

Efecto inhibitorio de fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración de hidrolizados proteínicos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*), sobre la renina

Inhibitory effect of peptide fractions obtained by ultrafiltration of cowpea (*Vigna unguiculata*) protein hydrolysates on renin

Luis Chel-Guerrero; Trinidad Cú-Cañetas; Wilbert Rodríguez-Canto; Arturo Castellanos-Ruelas; David Betancur-Ancona*

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615, Colonia Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, México, 97203. *Correo-e: bancona@correo.uady.mx

Recibido: 22/feb/2024 Aceptado: 14/may/2024 // <https://doi.org/10.32870/rayca.v5i5.78>

ID 1er Autor: *Luis Chel-Guerrero* / ORC ID: 0000-0001-9748-3704

ID 2do Coautor: *Trinidad Cú-Cañetas* / ORC ID: 0000-0002-3279-6969

ID 3er Coautor: *Wilbert Rodríguez-Canto* / ORC ID: 0000-0001-7728-9939

ID 4to Coautor: *Arturo Castellanos-Ruelas* / ORC ID: 0000-0002-4386-1519

ID 5to Coautor: *David Betancur-Ancona* / ORC ID: 0000-0002-9206-3222

Resumen

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es clave en la fisiopatología de la hipertensión arterial. La renina regula la cascada del SRAA al convertir el angiotensinógeno en angiotensina I, que es una molécula relativamente inactiva. En la presente investigación, se realizó la evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de la renina de fracciones peptídicas obtenidas mediante hidrólisis enzimática de la proteína de *Vigna unguiculata*. La proteína de frijol caupí se hidrolizó con cada uno de dos sistemas enzimáticos, pepsina-pancreatina o Flavourzyme®. La ultrafiltración de los hidrolizados produjo fracciones de diferentes pesos moleculares. La fracción >5 kDa del hidrolizado con Flavourzyme® tuvo la mayor actividad inhibidora de renina con 50,52 % mientras que para el hidrolizado de pepsina-pancreatina, la fracción >10 kDa fue la mejor con 33,46 % de inhibición de renina. Las fracciones peptídicas de los hidrolizados de proteínas de *Vigna unguiculata* exhibieron actividad antihipertensiva y tienen potencial aplicación como ingredientes en alimentos funcionales.

Palabras clave: *Vigna unguiculata*, renina, hipertensión, péptidos bioactivos, hidrólisis enzimática, ultrafiltración.

Abstract

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is key in the pathophysiology of high blood pressure. Renin regulates the RAAS cascade by converting angiotensinogen to angiotensin I, which is a relatively inactive molecule. In the present investigation, the *in vitro* evaluation of the renin inhibitory activity of peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of *Vigna unguiculata* proteins was carried out. Cowpea protein was hydrolyzed with one of two enzyme systems, pepsin-pancreatin or Flavourzyme®. The ultrafiltration of the hydrolysates produced fractions of different molecular weights. The >5 kDa fraction of the hydrolysate obtained with Flavourzyme® had the highest renin inhibitory activity with 50,52 %, while for the pepsin-pancreatin one, the >10 kDa fraction was the best at 33,46 % renin inhibition. The peptide fractions of *Vigna unguiculata* protein hydrolysates exhibited antihypertensive activity and have potential application as ingredients in functional foods.

Keywords: *Vigna unguiculata*, renin, hypertension, bioactive Peptides, enzymatic hydrolysis, ultrafiltration.

Introducción

La hipertensión es una enfermedad vascular multifacética, constituye un factor importante de riesgo de ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal crónica, daño renal y accidente cerebrovascular, que si no se trata adecuadamente puede avanzar hasta provocar daños en órganos esenciales como corazón y el riñón, lo que eventualmente puede conducir a la muerte (Ramya et al., 2020). A nivel mundial, la hipertensión es responsable del 40 % de todas las muertes asociadas con enfermedades cardiovasculares y esta tendencia continúa aumentando, particularmente en los países con desarrollo bajo y mediano (NCD-RisC, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020), señala que, si los países logran ampliar la cobertura del tratamiento de la hipertensión arterial, podrían evitarse 76 millones de muertes, 120 millones de accidentes cerebrovasculares y 79 millones de infartos de miocardio en el horizonte actual al año 2050. Entonces es evidente que encontrar tratamientos para coadyuvar a lograr esa meta es de primordial importancia.

