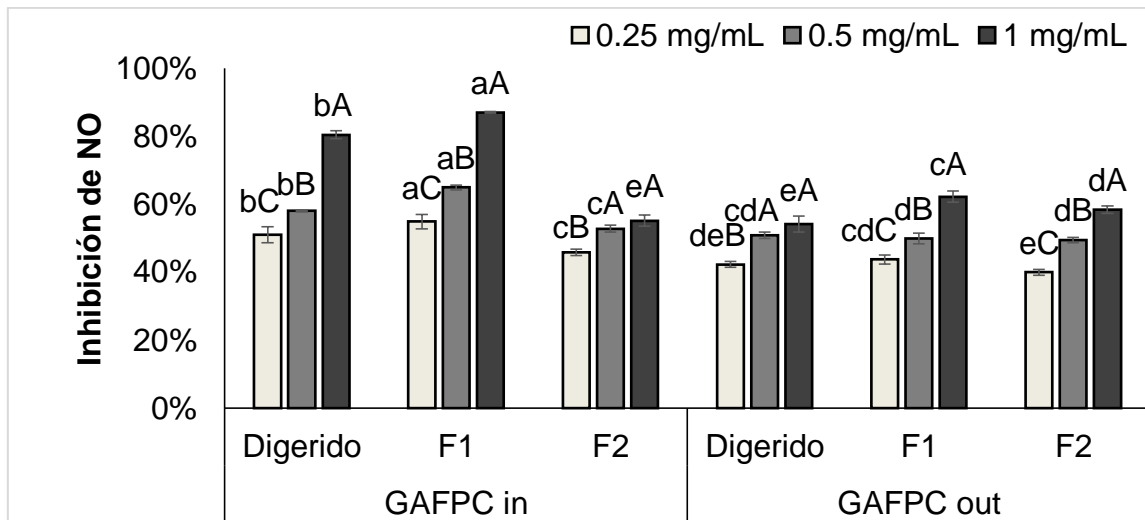


Fig. 12. Efecto anti-inflamatorio de los péptidos del concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido insoluble y soluble (GAFPC in y out, respectivamente). Las barras representan la media \pm la desviación estándar de 6 réplicas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para una misma dosis. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre dosis para un mismo tratamiento.

50.99, 58.03 y 80.45 % a 0.25, 0.5 y 1 mg/mL, respectivamente. A la dosis máxima probada (1 mg/mL), los tratamientos que presentaron el menor % de inhibición estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos, fueron la fracción F2 de GAFPC in (55.17 %) y el digerido de GAFPC out (54.2 %), sin embargo estos no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos. El tratamiento de GAFPC out a 1 mg/mL que presentó el mayor % de inhibición estadísticamente significativo ($p < 0.05$) fue F1 (62.23 %), seguido de F2 (58.43 %) y finalmente el Digerido (54.2 %). Estas inhibiciones en la producción de NO en macrófagos de ratón RAW 264.7 inducidos con LPS podría ser atribuida a los péptidos liberados durante la digestión gastrointestinal simulada del concentrado proteínico. Montoya-Rodríguez y col. (2014) observaron que los péptidos derivados de la digestión *in vitro* de amaranto sin procesar y extrudido presentaron actividad anti-inflamatoria. Milán-Noris y col. (2018) digirieron *in vitro* un concentrado proteínico de garbanzo germinado y observaron que los péptidos también presentaban efecto anti-inflamatorio, además estos péptidos podrían ser benéficos para mantener la salud en el intestino, debido a que ellos trabajaron con la fracción de péptidos insolubles, en nuestro trabajo la fracción insoluble (GAFPC in) fue la que presentó el mejor efecto anti-inflamatorio, por lo tanto también podría presentar el efecto benéfico al intestino, sin embargo, estudios *in vivo* serían necesarios para probar tal efecto.

Además del efecto de los péptidos, también se analizaron los extractos metanólicos (80 % v/v) para estudiar el efecto anti-inflamatorio de los compuestos fenólicos de las muestras UAF, GAF, GAFPC, GAFPC in y GAFPC out; estos resultados los podemos observar en la **Fig. 13**. De manera general, a la dosis de 0.5 mg/mL los extractos metanólicos mostraron una inhibición en la producción de NO de 42.03 a 80.76 %. Como se observa en la **Fig. 13**, las muestras de amaranto no presentaron un efecto de respuesta a la dosis a las concentraciones evaluadas. A la dosis de 0.25 mg/mL la germinación no

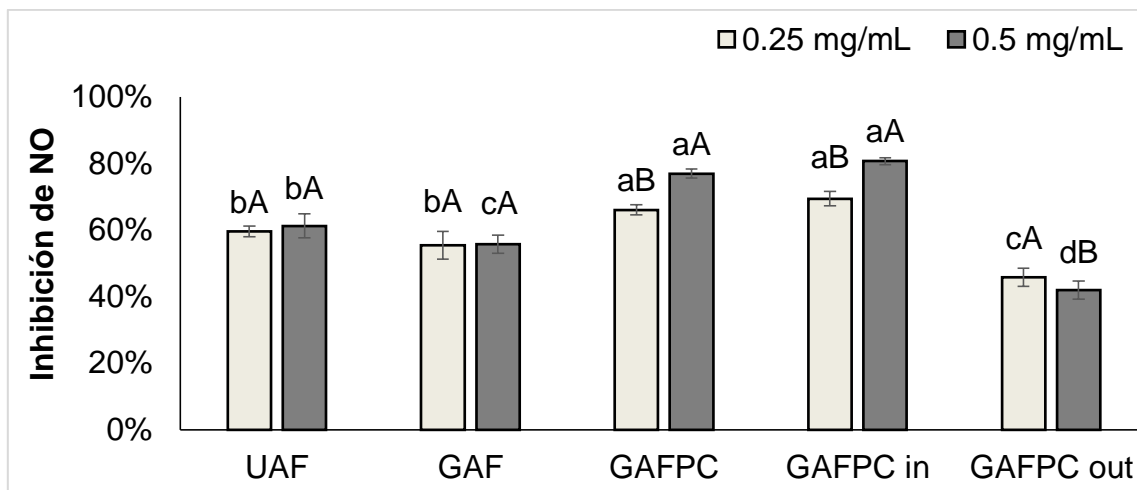


Fig. 13. Efecto anti-inflamatorio de los compuestos fenólicos de la harina de amaranto sin procesar (UAF); germinado (GAF); concentrado proteínico de harina de amaranto germinado (GAFPC); concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido insoluble y soluble (GAFPC in y GAFPC out, respectivamente). Las barras representan la desviación estándar de 6 réplicas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por tratamientos (para una misma dosis). Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) por dosis entre tratamiento.

presentó efecto significativo ($p > 0.05$) en el porcentaje de inhibición de NO, ya que el extracto de GAF presentó un porcentaje de inhibición de 55.45 %, y el de UAF 59.56 %. El concentrado proteínico de la harina de amaranto germinado (GAFPC) presentó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el % de inhibición (66.09 %) con respecto al de GAF; la digestión de GAFPC disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de inhibición de GAFPC out (45.83 %), sin embargo GAFPC in (69.45 %) no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a GAFPC. A la dosis de 0.5 mg/mL los tratamientos que presentaron la mayor inhibición de producción de NO estadísticamente significativa ($p < 0.05$) fueron GAFPC y GAFPC in con valores de 76.99 y 86.72 %, respectivamente; sin embargo no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos. Comparado con las muestras peptídicas, los compuestos fenólicos presentaron un mejor efecto en GAFPC in, ya que a la dosis de 0.5 mg/mL la muestra peptídica presentó una inhibición de 58.03 % y la de compuestos fenólicos 80.76 %; lo contrario sucedió a la misma dosis para las muestras de GAFPC out, en la cual presentaron mejor efecto los péptidos ya que estos mostraron un 50.83 % de inhibición, en comparación con 42.03 % de los compuestos fenólicos. En la literatura, no se encontraron estudios con extractos metanólicos de granos de *A. hypochondriacus* para evaluar su actividad anti-inflamatoria. Tyska-Czochara y col. (2016) observaron que extractos metanólicos de granos de *Amaranthus cruentus* sin procesar y germinados (0.01mg/mL), prevenían la translocación de NF- κ B al núcleo de células RAW 264.7 y presentaban efecto anti-inflamatorio por una disminución significativa de interleucina-6 (IL-6), citosina pro-inflamatoria. Liberal y col. (2016), evaluaron extractos metanólicos de flores de amaranto globo (*Gomphrena*) de variedades roja y rosa, y también observaron una inhibición en la producción de NO en macrófagos RAW 264.7 alrededor del 80 % con dosis de 0.4mg/mL, similar a la observada en el presente estudio para GAFPC in con 0.5 mg/mL de extracto metanólico. A pesar de que el contenido de PS y CFT

fue mayor en GAFPC out, los péptidos y compuestos fenólicos presentes en la fracción GAFPC in podrían ser empleados para estudios de inflamación en colon, tal como lo hicieron Milán-Noris y col. (2018), quienes también observaron un efecto anti-inflamatorio en extractos metanólicos de la fracción insoluble de hidrolizados de concentrado proteínico de garbanzo germinado. El mecanismo involucrado en estos efectos fue atribuido a una reducción en la expresión de la enzima iNOS responsable de la síntesis de NO.

H CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS PÉPTIDOS, LIBERADOS MEDIANTE LA SIMULACIÓN DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro* DEL CONCENTRADO PROTEÍNIC DE AMARANTO GERMINADO.

En el **Cuadro 15** se presentan las secuencias de aminoácidos de los péptidos presentes en las fracciones F1 y F2 de GAFPC in y GAFPC out que contribuyeron a su efecto anti-inflamatorio y antioxidante, las cuales fueron identificadas por MS/MS y análisis bioinformático. Algunas secuencias de estos péptidos han sido asociadas a actividades biológicas como inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa III (DPP-III), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), neuropéptidos, estimulantes de captación de glucosa, antioxidantes, antitrombóticos, estimulantes de liberación de sustancia vasoactiva, entre otros (**Cuadro 15**). Como se mencionó anteriormente, algunos autores observaron en sus investigaciones que los péptidos de proteínas de trigo, soya y garbanzo que contienen glutamina (Q) o poli-glutamina en su secuencia, presentaron efecto anti-inflamatorio en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, reduciendo la producción de mediadores pro-inflamatorios a través de mecanismos que envuelven la inhibición de la activación del NF- κ B (Lozano-Ojalvo y López-Fandiño 2017; González-Montoya y col, 2018 y Milán-Noris y col, 2018); En nuestro estudio, los péptidos que presentan en su secuencia residuos de Q son: WDSNEQ, GTGERQ, GQSVFDEEL y IREQGS (**Cuadro 15**), la mayoría de

Cuadro 15. Péptidos bioactivos identificados por MS/MS en una digestión con pepsina/pancreatina de concentrado proteínico de harina de amaranto germinado.

Muestra	Secuencia peptídica	PM (Da)	Secuencia Bioactiva	Actividad*
GAFPC in F1	GLKPGLHG	777.44	GL, LKP, KP, PGL, PG, GL, HG GL, KP, PG, GL, LH LKP, LK, KP, LH PG PG PG	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Antioxidante Antitrombótico Inhibidor de PEP Regulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago
	WDSNEQ	777.29	WD, NE	Inhibidor de DPP-IV
	VFFPFM	786.37	VF, FP VF, FP PF, FM	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III
	LLFVLFN	864.50	LLF, LF LL, VL, FN LL, VL	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Estimulante de captación de glucosa
	LDKNF	635.32	NF NF	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV
	GTGERQ	646.30	GTG, GT, TG, GE TG, GE GE	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III
	RPRY	590.32	RP, PR, PRY, RY RP PR	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III
	SPSS	376.15	SP, PS	Inhibidor de DPP-IV

GAFPC in F2	HHEKGGD	778.33	HH HH, HE, EK, KG, GG EK, KG, GG, GD	Antioxidante Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de ECA
	LDKNFPTR	989.52	NF, PT, FP NF, FP, PT, TR	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV
	WHPGG	552.24	WHP, HP, PG, GG WH, HP, PG, GG HP PG PG PG	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III Antitrombótico Inhibidor de PEP Regulador de la actividad de la membrana mucosa del estómago
GAFPC out F1	GQSVFDEEL	1022.45	GQ GQ, VF QS, SV, VF DEE EE	Neuropéptido Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Antitrombótico Estimulante de liberación de sustancia vasoactiva
	IARLFA	689.42	EL IA, AR, RL, LF IA, RL, FA FA	Antioxidante Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III
	PFPWPWYS	1078.48	PFP, FP PF,FP, PW, WY, YS PF PW, WY, WYS	Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de DPP-III Antioxidante

GAFPC out F2	NDPR	500.23	ND, DP PR PR	Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-III
	FTKPYKIPN	1106.61	FT TK, KP, PY, YK, KI, IP, PN KP, YK, IP KP YK	Inhibidor de Renina Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de ECA Antioxidante Inhibidor de DPP-III
	IREQGS	688.34	IR, QG, GS IR IR IR	Inhibidor de ECA Antioxidante Inhibidor de Renina Inhibidor de CaMPDE
	DALLDS	632.30	IR, QG DA DA AL, LL LL	Inhibidor de DPP-IV Inhibidor de ECA Inhibidor de DPP-III Inhibidor de DPP-IV Estimulante de captación de glucosa

*La identificación de péptidos bioactivos se realizó usando la base de datos biopep:

<http://www.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>

ECA: Enzima convertidora de angiotensina. DPP-IV: Dipeptidil peptidasa IV. DPP-III. Dipeptidil peptidasa III.

CaMPDE: Fosfodiéster nucleótido cíclico dependiente de calmodulina. PEP: Propil endopeptidasa.

ellos presentes en la muestra F1 de GAFPC in, la cual fue la fracción que presentó el mejor efecto anti-inflamatorio. Por otra parte, existen péptidos antimicrobianos que suprimen la activación de los macrófagos inducida por LPS, a través de la interacción con el propio LPS y la neutralización de su acción, debido a que estos péptidos son generalmente pequeños, catiónicos (+2 a +7), hidrofóbicos y anfipáticos; esto hace que interactúen con la superficie del LPS cargada negativamente, suprimiendo así la liberación desencadenada de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos (López-Abarrategui y col, 2013; Lozano-Ojalvo y col, 2017); cómo podemos observar en el **Cuadro 16** se presentan péptidos con carga positiva que también pudieran ser los responsables de la actividad anti-inflamatoria.

Según estudios previos, la actividad antioxidante de los péptidos está determinada por su composición de aminoácidos; de los cuales, los que presentan mayor AAOX son los azufrados (metionina y cisteína), aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina), e histidina, atribuida a su anillo de imidazol; cualquiera de estos aminoácidos puede estar al principio, en el medio o al final en la secuencia del péptido (Gallegos-Tintoré y col, 2013; Montoya-Rodríguez y col, 2014a); la mayoría de los péptidos identificados en este estudio contienen estos aminoácidos que pudieran ser los responsables de su AAOX. La mayoría de los péptidos reportados en la literatura que presentan actividad antioxidante, tienen una masa molecular entre 500 y 1800 Da (Gallegos-Tintoré y col, 2013; Vilcacundo y col, 2019), lo cual coincide con el tamaño de los péptidos identificados en este estudio como podemos observar en el **Cuadro 16**; además en este cuadro se muestran las propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados en las fracciones F1 y F2 de GAFPC in y out obtenidas usando la herramienta PepDraw, de la cual también se obtuvo la estructura de estos péptidos (**Fig. 14 y 15**).

Algunas secuencias de péptidos identificadas en esta investigación (WDSNEQ, LLFVLFN, RPRY, WHPGG, GQSVFDEEL, PFPWPWYS y NDPR)

Cuadro 16. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos identificados en las fracciones de GAFPC in y out usando la herramienta bioinformática pepDraw.

