



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA
ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA EN
LECHES FERMENTADAS CON CEPAS ESPECÍFICAS DE
Lactococcus lactis EN UN MODELO GASTROINTESTINAL
SIMULADO**

Por:

Alejandro Epigmenio Chávez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Alejandro Epigmenio Chávez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



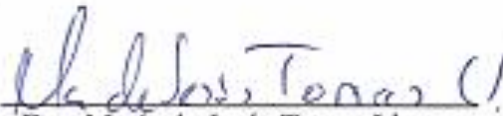
Dra. Belinda Vallejo Gálland
Directora de Tesis



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



Dra. María de Jesús Torres Llanez
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero durante el posgrado y por la preocupación de que más jóvenes se sigan preparando en beneficio de nuestra nación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), por haberme dado la oportunidad para realizar un posgrado y por brindarme un espacio en el Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos y de Química y Biotecnología de Productos Lácteos.

Especial agradecimiento a la Dra. Belinda Vallejo Galland, por ser mi directora de tesis y por haber depositado su confianza en mí para la realización de este trabajo. Muchas gracias por sus importantes aportaciones, disponibilidad de tiempo y apoyo durante el posgrado.

Agradezco al Dr. Aarón F. González Córdova. Usted fue pionero en mi llegada a CIAD. Por todo su apoyo desde la estancia preprofesional, su disponibilidad y su confianza durante estos tres años ¡mil gracias!

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza, por su asesoría durante el trabajo de laboratorio, por su disponibilidad de tiempo y sus aportaciones tanto laboral como personalmente.

A la Dra. María de Jesús Torres Llanez, por sus contribuciones al presente trabajo, su dedicación, tiempo y por los conocimientos aportados en el laboratorio.

Agradecimientos a la M. en C. María del Carmen Estrada Montoya por las facilidades otorgadas en el trabajo de laboratorio y a la Dra. Lilia Ma. Beltrán Barrientos por sus contribuciones y el apoyo brindado para la culminación del presente trabajo.

Al M. en C. Alejandro Santos Espinosa, a la Dra. Priscilia Yazmín Heredia Castro y a la Ing. Wendy Guadalupe Mora Cortés. Gracias infinitas a ustedes por todos los momentos maravillosos que hemos compartido, y por ser la mano de apoyo incondicional durante mi estancia en Hermosillo y en el laboratorio.

A la M. en C. Lourdes Santiago López y al M. en C. José Eleazar Aguilar Toalá, por la disponibilidad, sugerencias y aportaciones brindadas en cuestiones de trabajo. Gracias también por esos momentos agradables de pláticas y bromas y por ser un gran apoyo desde mi llegada a Hermosillo.

A mis compañeros de generación de la maestría: Ing. Rocío Hernández Mendoza y al Ing. Miguel Ángel Rendón Rosales, por la colaboración realizada durante la fase experimental y por hacer que fuera más ameno el trabajo de laboratorio.

Agradezco al personal de docencia que de la manera más amable, me atendieron en cuestiones de trámite: Faly Gil Lamadrid, Laura García, Verónica Araiza, Argelia Marín y Alejandra Córdova.

Gracias al equipo de trabajo del Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos y Química y Biotecnología de Productos Lácteos: M. en C Ricardo Reyes, M. en C. Carmen Manzanarez, M. en C. Isidro Méndez, Ing. Erick Valenzuela, Ing. Blanca Ocampo, Ma. Alejandra Ospina, Ing. Paul F. Cuevas, L.N Nicolás González, L.N Ildelfonso Guerrero, Ing. Daniel González, Ing. Adilene Mendoza y Cinthya García.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma fueron parte importante en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

*A mi madre, **Lucía Chávez González**. Por todo tu amor, comprensión, confianza y apoyo para poder llegar hasta donde ahora estoy. Gracias mamá por aguantarme, regañarme, quererme y apoyarme sin importar cualquier cosa que pudiera suceder. Te amo.*

*A mi padre, **Alejandro Epigmenio Benito**, por los consejos y el esfuerzo dedicados para siempre seguir adelante.*

*A mi hermano **Rodrigo** y su esposa **Lola**, quienes siempre han creído en mí. A mi hermano **Gerardo**, que ha estado al lado de mi familia.*

*Dedico este trabajo a mi sobrino, **Rodriguito**, porque ha hecho de mí el tío más cariñoso y por dame la oportunidad de quererlo como a un hijo, te quiero muchísimo.*

*A mis hermanos chapingueros, que estuvieron, están y estarán conmigo a pesar de la distancia: **Luz Belem, Carlos Israel, Luis Hugo** y **José Martín**. Los quiero mucho.*

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1 . Hipertensión Arterial: Enfermedad Crónica Degenerativa.....	18
2.2 . El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona en la Regulación de la Hipertensión Arterial.....	19
2.3 . Alimentos Funcionales como Fuentes de Péptidos Bioactivos.....	21
2.4 . Producción de Péptidos Bioactivos.....	22
2.4.1. Hidrólisis Enzimática.....	23
2.4.2. Fermentación Microbiana.....	24
2.5 . Péptidos Inhibidores de la ECA.....	26
2.6 . Estructura-Actividad de los Péptidos Inhibidores de la ECA.....	26
2.7 . Leches fermentadas: Fuentes de Péptidos Inhibidores de la ECA.....	28
2.8 . <i>Lactococcus lactis</i> : Potencial Benéfico en Leches Fermentadas.....	30
2.9 . Biodisponibilidad de Péptidos Inhibidores de la ECA.....	32
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.1. Objetivos Específicos.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Reactivación de Cepas.....	39
5.2. Elaboración de Leches Fermentadas.....	40
5.2.1. Elaboración de Preinóculo.....	40
5.2.2. Elaboración de Leches Fermentadas.....	41
5.3. Actividad Proteolítica de Leches Fermentadas.....	42
5.4. Obtención de Extractos Acuosa.....	42

CONTENIDO (continuación)

	Página
5.5. Ensayo <i>in vitro</i> : Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina.....	43
5.6. Cuantificación de Proteína.....	44
5.7. Simulación Gastrointestinal.....	44
5.8. Perfiles Peptídicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución....	48
5.9. Análisis Estadístico.....	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
6.1. Cambio de pH Durante la Fermentación.....	50
6.2. Actividad Proteolítica.....	51
6.3. Ensayo <i>in vitro</i> : Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina de Leches Fermentadas.....	53
6.4. Ensayo <i>in vitro</i> : Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina de Leches Fermentadas Después del Modelo Gastrointestinal Simulado.....	56
6.5. Perfil de Péptidos de Leches Fermentadas con <i>Lc. lactis</i> Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	60
7. CONCLUSIONES.....	78
8. REFERENCIAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	21
2	Sistema proteolítico de <i>Lc. lactis</i>	25
3	Modelo de interacción del centro activo de la ECA con los sustratos o inhibidores competitivos.....	27
4	Transporte de péptidos en el sistema gastrointestinal.....	33
5	pH de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 24 y 48 h de incubación.....	51
6	Actividad proteolítica de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 24 y 48 h de incubación.....	53
7	Porcentaje de inhibición de la ECA de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 24 y 48 h de incubación.....	54
8	IC ₅₀ de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 24 y 48 h de incubación.....	55
9	Porcentaje de inhibición de la ECA de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 24 h de incubación antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado (DGIS).....	57
10	Porcentaje de inhibición de la ECA de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 48 h de incubación antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado (DGIS).....	58
11	IC ₅₀ de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> a 24 y 48 h de incubación antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado (DGIS)	60
12	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50598 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	64
13	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50571 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	65
14	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	66
15	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50599 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	67

LISTA DE FIGURAS (continuación)

16	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50600 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	68
17	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> Q ₃ antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	69
18	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50571 y NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	70
19	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50598 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	71
20	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50571 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	72
21	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	73
22	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50599 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	74
23	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50600 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	75
24	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de <i>Lc. lactis</i> Q ₃ antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	76
25	Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de <i>Lc. lactis</i> NRRL B-50571 y NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de la presión arterial en adultos.....	18
2	Secuencias de péptidos con actividad inhibidora de la ECA en leches fermentadas.....	29
3	Cepas de <i>Lc. lactis</i> empleadas para la fermentación de leches.....	40
4	Leches fermentadas por cepas de <i>Lc. lactis</i> empleadas.....	41
5	Composición de los diferentes fluidos digestivos empleados en el modelo gastrointestinal simulado.....	46
6	Áreas totales de los perfiles peptídicos de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> antes y después de ser sometidas en un modelo gastrointestinal <i>in vitro</i>	62
7	Áreas totales de los perfiles peptídicos e IC ₅₀ de leches fermentadas por cepas específicas de <i>Lc. lactis</i> después de ser sometidas en un modelo gastrointestinal <i>in vitro</i>	63

RESUMEN

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por valores de presión arterial que exceden el rango normal ($\geq 130/80$ mmHg). Estudios han demostrado que, a partir de las proteínas lácteas, las bacterias ácido lácticas pueden generar péptidos con capacidad para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina (ECA), responsable del incremento de la presión sanguínea. Sin embargo, la biodisponibilidad y bioactividad de los péptidos puede aumentar o disminuir debido a las condiciones del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la inhibición de la ECA en leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis*, antes y después de someterlas a un modelo gastrointestinal simulado. Se fermentaron leches a 24 y 48 h, y se les evaluó la actividad proteolítica y la actividad inhibidora de la ECA. Así mismo, las leches fermentadas fueron sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas y, posteriormente, se determinó la actividad inhibidora de la ECA. Los resultados mostraron que la actividad proteolítica y la actividad inhibidora de la ECA de las leches con 48 h de fermentación fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las de leches a 24 h de fermentación. Sin embargo, después de la digestión gastrointestinal simulada, los IC_{50} de las leches fermentadas B-572, B-599, B-600, la mezcla M B-571-B-572 (1:1) y Q₃ a las 24 h, disminuyeron de manera significativa ($p < 0.05$). La leche fermentada Q₃ a las 24 h fue la que presentó menor IC_{50} de todas las leches fermentadas sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas, por lo que la liberación de péptidos con mayor actividad inhibidora de la ECA podría ser favorecida por el proceso de digestión gastrointestinal. Por lo anterior, la leche fermentada Q₃ podría presentar un mejor potencial efecto antihipertensivo en modelos *in vivo*.

Palabras clave: ECA, leches fermentadas, *Lactococcus lactis*, digestión gastrointestinal

ABSTRACT

Hypertension is a chronic degenerative disease characterized by blood pressure values that exceeds the normal range ($\geq 130/80$ mmHg). Studies have shown that lactic acid bacteria can generate peptides from milk proteins, capable of inhibiting the angiotensin converting enzyme (ACE), responsible for the increase in blood pressure. However, the bioavailability and bioactivity of the peptides may increase or decrease due to the conditions of the gastrointestinal tract. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inhibition of ACE in fermented milk with specific strains of *Lactococcus lactis*, before and after submitting them to a simulated gastrointestinal model. Milks were fermented at 24 and 48 h, and the proteolytic activity and the ACE inhibitory activity were evaluated. Likewise, the fermented milks were subjected to simulated gastrointestinal conditions and, subsequently, the ACE inhibitory activity was determined. The results showed that the proteolytic activity and the ACE inhibitory activity of the milks with 48 h of fermentation were significantly higher ($p < 0.05$) those of the milks at 24 h of fermentation. However, the IC_{50} of the fermented milks B-572, B-599, B-600, the mixture M B-571-B-572 (1:1) and Q₃ at 24 h, decreased significantly ($p < 0.05$) after the simulated gastrointestinal digestion. On the other hand, the IC_{50} of the fermented milks B-571, B-572 and the mixture M B-571-B572 (1:1) at 48 h were lower ($p > 0.05$) than before digestion. The fermented milk Q₃ at 24 h was the one with the lowest IC_{50} of all the fermented milks at the simulated gastrointestinal conditions, so the release of the acids with greater ACE inhibitory activity could be favored by the gastrointestinal digestion process. Therefore, fermented milk with Q₃ could present a better potential antihypertensive effect in *in vivo* models.

Key words: ACE, fermented milk, *Lactococcus lactis*, gastrointestinal digestion

1. INTRODUCCION

La hipertensión se define como una elevación crónica de la presión arterial sistémica por arriba de 130 mmHg de presión sistólica y de 80 mmHg de presión diastólica (Whelton et al., 2017). Desde el punto de vista clínico, la hipertensión es el principal factor de riesgo desencadenante de enfermedades cardiovasculares a nivel mundial, y afecta tanto a hombres como a mujeres (OMS, 2013). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es la responsable del aumento de la presión arterial (Skrbic y Igit, 2009). De acuerdo a Pereira et al., (2006), aumenta la presión sanguínea al catalizar la conversión del decapeptido angiotensina I en el octapeptido angiotensina II. Este último es un potente vasoconstrictor, por lo que su inhibición favorecerá una disminución de la presión arterial sanguínea.