El tratamiento de la hipertensión consiste en hacer cambios de estilos de vida en los que está inmersa la alimentación y el sedentarismo. Sin embargo, cuando esto no es suficiente, se opta por tratamientos farmacológicos antihipertensivos, entre ellos los inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Sin embargo, estos fármacos, si bien logran controlar la presión arterial, también generan en el paciente efectos secundarios indeseables (Ciau-Solís y Betancur-Ancona, 2021).

De los compuestos sintéticos actualmente utilizados como inhibidores de renina, sólo el Aliskiren está aprobado como fármaco para el tratamiento de la hipertensión. El Aliskiren, es un inhibidor competitivo no

peptídico de la renina utilizado por vía oral y que se une al sitio activo de la molécula de renina, bloqueando la fragmentación del angiotensinógeno y previniendo la formación de angiotensina I (Chen et al., 2013; Ramya et al., 2020).

La renina (EC 3.4.23.15) es una proteína de 37 kDa que cataliza el paso determinante y controla la velocidad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, responsable de la regulación de la presión arterial de los mamíferos, al convertir el angiotensinógeno (una proteína hepática de 55 kDa), en angiotensina I (Ang I) que es un decapeptido inactivo. Los niveles plasmáticos excesivos de Ang I son un factor causante del desarrollo de hipertensión, ya que es la etapa previa para convertir ese decapeptido en un compuesto activo. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la renina puede evitar que se eleve y posteriormente reducir la presión arterial y aliviar los síntomas clínicos asociados con la hipertensión (Aluko, 2019).

Los inhibidores naturales de origen alimentario que poseen efectos inhibidores tanto de la renina como de la enzima convertidora angiotensina (ECA), suelen ser los preferidos como agentes antihipertensivos porque podrían proporcionar un control más eficaz de la presión arterial alta. Actualmente, se están investigando fuentes naturales de inhibidores de renina y ECA como una alternativa más natural, pero eficaz para el control de la presión arterial elevada, mediante la hidrólisis de proteínas utilizando enzimas individuales o combinación de enzimas en tratamientos secuenciales (Girgih et al., 2015).

Las fracciones peptídicas bioactivas son atractivas como agentes terapéuticos debido al riesgo reducido de efectos secundarios o toxicidad asociados con los fármacos antihipertensivos. Si bien existe un abundante volumen de información bibliográfica sobre

los péptidos inhibidores de la ECA, los datos sobre los péptidos inhibidores de la renina y su eficacia antihipertensiva es limitada. Pihlanto y Makinen (2017), han proporcionado información relevante sobre los péptidos inhibidores de la renina disponibles en fuentes alimentarias como la linaza, las semillas de cáñamo, las proteínas albúminas séricas de bovinos, las proteínas de leguminosas y las algas marinas.

Las proteínas vegetales son de particular interés para la producción de péptidos inhibidores de enzimas que regulan la presión arterial, debido a su bajo costo y a su amplia disponibilidad. Los granos de leguminosas son especialmente prometedoras debido a su alto contenido de proteínas, que podrían mejorar su relevancia al generar hidrolizados proteínicos y fracciones peptídicas potencialmente bioactivas.

Cú-Cañetas et al. (2015), utilizando fracciones peptídicas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) obtenidas por la ultrafiltración de hidrolizados enzimáticos, realizaron estudios de inhibición de la ECA, encontrando que las fracciones con tamaños menores a 1 kDa obtenidas por la hidrólisis de las enzimas Flavourzyme® y el sistema secuencia pepsina-pancreatina, presentaron una inhibición hasta del 79 % y del 62 %, respectivamente. El objetivo de este trabajo fue la evaluación del efecto *in vitro* de fracciones peptídicas de *Vigna unguiculata*, obtenidas mediante hidrólisis enzimática sobre la inhibición de la actividad de la renina.

Materiales y métodos

Obtención del concentrado proteínico de *Vigna unguiculata*

Los granos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) fueron adquiridos en el mercado local de la ciudad de Mérida, Yucatán en México. Se utilizaron 30 kg de granos, los

cuales se limpiaron manualmente para eliminar las impurezas y fueron secados durante 2 h a 60 °C en una estufa de convección Fisher Scientific®. Posteriormente, fueron quebrados en un molino de impacto marca Mikros® (Industrial Machinery, Monterrey, México) y luego fueron molidos en un equipo Cyclotec 1093® (Tecator, Sweden).