Muestra	Secuencia	Masa molecular (Daltons)	Punto isoelectrico	Carga neta	Hidrofobicidad (Kcal/mol)
GAFPC in F1	GLKPGLHG	777.45	10.16	+1	+14.12
	WDSNEQ	777.29	2.91	-2	+15.16
	VFFPFM	786.38	5.40	0	+1.78
	LLFVLFN	864.51	5.41	0	+1.12
	LDKNF	635.33	6.71	0	+12.23
	GTGERQ	646.30	6.86	0	+16.66
	RPRY	590.33	11.14	+2	+10.95
	SPSS	376.16	5.38	0	+9.42
GAFPC in F2	HHEKGGD	778.33	6.06	-1	+24.93
	LDKNFPTR	989.53	10.14	+1	+14.43
	WHPGG	552.24	7.72	0	+10.58
GAFPC out F1	GQSVFDEEL	1022.45	2.90	-3	+17.76
	IARLFA	689.42	11.12	+1	+6.63
	PFPWPWYS	1078.49	5.47	0	+2.18
GAFPC out F2	NDPR	500.23	6.29	0	+14.34
	FTKPYKIPN	1106.61	10.16	+2	+11.34
	IREQGS	688.35	6.85	0	+14.60
	DALLDS	632.30	2.88	-2	+13.64

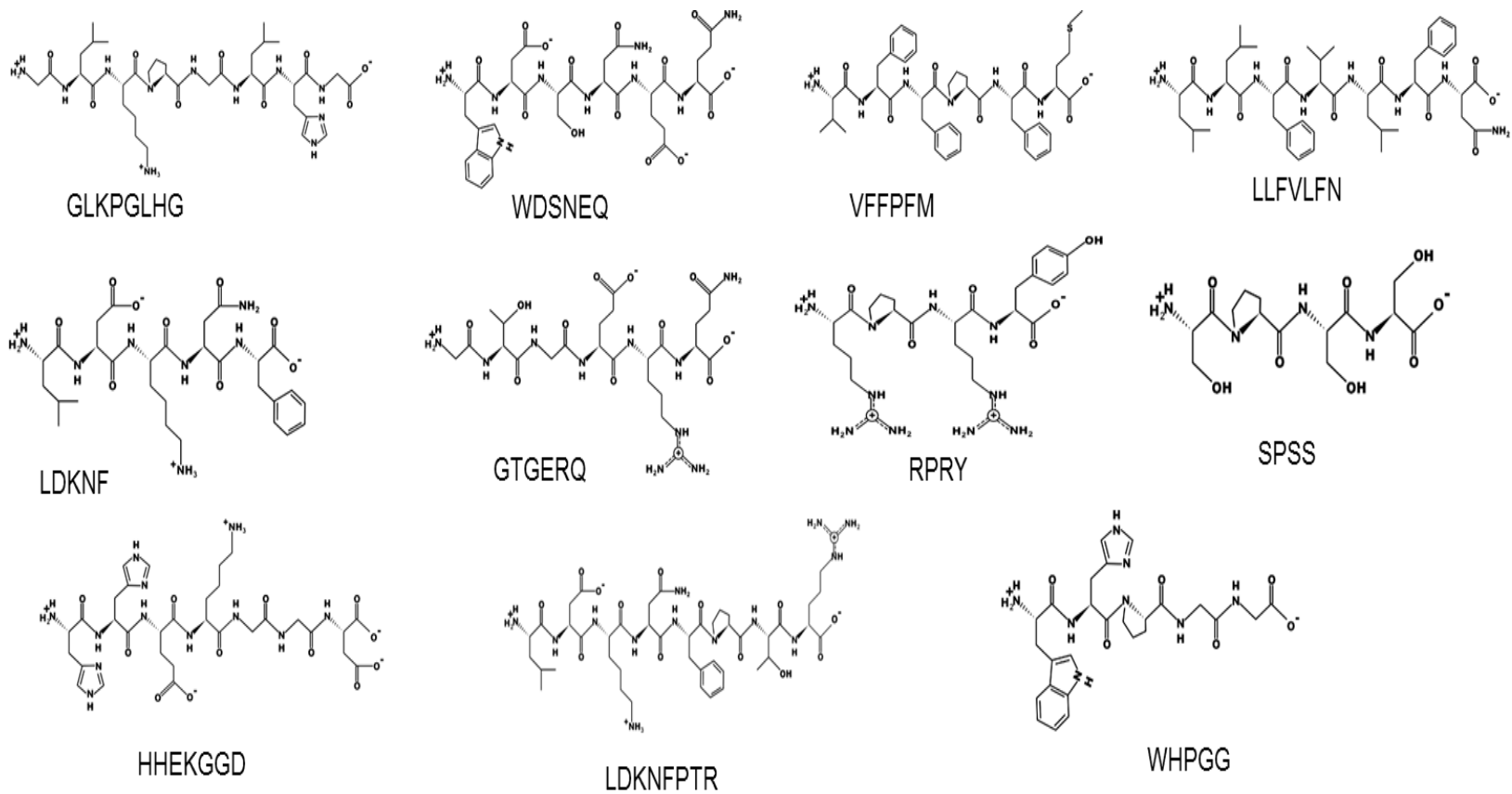


Fig. 14. Estructura de los péptidos identificados en las fracciones F1 y F2 de GAFPC in (ver **cuadro 15**), usando la herramienta bioinformática PepDraw.

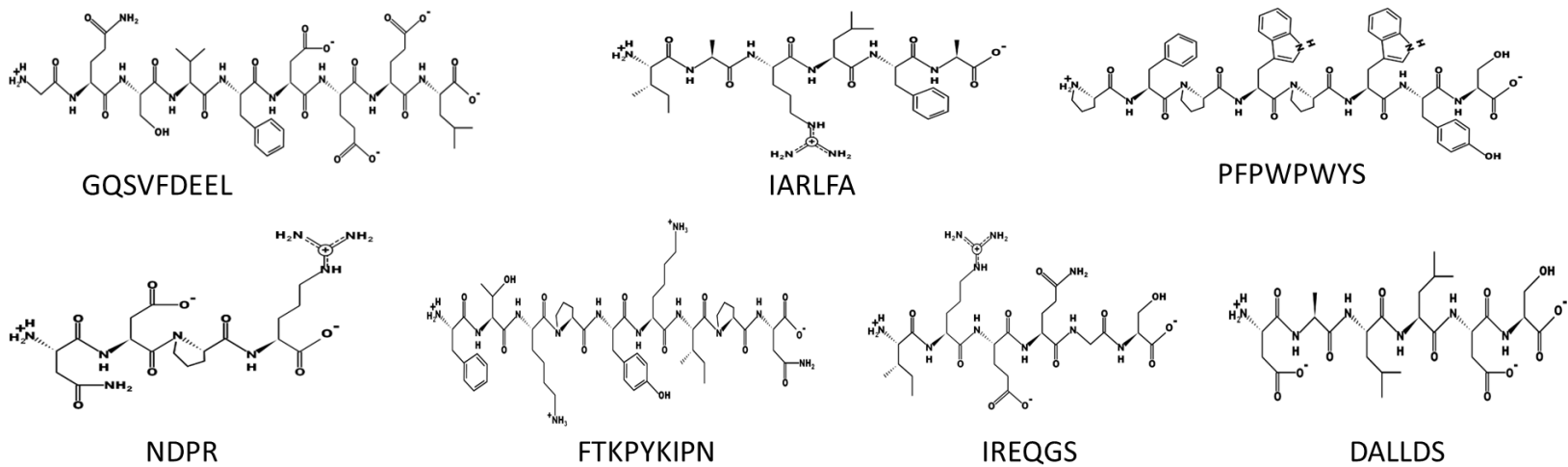


Fig. 15. Estructura de los péptidos identificados en las fracciones F1 y F2 de GAFPC out (ver **cuadro 15**), usando la herramienta bioinformática PepDraw.

se encuentran dentro de las secuencias de péptidos previamente reportadas en *Amaranthus* spp con actividad antioxidante, anti-inflamatoria, anti-trombótica, anti-diabética y anti-hipertensiva (Velarde-Salcedo y col, 2013; Montoya-Rodríguez y col, 2014a; Orsini-Delgado y col, 2016; Sabbione y col, 2016; Vilcacundo y col, 2019).

IX CONCLUSIONES

1. El proceso de germinación bajo condiciones optimizadas de temperatura y tiempo resultó ser una estrategia efectiva para mejorar la calidad de la harina de amaranto, debido a que provocó un incremento significativo ($p < 0.05$) en el contenido de PS, CFT y la AAOX en un 37.5 %, 17.2 % y 54.3 %, respectivamente. Además la germinación también modificó el perfil proteínico de UAF, observándose en GAF una débil proteólisis.
2. La simulación de digestión gastrointestinal secuencial provocó la liberación de péptidos de masa molecular $< 10\text{KDa}$; a los 205 min de digestión se presentó el mayor incremento de %GH para UAD (73.4 %) y GAD (60.3 %), también a este tiempo de digestión se produjo un incremento máximo de PS de 70.2 % y 41.3 % para UAD y GAD, respectivamente. Los CFT presentaron un incremento al final de la digestión gastrointestinal secuencial de 658 % y 883 % para UAD y GAD, respectivamente. La AAOX también se incrementó a medida que incrementaba el tiempo de digestión gastrointestinal simulada presentando un incremento máximo a los 270 min con un incremento del 136.4 % y 103.4 % para UAD y GAD, respectivamente.
3. Los péptidos generados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de harina de amaranto germinado presentaron potencial actividad biológica como antioxidantes y anti-inflamatorios, observándose un mejor efecto de estos que su sinergia con los CFT. Además estos péptidos no presentaron citotoxicidad a la dosis máxima probada de 1 mg/mL.
4. Los péptidos identificados en F_1 de GADW 90 (SPSS, QDMK, RFQDQHQ y AITGQVPRR) y F_2 de GADW 90 (ISYNY, GRFREF y DIFAM) presentaron el mejor efecto anti-inflamatorio (65 % inhibición de NO) a 0.5 mg/mL, además los de F_2 de GADW 90 también mostraron el mejor efecto antioxidante. Los péptidos liberados mediante la digestión gastrointestinal *in vitro* de harina de amaranto germinado podrían tener un efecto multifuncional, ya que además del potencial efecto antioxidante y anti-inflamatorio presentado,

algunas secuencias de estos péptidos se han asociado con actividades biológicas como inhibidores de las enzimas DPP-III, DPP-IV y ECA, como neuropéptidos, antitrombóticos, entre otros.