La hipertensión ha sido tratada con diversos medicamentos sintéticos que inhiben a la ECA. Sin embargo, las desventajas del uso de estos medicamentos es la producción de ciertas alteraciones secundarias a corto y largo plazo como tos, perturbación del gusto y salpullidos en la piel (Torruco-Uco et al., 2008). Por lo que, en la actualidad, el desarrollo de alimentos funcionales es una de las estrategias que representan una alternativa en la prevención y reducción de la hipertensión arterial y de los efectos negativos en el organismo (Herrera et al., 2014).

Hoy en día los alimentos funcionales se consideran, además de una fuente de nutrientes, un recurso importante para obtener compuestos bioactivos, entre ellos los péptidos bioactivos, a partir de las proteínas (González-Córdova et al., 2011). Los péptidos son secuencias de 3 a 20 aminoácidos, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación de la proteína precursora (Alvarado y Guerra, 2010; Mulero-Cánovas et al., 2011). Diversos estudios sugieren que el consumo de leche y productos lácteos está inversamente relacionado con el riesgo de padecer hipertensión, donde se ha demostrado que algunas leches fermentadas contienen péptidos inhibidores de la ECA que se producen gracias al sistema proteolítico de las bacterias ácido lácticas (BAL), y en casos particulares

por la adición de enzimas digestivas (Rokka et al., 1997; Leclerc et al., 2002; Fuglsang et al., 2003; Hernández-Ledesma et al., 2004).

Los primeros estudios del efecto de la inhibición de la ECA en leches fermentadas fueron publicados por Nakamura et al., (1995) y Yamamoto et al, (1999). La mayoría de los estudios del efecto de inhibición de la ECA de leches fermentadas se han realizado con cepas específicas de *Lactobacillus* (*Lb.*) (Mulero-Cánovas et al., 2011). No obstante, Rodríguez-Figueroa et al., (2010) evaluaron la capacidad inhibidora de la ECA de diferentes leches fermentadas por 48 h con cepas específicas de *Lactococcus* (*Lc.*) *lactis* aisladas de diferentes nichos. Los resultados mostraron que las leches fermentadas por *Lc. lactis* de nichos lácteos artesanales (NRRL B-50571, NRRL B-50572, NRRL B-50598, NRRL B-50599, NRRL B-50600 y Q₃), mostraron mayor inhibición de la ECA y menor IC₅₀ (concentración mínima necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ECA). Posteriormente, dos cepas fueron seleccionadas (NRRL B-50571 y NRRL B-50572) para fermentar leche por 48 h y evaluar su potencial efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (REH). Los resultados demostraron que después de administrar las leches o sus extractos solubles en agua a REH, la presión arterial y ritmo cardiaco disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). Además, las leches fermentadas administradas presentaron un efecto hipolipidémico e hipotrigliceridémico (Rodríguez-Figueroa et al., 2013a, b). Posteriormente, la cepa NRRL B-50571 fue seleccionada para fermentar leche por 48 h y evaluar el efecto antihipertensivo en un estudio clínico. Al finalizar del estudio, los resultados mostraron que al final de la intervención de 8 semanas, la presión arterial sistólica en los sujetos de estudios disminuyó en 13 mmHg respecto al valor inicial (Beltrán-Barrientos et al., 2018).

Como pudo observarse, de las cepas seleccionadas para este estudio para evaluar el efecto antihipertensivo de leche fermentada por 48 h, solo dos (NRRL B-50571 y NRRL B-50572) han sido objeto de estudios *in vivo* y en el caso de la primera (NRRL B-50571), de un estudio clínico. Por otro lado, la evaluación de la inhibición de la ECA ha sido en extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas a las 48 h. Por todo lo anterior, es importante determinar la inhibición de la ECA de leches fermentadas a 24 y 48 h de incubación. Así mismo, conocer si existen diferencias significativas en los IC₅₀ de las

leches fermentadas en ambos tiempos de fermentación después de someterlas a un modelo gastrointestinal simulado. Se ha reportado que, durante el proceso de digestión, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden inactivar péptidos o liberarlos de la proteína nativa donde se encontraban inactivos, pudiendo presentar bioactividad una vez liberados (Segura-Campos et al., 2010). Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas por cepas específicas de *Lc. lactis*, antes y después de un modelo gastrointestinal simulado.

2. ANTECEDENTES

2.1. Hipertensión Arterial: Enfermedad Crónica Degenerativa

La presión arterial, también llamada presión sanguínea, es la fuerza con la que la sangre circula por las paredes de las arterias al ser bombeada por el corazón. Se diferencia en valores de presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD), los cuales son expresados en milímetros de mercurio (mmHg) (Brack, 2009). De acuerdo a las nuevas pautas del Colegio Americano de Cardiología (por sus siglas en inglés, ACC) y de la Asociación Americana del Corazón (por sus siglas en inglés, AHA) los valores normales de PAS y PAD son de 120/80 mmHg, respectivamente. Actualmente, dichas asociaciones han clasificado a los pacientes con presión arterial elevada si presentan una PAS de 120-129 mmHg y menores de 80 mmHg en la PAD (Tabla 1) (Whelton, et al., 2017).

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial en adultos

	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Presión arterial normal	< de 120	< de 80
Presión arterial elevada	120-129	< de 80
Hipertensión etapa 1	130-139	80-89
Hipertensión etapa 2	≥ 140	≥ 90

Fuente: Whelton et al., (2017).

La hipertensión arterial se ha definido como el incremento continuo de la presión que ejerce la sangre sobre los vasos sanguíneos, presentando valores por arriba de 130/80 mmHg de PAS y PAD, respectivamente (Torruco-Uco et al., 2008; OMS, 2013; ACC/AHA, 2017). Esta enfermedad es considerada un factor de riesgo que conlleva al

desarrollo de otras enfermedades cardiovasculares, al aumentar las probabilidades de sufrir un ataque al corazón o un accidente cerebrovascular. La hipertensión arterial también es llamada el “asesino silencioso”, ya que normalmente esta enfermedad es asintomática. Sin embargo, a largo plazo es posible que el paciente presente algunos síntomas como dolores de cabeza, mareos o dificultad para respirar (CENAPRECE, 2011).

La hipertensión está distribuida en todas las regiones del planeta atendiendo a múltiples factores: económicos, sociales, culturales, ambientales y étnicos. Se estima que 1,130 millones de personas la padecen y está presente en la mayoría de los 9.4 millones de muertes de origen cardiovascular al año (Lim et al., 2012; OMS, 2015). Factores como el consumo excesivo de sodio, dietas elevadas en grasas, tabaquismo, diabetes, obesidad, inactividad física y la edad han sido relacionadas con la contribución a la aparición de la hipertensión (Campos-Nonato et al., 2013). En México, de acuerdo con las cifras reportadas por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT MC 2016), uno de cada 4 adultos padece hipertensión (25.5%). A su vez, esta enfermedad se encuentra relacionada con casos de hipercolesterolemia, diabetes y obesidad abdominal, lo que agrava la situación del paciente. Es por esto que la hipertensión es considerada un problema de salud pública (Campos-Nonato et al., 2013; Román et al., 2015).

2.2. El Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona en la Regulación de la Hipertensión Arterial

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una dicarbopeptidasa y es la enzima clave en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Figura 1), ya que por medio de dicho sistema se realiza el proceso de regulación de la presión arterial (Skrbic y Igic, 2009). Este sistema ayuda a la regulación y estabilidad hemodinámica del cuerpo humano a través del balance de agua y electrolitos, y con ello, la regulación de la presión arterial. Cuando la presión arterial disminuye, inicia la liberación de renina por el aparato yuxtglomerular

de los riñones, actuando sobre el angiotensinógeno, el cual es un péptido sintetizado por el hígado. De este modo, se libera la angiotensina I, una hormona no activa constituida por 10 aminoácidos (Fitzgerald et al., 2004).

La ECA es producida en el epitelio pulmonar y renal, y ésta actúa sobre la angiotensina I eliminando dos aminoácidos terminales: histidina-leucina y se da paso a la conversión del octapéptido angiotensina II (Pereira et al., 2006). La angiotensina II estimula a las células de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal para sintetizar y segregar aldosterona, por lo que influye significativamente en la absorción de sodio y agua. Además, la aldosterona aumenta la reabsorción de sal y agua por parte de los túbulos renales, aumentando el volumen del líquido extracelular, provocando a su vez el aumento de la presión arterial (Feldstein et al., 2007).

En la actualidad, los estudios realizados para el tratamiento de la hipertensión se basan en el control del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Es por ello que diversos medicamentos son diseñados con el objetivo de inhibir a la ECA. Un ejemplo de estos fármacos es el Captopril®, sintetizado por Ondetti et al., (1977). Otros medicamentos inhibidores de la ECA disponibles comercialmente son Benazapril®, Fosinopril® y Moexipril®. Sin embargo, las desventajas del uso de estos medicamentos son las reacciones secundarias generadas a corto y largo plazo en la salud humana. Algunos de ellos son tos, fatiga y erupciones en la piel (Torruco-Uco et al., 2008).

Otra desventaja de los tratamientos farmacológicos es su elevado costo, por lo que es muy común que los pacientes hipertensos opten por abandonar el tratamiento (Román et al., 2015). Por lo anterior, y de acuerdo a las estrategias dietéticas para detener la hipertensión (por sus siglas en inglés DASH) y a lo citado por Sosa-Rosado (2010), se recomienda limitar el consumo de sal y alcohol, realizar ejercicio físico, así como llevar un control de peso y consumir frutas, verduras, grasas saludables y lácteos semidescremados o descremados. Aunado a esto, se ha enfatizado la importancia del desarrollo de estrategias que representen una alternativa más en la prevención y reducción de la hipertensión: los alimentos funcionales (Herrera et al., 2014).

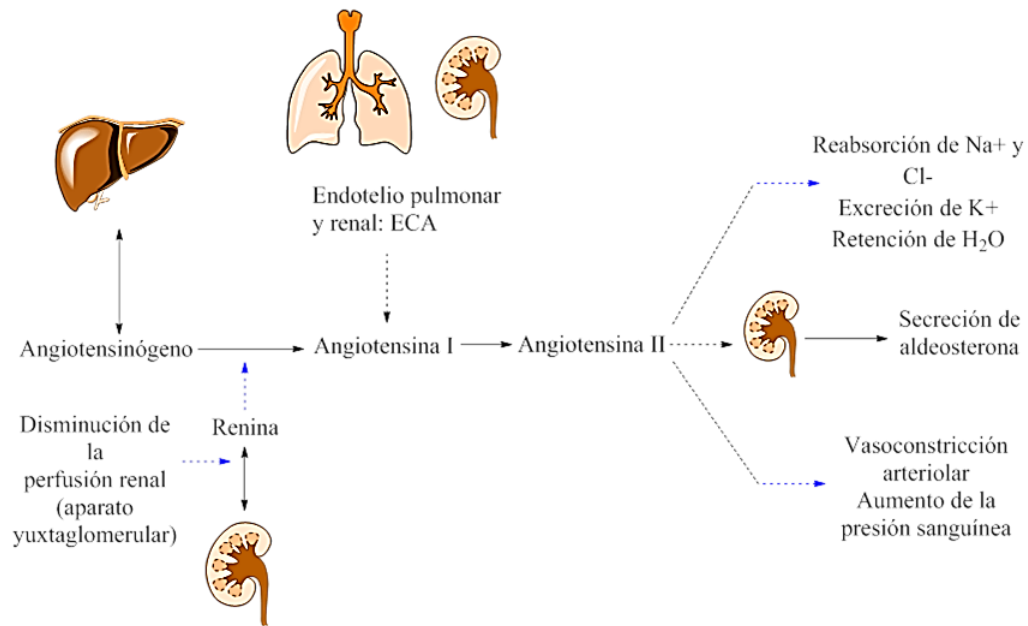


Figura 1. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Adaptado de Rad (2006).