La harina obtenida se tamizó en una malla de 60 para obtener un tamaño de partícula de 250 µm. Se realizó el fraccionamiento húmedo de la harina para obtener un concentrado proteínico preparando una suspensión de la harina con agua destilada en una relación 1:6 p/v, ajustando el pH a 11 con una solución NaOH 1N y agitando durante una hora de acuerdo a los métodos indicados por Cú-Cañetas et al. (2015).

Hidrólisis enzimáticas de los concentrados proteicos

Se realizó la hidrólisis enzimática del concentrado proteínico empleando dos procedimientos; el primero utilizó un sistema enzimático secuencial de pepsina-pancreatina (PP) de acuerdo con Castañeda-Pérez et al. (2021). Los parámetros de hidrólisis fueron: concentración de sustrato 4 %, relación enzima sustrato 1/10 p/v, temperatura de 37 °C, pH 2 para pepsina y pH 7,5 para pancreatina y un tiempo total de 90 min.

Durante los primeros 45 min, la hidrólisis se realizó con pepsina, seguida por la hidrólisis con pancreatina, ambas en un reactor de vidrio de 2 L colocado en un baño de agua Cole-Parmer Poystat®. La agitación se realizó con un agitador mecánico (Caframo RZ-I®) a 300 rpm, empleado un termómetro y un electrodo del potenciómetro Orión Star A215®. El segundo proceso de hidrólisis se realizó con una preparación de Flavourzyme® 500MG (Novo

Laboratories-Copenhagen, Denmark), a 50 °C, ajustando el pH a 7 con una solución de NaOH 0,1 M y manteniendo la suspensión en agitación (Cú-Cañetas et al., 2015).

Ambas hidrólisis fueron detenidas inactivando las proteasas en un baño de agua a 85 °C por 20 min. Los hidrolizados fueron centrifugados a 12 000 \times g durante 45 min (Centrífuga Heraeus Fresco 17-Thermo Scientific®). Se recuperaron los sobrenadantes, previo a su conservación en congelación a -20°C para su análisis posterior.

Determinación del grado de hidrólisis

Se determinaron los aminoácidos libres con la técnica del O-ftaldialdehído de Nielsen et al. (2001), preparando una curva de calibración con diferentes volúmenes en μ L de una solución madre del aminoácido L-serina. El grado de hidrólisis se calculó dividiendo el contenido de grupos aminos libres en el hidrolizado total (meq/g de proteína), respecto a aminos totales en el concentrado proteico (meq/g de proteína) y expresados en porcentaje. El contenido de proteína se determinó mediante el método de Lowry (Satpathy et al., 2020). La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración preparada a partir de una solución de 1 mg/mL de seroalbúmina bovina (BSA).

Fraccionamiento por ultrafiltración

Las porciones solubles de los hidrolizados enzimáticos fueron sometidas a un fraccionamiento por ultrafiltración basados en lo reportado por Ciau-Solís et al. (2018). Se utilizaron membranas de diferentes cortes moleculares: 1 kDa, 3 kDa, 5 kDa y 10 kDa y una unidad de ultrafiltración Amicon Modelo 2000® (Millipore, Inc., Marlborough, MA, USA). Se pasó a través de las membranas de manera secuencial colectando el retenido en cada la membrana. La fracción peptídica fue liofilizada -47 °C y

13 \times 10⁻³ mbar en un liofilizador Labconco®.

Evaluación de la actividad inhibitoria de renina

La actividad inhibidora sobre la renina de los hidrolizados y fracciones peptídicas se determinó empleando el kit Renin Inhibitor Screening Assay (Li y Aluko, 2010). El buffer empleado para la renina se preparó disolviendo 3 mL en 27 mL de agua grado HPLC, 1:10 (v/v). Ese buffer fue preparado con 50 mM de Tris-HCl, pH 8 y 100 mM de NaCl. Se diluyeron 50 μ l de la solución proteínica de renina en 950 μ l del buffer, es decir en relación 1:20 (v/v).