5. Los péptidos y CFT generados durante la digestión gastrointestinal *in vitro* del concentrado proteínico de amaranto germinado presentaron potencial actividad biológica como antioxidantes y anti-inflamatorios. Cabe destacar que la concentración de proteínas en la harina de amaranto germinada más la digestión gastrointestinal *in vitro* produjeron un incremento de 551.15 % en la AAOX de la fracción soluble (out). De manera general los péptidos de GAFPC in y out presentaron una inhibición de NO del 40-87 % con dosis de 0.25-1 mg/mL y los CFT presentaron de 42-80 % con dosis de 0.5 mg/mL.

6. Los péptidos identificados en F1 de GAFPC in (GLKPGLHG, WDSNEQ, VFFPFM, LLFVLFN, LDKNF, GTGERQ, RPRY y SPSS) presentaron el mejor efecto anti-inflamatorio (87% inhibición de NO a 1mg/mL) y los identificados en GAFPC out (GQSVFDEEL, IARLFA, PFPWPWYS, NDPR, FTKPYKIPN, IREQGS y DALLDS) presentaron el mejor efecto antioxidante. Los péptidos liberados mediante la digestión gastrointestinal *in vitro* del concentrado proteínico de la harina de amaranto germinado podrían tener un efecto multifuncional, ya que además del potencial efecto antioxidante y anti-inflamatorio presentado, algunas secuencias de estos péptidos se han asociado con actividades biológicas como inhibidores de las enzimas DPP-III, DPP-IV y ECA, como neuropéptidos, antitrombóticos, entre otros.

7. De manera general el proceso de germinación en conjunto con la concentración de proteínas más la digestión gastrointestinal *in vitro* mejora el potencial del amaranto como ingrediente en el desarrollo de alimentos funcionales con potencial actividad antioxidante y anti-inflamatoria.

X BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152: 46-55.
- Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 27(6):1256-1262.
- Aguayo-Rojas J, Mora-Rochín S, Cuevas-Rodríguez EO, Serna-Saldivar SO, Gutiérrez-Urbe JA, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2012. Phytochemicals and antioxidant capacity of tortillas obtained after lime cooking extrusion process of whole pigmented mexican maize. *Plant Foods Human Nutrition*, 67(2):178-185.
- Alvarez-Jubete L, Arendt EK, Gallagher E. 2010b. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Food Science and Technology*, 21:106–13.
- Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt EK, Gallagher E. 2010a. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*, 119: 770–778.
- Aphalo P, Martínez EN, Añón MC. 2015. Amaranth sprouts: a potential health promoting and nutritive natural food. *International Journal of Food Properties*, 18:2688-2698.
- Arellano MI, Florentino CI, Guerra MF, Iribarren M and Torresani, ME. 2007. Seeds in human diet. *Actualización en Nutrición*, 8(3):144-161.
- Argüelles-López OD. 2020. Impacto de la germinación sobre la toxicidad y propiedades biológicas de compuestos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma de Sinaloa. 211p.

- Avanza MV, Puppo MC, Añón MC. 2005. Structural characterization of amaranth protein gels. *Journal of Food Science*, 70:223-229.
- Ayala-Niño A, Rodríguez-Serrano G, González-Olivares L, Contreras-Lopez E, Regal-Lopez P, & Cepeda-Saez A. 2019. Sequence identification of bioactive peptides from amaranth seed proteins (*amaranthus hypochondriacus* spp.). *Molecules*, 24(17), 3033. doi:10.3390/molecules24173033
- Bains K, Uppal V y Kaur Harpreet. 2014. Optimization of germination time and heat treatment for enhanced availability of minerals from leguminous sprouts. *Journal of Food Science and Technology*, 51:1016-1020.
- Barba de la Rosa AP, Barba-Montoya A, Martínez-Cuevas P, Hernández-Ledesma B, León-Galván MF, De León-Rodríguez A, González C. 2010. Nitric Oxide-Biol Ch, 23:106–111.
- Barba de la Rosa AP, Fomsgaard IS, Bente L, Mortensen AG, Olvera-Martínez L, Silva-Sánchez C, Mendoza-Herrera A, González-Castañeda J, De León-Rodríguez A. 2009. *J Cereal Sci*, 49:117–121.
- Barrio DA, Añón MC. 2010. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European Journal of Nutrition*, 49:73–82.
- Barrón-Yáñez MR, Villanueva-Verduzco C, García-Mateos MR y Colinas-León MT. 2009. Valor nutricional y contenido de saponinas en germinados de huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.), Calabacita (*Cucurbita pepo* L.), Canola (*Brassica napus* L.) y Amaranto (*Amaranthus leucocarpus* S. Watson syn. *hypochondriacus* L.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15:237-243.
- Becerra R. 2000. El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo. *CANABIO, Biodiversitas*, 30:1-6.

- Becker R, Wheeler EL, Lorenz K, Stafford AE, Grosjean OK, Betschart AA y Saunders RM. 1981. A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science*, 46:1175-1180.
- Benitez V, Cantera S, Aguilera Y, Mollá E, Díaz RMF y Martín-Cabrejas MA. 2013. Impact of germination on starch, dietary fiber and physicochemical properties in non-conventional legume. *Food Research International*, 50:64-69.
- Berger A, Monnard I, Dionisi F, Gummy D, Hayes KC, Lambelet P. 2003. Cholesterol lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters *Food Chemistry*, 81:119–124.
- Berghofer E, Schoenlecher R. 2002. Pseudocereal and Less Common Cereals: Grain Properties and Utilization Potential. In “Grain Amaranth” pp 219-260.
- Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9:1055-1066
- Borneo R, Aguirre A. 2008. Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. *LWT - Food Science and Technology*. 41: 1748–1751.
- Botero-Omary M, Fong C, Rothchild J, Finney P. 2012. Effects of Germination on the Nutritional Profile of Gluten-Free Cereals and Pseudocereals: A Review. *Cereal Chemistry*, 89(1):1-14.
- Boukid F, Folloni S, Sforza S, Vittadini E, Prandi B. 2018. Current Trends in Ancient Grains-Based Foodstuffs: Insights into Nutritional Aspects and Technological Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17: 123-136.
- Bradford KJ. 1990. A water relations analysis of seed germination rates. *Plant Physiology*, 94:840.
- Brenner WM. 1991. Food uses of grain amaranth. *Cereal Foods World*, 36, 426-430.

- Bressani R, Marroquín AS, Morales E. 1992. Chemical composition of grain Amaranth cultivars and effect of Processing on their nutritional quality. *Food Reviews International*, 8: 23-44.
- Bressani R, Rodas-Mendoza B. 2006. Industrialización del grano de amaranto, caracterización química y nutricional de productos intermedios y finales de procesamiento. Proyecto FODECYT, Guatemala, Octubre 2006.
- Bressani R, Velásquez L, Acevedo E. 1990. Dietary fiber content in various grain amaranth species and effect of processing. *Amaranth News I*, 1:5-8.
- Bressani R. 1989. The proteins of grain amaranth. *Foods Reviews International*, 51:1338.
- Bressani R. 1995. Amaranto: Composición Química y Valor Nutritivo del Grano de amaranto. En: *Agroindustrial Rural*, Boucher F y Muchnik J (eds). CIRADCIID-IICA. San José, Costa Rica, 83-114p.
- Cai YZ, Corke H, Wu HX. 2004. Amaranth En: *Encyclopedia of Grain Science*. 3ra Edición. Wringley C, Corke H y Walker CE (ed). Food Science Australia and Wheat CRC. North Ryde, Australia. Pp. 1-10.
- Cam A, González de Mejía E. 2012. RGD-peptide lunasin inhibits Akt-mediated NF- κ B activation in human macrophages through interaction with the α V β 3 integrin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 1569–1581.
- Camire M.E. 2003. Extrusion Cooking. En: *The Nutrition Handbook for Food Processors*, Henry CJK y Chapman C (ed). WoodheadPublishing Limited, Cambridge, Reino Unido.pp. 314-330.
- Caselato-Sousa VM, Amaya-Farfán J. 2012. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *Journal of Food Science*, 77:93-104.
- Charoenthaikij P, Jangchud K, Jangchud A, Piyachomkwan K, Tungtrakul P y Prinyawiwatkul W. 2009. Germination conditions affect physicochemical properties of germinated brown rice flour. *Journal of Food Science*, 74:658-665.