2.3. Alimentos Funcionales como Fuentes de Péptidos Bioactivos

El término “alimento funcional” se utilizó por primera vez en 1984 en Japón como resultado de un estudio sobre las relaciones entre la nutrición, la satisfacción sensorial, el enriquecimiento y la modulación de los sistemas fisiológicos. Lo anterior con el fin de definir los productos alimenticios enriquecidos con componentes especiales que poseen efectos benéficos a nivel fisiológico, más allá de los nutricionales (Baeza Jiménez, 2013). Hoy en día los alimentos funcionales se consideran, además de una fuente de nutrientes, un recurso importante para obtener compuestos fisiológicamente activos (González-Córdova et al., 2011). Esto ha generado que los alimentos funcionales se posicionen con mayor fuerza dentro del sector alimentario y en la preferencia de los consumidores. Así, desde hace tiempo, una gran cantidad de alimentos con propiedades funcionales han sido desarrollados para aportar un beneficio a la salud (Herrera et al., 2014).

Dentro de los componentes fundamentales de los alimentos, se pueden mencionar a las proteínas, ya que estas son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del organismo humano. Desde un punto de vista funcional, las proteínas afectan las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos (Torruco-Uco et al., 2008). Además del aporte de energía metabólica y aminoácidos esenciales, las proteínas pueden tener un efecto en el organismo a nivel fisiológico o funcional (Sánchez-Mendoza et al., 2016). Por ello, la investigación de las propiedades funcionales de las proteínas ha sido un área que ha tomado bastante fuerza y, actualmente, las proteínas alimentarias son consideradas materia prima para la obtención de péptidos con actividad biológica.

Los péptidos bioactivos son cadenas de aminoácidos que se encuentran encriptados e inactivos en la proteína nativa. Dichos compuestos, al ser liberados por medio de la hidrólisis química o enzimática, ejercen determinadas actividades biológicas (Mulero-Cánovas et al., 2011). Generalmente, son cadenas cortas que comprenden de 3 a 20 aminoácidos, presentan residuos de aminoácidos hidrofóbicos, en adición a grupos lisina o arginina, lo que les atribuye una resistencia a la acción de peptidasas digestivas. Esto último les permite su absorción en el intestino y su posterior paso al torrente sanguíneo, sin que su estructura resulte alterada (Alvarado y Guerra, 2010). Los péptidos bioactivos se encuentran en los productos alimentarios ricos en proteínas, por ejemplo, productos lácteos (Mulero-Cánovas et al., 2011).

2.4. Producción de Péptidos Bioactivos

Para que los péptidos bioactivos puedan ejercer sus funciones, es necesario que estos mismos sean liberados de la proteína nativa. Diversos estudios señalan que los péptidos se liberan de la proteína original durante el procesamiento de los alimentos o durante su paso por el sistema digestivo. Claro ejemplo de estas formas de liberación de péptidos bioactivos se dan mediante la hidrólisis enzimática y la fermentación (Korhonen y Pihlanto, 2006).

2.4.1. Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso donde ocurre una ruptura de enlaces con distintas especies cargadas en equilibrio. Primeramente, ocurre la formación de un complejo enzima-proteína, para después dar paso a la ruptura del enlace amídico, lo que ocasionará que el péptido liberado se separe de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua (Najafian y Babji, 2014). La hidrólisis enzimática es un tratamiento eficiente destinado para liberar secuencias peptídicas con actividad biológica a partir de la fragmentación de proteínas y que puede inducir en la bioactividad de las proteínas intactas. También debe considerarse de gran importancia la selección de las enzimas apropiadas o la mezcla de ellas, ya que de ello depende obtener de modo eficaz los resultados esperados. Posteriormente, diversas condiciones del proceso pueden ser empleadas con el fin de conseguir una mayor producción de péptidos bioactivos (Borja-Lozano, 2014).

En la producción enzimática de péptidos bioactivos se han empleado diversas enzimas de origen gastrointestinal, las más comunes son la pepsina y la tripsina. También se han utilizado combinaciones de enzimas, las cuales incluyen pancreatina y quimotripsina. A su vez, diversas enzimas obtenidas de cepas microbianas se han empleado con el objetivo de generar péptidos bioactivos (Liu et al., 2010; Nalinanon et al., 2011; Ahn et al., 2012). Resulta ventajoso el empleo de proteasas derivadas de fuentes microbianas comerciales, por ejemplo, alcalasa, flavourzima, neutrasa para degradar proteínas alimentarias, ya que dichas proteasas han logrado demostrar ser seguras y de bajo costo. Además, los rendimientos de producción son muy altos (Clemente, 2000; Agyei y Danquah, 2011). La ventaja de esta tecnología radica en mejorar las dietas de las personas complementando los sistemas biológicos capaces de regular las funciones del cuerpo. Los efectos fisiológicos de péptidos sobre la regulación de la presión arterial han llevado a los científicos a explotar diferentes matrices alimenticias tales como pescado, carne, leche, huevos, frijoles y vegetales (Saadi et al., 2015).

2.4.2. Fermentación Microbiana

La obtención de péptidos bioactivos por fermentación microbiana ha sido de particular interés para la industria láctea, debido a la actividad proteolítica de los cultivos iniciadores, la cual ha sido utilizada de manera exitosa en la elaboración de productos lácteos fermentados (Pihlanto et al., 2010). Los productos lácteos han sido los más llamativos para la generación de péptidos con potente actividad biológica por la intervención de particulares proteasas presentes en la pared celular de los microorganismos fermentadores (Korhonen, 2009). En la fermentación de la leche, las denominadas bacterias ácido lácticas (BAL) hidrolizan principalmente a las caseínas con el fin de generar grupos amino necesarios para su desarrollo y, por ende, dar paso a la liberación de aminoácidos y péptidos. Se tiene reportado que los péptidos bioactivos pueden ser generados por bacterias iniciadoras y no iniciadoras que se utilizan en la fabricación de productos lácteos fermentados (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Se ha reportado que los géneros bacterianos *Lb. helveticus* y *Lc. lactis* propician la producción de péptidos con capacidad inhibidora de la ECA en leches fermentadas (Figuroa-Hernández et al., 2012). La presencia de varias peptidasas principales específicas en estos géneros indica que ambos géneros hacen uso de un sistema proteolítico similar (Sasaki, et al., 1995). Sin embargo, el sistema proteolítico más estudiado es el de *Lc. lactis* y, por ende, es que modelo que se ha tomado para ejemplificar la proteólisis de las caseínas lácteas (Savijoki, 2006).

Los componentes estructurales del sistema proteolítico de las BAL pueden ser divididos en tres grandes grupos de acuerdo a su función (Kunji et al., 1996):

- Proteinasas: son las encargadas del rompimiento inicial de péptidos.
- Peptidasas: degradan los péptidos formados por la acción de las proteinasas.
- Sistemas de transporte: trasladan los péptidos producidos hacia la membrana citoplasmática.

En la Figura 2 se describe el sistema proteolítico de *Lc. lactis* por el cual las proteínas son degradadas. Dicho sistema implica la proteinasa PrtP, que se encuentra asociada a la pared celular. Se generan di, tri y tetrapéptidos, los cuales son internalizados mediante sistemas de transportes de oligopéptidos (Opp, DtpT y DtpP) a través de la membrana citoplasmática. Una vez que los oligopéptidos están en el interior de la célula, específicamente en el citoplasma, son degradados por peptidasas intracelulares. Esto da como resultado la formación de péptidos pequeños y aminoácidos libres (Savijoki et al., 2006).

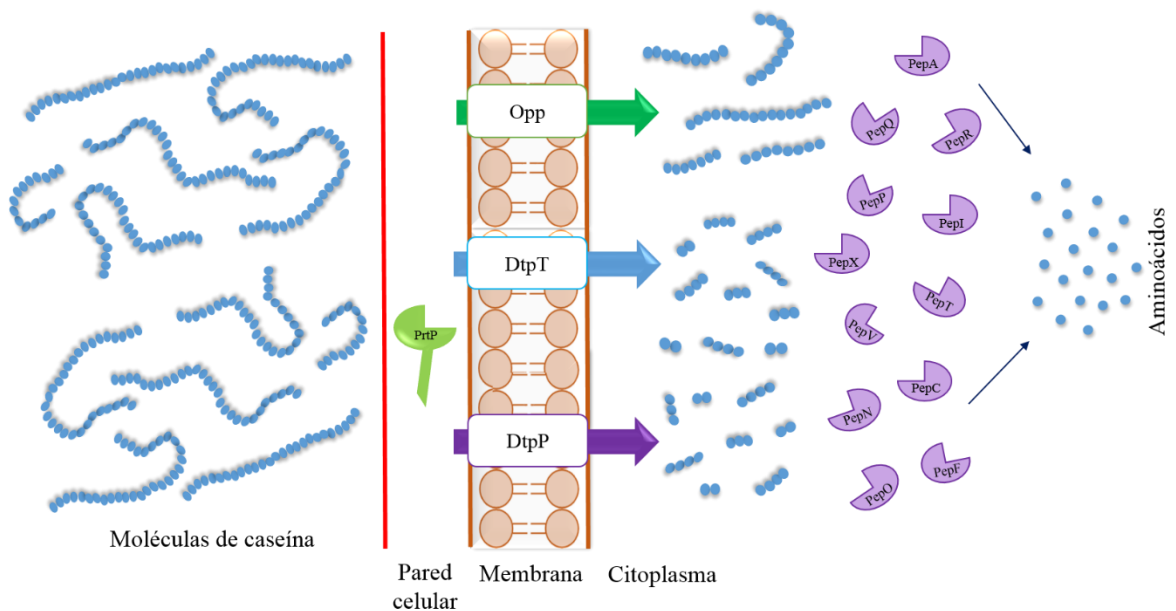


Figura 2. Sistema proteolítico de *Lc. lactis*. Adaptado de Savijoki et al., (2006)

2.5. Péptidos Inhibidores de la ECA

Entre los efectos benéficos al organismo atribuidos a los péptidos bioactivos destacan las actividades: antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora, opioide, antitrombótica y antihipertensiva (Mulero-Cánovas et al., 2011). Los péptidos con esta última bioactividad han sido los más estudiados en los alimentos, puesto que han demostrado inhibir a la ECA y esto a su vez, ocasiona la disminución de la presión sanguínea (Cú-Cañetas et al., 2015). Ferreira (1965) fue el primero en aislar péptidos del extracto de veneno de la cobra brasileña (*Bothrops jararaca*). Dichos péptidos presentaban una potente capacidad para disminuir la presión sanguínea. En las últimas décadas, se han llevado a cabo numerosos estudios donde el principal objetivo es obtener mediante la hidrólisis de las proteínas lácteas, péptidos con actividad hipotensora. En este caso, los péptidos son originados a partir de diversos fragmentos de las caseínas, conocidos como casoquininas. La proteína de la leche que contiene el mayor número de fragmentos con actividad inhibidora de la ECA es la β -caseína (Domínguez-González et al., (2014). También los péptidos se originan de las lactoquininas, que son fragmentos derivados de las proteínas del lactosuero (Hernández-Ledezma et al., 2007).

2.6. Estructura-Actividad de los Péptidos Inhibidores de la ECA

Los estudios de la relación “estructura-actividad” de péptidos con capacidad inhibidora de la ECA, indican que los residuos del tripéptido carboxilo terminal juegan un rol significativo en la unión competitiva al sitio activo de la ECA (Hernández-Ledezma et al., 2011). Los péptidos que contienen prolina en su estructura, son los que han presentado potencial inhibidor de la ECA, por esta conformación, se le ha conferido una resistencia a hidrólisis digestiva (Maeno et al., 1996). Aunado a esto, los péptidos que cuentan en la antepenúltima posición con un aminoácido aromático (como la fenilalanina) y secuencias peptídicas de cadena corta, presentan mayor inhibición de la ECA que las fracciones

peptídicas con residuos de aminoácidos básicos (Phelan y Kerins, 2011). Además, ha sido reportado que la ECA prefiere sustratos con residuos de aminoácidos hidrófobos en las últimas tres posiciones carboxilo terminal. Los datos de estructura-actividad sugieren que la carga positiva de lisina (grupo ϵ -amino) y arginina (grupo guanidina) como el residuo carboxilo terminal puede contribuir a la potencia inhibidora de la enzima (Phelan y Kerins, 2011).

En el modelo propuesto por Ondetti et al., (1977) (Figura 3), indica que “centro activo de la ECA está constituido por tres subunidades que pueden interaccionar potencialmente con los aminoácidos de los sustratos o inhibidores de la enzima”. El modelo propone que el centro activo cuenta con tres subunidades: la primera presenta un grupo con carga positiva, el cual forma un electrovalente con el grupo carboxilo terminal del péptido. Una segunda subunidad interacciona probablemente por un puente de hidrógeno con el enlace peptídico del aminoácido carboxilo terminal y la tercera subunidad, la cual contiene un átomo de zinc, es capaz de polarizar el grupo carbonilo del enlace peptídico entre el antepenúltimo y penúltimo aminoácido del péptido, lo que lo hace más propenso a hidrólisis (Ondetti et al., 1977).