Antes de llenar la microplaca, se atemperó la solución de renina a 37 °C. La microplaca se llenó como se indica: Blanco: 20 μ L de sustrato, 160 μ L de buffer de renina y 10 μ L de agua grado HPLC; Actividad máxima (100 %): 20 μ L de sustrato, 150 μ L de buffer de renina y 10 μ L de agua grado HPLC y Celda de inhibición: 20 μ L de sustrato, 150 μ L de buffer de renina y 10 μ L de muestra.

La reacción se inició al añadir la renina a los pocillos de actividad máxima y celdas de inhibición. La microplaca se agitó suavemente por 10 s para homogenizar y se dejó incubar por 15 min a 37 °C. La intensidad de fluorescencia (IF) se midió utilizando la longitud de onda de excitación a 340 nm, y la longitud de onda de emisión a 500 nm. El porcentaje de inhibición se calculó restando el promedio de fluorescencia de la celda blanco a las muestras y la celda de actividad máxima, y aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = ((\text{IFAM} - \text{IFM}) / \text{IFAM}) \times 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde: IFAM: Intensidad de fluorescencia de la actividad máxima, IFM: Intensidad de fluorescencia de la muestra.

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). Los datos obtenidos de la actividad inhibitoria de renina se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía y comparación de medias por el método de Duncan para establecer las diferencias entre los tratamientos, utilizando el paquete computacional Statgraphics Centurión Versión 19® y de acuerdo a los métodos de Montgomery (2020).

Resultados y discusión

Grado de hidrólisis

Los hidrolizados proteínicos obtenidos con los sistemas enzimáticos pepsina-pancreatina y Flavourzyme® alcanzaron grados de hidrólisis de 58,95 y 38,76 %, respectivamente. Estos valores presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) confirmando que el sistema enzimático tuvo un efecto significativo sobre la hidrólisis de la proteína del frijol caupí (Figura 1). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Segura-Campos et al. (2013), al realizar la hidrólisis enzimática de los extractos proteicos de *V. unguiculata* con Flavourzyme®, donde se obtuvo un valor de 58,82 %, mientras que para el sistema secuencial pepsina-pancreatina, se obtuvo un valor de 35,74 %.

La pepsina hidroliza principalmente los enlaces peptídicos que contienen aminoácidos aromáticos, metionina o leucina, mientras que la pancreatina tiene una mayor especificidad por los enlaces C-terminales de los residuos de metionina y leucina. Sin embargo, el uso *in vitro* de un sistema enzimático secuencial pepsina-pancreatina se considera una acción equivalente a la hidrólisis de péptidos durante la digestión gástrica.

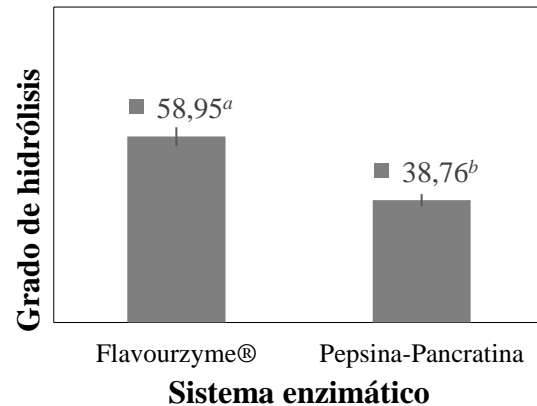


Figura 1. Grados de hidrólisis de los concentrados proteínicos de *V. unguiculata*. ^{a-b} Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Los resultados indicaron que el uso de ambos sistemas proteolíticos permitió generar hidrolizados extensivos de frijol caupí con grados de hidrólisis superiores al 10 % y sus fracciones peptídicas derivadas podrían tener actividad biológica, es decir, el potencial de regular procesos fisiológicos específicos como la inhibición de enzimas relacionadas con la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, principal responsable de la hipertensión.

Actividad inhibitoria sobre la renina

Las fracciones peptídicas ultrafiltradas obtenidas de los hidrolizados de *V. unguiculata* con el sistema enzimático secuencial con pepsina-pancreatina, tuvieron valores de actividad inhibitoria de la renina que oscilaron entre 5,36 y 33,461 %, teniendo la fracción > 10 kDa el mayor grado de inhibición (Figura 2).