- Chavan JK, Kadam SS. 1989. Nutritional improvement of cereal by sprouting. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 28:401.
- Coehlo LM, Silva PM, Martins JT, Pinheiro AC, Vicente AA. 2018. Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth, *Food and Function*, 9, 5499-5512.
- Colmenares de Ruiz AS y Bressani R. 1990. Effect of germination on the chemical composition and nutritive value of amaranth grain. *Cereal Chemistry*, 67:519-522.
- Conforti F y Menichini F. 2011. Foods of plant origin as source of nitric oxide production inhibitors. In S. Haugen, & S. Meijer (Eds.). *Handbook of nutritional biochemistry: Genomics, metabolomics, and food supply* (pp. 385–403). Nova Science.
- Conforti F, Giancarlo A, Statti A, Loizzo MR, Gianni A, Sacchetti B, Poli F, Menichini F. 2005. *Biol Pharm Bull*, 28:1098–102.
- Coskuner Y y Karababa E. 2004. Lablebi: a roasted chickpea product as a traditional Turkish snack food. *Food reviews international*. 20: 257–274, 2004.
- Czaplicki S, Ogdowska D, Zadernowski R y Derewiaka D. 2012. Characteristics of biologically-active substances of amaranth oil obtained by various techniques. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62:235-239.
- Czerwinski J, Bartnikowskab E, Leontowicza H, Langeb E, Leontowicza M, Katrichc E, Trakhtenbergd S y Gorinstein S. 2004. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol containing diets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15:622-629.
- De la Rosa AB, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, Olvera-Martínez L, Silva-Sánchez C, Mendoza-Herrera A, Gonzalez-Castañeda J, De León-Rodríguez A. 2009. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an

- alternative crop for suitable food production: phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49(1):117-121.
- De Souza-Rocha T, Hernández LMR, Chang YK, De Mejía EG. 2014. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea vean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. *Food Research International*, 64: 799-1760.
- Délano-Frier JP, Avilés-Arnaut H, Casarrubias-Castillo K, Casique-Arroyo G, Castrillón-Arbeláez PA, Herrera-Estrella L, Massange-Sánchez J, Martínez-Gallardo NA, Parra-Cota FI, Vargas-Ortiz E, Estrada-Hernández MG. 2011. *BMC Genomics*, 12:363-380.
- Dia VP, Bringe NA, De Mejía EG. 2014. Peptides in pepsin–pancreatin hydrolysates from commercially available soy products that inhibit lipopolysaccharide induced inflammation in macrophages. *Food Chemistry*, 152: 423–431.
- Dia VP, Wang W, Oh VL, de Lumen BO, Gonzalez de Mejía E. 2009. Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and in vitro evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, 114:108-115.
- Dominguez-Arispuro DM, Cuevas-Rodriguez EO, Milán-Carrillo J, León-López L, Gutiérrez-Dorado R, Reyes-Moreno C. 2018. Optimal germination condition impacts on the antioxidant activity and phenolic acids profile in pigmented desi chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 55, 638-647.
- Drago-Serrano ME, López-López M, Sainz-Espuñes TR. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4):58-68.

- Dueñas M, Hernández T, Estrella I y Fernández D. 2009. Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.). *Food Chemistry*, 117:599-607.
- Duffus CM, Slaughter JC. 1980. *Seeds and their uses*. P. 1-154. John Wiley and sons. New York, NY.
- Ellis HS, Ring SG, Whittam MA. 1989. A comparison of the viscous behavior of wheat and maize starch pastes. *Journal of Cereal Science*, 10:33-44.
- Elmalik M, Klopfenstein C, Hosney RC y Bates LS. 1986. Effects of germination on the nutritional quality of sorghum grain with contrasting kernel characteristics. *Nutrition Reports International*, 34:941.
- Espín JC, García-Conesa MT y Tomás-Barberán FA. 2007. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, 68:2986–3008.
- FAO. 2020. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org> (consultado el 02 de febrero del 2020).
- Fincher GB. 1989. Molecular and celular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 305-346.
- Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Añón MC. 2011. Amaranth Seed Protein Hydrolysates Have in Vivo and in Vitro Antihypertensive Activity. *Food Chemistry*, 126:878-884.
- Fruton JS. 2002. A history of pepsin and related enzymes. *The Quarterly Review of Biology*, 77:127–47.
- Galland L. 2010. Diet and Inflammation. *Nutrition in Clinical Practice*, 25:634–640.
- Gallego M, Mora L, Hayes M, Reig M, Toldrá F. 2017. Effect of cooking and *in vitro* digestion on the antioxidant activity of dry-cured ham by-products. *Food Research International*, 97:296–306.

- Gallegos-Tintoré S, Chel-Guerrero L, Corzo-Rios LJ, Matínez-Ayala AL. 2013. Peptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. *In* M. Segura-Campos, L., Chel Guerrero, Betancur-Ancona, D. (Eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (pp. 111-122). *OmniaScience*.
- Gamel T. H., Linssen J. P., Mesallem A. S., Damir A. A., and Shekib L. A. 2006b. Seed treatments affect functional and antinutritional properties of amaranth flours. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:1095-1102.
- Gamel TH, Linssen JP, Mesallem AS, Damir AA y Shekib LA. 2005. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 319-327.
- Gamel TH, Linssen JP, Mesallem AS, Damir AA y Shekib LA. 2006a. Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:82-89.
- Gamel TH, Linssen JP, Mesallem AS, Damir AA, Shekib LA. 2005. Effect of seed treatments on the chemical composition and properties of two amaranth species: starch and protein. *Journal of Science Food and Agriculture*, 85:315-327.
- Gamel TH, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA y Linssen JP. 2007. Characterization of amaranth seed oils. *Journal of Food Lipids*. 14: 323-334.
- Gamel TH, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA y Linssen JP. 2007. Characterization of amaranth seed oils. *Journal of Food Lipids*. 14: 323-334.
- García-Barreno P. 2008. Inflamación. *Revista de la Real academia de las Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 102: 91-159.

- Garciarrubio A, Legaria JP y Cavarrubias A. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature Arabidopsis seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta*, 203:182-187.
- Gimbi DM y Kitabatake N. 2002. Changes in α - and β -amylase activities during seed germination of African finger millet. *International Journal Food Science Nutrition*, 53:481-488.
- Gómez-Ortiz S. 1982. Cambios en la concentración de lisina durante la germinación del amaranto. [Tesis de Licenciatura]. ENCB-IPN. México, D.F.
- González de Mejía E, Martínez-Villaluenga C, Fernández D, Urado D, Sato K. 2012. Bioavailability and safety of food peptides In: *Food proteins and peptides: chemistry, functionality interactions, and commercialization*. CRC Press, 297–330.
- González-Castañeda J, Arrollo-Torres IL, Borondanenko A, Carballo-Monsivais CA. 2005. Efecto de la época de cosecha en las características físicas, químicas y funcionales del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). VII Congreso Nacional de Ciencias de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato, Gto. Pp. 95-102.
- González-Montoya M, Hernández-Ledesma B, Silván JM, Mora-Escobedo R y Martínez-Villaluenga C. 2018. Peptides derived from *in vitro* gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry*, 242:75–82.
- Gorinstein S, Lojek A, Cíz M, Pawelzik E, Delgado LE, Medina OJ, Goshev I. Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(4):629-637.