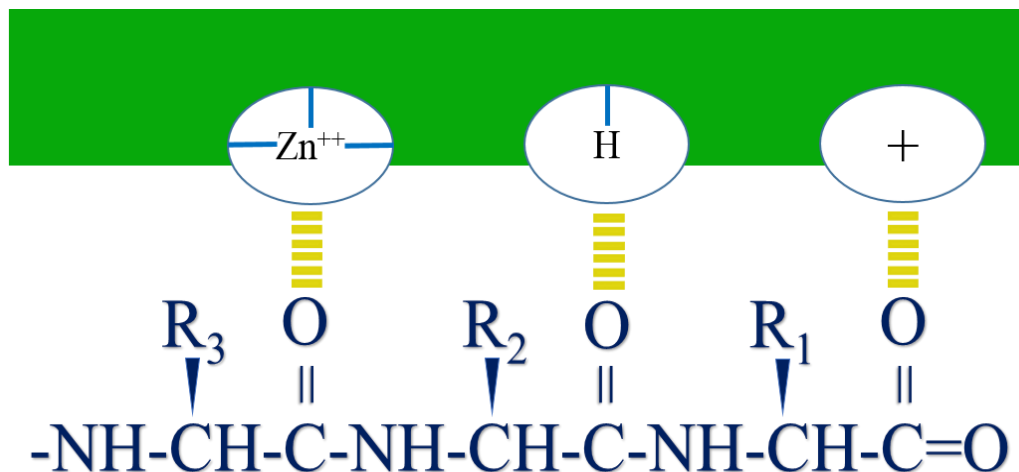


Figura 3. Modelo de interacción del centro activo de la ECA con los sustratos o inhibidores competitivos. Adaptado de Quirós del Bosque et al., (2007).

2.7. Leches Fermentadas: Fuentes de Péptidos Inhibidores de la ECA

En la actualidad, de todos los alimentos funcionales disponibles, los productos lácteos fermentados son los que predominan en el mercado. El éxito de estos productos radica en las excelentes propiedades nutricionales que ofrece la leche, ya que de dicho alimento se obtienen más productos proteicos de valor añadido (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014). Entre las principales fracciones proteicas de la leche de vaca están: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, caseínas, inmunoglobulinas, lactoferrina, fracciones de péptido-proteasa (estables al calor), fosfoglicoproteínas (solubles en ácido) y proteínas séricas menores (transferina y albúmina sérica) (Torres-Llanez et al., 2005).

Según la definición del Codex Alimentarius, una leche fermentada es “un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación, con modificaciones en la composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y tiene como resultado la reducción del pH con o sin coagulación”. Desde hace varios años las leches fermentadas son consideradas productos que aportan beneficios a la salud. Estos aportes benéficos se deben a los metabolitos y moléculas biológicamente activas liberados durante la fermentación. Es por ello que la industria alimentaria ha encontrado la base idónea sobre la que incorporar ingredientes y/o nutrientes que otorguen al producto final propiedades que conviertan a las leches fermentadas en alimentos funcionales (Fitzgerald y Murray, 2006).

Se ha demostrado que algunas leches fermentadas contienen péptidos inhibidores de la ECA que se producen gracias al sistema proteolítico de las BAL, y en casos particulares, por la adición de enzimas digestivas (Leclerc et al., 2002; Fuglsang et al., 2003; Hernández-Ledesma et al., 2004). Las primeras investigaciones sobre la inhibición de la ECA en leches fermentadas fueron publicadas por Nakamura et al., (1995), Rokka et al., (1997) y Yamamoto et al., (1999). Desde entonces, se han publicado numerosos trabajos sobre el empleo de microorganismos iniciadores para producir péptidos con potencial inhibidor de la ECA a partir de la fermentación de la leche. En la Tabla 2 se señalan algunas fracciones peptídicas con capacidad inhibidora de la ECA reportadas en leches fermentadas.

Tabla 2. Secuencias de péptidos con actividad inhibidora de la ECA en leches fermentadas.

Secuencia	IC ₅₀ (μ mol)	Bacteria	Referencia
VPP	9	<i>Lb. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Nakamura et al., 1995
IPP	15	<i>Lb. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Nakamura et al., 1995
YP	720	<i>Lb. helveticus</i> CPN4	Yamamoto et al., 1999
AVPYPQR	15	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Rokka et al., 1997
DKIHPF	193.9	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	Gobbetti et al., 2000
VIGSPPEINK	> 1000	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	Gobbetti et al., 2000
IPP	5	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Donkor, 2007 ^a
LVYPPFGPIH	89	<i>Lb. jensenii</i>	Pihlanto et al., 2010

IC₅₀= concentración mínima de proteína para inhibir a la ECA en un 50%
 μ mol=micromoles

Se tiene reportado que, además de la cepa empleada, se debe considerar las condiciones de fermentación como el tiempo y la temperatura. De acuerdo a Pihlanto et al., (2010), el grado de hidrólisis se encuentra correlacionado directamente con el porcentaje de inhibición de la ECA. Además, el pH final de la fermentación está relacionado con la cepa utilizada y con el tiempo de la fermentación. Domínguez-González et al., (2014) reportan que la temperatura de almacenamiento también puede afectar el perfil de los péptidos de una leche fermentada.

2.8. *Lactococcus lactis*: Potencial Benéfico en Leches Fermentadas

Por su considerable contribución en la industria alimentaria, la importancia de las BAL ha destacado por décadas. Debido a varias de sus propiedades metabólicas, estas bacterias han contribuido significativamente en el desarrollo del sabor, aroma, textura, propiedades terapéuticas y valor nutricional de los alimentos (Parra, 2010). Dentro del grupo de las BAL se incluyen principalmente las especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*.

Anteriormente, *Lc. lactis* era una bacteria perteneciente al género *Streptococcus* y fue reclasificada dentro del género *Lactococcus* en 1985. Este género se caracteriza como bacterias Gram positiva, no esporuladas, esféricas, inmóviles, homolácticas y anaerobias facultativas (Song et al., 2017). La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés), considera que *Lc. lactis* es GRAS (generalmente reconocida como segura), ya que durante varios años ha sido empleada en la fabricación de productos fermentados, principalmente lácteos. A este género se le atribuye una fácil fermentación de la lactosa, y a su vez, una producción de ácido láctico que ayuda en la conservación de los alimentos (Rodríguez-Figueroa et al., 2010). Aunado a lo anterior, algunas cepas, mediante la producción de bacteriocinas, promueve la conservación de los productos alimenticios (Song et al., 2017).

A continuación, se citarán algunos estudios que demuestran el potencial benéfico de leches fermentadas con cepas de *Lc. lactis* para la disminución de la hipertensión arterial. El efecto hipotensor de estas leches es atribuido a la liberación de péptidos inhibidores de la ECA a partir de la degradación de las proteínas lácteas (principalmente caseínas) por la acción proteolítica por parte de cultivos iniciadores, como *Lc. lactis* (Muro-Urista et al., 2011). Gobbetti et al., (2000), demostraron que por tiempos prolongados de fermentación de una leche con *Lc. lactis* subsp. *cremoris* FT4, se obtienen péptidos con actividad antihipertensiva capaces de resistir la hidrólisis de proteasas digestivas (tripsina y quimotripsina).

Por su parte, Rodríguez-Figueroa et al., (2010) realizaron estudios *in vitro* con el propósito de evaluar la actividad inhibidora de la ECA empleando leches fermentadas con cepas de *Lc. lactis* aisladas de diversos nichos naturales. Los autores reportaron que las leches fermentadas durante 48 h, por las bacterias aisladas de productos lácteos artesanales (queso tipo Chihuahua y requesón), proporcionaron mayor actividad inhibidora de la ECA, obteniendo valores de concentración mínima de proteína para inhibir a la ECA en un 50% (IC₅₀) que van de 13 a 20 µg/mL. Posteriormente, Rodríguez-Figueroa et al., (2012) llevaron a cabo la identificación de las fracciones peptídicas con actividad inhibidora de la ECA, obtenidas a partir de leches fermentadas por 48 h con las cepas específicas de *Lc. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572. Los perfiles peptídicos se obtuvieron a partir extractos acuosos <3 kDa y posteriormente fueron fraccionados por HPLC en fase reversa. De las fracciones obtenidas, se evaluó la actividad inhibidora de la ECA y se encontraron que los valores más bajos de IC₅₀ fueron para *Lc. lactis* NRRL B-50571 fracción 1 (0.034 µg/mL) y *Lc. lactis* NRRL B-50572 fracción 1 (0.041 µg/mL).

Así mismo, Rodríguez-Figueroa et al., (2013a) llevaron a cabo un estudio *in vivo* con REH y les administraron leches fermentadas por las cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en una sola dosis (35 o 50 mg/kg de peso corporal). Los autores reportaron una reducción de los valores de PAD y PAS. Sin embargo, la leche fermentada con NRRL-B50571 tuvo reducciones máximas a las 6 h después de la administración. En dicho ensayo, la frecuencia cardíaca también disminuyó después de 24 h de administración de leche fermentada. En otro estudio de Rodríguez-Figueroa et al., (2013b) se evaluó el efecto antihipertensivo e hipolipidémico de leches fermentadas con *Lc. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 en REH. Ambas leches fueron administradas *ad libitum* en un periodo de 4 semanas. Los resultados mostraron que las leches redujeron la presión arterial y, para el caso de la leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50571, su efecto máximo se registró en la segunda y tercera semana de administración.

Por su parte, Beltrán-Barrientos et al., (2018) evaluaron el efecto antihipertensivo asociado al consumo de leche fermentada con *Lc. lactis* NRRL B-50571 en un grupo de sujetos pre-hipertensos. En este estudio demostraron que al final de la intervención de 8 semanas, la PAS en los sujetos de estudio disminuyó en 13 mmHg respecto al valor inicial.

Por todo lo anterior, en la actualidad, la leche fermentada es recomendada como parte del tratamiento no farmacológico para la hipertensión arterial, ya que esta no muestra efectos secundarios no deseables (Flambard y Johansen, 2007).

2.9. Biodisponibilidad de Péptidos Inhibidores de la ECA

Cuando los péptidos encriptados en la matriz alimentaria son liberados, éstos pueden ejercer su bioactividad en el lumen del tracto gastrointestinal, o bien en órganos periféricos después de ser absorbidos. Para que un péptido pueda ser utilizado como componente de un alimento funcional y pueda ejercer un efecto fisiológico *in vivo* después de su administración oral, deberá permanecer activo durante la digestión y absorción gastrointestinal (Segura-Campos et al., 2010). Sin embargo, la actividad por parte de las enzimas del tracto gastrointestinal y “la baja permeabilidad” de los péptidos bioactivos al atravesar las membranas biológicas son algunos factores principales que pueden llegar a afectar la absorción oral de los péptidos. Es por ello que, la efectividad de los péptidos bioactivos depende de su capacidad para alcanzar intactos el órgano diana (Madureira et al., 2010). Además, los péptidos durante su paso por el tracto gastrointestinal pueden ser hidrolizados por las enzimas gastrointestinales, causando su inactivación. Incluso pueden liberarse otras secuencias peptídicas que se encontraban encriptadas dentro de la proteína nativa y que ejerzan una mayor bioactividad. También puede suceder que los péptidos no sufran un cambio en su conformación estructural durante el proceso de digestión (Vermeirssen et al., 2004; Hernández-Ledesma et al., 2011).

Las proteínas, después de ser ingeridas, son desnaturalizadas en el estómago por acción de los jugos gástricos y la pepsina. Posteriormente, los fragmentos liberados en la etapa gástrica son hidrolizados por enzimas pancreáticas como tripsina, α -quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A y B a un pH más alcalino generando una mezcla de oligopéptidos y aminoácidos libres (Vermeirssen et al., 2004; Arhewoh et al., 2005). Los aminoácidos libres son absorbidos en los enterocitos a través de la membrana del borde en cepillo mediante distintos sistemas de transporte de aminoácidos (Figura 4). Mientras

que los oligopéptidos son sometidos a una hidrólisis adicional por la acción de las peptidasas del borde en cepillo, lo que resulta en una mezcla que consiste principalmente en aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos (Soltero y Ekwuribe, 2005).