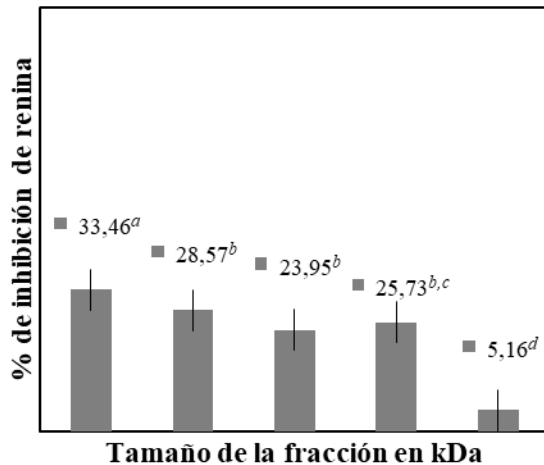


Figura 2. Efecto inhibitor sobre la actividad de la renina de fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración del hidrolizado proteínico de *V. unguiculata* con pepsina-pancreatina. ^{a-d} Literales diferentes en las barras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

El análisis estadístico indicó que la actividad inhibitoria sobre la renina fue estadísticamente diferente ($p < 0,05$) entre fracciones peptídicas. En la actividad inhibitoria sobre la renina en las fracciones obtenidas con el hidrolizado con Flavourzyme®, se presentaron valores de inhibición mayores al 50 % con la fracción >5 kDa y 45 % con la fracción <1 kDa (Figura 3).

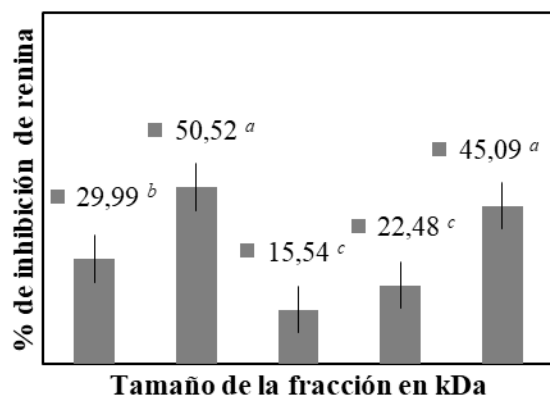


Figura 3. Efecto inhibitor sobre la actividad de la renina de fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración del hidrolizado proteínico de *V. unguiculata* con Flavourzyme®. ^{a-c} Literales diferentes en las barras indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$).

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fracciones ultrafiltradas obtenidas con este sistema enzimático. Este mismo comportamiento fue observado en los estudios de las fracciones peptídicas, obtenidas mediante este mismo método, a partir de proteínas hidrolizadas de semillas de calabaza estriada (*Telfairia occidentalis*), donde la fracción de 5 a 10 kDa, exhibió una actividad inhibitoria de la renina significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con las otras fracciones (Malomo et al., 2020).

El efecto de inhibición de la actividad de la renina que se observó en las fracciones obtenidas por hidrólisis con Flavourzyme®, fue mayor que el que se presentó con pepsina-pancreatina, posiblemente por el tamaño molecular que puedan tener las fracciones, dado que se ha reportado que la hidrólisis con un sistema de exoproteasas y endoproteasas como es Flavourzyme®, libera dipéptidos de bajo peso molecular e incluso aminoácidos libres y se ha encontrado que a menor peso molecular se presentan mejores efectos inhibitorios (Nardo et al., 2020).

En este sentido, Quiroga et al. (2017), reportan valores ligeramente superiores en la capacidad de inhibir a la renina con fracciones peptídicas de *Amatathus hipocondriacus* con una longitud promedio de 4 a 6 aminoácidos. Estos péptidos fueron capaces de inhibir la renina en un 60 %.

La mayoría de los péptidos inhibitorios de la renina se han producido mediante hidrólisis de diversas proteínas de granos. Udenigwe et al. (2009), realizaron uno de los trabajos iniciales que informó sobre la capacidad de las fracciones peptídicas de linaza para inhibir la actividad *in vitro* de la renina. La proteína de linaza (*Linum usitatissimum*) se trató con pepsina, ficina, tripsina, papaína, termolisina, pancreatina y

Alcalase® en condiciones óptimas de hidrólisis y se fraccionaron mediante ultrafiltración (1–3 y 3–5 kDa). Las fracciones obtenidas con pepsina y con Alcalasa® mostraron una actividad moderada o no tuvieron actividad sobre la enzima renina respectivamente.