- Gorinstein S, Medina-Vargas OJ, Jaramillo NO, Arnao-Salas I, Martínez-Ayala AL, Arancibia-Ávila P, Toledo F, Katrich E, Trakhtenberg S. 2007. Eur Food Res Technol, 225:321–328.
- Grobelnik-Mlakar S, Turinek M, Jakop M, Bavec M, Bavec F. 2009. Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. Agricultura, 6:43–53.
- Grobelnik-Mlakar S, Turinek M, Jakop M, Bavec M, Bavec F. 2010. Grain amaranth as an alternative and prospective crop in temperate climate. Journal for Geography, 5:135–46.
- Guan H, Diao X, Jiang F, Han J, Kong B. 2018. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. Food Chemistry, 242: 89-96.
- Guardado-Félix D, Serna-Saldivar SO, Cuevas-Rodríguez EO, Jacobo-Velázquez DA, Guitiérrez-Urbe JA. 2017. Effect of sodium selenite on isoflavonoid contents and antioxidant capacity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. Food Chemistry. 226: 69-74.
- Halliwel B, Rafter J, Jenner A. 2005. *Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?*, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 268S–276S.
- Hernández GR y Herrerías GG. 1998. Amaranto: Historia y Promesa. Tehuacán: Horizonte del Tiempo. Vol. 1. Pp: 529. México, 1998.
- Hoyle NT, Merritt JH. 1994. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1):76-79.
- Hübner F, Arendt EK. 2013. Germination of cereal grains as a way to improve the nutritional value: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:853–861.

- Husain K, Hernández W, Ansari RA, Ferder L. 2015. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3):209-217.
- Irving DW, Betschart AA y Saunders RM. 1981. Estudios Morfológicos en *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science*. 46: 1170-1174.
- Iturbe GA, Gispert M. 1994. Graís Amaranth. En: "Neglected crops: 1992 from a different perspective". Hernandez-Bermejo JE y León J. *Plant Production and Protection Series*. No. 26. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. 93-101p.
- Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121: 178-184.
- Kabiri N, Asgary S, Madani H, Mahzouni P. 2010. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4:355–364.
- Kermode AR. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9:155-195.
- Ketnawa S, Suwannachot J, Ogawa Y. 2020. In vitro gastrointestinal digestion of crisphead lettuce: changes in bioactive compounds and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 311:125885.
- Khandaker L, Masum-Akond ASMG, Ali MB, Oba S. 2010. Biomass yield and accumulations of bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) grown under different colored shade polyethylene in spring season. *Scientia Horticulturae*, 123:289–94.
- King J. 1991. *The genetic basis of the plant physiological processes*. Oxford University Press. New York, USA, pp: 347-393.
- Lee MH, Lee JS y Lee TH. 2004. Germination of Buckwheat Grain: Effects on Minerals, Rutin, Tannins and Colour. En: "Advances in Buckwheat

- Research: Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat". Research Institute of Crop Production. Prague, Czech Republic. pp 50-54.
- Legaria-Solano J, Ponce-Romero G y Muñoz-Orozco A. 2000. Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Revista Fitotécnica Mexicana*, 23:153- 166.
- Li YW, Li B. 2013. Characterization of structure-antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318: 29-43.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105:1135-1143
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420:868–874.
- Libby P. 2012. History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9):2045-2051. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705.
- Liberal A, Calhelha RC, Pereira C, Adegas F, Barros L, Dueñas M, Santos-Buelga C, Abreu RMV, Ferreira ICFR. (2016). A comparison of the bioactivity and phytochemical profile of three different cultivars of globe amaranth: red, White and pink. *Food and Function*, 7, 679-688.
- Lino-Pérez LE. 2007. Exportación de amaranto a Huoston, Texas. Informe Final para obtener el Título de Licenciado en Relaciones Comerciales. Escuela Superior de Comercio y Administración, Unidad TEPEPAN. Instituto Politécnico Nacional.
- Lipkin A, Anisimova V, Nikonorova A, Barbakov A, Krause E, Bienert M, Grishin E, Egorov T. 2005. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*, 66:2426-2431.

- Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 134: 3479S-3485S
- López-Abarrategui C, del Monte-Martinez A, Reyes-Acosta O, Franco OL, Otero-González AJ. 2013. LPS in mobilization on porous and non-porous supports as an approach for the isolation of anti-LPS host-defense peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4: 389.
- López-Barrios L, Antunes-Ricardo M, Gutiérrez-Urbe JA. 2016. Changes in antioxidant and antiinflammatory activity of black vean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates due to germination and enzymatic digestion. *Food Chemistry*, 203: 417-424.
- López-Mejía OA, López-Malo A, Palou E. 2014. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*, 53:55–59. 10.1016/j.indcrop.2013.12.017.
- Lozano-Ojalvo D y López-Fandiño R. 2017. Immunomodulating peptides for food allergy prevention and treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–21.
- Maldonado-Cervantes E, Jeong HJ, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, González de Mejía E, De Lumen BO, Barba de La Rosa AP. 2010. *Peptides*, 3:11635–1642.
- Martinez-Villaluenga C, Dia PV, Berhow M, Bringe NA, González de Mejia E. 2009. Protein hydrolysates from β -conglycinin enriched soybean genotypes inhibit lipid accumulation and inflammation in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53: 1007-1018.
- Martirosyan DM, Miroshnichenko LA, Kulakova SN, Pogojeva AV y Zoloedov VI. 2007. Amaranth oil application for coronary heart disease and Hypertension. *Lipids in Health and Disease*, 6:1-12
- Maruyama W, Shirakawa K, Matsui H, Matsumoto T, Yamazaki H, D. Sarca A, Kazuma Y, Kobayashi M, Shindo K, Takaori-Kondo A. 2016. Classical NF-kB pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells.

Biochemical and Biophysical Research Communications, xxx 1-6.
Disponibile en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.148>

- Mazón N, Peralta E, Rivera M, Subia G, Tapia C. 2003. Catalogo del banco de germoplasma de amaranto (*Amaranthus* spp.) del INIAP-Ecuador. Programa Nacional de Leguminosas y Granos Andinos, Departamento Nacional de Recursos filogenéticos y Biotecnología, Estacion experimental Santa Catalina Quito, Ecuador. 98 p.
- Mbithi-Mwikya SM, Van Camp J, Yiru Y y Huyghebaert A. 2000. Nutrient and antinutrient changes in finger millet (*Eleusine coracana*) during sprouting. *LWT- Food Science and Technology* 33:9-14.
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., Lquari, H., Giron-Calle J., Alaiz, M. 2009. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:1928–1932.
- Mendonca S, Saldiva PH, Cruz RJ, Gómez-Arêas JA. 2009. *Food Chemistry*, 116:738–742.
- Mendonca X, Modesta R, Ascheri J, Maia M, Ascheri D, Carvalho C. 2005. Chemical characteristic and color analysis of instant flours of amaranth and rice used in new extruded products. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- Meredith P, Pomeranz Y. 1985. Sprouted grain. En: *Advances in Cereal Science and Technology*. Pomeranz Y (ed.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul MN, Pp. 239-320.
- Milán-Carrillo J, Gutierrez-Dorado R, Cuevas-Rodríguez EO, Garzón-Tiznado JA, Reyes-Moreno C. 2004. Nixtamalized flour from quality protein maize (*Zea mays* L). optimization of alkaline processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59:35-44.

- Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez JJK, Cuevas-Rodríguez EO Ramírez-Wong B, Reyes-Moreno C. 2006. International Journal of Food Science and Technology, 41:727–736.
- Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez X, Reyes-Moreno C. 2012a. Optimization of extrusion process for producing high-antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. Applied Mathematics, 3:1516–1525. DOI: 10.4236/am.2012.330211.
- Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Reyes-Moreno C. 2012b. High-Antioxidant Capacity Beverages Based on Extruded and Roasted Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Flour. In: Tunick MH, González de Mejía E, editors. Hispanic foods: chemistry and bioactive compounds. 1st ed, vol 1109. Washington, D.C.: American Chemical Society. p 199–216. DOI: 10.1021/bk-2012-1109.ch013.
- Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, Camacho-Hernández IL, Rouzaud-Sandez O. 2002. Optimization of extrusion process to transform hardened chickpeas (*Cicer arietinum* L) into a useful product. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82: 1718-1728.
- Milán-Noris AK, Gutiérrez-Urbe JA, Santacruz A, Serna-Saldívar SO, Martínez-Villaluenga C. 2018. Peptides and isoflavones in gastrointestinal digest contribute to the antiinflammatory potential of cooked or germinated desi and kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). Food chemistry, 268: 66-76.
- Monteros C, Nieto C, Caicedo C, Rivera M y Vimos N. 1994. Iniap – alegría; Primera Variedad Mejorada de Amaranto para la Sierra Ecuatoriana. Boletín divulgativo N° 246. 24 p.
- Montoya-Rodríguez A, Gómez-Favela M, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, González de Mejía E. 2015a. 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.
- Montoya-Rodríguez A, González de Mejía E, Dia VP, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2014a. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF- κ B signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58:1028-1041.
- Montoya-Rodríguez A, González de Mejía E. 2015. Pure peptides from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development *in vitro*. *Food Research International*, 77:204-214.
- Montoya-Rodríguez A, Milán-Carrillo J, Dia VP, Reyes-Moreno C, González de Mejía E. 2014b. Pepsin-pancreatin protein hydrolysates from extruded amaranth inhibit markers of atherosclerosis in LPS-induced THP-1 macrophages-like human cells by reducing expression of proteins in LOX-1 signaling pathway. *Proteome Science*, 12:30-42.
- Montoya-Rodríguez A, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, González de Mejía E. 2015b. Characterization of Peptides Found in Unprocessed and Extruded Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Pepsin/Pancreatin Hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:8536-8554.
- Montoya-Rodríguez A. 2015. Identificación de Biopéptidos en Hidrolizados Proteínicos de Harina de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) Extrudido. Evaluación de la Actividad Biológica. [Tesis de Doctorado en Biotecnología de Alimentos]. Culiacán, México: Universidad Autónoma de Sinaloa. 244p. Disponible en la biblioteca de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