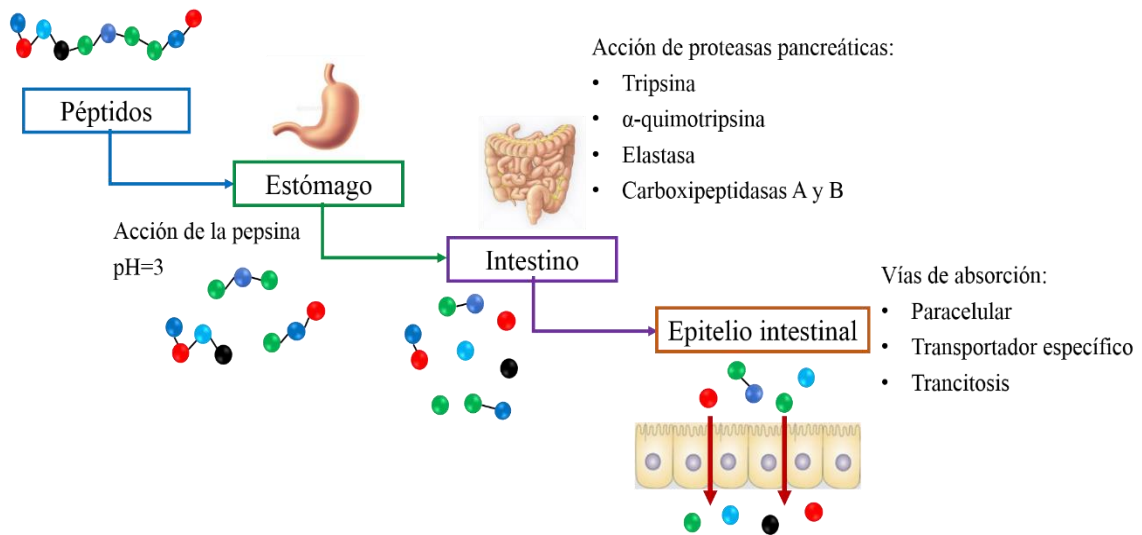


Figura 4. Transporte de péptidos en el sistema gastrointestinal. Adaptado de Hayes et al., (2007).

Los péptidos formados por dos o tres aminoácidos son absorbidos intactos a través de la membrana del borde en cepillo por un sistema de transporte de péptidos específicos (Vermeirssen et al., 2004). Aquellos péptidos que resisten el proceso de digestión y llegan intactos al intestino, bien pueden ejercer una función local, o bien, si su acción es sistémica deben atravesar el epitelio y pasar al torrente circulatorio (Pihlanto-Leppälä et al., 2000; Arhewoh et al., 2005; Fitzgerald y Murray, 2006; Foltz et al., 2007).

Se ha demostrado que, a menor longitud de la cadena peptídica, los péptidos son más resistentes a los procesos gastrointestinales (Roberts et al., 1999), como ejemplo, los tripéptidos IPP y VPP que han demostrado ser resistentes a las enzimas gastrointestinales

y llegar intacta al lumen para su absorción y ejercer su potencial inhibidor de la ECA. Aunque también se ha demostrado que cadenas peptídicas más largas ricas en prolina, pueden llegar a generar efecto, como es el caso de la cadena peptídica LHLPLP, la cual resiste la digestión gastrointestinal. Sin embargo, es hidrolizado por peptidasas celulares hasta una forma más corta HLPLP, y así ser transportado a través del epitelio intestinal (Hernández-Ledezma et al., 2011).

Los modelos de simulación gastrointestinal *in vitro* son ensayos muy útiles para evaluar si los péptidos con actividad inhibidora de la ECA mantienen su bioactividad frente a enzimas digestivas. Roufik et al., (2006), proponen un ensayo *in vitro* de dos etapas: la primera consiste en una hidrólisis con pepsina a pH ácido y la segunda parte consiste en una digestión con extracto pancreático a pH intestinal. Uno de los posibles efectos que se pueden encontrar es que los péptidos con actividad inhibidora de la ECA en modelos *in vitro* pierdan su potencial inhibidor al ser atacadas por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal. Aunque también se ha reportado que algunos péptidos que inicialmente no presentan actividad después de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas presentan el efecto inhibidor de la ECA (Segura-Campos et al., 2010).

Estudios han reportado que algunos péptidos inhibidores de la ECA producidos de la leche fermentada, sufren modificaciones en cuanto a su capacidad hipotensora por la acción de proteasas digestivas, como la carboxipeptidasa A. En un estudio, se reportó que el péptido obtenido de la fracción β 169-175, con baja actividad inhibitoria de ECA *in vitro*, tuvo mejor efecto antihipertensivo después de ser administrado a REH (Maeno et al., 1996). Así mismo, Quirós et al., (2009) encontraron que el péptido LHLPLP presentó resistencia a enzimas digestivas, además de mostrar una actividad inhibidora de la ECA elevada. Además, las secuencias VVVPPF y LTQTPVVPPF, las cuales no presentaban una actividad inhibidora de la ECA *in vitro* relativamente alta, al sufrir hidrólisis por parte de las proteasas digestivas se formaron péptidos más cortos con mejor actividad inhibidora, por lo que el proceso de digestión gastrointestinal puede degradar o favorecer la producción de péptidos potencialmente inhibidores de la ECA (Quirós et al., 2009).

Por otro lado, Rojas-Ronquillo et al., (2012) estudiaron las propiedades antitrombóticas y antihipertensivas de los péptidos liberados durante la fermentación de caseínas por *Lb*.

casei Shirota, y consiguieron purificar e identificar el péptido multifuncional YQEPVLGPVRGPFPIIV, resistente a hidrólisis por pepsina y tripsina. Estos resultados indican que las enzimas digestivas tienen una participación especial sobre la biodisponibilidad de los péptidos y sobre la eficiencia de los mismos para inhibir a la ECA (Rojas-Ronquillo et al., 2012).

En el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), se han realizado ensayos para evaluar si la actividad inhibidora de la ECA de leches fermentadas por cepas específicas de *Lc. lactis* es afectada por condiciones del sistema gastrointestinal. López-Armenta, (2014) evaluó si las condiciones gastrointestinales simuladas afectaban la actividad inhibitoria de la ECA de 12 secuencias peptídicas aisladas de leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50571. Los resultados mostraron que los valores iniciales de IC₅₀ de los péptidos YLAVA, HPHPHLSFMAIPP, HIQKEDVPS y NAVPITPTLN, no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) con respecto a los valores generados después de la digestión gastrointestinal simulada, a pesar de haber sido fragmentados a péptidos de menor tamaño, por lo que se les podría conferir una actividad antihipertensiva *in vivo*.

En otro estudio, se determinó la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos <3 kDa, generados a partir de leches fermentadas a 24 y 48 h con cepas de *Lc. lactis* (NRRL B-50598, NRRL B-50599, NRRL B-50600 y Q₃) antes y después de exponer dichos extractos a condiciones gastrointestinales simuladas. Los resultados mostraron que los valores de IC₅₀ fueron disminuyendo conforme transcurrió el tiempo de incubación. Los extractos acuosos obtenidos a 48 h de fermentación obtenidos de la cepa NRRL B-50598 fueron los que reportaron un IC₅₀ más bajo (8.7 µg/mL). Sin embargo, los datos IC₅₀ correspondientes a los extractos de las cepas NRRL B-50599 con 24 h de fermentación y Q₃ con 48 h no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) a los valores de IC₅₀ después de someter a los extractos a digestión gastrointestinal. Por lo que las leches fermentadas por estas cepas pueden ejercer un efecto antihipertensivo (Santos-Espinosa, 2014).

Como puede observarse, aunque ya se haya evaluado la resistencia a condiciones gastrointestinales simuladas, solo se han utilizado solo los extractos acuosos <3 kDa obtenidos a partir de las leches fermentadas por las cepas de *Lc. lactis* NRRL-B-50598,

NRRL-B-50571, NRRL-B-50572, NRRL-B-50599, NRRL-B-50560 y Q₃. Además, puesto que la inhibición de la ECA de leches fermentadas por las cepas antes mencionadas ha sido estudiada a las 48 h de incubación, aún se desconoce si la actividad inhibidora de la ECA de leches fermentadas obtenidas a un tiempo menor de fermentación, suele ser significativamente diferente con respecto al tiempo de incubación utilizado (48 h). Por lo anterior, resulta interesante conocer si la actividad inhibidora de la ECA de las leches fermentadas a 24 y 48 h sin fraccionar, se mantiene estable o aumenta después de someterlas a un modelo gastrointestinal simulado, ya que como se ha mencionado anteriormente, las enzimas proteolíticas gastrointestinales pueden liberar péptidos que se encuentran inactivos dentro de la proteína nativa presentando bioactividad una vez liberados (Segura-Campos et al., 2010).

3. HIPÓTESIS

La actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas por cepas específicas de *Lactococcus lactis* se mantiene después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulado

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Evaluar la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis*, antes y después de un modelo gastrointestinal simulado.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad inhibidora de la ECA de leches fermentadas a 24 y 48 h de incubación, antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.
- Determinar los perfiles peptídicos de las leches fermentadas a 24 y 48 h, antes y después de ser sometidas a una simulación gastrointestinal simulada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y reactivos empleados para los ensayos consistieron en: medio de cultivo caldo M17 y lactosa procedente de Difco, (Spark, MD); leche descremada en polvo comercial. El kit para ensayo de cuantificación de proteína por el método de Lowry y la albúmina sérica bovina (BSA) proceden de Bio-Rad Laboratorio INC (Hercules, CA); la membrana de poro de 3 kDa se obtuvieron de Pall Life Science (Ann Arbor, MI) y los reactivos tetraborato de sodio, metanol, cloruro de sodio, HCl, NaOH, ECA [1 U] (Pulmón de conejo, EC. 3.4.15.1), Hippuril-L-Histidil-L-Leucina y acetato de etilo de Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

5.1. Reactivación de Cepas

Las cepas utilizadas para el presente trabajo pertenecen a la colección de bacterias ácido lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C.), Unidad Hermosillo, Sonora (Tabla 3). Estas cepas fueron aisladas de productos lácteos artesanales por Gutiérrez-Méndez et al., (2008).

Las cepas fueron propagadas de manera individual inoculando 1% (v/v) de cada bacteria en 5 mL de caldo M17 (DIFCO, Sparks, MD) suplementado con 5% (v/v) de lactosa (DIFCO, Sparks, MD) al 10% (p/v) para el caso de las cepas NRRL B-50571 y NRRL B-50572 y con 5% (v/v) de glucosa al 10% (p/v) para las cepas NRRL B-50598, NRRL B-50599, NRRL B-50600 y Q₃. Los medios inoculados se incubaron a 30 °C por 24 h. Para conseguir cultivos frescos, se realizaron 2 subcultivos más de 24 h a 30 °C para las cepas NRRL B-50571 y NRRL B-50572, y de 5 y 4 h a 30 °C para las cepas NRRL B-50598, NRRL B-50599, NRRL B-50600 y Q₃.

Tabla 3. Cepas de *Lc. lactis* empleadas para la fermentación de leches.

Clave
NRRL B-50571
NRRL B-50572
NRRL B-50598
NRRL B-50599
NRRL B-50560
Q ₃

5.2. Elaboración de Leches Fermentadas

5.2.1. Elaboración de Preinóculo

Se reconstituyó leche descremada en polvo con agua destilada al 10% (p/v). En total se prepararon 50 mL de leche. Después, se repartió el total de leche preparada en tubos de ensayo con 3 mL cada uno, para luego llevar a esterilización por 10 min a 110 °C. Posteriormente, las leches estériles se inocularon con una alícuota del 3% (v/v) de los últimos subcultivos de cada cepa de *Lc. lactis*. También se realizó un preinóculo que contenía la mezcla de las cepas NRRL B-50571-NRRL B-50572 (1:1). Los preinóculos fueron incubados a 30 °C por 12 horas (Beltrán-Barrientos et al., 2018).

5.2.2. Elaboración de Leches Fermentadas

Para la elaboración de las leches fermentadas se siguió la metodología de Beltrán-Barrientos et al., (2018). Se reconstituyó leche descremada en polvo con agua purificada al 10% (p/v). Después, se llevó a cabo un tratamiento térmico por 30 min a 80 °C. Posteriormente, los frascos fueron sometidos a un baño de hielo por 50 min. Después, las leches pasteurizadas fueron inoculadas al 3% (v/v) con los preinóculos elaborados anteriormente y se incubaron a 30 °C por 24 y 48 h. Transcurridos ambos tiempos, se detuvo la fermentación con un tratamiento térmico (75 °C, 15 min) para posteriormente, llevar a cabo otro baño de hielo por 50 min. Las leches fermentadas fueron guardadas en condiciones de congelación (-20 °C) para su posterior uso. Las leches fueron etiquetadas como se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* empleadas

Cepa	Código
NRRL B-50571	B-571
NRRL B-50572	B-572
NRRL B-50598	B-598
NRRL B-50599	B-599
Q ₃	Q ₃
NRRL B-50600	B-600
Mezcla NRRL B-50571-NRRL B-50572 (1:1)	M B-571-B-572

5.3. Actividad Proteolítica de las Leches Fermentadas

Las leches fermentadas obtenidas anteriormente se descongelaron y homogeneizaron antes de su uso. La determinación de proteólisis se determinó mediante la metodología establecida por Church et al., (1983). A 2.5 mL de leche fermentada le fueron añadidos 0.5 mL de agua destilada y 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 12% y se agitó por 1 min. La suspensión se dejó en reposo por 10 min (4 °C) y luego se filtró con papel Whatman #2.