Este mismo estudio encontró relación entre el carácter catiónico de las fracciones obtenidas con su potencial inhibidor, de manera que la fracción con mejor capacidad de inhibición de la renina, fue la que presentaba mayor carácter catiónico, a diferencia del péptido menos catiónico que no tuvo actividad de inhibición de la renina.

Las proteínas de linaza están constituidas principalmente por un 80 % de globulinas similar al 79 % de estas mismas en el frijol caupi. Estas proteínas son mayoritarias en ambos granos y su hidrólisis libera fracciones peptídicas con aminoácidos catiónicos como arginina, histidina y lisina, cuya proporción dependerá de la enzima utilizada (Gonçalves et al., 2020; Mueed et al., 2022). Esto señala que el uso de estas enzimas no siempre produce péptidos potencialmente inhibidores, comportamiento que pudiera explicar lo observado en las fracciones de *V. unguiculata* (Figura 2), que al ser hidrolizadas con el sistema enzimático secuencial de pepsina-pancreatina, presentaron bajos grados de inhibición de la renina.

Ciau-Solís et al. (2018), indicaron que el fraccionamiento en membranas de ultrafiltración mejoró la inhibición de la renina en comparación con los hidrolizados de proteínas de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) obtenidos por hidrólisis con Flavourzyme®-Alcalase® y Pepsina-Pancreatina. Las fracciones de ultrafiltración exhibieron valores inhibidores de la renina del 13,7 % al 31,7 %, respectivamente y que resultaron similares a los obtenidos en las fracciones de frijol caupí que fueron obtenidas mediante el

sistema pepsina-pancreatina. Sin embargo, la fracción >3 kDa con péptidos de menor tamaño, tuvo la mayor inhibición de renina, contra-riamente a lo observado con *V. unguiculata* hidrolizada con Flavourzyme®.

Estos resultados permiten observar la capacidad de inhibición de las distintas fracciones sobre la actividad de la renina y se hace notoria la diferencia entre las fracciones obtenidas por distintos sistemas de hidrólisis. Es posible que el tamaño de los péptidos generados por la hidrólisis sea un factor que influyó en su comportamiento como inhibidores, dado que se puede notar que la fracción >5 kDa con Flavourzyme® y la fracción >10 kDa para Pepsina-Pancreatina, presentaron los mayores niveles inhibición de la enzima y que probablemente esa diferente carga iónica sea importante según la composición de las cadenas proteicas presentes en las fracciones.

Conclusiones

Las fracciones peptídicas producidas por hidrólisis enzimática de proteínas de frijol caupí (*Vigna unguiculata*), seguida de un proceso de ultrafiltración exhibieron actividad biológica *in vitro*, al actuar como inhibidores de la renina presentando inhibición máxima de 50,5 %. Las proteínas hidrolizadas y ultrafiltradas, podrían contemplarse como una alternativa que contribuya a reducir la presión arterial, ayudando a la prevención de eventos vasculares, mediante su uso en alimentos funcionales o nutraceuticos y para regímenes especializados.

Referencias

- Aluko, R. E. (2019). Food protein-derived renin-inhibitory peptides: in *vitro* and *in vivo* properties. *Journal of Food Biochemistry*, 43, e12648. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12648>
- Castañeda-Pérez, E., Jiménez-Morales, K., Castellanos-Ruelas, A. Chel-Guerrero, L., &