- Moongngarm A, Saetung N. 2010. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122:782-788.
- Moore KJ, Tabas I. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 145:341–355.
- Moore MM, Chua W, Charles KA, Clarke SJ. 2010. Inflammation and cancer: causes and consequences. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 87(4):504–508.
- Mora-Escobedo R, Paredes-López O y Dominguez J. 1991. Optimization of germination procedure by response surface methodology. *LWT –Food Science and Technology*, 24:51.
- Mora-Escobedo R, Paredes-López O y Gutiérrez-López GF. 1994. Effect of germination on the rheological and functional properties of amaranth seeds. *Lebensm Wiss Technol*. 24:241-246.
- Mora-Rochín S, Gutierrez-Uribe JA, Serna-Saldivar SO, Sanchez-Peña P, y col. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented corns processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 52:502-508.
- Mores HG, Magan N, Stenning BC. 1992. Effect of microwave heating on quality and mycoflora of sorghum grain. *Journal of Stored Product Research*, 28:251-256.
- Moronta J, Smaldini PL, Docena GH, Añón MC. 2016. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods*, 21:463-473.
- Mota C, Santos M, Mauro R, Samman N, Matos AS, Torres D, Castanheira I. 2016. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*, 193:5561.
- Mtolo M, Gerrano A, Mellem J. 2017. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compounds content and in vitro antioxidant

- capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. *CyTA- Journal of Food*, 15(3):391-399.
- Murphy MP y Thompson FW. 1988. *Molecular Plant Development*. Prentice Hall. USA. Pp: 1-29.
- Nieto C. 1990. Identificación de microcentros de variabilidad en quinua, amaranto y chocho en Ecuador INIAP, EE. Santa Catalina. Publicación Miscelanea N° 52. Quito, Ecuador. Proyecto INIAP/IFAD/IPGRI. s. n. t. 15p.
- Ogrodowska O, Zadernowski R, Czaplicki S, Derewiaka D y Wronowska B. 2014. Amaranth Seeds and products - The Source of Bioactive Compounds. *Polish Journal of Food Nutrition Science*, 64:0-0.
- Ohtsubo K, Suzuki K, Yasui Y y Kasumi T. 2005. Biofunctional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:303-316
- Okuno K. y Sakagauchi S. 1981. Glutinous and non-glutinous starches in perisperm of grain amaranths. *Cereal Research Communication*, 9:305-310.
- Omami EN. 2005. Effect of salinity stress on amaranth seed germination and seedling growth. University of Pretoria. pp 35-59.
- Orsini-Delgado MC, Nardo A, Pavlovic M, Rogniaux H, Añón MC, Tironi VA. 2016. Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197:1160-1167.
- Orsini-Delgado MC, Tironi VA, Añón MC. 2011. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT – Food Science & Technology*. 44:1752-1760.
- Ortega N, Macia A, Romero MP, Reguant J, Motilva MJ. 2011. Matrix composition effect on the digestibility of carb flour phenols by an in vitro digestión model. *Food chemistry*, 124:65—71.

- Oseguera-Toledo ME, Gonzalez de Mejia E, Dia VP, Amaya-Llano SL. 2011. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF- κ B pathways. *Food Chemistry*. 127:1175–1185.
- Ottesen M, Svendsen I. 1970. The subtilisins. *Methods in Enzymology*, 19:199-215.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619–4626.
- Pant KC. 1985. Effect of heating processing (popping) on protein nutritional quality of grain amaranth. *Nutrition Reports International*. 32:1089-1098.
- Paredes-López O, Guevara-Lara F y Bello-Pérez LA. 2006. *Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericanas*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp.
- Paredes-López O, Mora-Escobedo R. 1989. Germination of amaranth seeds: effect of nutrient composition and color. *Journal of Food Science*, 54:761-762.
- Pasko P, Barton HK, Zagrodzki P, Gorinstein S, Fołta M, Zachwieja Z. 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115:994–998.
- Paucar-Menacho LM, Berhow MA, Gontijo-Mandarino JM, Chang YK y Gonzalez de Mejia E. 2010. Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258. *Food Research International*, 43:1856-1865.
- Paucar-Menacho LM, Peñas E, Dueñas M, Frias J, Martínez-Villaluenga C. 2017. Optimizing Germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus*

- caudaus) using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 76:245-252.
- Pavlik V. 2012. The revival of amaranth as a third-millennium food. *Neuroendocrinol Lett*, 33:3–7.
- Pazzinatto C, Malta LG, Pastore GM, Maria Netto F. 2013. Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*, 33: 485-493.
- Pellegrini M, Lucas-Gonzalez R, Fernández-López J, Ricci A, Pérez-Álvarez JA, Sterzo CL, Viuda-Martos M. 2017. Bioaccessibility of phenolic compounds of six quinoa seeds during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 38:77-88.
- Perales-Sánchez JXK, Reyes-Moreno C, Gómez-Favela MA, Milán-Carrillo J, Cuevas-Rodríguez EO, Valdez-Ortiz A, Gutiérrez-Dorado R. 2014. Increasing the Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents by Optimizing the Germination Conditions of Amaranth Seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69:196–202.
- Perales-Sánchez JXK, Reyes-Moreno C, Gutiérrez-Dorado R. 2016. Efecto de la germinación sobre el potencial antioxidante de Amaranto. Ed. Publicia. 215p. ISBN: 973-3-8416-8019-8.
- Plate AYA, Gómez-Areas JA. 2002. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chemistry*, 76:1-6.
- Quiróga AV, Aphalo P, Ventureira JL, Martínez EN, Añón MC. 2012. Physicochemical, functional and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) 7S globulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2):397-403. doi:10.1002/jsfa.4590

- Rastogi A, Shukla S. 2013. Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:109–125. DOI: 10.1080/10408398.2010.517876
- Raveh B, London N, Schueler-Furman O. 2010. *Proteins*, 78: 2029–2040.
- Rawlings ND, Barrett AJ. 1994. Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:19–61.
- Repo-Carrasco R, Espinoza C, Jacobsen SE. 2003. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*), *Food Reviews International*, 19:1-2, 179-189, DOI: 10.1081/FRI-120018884
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, 49:1603–1616.
- Robbins WW, Weier TE, Stoking CR. 1974. *Botánica*. Cap. 15. Pp. 253-277. Ed. Limusa, Mexico.
- Rodas B y Bressani R. 2009. Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59:82-87.
- Ruiz-Ruiz J, Segura-Campos M, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L. 2013. Proteínas y péptidos biológicamente activos con potencial nutracéutico. En M. Segura-Campos, L. Chel-Guerrero, D. Betancur-Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 11-27). Barcelona, *OmniaScience*.
- Sabbione AC, Nardo AE, Añón MC, Scilingo A. 2016. Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of functional foods*, 20:204-214.
- SAGARPA-SIAP. 2020. Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado el 02 de febrero del 2020.