En una celda de cuarzo, 20 µL del filtrado con la fracción peptídica soluble en TCA fueron adicionados a 400 µL del reactivo de OPA. Se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida usando un espectrofotómetro (Spectro Max M3 MD, Estados Unidos) a una absorbancia de 340 nm. Como control se utilizó leche descremada no fermentada y las mediciones fueron realizadas por duplicado.

5.4. Obtención de Extractos Acuosa

Se aplicó la metodología descrita por Muguerza et al., (2006) con algunas modificaciones. Las leches fermentadas obtenidas anteriormente fueron descongeladas y homogeneizadas. Se centrifugaron las muestras a 5000 rpm, 40 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y ultrafiltrado empleando membranas con tamaño de poro <3 kDa. Se realizaron dos diluciones más a partir de los ultrafiltrados, de modo que se obtuvieron tres concentraciones (100, 60 y 40%) de extractos <3 kDa. Dichas fracciones se almacenaron a -80 °C hasta su análisis posterior.

5.5. Ensayo: Actividad Inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina

Se siguió la metodología propuesta por Cushman y Cheung (1971) con algunas modificaciones. En el ensayo se emplearon ECA (0.1 U/mL); solución amortiguadora (pH 8.3) de metaborato de sodio tetrahidratado (0.1 M) adicionado con NaCl (0.3 M) y el sustrato de la ECA, Hippuril-L-Histidil-L-Leucina (5 mM). La solución amortiguadora y agua milli-Q (blanco) se ajustaron a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se prepararon cuatro viales como se indica a continuación:

Mezclas de reacción:

A = 100 µL de Solución Amortiguadora Sustrato + 40 µL de H₂O milli-Q + 20 µL de ECA

B = 100 µL de Solución Amortiguadora Sustrato + 20 µL de H₂O milli-Q + 40 µL de extracto acuoso

C = 100 µL de Solución Amortiguadora Sustrato + 40 µL de extracto acuoso + 20 µL de ECA

D = 100 µL de Solución Amortiguadora Sustrato + 60 µL de H₂O milli-Q

Todos los viales se colocaron a 37 °C por 35 min en una incubadora. Posteriormente, se detuvo la reacción mediante la adición de 250 µL de HCl 1 M a cada tubo. El ácido hipúrico resultante de la reacción se extrajo incorporando 1 mL de acetato de etilo mediante agitación vigorosa por 30 s y se centrifugó a 1500 *xg*, 10 min, 4 °C. Posteriormente, 750 µL de la fase orgánica se extrajo y se evaporó con un equipo Centrivap (75 °C, 15 min). La muestra de cada tubo se resuspendió en 1 mL de agua Milli-Q y se registró la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA). El porcentaje de inhibición de la ECA se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ actividad IECA} = \left(\frac{1 - (C - B)}{A - D} \right) * 100 \quad (1)$$

5.6. Cuantificación de Proteína

El contenido peptídico de las leches fermentadas se determinó por el método de Lowry modificado (1951) utilizando una curva de calibración con BSA como testigo. A 5 μL de cada extracto <3 kDa se añadieron 25 μL del reactivo A y, posteriormente, 200 μL del reactivo B. La mezcla de soluciones se dejó en reposo por 15 min en condiciones de oscuridad y después se procedió a la lectura en el espectrofotómetro (SpectroMax M3, Molecular Devices, EE. UU) a una absorbancia de 750 nm.

Para el cálculo del IC_{50} (concentración peptídica requerida para inhibir a la ECA en un 50%) se realizó una regresión lineal graficando el porcentaje de inhibición de la ECA de las fracciones peptídicas y sus diluciones (mencionadas anteriormente) contra la concentración de proteína de las muestras. Se obtuvo la gráfica y con ello, la ecuación de la recta para calcular el IC_{50} . Se realizaron dos repeticiones con sus respectivos triplicados y el IC_{50} se reportó en $\mu\text{g/mL}$.

5.7. Simulación Gastrointestinal

Para llevar a cabo el modelo de simulación gastrointestinal se siguió la metodología de Kopf-Bolanz et al., (2012) con algunas modificaciones. Todos los fluidos digestivos empleados (Tabla 5) se mantuvieron a una temperatura fisiológica (37 ± 1 °C) previo a su utilización. Para llevar a cabo la incubación de las muestras se utilizó un baño con agitación constante (55 rpm) y temperatura controlada (37 ± 1 °C). La digestión comenzó mediante la adición de 6 mL de solución salival a 5 mL de leche fermentada. La mezcla se incubó durante 5 min a pH 6.8. Después se añadieron 12 mL de jugo gástrico, y la mezcla se mantuvo con agitación constante (55 rpm) durante 2 h, manteniendo el pH entre 2 y 3. Finalmente, se añadieron, simultáneamente, 12 mL de jugo duodenal y 6 mL de jugo biliar, ajustando el pH entre 7.5 y 8. Todo el sistema se mantuvo a 37 °C en agitación

orbital (55 rpm). Al final del proceso digestivo, las muestras fueron centrifugadas a 2750 *xg* durante 5 min y ultrafiltradas utilizando una membrana <3 kDa.

A las muestras ultrafiltradas se les evaluó el contenido de proteína mediante el método de Lowry y la inhibición de la ECA mediante el ensayo de Cushman y Cheung (1971). Los resultados fueron expresados en % de inhibición de la ECA e IC₅₀ como se describió anteriormente.

Tabla 5. Composición de los diferentes fluidos digestivos empleados en el modelo gastrointestinal simulado.

Saliva (200 mL)			Jugo gástrico (400 mL)			Jugo pancreático (400 mL)			Jugo biliar (200 mL)		
Volumen (mL)	Componente	Stock (g/L)	Volumen (mL)	Componente	Stock (g/L)	Volumen (mL)	Componente	Stock (g/L)	Volumen (mL)	Componente	Stock (g/L)
4	KCl	46.72	22.4	KCl	46.72	4.32	KCl	46.72	2.16	KCl	46.72
0.4	KSCN	40	0.72	KH ₂ PO ₄	68	0.64	KH ₂ PO ₄	68	7.12	KH ₂ PO ₄	68
8	KH ₂ PO ₄	68	5.2	NaHCO ₃	168	34	NaHCO ₃	42.5	3.8	NaHCO ₃	84
1.6	NaHCO ₃	84	8	NaCl	120	6.4	NaCl	120	3.2	NaCl	120
0.4	NaCl	120	0.24	Urea	22.5	1.92	Urea	22.5	2.08	Urea	22.5
4	Urea	22.5	1.6	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	0.88	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	0.44	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30
0.4	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	0.8	NH ₄ Cl	27.28				4	NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	187.7
			0.8	Ac. Glucorónico	9.7						
			0.8	Glucosamina	167.5						
			0.8	Dextrosa	160.35						
	pH 6.8 ± 0.2			pH 1.3 ± 0.2			pH 8.1 ± 0.2			pH 8.2 ± 0.2	

Tabla 5. Composición de los diferentes fluidos digestivos empleados en el modelo gastrointestinal simulado (continuación)

Por cada mL de saliva:			Por cada mL de jugo gástrico:			Por cada mL de jugo pancreático:			Por cada mL de jugo biliar:		
Volumen (μL)	Componente	Stock (g/L)	Volumen (μL)	Componente	Stock (g/L)	Volumen (μL)	Componente	Stock (g/L)	Volumen (μL)	Componente	Stock (g/L)
0.5	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588	0.15	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588	0.15	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588	0.925	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588
20	Mucina	50	20	Mucina	70	40	Mucina	35	7.2	BSA	250
0.2	α-amilasa	12.5	4	BSA	250	4	BSA	250	200	Bilis	300
0.2	Lisozima	93.5	4	Pepsina	625	50	Pancreatina	360			

5.8. Perfiles Peptídicos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Los perfiles peptídicos de las leches fermentadas por cepas específicas de *Lc. lactis* se obtuvieron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) mediante el equipo serie 1100, de Agilent Technologies. La separación se llevó a cabo con una columna ZORBAX 300SB-C18 (0.075 x 150 mm, tamaño de partícula de 3.5 μm con un flujo de 0.25 mL/min. Una vez que la columna se equilibró con el disolvente A (0.04% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua Mili-Q), se inyectaron 20 μL de extracto acuoso de cada leche fermentada. Los péptidos se eluyeron con un gradiente creciente de disolvente B (TFA al 0.03% en acetonitrilo) de 0 a 45% en disolvente A durante 60 min. Los perfiles de péptidos fueron monitorizados a 214 nm.

5.9. Análisis Estadístico

Se buscó la normalidad de los datos por medio de estadística descriptiva (pH, proteólisis, porcentaje de inhibición de la ECA e IC_{50}). Se realizó un diseño completamente al azar, y el análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA). En el caso de existir diferencias entre las medias se analizaron por la prueba de Tukey-Kramer y se consideró significativo cuando $p < 0.05$. El análisis para ver las diferencias antes y después de la simulación gastrointestinal se realizó mediante una prueba de t-pareada de los parámetros inhibición de ECA e IC_{50} y se consideró significativo cuando $p < 0.05$. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Para procesar los datos se utilizó el programa estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cambio de pH Durante la Fermentación

Los valores de pH en la fermentación de la leche por *Lc. lactis* a 24 y 48 h se muestran en la Figura 5. Los resultados indicaron que las leches fermentadas B-571, B-572 y la mezcla M B-571-B-572 a 24 h de incubación alcanzaron valores de pH a 4.29 ± 0.007 , 4.305 ± 0.007 y 4.3 ± 0 , respectivamente. Dichos valores de pH fueron similares ($p > 0.05$) para el caso de las leches fermentadas a 48 h por estas mismas cepas. De acuerdo a lo mencionado por Tamine et al., (2006), el descenso de pH es un punto clave para la obtención de leches fermentadas. Además, se espera que el pH se alcance en menor tiempo y que dicho valor de pH se mantenga estable durante su almacenamiento. Por otro lado, las leches fermentadas B-598, B-599, Q₃ y B-600 presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en ambos tiempos de fermentación evaluados, siendo a las 48 h donde los valores de pH fueron menores, con un rango de 4.695 ± 0.007 a 4.25 ± 0.014 .

Estos datos son similares a los reportados por Rodríguez-Figueroa et al., (2010) para las mismas cepas de *Lc. lactis*, sin contar a la mezcla de cepas M B-571-B-572 (1:1). En la literatura científica se ha reportado que los productos fermentados con péptidos inhibidores de la ECA alcanzan valores de pH entre 4 y 5. Un ejemplo de ello son los resultados en cuanto a pH reportados por Sathya et al., (2017), quienes mencionan que el descenso de pH en leches fermentadas con actividad inhibidora de la ECA varía de 4.53 a 5.9. Caridi et al., (2003) reportaron que cepas de *Lc. lactis* disminuyeron el pH de leches fermentadas a valores inferiores de 5, después de 24 h de incubación a 30 °C. Los valores bajos de pH alcanzados en las leches fermentadas, junto con el ácido láctico y otros metabolitos producidos durante la fermentación inhiben el desarrollo microbiano no deseado.