- Betancur-Ancona, D. (2021). Antidiabetic potential of protein hydrolysates and peptide fractions from Lima bean (*Phaseolus lunatus* L): An *in vitro* study. *International Journal of Peptide Research and Therapeutic*, 27, 1979-1988. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10226-8>
- Chen, Y., Meng, L., Shao, H., & Yu, F. (2013). Aliskiren vs. other antihypertensive drugs in the treatment of hypertension: a meta-analysis. *Hypertension Research*, 36, 252-261. <https://doi.org/10.1038/hr.2012.185>
- Ciau-Solís, N.A., Acevedo-Fernández, J.J., & Betancur-Ancona, D. (2018). *In vitro* renin-angiotensin system inhibition and *in vivo* antihypertensive activity of peptide fractions from lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Journal of the Science and Food Agriculture*, 98, 781-786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8543>
- Ciau-Solís, N., & Betancur-Ancona, D. (2021). Sistema renina-angiotensina (SRA) en las patologías cardiovasculares: papel sobre la hipertensión arterial. *Journal of Negative and Non Positive Results*, 6(1), 163-76. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3712>
- Cú-Cañetas, T., Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., Sandoval-Peraza, M., & Chel-Guerrero, L. (2015). Estudios de inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina-I, efectos hipotensor y antihypertensivo de fracciones peptídicas de *V. unguiculata*. *Nutrición Hospitalaria*, 32(5), 2117-2125. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9624>
- Girgih, A.T., Nwachukwu, I.D., Hasan, F., Fagbemi, T.N., Gill, T., & Aluko, R.E. (2015). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates and their antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *Food & Nutrition Research*, 59, 2978. <https://doi.org/10.3402/fnr.v59.29788>
- Gonçalves, F.V., Medici, L.O., Da Fonseca, M.P.S. Gaziola, S.A., Lima, G.R., Macedo, D.C., & Azevedo, R.A. (2020). Characterization of the development of Cowpea cultivars and of the quantity and quality of proteins in their grains. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 55, e00837. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.00837>
- Li, H., & Aluko, R. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11471-11476. <https://doi.org/10.1021/jf102538g>
- Malomo, S.A., Nwachukwu, I.D., Girgih, A.T., Idowu, A.O., Aluko, R.E., & Fagbemi, T.N. (2020). Antioxidant and renin-angiotensin system inhibitory properties of Cashew Nut and Fluted-Pumpkin protein hydrolysates. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 70(3), 275-289. <https://doi.org/10.31883/pjfn/122460>
- Montgomery D.C. (2020). *Design and analysis of experiments*. Hoboken, NJ, USA; Wiley & Sons; pp. 408-72.
- Mueed, A., Shibli, S., Korma, S.A., Madjirebaye, P., Esatbeyoglu, T., & Deng, Z. (2022). Flaxseed bioactive compounds: Chemical composition, functional properties, Food Applications and Health Benefits-Related Gut Microbes. *Foods*, 11(20), 3307-3332. <https://doi.org/10.3390/foods11203307>
- Nardo, A.E., Suárez, S., Quiroga, A.V., & Añon, M.C. (2020). Amaranth as a source of antihypertensive peptides. *Frontiers in Plant Science*, 11, 578631. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.578631>
- NCD-RisC. (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *Lancet*, 7, 389(10064), 37-55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5)
- Nielsen, P.M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66, 642-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Pihlanto, A., y Makinen, S. (2017). The function of renin and the role of food-derived peptides as direct renin inhibitors. In A. Tolekova (Ed.), *Renin-angiotensin system-past, present and future* IntechOpen. (pp. 241-258). <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69513>
- Quiroga, A.V., Aphalo, P., Nardo, A.E., & Añon, M. C. (2017). *In vitro* modulation of renin-angiotensin system enzymes by Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein derived

- peptides: Alternative mechanisms different from ACE Inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415-7423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02240>
- Ramya, K., Suresh, R., Kumar, H.Y., Kumar, B.R.P., & Murthy, N.B.S. (2020). Decades-old renin inhibitors are still struggling to find a niche in antihypertensive therapy. A fleeting look at the old and the promising new molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(10), 115466. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115466>
- Satpathy, L., Dash, D., Sahoo, P., Anwar, T.N., & Parida, S.P. (2020). Quantitation of total protein content in some common edible food sources by Lowry protein assay. *Letters in Applied NanoBioScience*, 9(3), 1275-1283. <https://doi.org/10.33263/LIANBS93.12751283>
- Segura-Campos, M., Ruiz-Ruiz, J., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2012). Antioxidant activity of *Vigna unguiculata* L. walp and hard-to-cook *Phaseolus vulgaris* L. protein hydrolysates. *CyTA-Journal of Food*, 11(3), 208-215. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.722687>
- Udenigwe, C. C., Lin, Y.-S., Hou, W.C., & Aluko, R. E. (2009). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.009>
- World Health Organization. (2020). *WHO reveals leading causes of death and disability worldwide 2000-2019*. who.int <https://www.who.int/es/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>