- Sánchez-Olarte J, Argumedo-Macías A, Álvarez-Gaxiola JF, Méndez-Espinoza JA, Ortiz-Espejel B. 2015. Conocimiento tradicional en prácticas agrícolas en el sistema del cultivo de amaranto en Tochimilco, Puebla. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*, 12: 237-254.
- Sancho RAS, Pavan V, Pastore GM. 2015. Effect of in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity of common bean seed coats. *Food Research International*, 76: 74-78.
- Sandoval-Sicairos ES, Domínguez-Rodríguez M, Montoya-Rodríguez A, Milán-Noris AK, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2020. Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity Modified by Germination and Hydrolysis in Mexican Amaranth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(2):192-199.
- Sangsukiam T, Duangmal K. 2017. A comparative study of physico-chemical properties and antioxidant activity of freeze-dried mung vean (*Vigna radiata*) and adzuki vean (*Vigna angularis*) sprout hydrolysate powders. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(9):1971-1982.
- Santiago PD, Tenbergen K, Vélez-Jiménez E, Cardador-Martínez MA. 2014. Review: Functional Attributes of Amaranth. *Austin Journal of Nutrition and Food Science*, 2:1-6.
- Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancour-Anaconda D. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev Chil Nutr*, 37(3):386-391.
- Segura-Nieto M, Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. 1994. Biochemistry of Amaranth Proteins. En: "Amaranth: Biology, Chemistry and Technology". Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 76-95.
- Sepúlveda-Ahumada DR, García-Amezquita ME, Martínez-Alvarenga E, Martínez-Rodríguez Y, Peña-Ramos EA. 2012. Péptidos con actividad antioxidante. In *Antioxidantes*, Editorial Clave, México. pp 201-234.

- Servín-Hernández A, Trejo-Garnica A, Sacramento-Marin C, Rosas-Flores G y Contreras-Rodriguez IM. 2009. Guatemala, Mercado Potencial del Amaranto Natural. Tesina.IPN. Mexico.
- Shi J, Mazza G y Le Maguer M. 2002. Functional foods: Biochemical and processing aspects. CRC Press Boca Raton. FL. 2:409.
- Silva LR, Pereira MJ, Azevedo J. 2013. Glycine max (L.) merr, Vigna radiate L. and Medicago sativa L. sprouts: a natural source of bioactive compounds. Food Res Int. 50:167–175.
- Silva-Sánchez C, Barba de la Rosa AP, León-Galván MF, De Lumen BO, De León-Rodríguez A, González de Mejía E. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 1233–1240.
- Singleton VL, Orthofer R y Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. 299: 152-178.
- Spetter J y Thompson L. 2007. The revival of an ancient crop. LEISA Magazine, 23:3.
- Steffensen SK, Rinnan Å, Mortensen AG, Laursen B, de Troiani RM, Noellemeyer EJ, Janovska D, Dusek K, Délano-Frier J, Taberner A. 2011. Variations in the polyphenol content of seeds of field grown *Amaranthus*
- Sumar IK. 1982. *Amaranthus caudatus* El Pequeño Gigante. (Tercer congreso Internacional de cultivos andinos, La Paz) Universidad Nacional del Cusco, Perú Centro de Investigaciones de Cultivos Andinos, 7p.
- Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. 2003b. Biomarkers of Vascular Disease Linking Inflammation to Endothelial Activation Part II. Circulation, 108:2041-2048.
- Tandang-Silva MR, Cabanos CS, Carrasco-Peña LD, Barba De La Rosa AP, Osuna-Castro JA, Utsumi S, Mikami B, Maruyama N. 2012. Crystal

- structure of a major seed storage protein, 11S proglobulin, from *Amaranthus*. *Food Chemistry*, 135:819-826.
- Tang Y, Tsao R. 2017. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(7):1600767-n/a. doi:10.1002/mnfr.201600767
- Tang-Bin, Z., Tai-Ping, H., Hua-Bin, L., Huan-Wen, T., & En-Qin, X. (2016). The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*, 21:1-14.
- Tiengo A, Faria M, Netto FM. 2009. Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins. *Journal of Food Science*, 74:121-6. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2009.01145.x
- Tironi VA, Añón MC. 2010. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 43:315-322.
- Torruco-Uco J, Domínguez-Magaña MA, Dávila-Ortiz G, Martínez-Ayala A, Chel-Guerrero L, Betancur A. 2008. Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: A review. *CYTA - Journal of Food*, 6:158-168. Doi:10.1080/11358120809487641.
- Tovar LR, Brito E, Takahashi T, Miyazawa T, Soriano J, Fujimoto K. 1989. Dry heat popping of amaranth seed might damage some of its essential aminoacids. *Plant Foods for Human Nutrition*, 39:299-309.
- Tovar-Pérez EG, Guerrero-Legarreta I, Farrés-González A, Soriano-Santos J. 2009. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116:437–444. Doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.062.
- Tunon MJ, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. 2009. *Current Drug Metabolism*, 10:256–271.
- Tyszka-Czochara M, Pasko P, Zagrodzki P, Gajdzik E, Wietecha-Posluszny R, Gorinstein S. 2016. Selenium Supplementation of Amaranth Sprouts

- Influences Betacyanin Content and Improves Anti-Inflammatory Properties via NF κ B in Murine RAW 264.7 Macrophages. *Biological Trace Element Research*, 169, 320-330.
- Udenigwe CC, Aluko RE. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, 77: R11-R24. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x
- Velarde-Salcedo AJ, Barrera-Pacheco A, Lara-González S, Montero-Morán GM, Díaz-Gois A, González de Mejía E, Barba de la Rosa AP. 2013. *In vitro* inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*. 136:758–764.
- Venskutonis PR, Kraujalis P. 2013. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12:381-412.
- Vernaza MG, Dia VP, De Mejia EG, Chang YK. 2012. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. *Food Chemistry*, 134(4): 2217-2225.
- Vilcacundo R, Martínez-Villaluenga C, Hernández-Ledesma B. 2017. Release of dipeptidyl peptidase IV, α -amilase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35:531-539.
- Vilcacundo R, Martínez-Villaluenga C, Miralles B, Hernández-Ledesma B. 2019. Release of multifunctional peptides from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) protein under *in vitro* gastrointestinal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99:1225-1232.
- Vioque J, Millán F. 2005. Los hidrolizados proteicos en alimentación: suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *CTC Alimentación*, 26:96-102.

- Wang W, González de Mejía E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4:63–78.
- Weiss, U. 2008. Inflammation. *Nature*, 454(7203):427. Doi:10.1038/454427a
- Wilcox PE. 1970. Chymotrypsinogens -chymotrypsins. *Methods in Enzymology*, 19:64–108.
- Wood ID, Betrcharta A y Saunders RM. 1981. Morphological Studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science*, 46:1170-1174.
- Wrigley C, Corke H, Seetharaman K, Faubion J. 2016. *Encyclopedia of Food Grains, Second Edition*. Elsevier Academic Press. 532p.
- Yu LG, Milton JD, Fernig DG, Rhodes JM. 2001. *Journal of Cellular Physiology*, 186:282-287.
- Zhang G, Xu Z, Gao Y, Huang X, Zou Y, Yang T. 2015. Effects of germination on the nutritional properties, phenolic profiles, and antioxidant activities of buckwheat. *Journal of Food Science*, 80:H1111-HH1119.
- Zhao X, Wei Y, Wang Z, Chen F y Ojokoh AO. 2011. Reaction kinetics in food extrusion: methods and results. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:835-854.

ABREVIATURAS

Abrev	Significado
%	Porcentaje
xg	Gravedades
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar
μmol	Micromoles
AAOX	Actividad Antioxidante
AAPH	2,2`-azo-bis (2 amidino-propano) dihidrocloruro
AR	Actividad residual
bs	Base seca
CFT	Compuestos Fenólicos Totales
Da	Daltons
DPP-III	Enzima dipeptidil peptidasa III
DPP-IV	Enzima dipeptidil peptidasa IV
EAG	Equivalentes de Acido Gálico
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ET	Equivalentes de Trolox
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización para los Alimentos y la Agricultura)
g	Gramo
GAD	Harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente
GADW	Harina de amaranto germinado digerida gastrointestinalmente lavada (sin fenólicos)
GAF	Harina de amaranto germinado
GAFPC	Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado

GAFPC in	Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido gastrointestinalmente (insoluble)
GAFPC out	Concentrado proteínico de harina de amaranto germinado digerido gastrointestinalmente (Soluble)
GH	Grado de Hidrólisis o de digestión
h	Hora
HCl	Ácido Clorhídrico
IB	Índice de Bioaccesibilidad
IR	Índice de recuperación
KDa	Kilo Daltons
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitro
mmol	Milimoles
NaOH	Hidróxido de Sodio
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
°C	Grados Celsius
OH	Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAC	Capacidad de absorcion de radicales de oxígeno
p/v	Peso/Volumen
PAL	Fenilalanina Amonio Liasa
PBS	Buffer de Fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millon
PS	Proteína Soluble
rpm	Revoluciones por minuto

SAGARPA	Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
UAD	Harina de amaranto sin procesar digerida gastrointestinalmente
UAF	Harina de Amaranto Sin Procesar