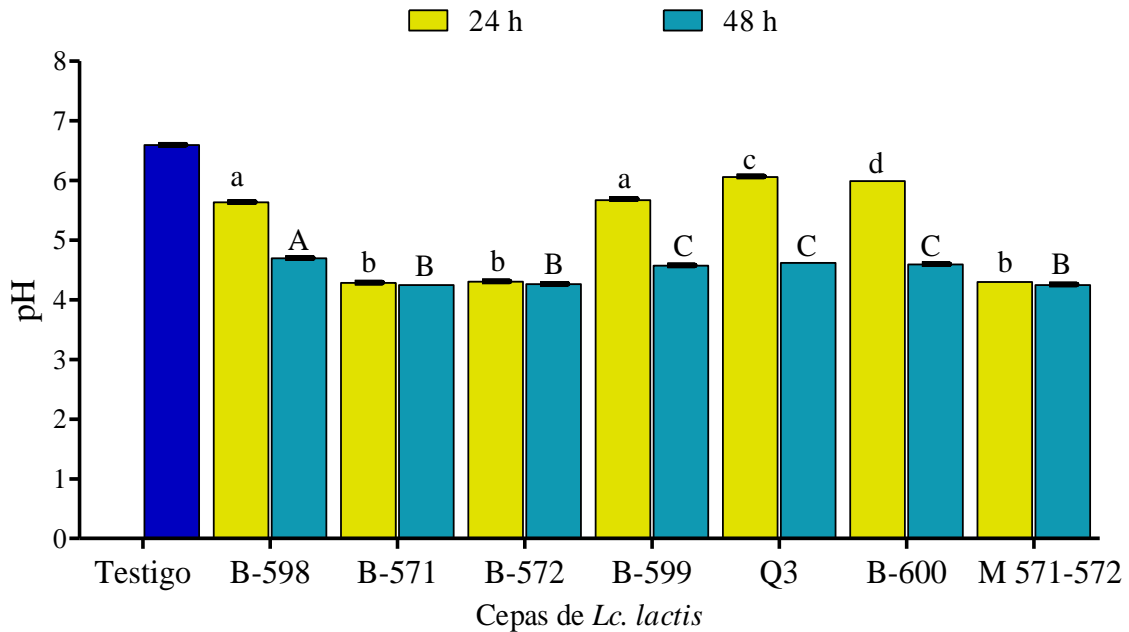


Figura. 5. pH de cada muestra de leche fermentada por *Lc. lactis* a 24 y 48 h de incubación. Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cepas a 24 h (minúsculas) y 48 h (mayúsculas). Medias \pm D.E.

6.2. Actividad Proteolítica

En la Figura 6 se muestran los resultados de proteólisis. Los valores de D.O. reportados se encuentran relacionados directamente con los grupos amino generados por el sistema proteolítico de las cepas (Donkor et al., 2007b). A 24 h de incubación, las leches fermentadas que presentaron valores promedio de D.O más altos fueron B-571 (0.0815 ± 0.002), B-600 (0.0525 ± 0.017) y la mezcla M B-571-B-572 (0.1065 ± 0.007), en contraste con las leches fermentadas B-598 y Q₃, las cuales reportaron actividades proteolíticas más bajas (0.011 ± 0.005 y 0.009 ± 0.005 , respectivamente). A 48 h, las leches fermentadas que presentaron mayor proteólisis fueron las B-572 (0.2325 ± 0.0007) y B-599 (0.2255 ± 0.005). La leche fermentada B-598 no mostró diferencia significativa ($p > 0.05$) en ambos tiempos de fermentación. En general, se pudiera interpretar que existe mayor liberación

de grupos aminos libres necesarios para el crecimiento de la bacteria a 48 h de fermentación de las leches, con respecto a 24 h.

Rodríguez-Figueroa et al., (2010) reportaron para las cepas B-572, B-599, Q₃ y B-600 valores de D.O superiores a 0.20 a 48 horas de fermentación. Por otro lado, Vasek et al., (2004) durante la elaboración de queso artesanal Correntino con cepas de *Lc. lactis*, reportan valores de D.O entre 0.15 y 0.25 a 48 h. Existen diversos estudios que reportan que las BAL pertenecientes al género *Lactobacillus* presentan mayor capacidad proteolítica que *Lc. lactis* (Olivera, 2011). Sin embargo, la actividad proteolítica no puede ser atribuida a algún microorganismo en particular, ya que la actividad es variable por la gran diversidad de cepas entre microorganismos de la misma especie (Baqueiro-Peña et al., 2004). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Dal Bello et al., (2012), donde al evaluar la actividad proteolítica de cepas de *Lc. lactis*, reportaron que ocho cepas presentan alta actividad proteolítica, cinco mostraron proteólisis media y siete cepas no presentaron actividad. Por lo tanto, y tomando en cuenta los resultados obtenidos, junto con los ya reportados, se encontró que la actividad proteolítica es cepa-dependiente.

La degradación de las proteínas de la leche, principalmente de las caseínas, es lo que sustenta el crecimiento de las BAL en leche, ya que la cantidad inicial de aminoácidos libres que se encuentra presente en la misma es insuficiente para que el microorganismo pueda crecer óptimamente. De esta manera se liberan los péptidos que se encuentren encriptados en las proteínas de la leche (Juillard et al., 1995; Domínguez-González et al., 2014). Sin embargo, ha sido reportado que las cepas con una mayor actividad proteolítica no suelen ser siempre las más adecuadas, ya que se pueden generar péptidos que le confieren características no deseables a las leches fermentadas (Buffa et al., 2006).

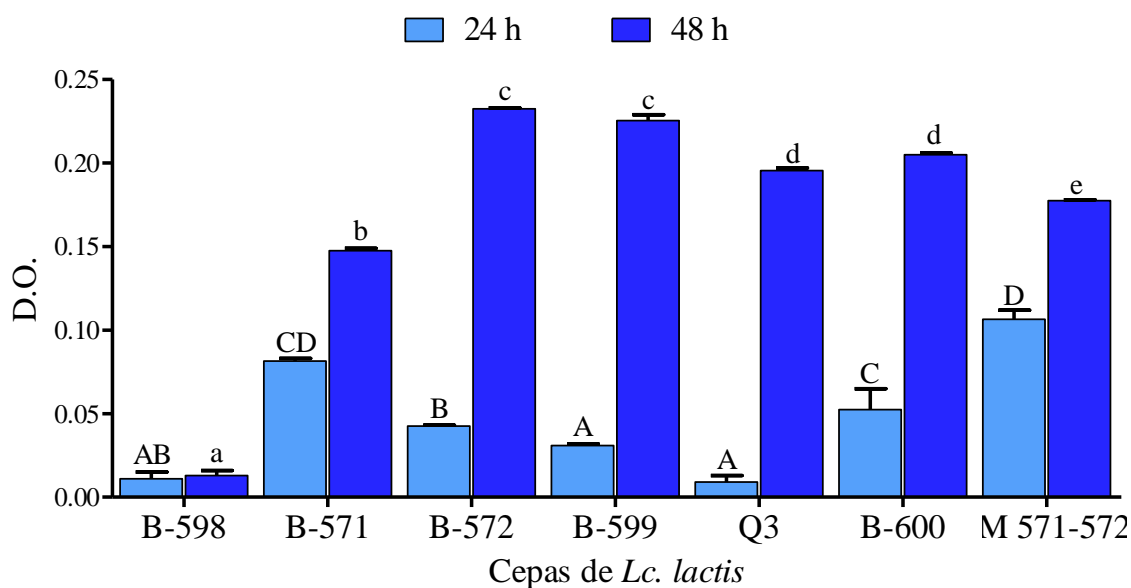


Figura. 6. Actividad proteolítica de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* a 24 y 48 h de incubación. Literales indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas a 24 h (mayúsculas) y 48 h (minúsculas). Medias \pm D.E.

6.3. Ensayo *in vitro* de la Actividad Inhibidora de la ECA en Leches Fermentadas

La Figura 7 muestra los valores de porcentaje de inhibición de la ECA evaluados en extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas a 24 y 48 h por las cepas de *Lc. lactis*. De acuerdo a la figura anterior, todas las leches fermentadas presentaron actividad inhibidora de la ECA. Dicha bioactividad puede ser atribuida a la presencia de péptidos que ejerzan una inhibición sobre la ECA. A 24 h de incubación, se reportaron un rango de $57.26 \pm 0.9\%$ a $72.33 \pm 0.21\%$ y no se muestran diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las leches fermentadas en este periodo. Al comparar ambos tiempos de fermentación evaluados, los porcentajes registrados para las leches fermentadas a 48 h fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) con respecto a las leches fermentadas a 24 h, siendo las leches fermentadas B-571, B-572, B-599 y la mezcla M B-571-B-572 (1:1) a las 48 h las que presentaron los mayores porcentajes de inhibición de la ECA ($87.68 \pm 2.33\%$, 92.2

$\pm 0.40\%$, $93.48 \pm 2.21\%$ y $92.37 \pm 2.02\%$, respectivamente). Estos valores son similares a los reportados por Rodríguez-Figueroa et al., (2010), en donde evaluaron la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas por cepas de *Lc lactis* a 48 h de incubación.

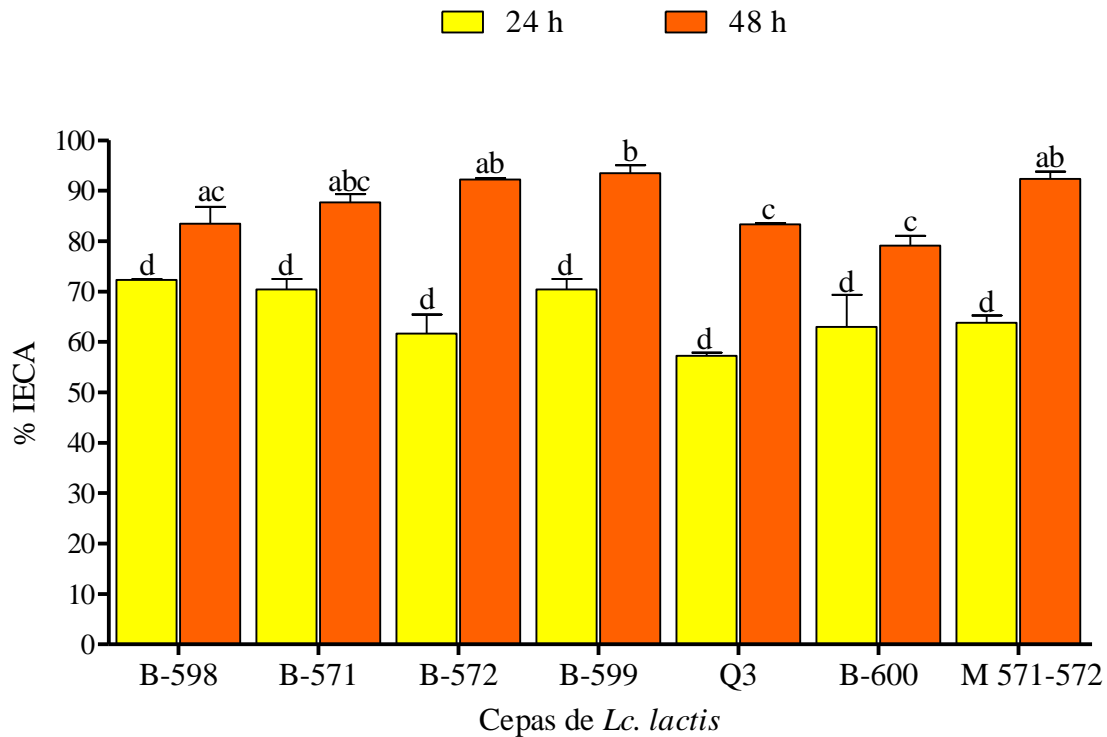


Figura. 7. Porcentaje de inhibición de la ECA de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* a 24 y 48 h de incubación. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras de leches fermentadas. Medias \pm D.E.

Murgueza et al., (2006) al evaluar cepas de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LP25, LP26 y LP27 aisladas de leche cruda de vaca, reportaron valores de 91%, 92.8% y 91.4%, respectivamente. Por su parte, Philanto et al., (2010) evaluaron diferentes BAL, de las cuales *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 reportaron un porcentaje de inhibición de la ECA en un 57%. Los resultados mostrados por Nielsen et al., (2009) señalaron que al evaluar leches fermentadas con cepas de *Lc. lactis*, mostraron porcentajes de inhibición de la ECA que comprenden de 25 a 33%. Estos valores son menores respecto a los

presentados en este estudio, por lo que se puede mencionar que la actividad inhibidora de la ECA es cepa-dependiente. Se ha postulado que la leche fermentada por una mezcla de bacterias podría contener un mayor potencial que la leche inoculada con una sola cepa (Kuwabara et al., 1995). De hecho, la leche agria Calpis, fermentada con *Lb. helveticus* y *Sacharomyces cerevisiae*, ha sido la fuente de dos potentes péptidos inhibidores de la ECA (Nakamura et al., 1995).

La determinación de la actividad inhibidora de la ECA mediante un ensayo *in vitro* puede expresarse como el porcentaje de inhibición de dicha enzima. Sin embargo, para expresar mejor la actividad evaluada es conveniente determinar el parámetro IC_{50} , que representa la concentración mínima de proteína (concentración peptídica) necesaria para inhibir en un 50% la actividad de la ECA. Por ello, en la Figura 8 se muestran los valores obtenidos de IC_{50} para las leches fermentadas a 24 y 48 h.

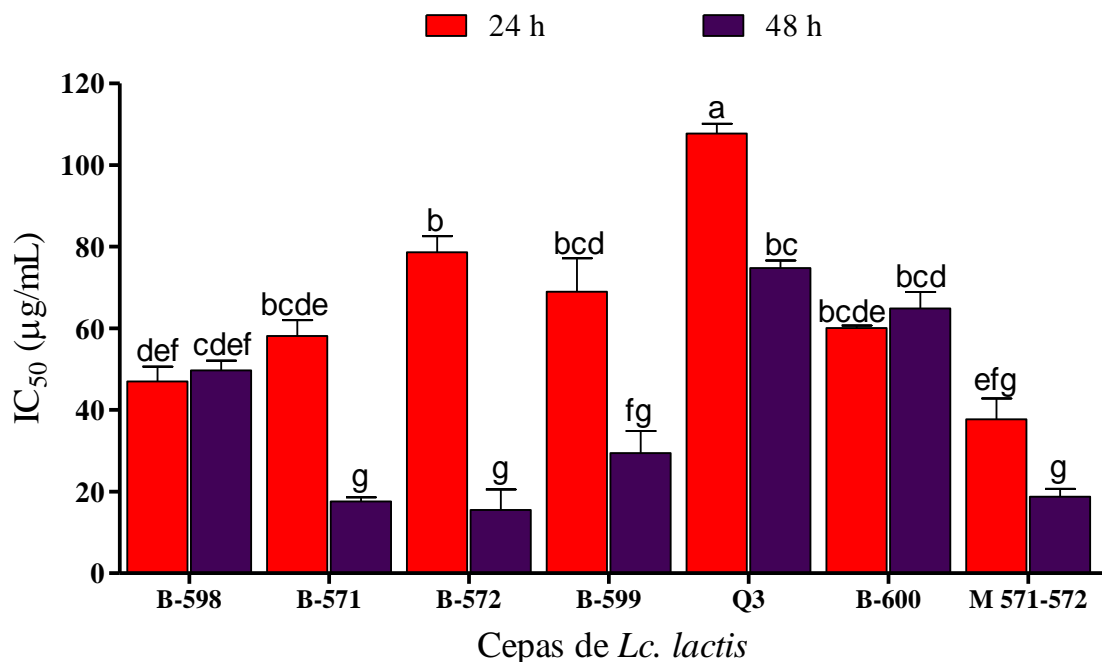


Figura 8. IC_{50} de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* a 24 y 48 h de incubación. Literales diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre muestras de leche fermentada. Medias \pm D.E.

De acuerdo a la gráfica anterior, los IC_{50} menores correspondieron a las leches fermentadas a 48 h B-571 ($17.62 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$), B-572 ($15.53 \pm 5.04 \mu\text{g/mL}$), la mezcla M 571-572 (1:1) ($18.72 \pm 1.99 \mu\text{g/mL}$) y B-599 ($29.43 \pm 5.45 \mu\text{g/mL}$), no habiendo diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$). Estos resultados fueron similares a los reportados por Rodríguez-Figueroa et al., (2010), Beltrán-Barrientos (2013) y Vargas Lucero (2018).

Un valor menor de IC_{50} indica que se requiere de un menor contenido de proteína peptídica para inhibir a la ECA en un 50%, por lo que los resultados obtenidos indican que las leches fermentadas por las cepas de estudio ejercen un potente efecto inhibitor de la ECA. Comparando con otros estudios relacionados a productos lácteos fermentados, Leclerc et al., (2002) al evaluar la actividad de suero procedente de leche fermentada enriquecida con caseína, obtuvieron valores de IC_{50} que comprendían entre 0.6 y 1.1 mg/mL. O en el caso de la actividad inhibitora de la ECA de una leche descremada, hidrolizada por proteasas de *Saccharomyces cerevisiae*, donde el valor del IC_{50} es de 0.42 mg/mL. Quirós et al., (2009), registraron un valor de IC_{50} de 0.365 mg/mL en extracto soluble obtenido de muestras de kéfir.

6.4. Ensayo *in vitro* de la Actividad Inhibidora de la ECA en Leches Fermentadas Después del Modelo Gastrointestinal Simulado

Diversos estudios han comprobado que el proceso de digestión gastrointestinal suele repercutir en la generación y/o inactivación de péptidos con capacidad inhibitora de la ECA, ya que las enzimas digestivas pueden dar lugar a péptidos con baja o nula actividad, así como péptidos que presenten mayor bioactividad que la secuencia precursora (Vermeirssen et al., 2004). En la Figura 9 puede apreciarse que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las leches fermentadas a 24 h antes y después de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas. Los resultados mostraron que hubo un aumento en el porcentaje de inhibición de la ECA, siendo las leches fermentadas B-572 ($94.56 \pm 2.93\%$), B-599 ($85.97 \pm 2.82\%$) y la mezcla M B-571-B-572 (1:1) ($93.98 \pm$

6.02 0%) las que registraron un aumento significativo de inhibición de la ECA. Caso contrario, la leche fermentada B-571 registró una disminución del porcentaje de inhibición de la ECA después de la simulación gastrointestinal. Este resultado pudiera relacionarse con una hidrólisis y/o inactivación de los péptidos a los que se les atribuye el efecto inhibidor de la ECA (Hernández-Ledezma et al., 2011).

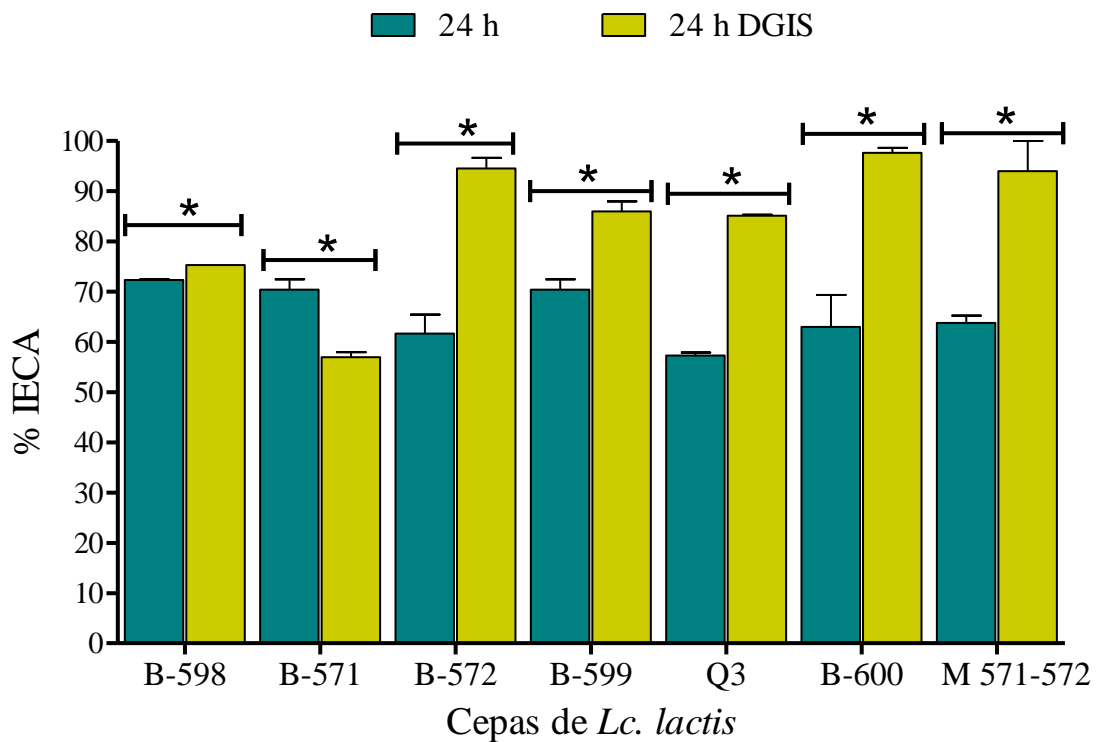


Figura 9. Porcentaje de inhibición de la ECA de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* a 24 h de incubación antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado (DGIS). * indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Medias \pm D.E.

En contraste, en la Figura 10, en donde se muestran los valores de porcentaje de inhibición de la ECA de leches incubadas a 48 h después de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas, las leches fermentadas B-600, la mezcla M B-571-B-572 y Q₃ no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la actividad inhibidora de la ECA antes y después de la simulación *in vitro*, ya que después de la digestión *in vitro*, dicha leche fermentada reportó un valor de $66.97 \pm 3.29\%$. En el resto de las leches

fermentadas a 48 h, no hubo un cambio significativo después de someterlas a la digestión gastrointestinal simulada. Se ha contemplado la posibilidad de que el uso de enzimas gastrointestinales sea un método eficaz para la producción de péptidos con actividad inhibidora de la ECA, ya que estos, al ser hidrolizados a péptidos de menor tamaño, pueden presentar la ventaja de ser resistentes a condiciones del tracto gastrointestinales después de su administración oral (Matsui et al., 2002).

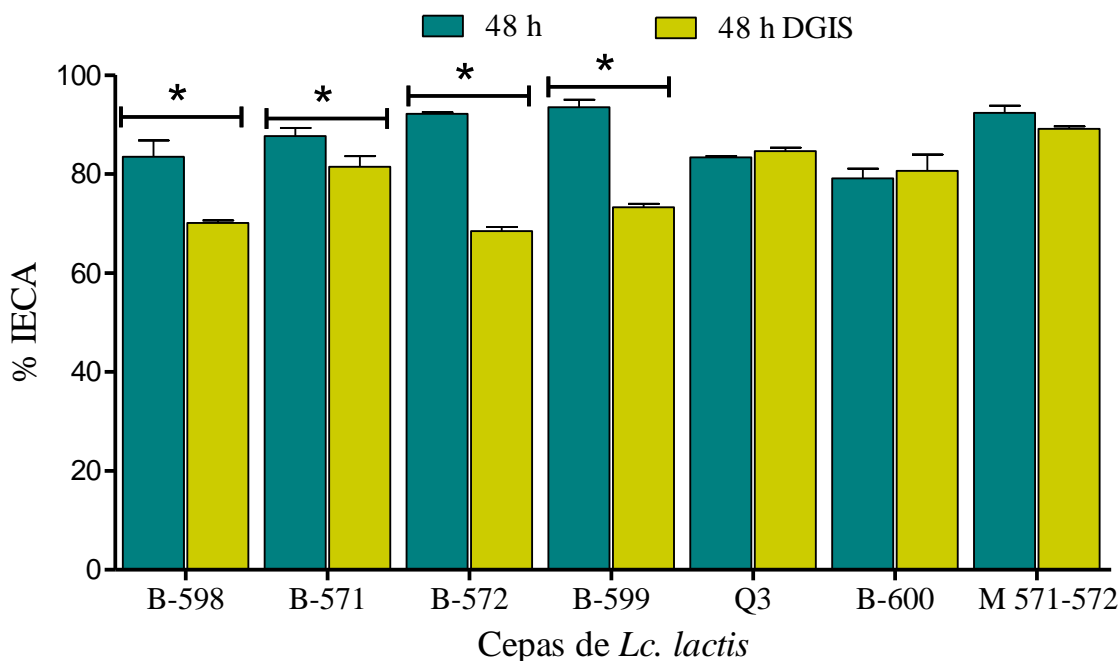


Figura 10. Porcentaje de inhibición de la ECA de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* a 48 h de incubación antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado (DGIS). * indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Medias \pm D.E.

De acuerdo con Gómez-Ruiz et al., (2004), debido a la acción de enzimas digestivas en productos fermentados, la actividad inhibidora de la ECA puede incrementarse al haber una formación de secuencias peptídicas más pequeñas con un potencial inhibidor mayor del que tenían antes de ser hidrolizadas. Maeno et al., (1996) reportaron que la capacidad inhibidora de la ECA de un péptido se potenció después de la digestión pancreática del mismo, ya que antes de la digestión presentaba una actividad inhibidora muy baja. Sin

embargo, algunos péptidos que muestren actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, pueden no presentar su potencial antihipertensivo *in vivo* al actuar como sustrato de la ECA (Fujita, Yokoyama y Yoshikawa, 2000) o al ser inactivados mediante la hidrólisis de los mismos.

En la Figura 11, se muestran los IC₅₀ registrados para las leches fermentadas a 24 y 48 h, antes y después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulado. Los resultados mostraron que el IC₅₀ de las leches fermentadas por B-598 y B-571 a 24 h, no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0.05$) a los IC₅₀ de dichas leches fermentadas antes de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas. Por otro lado, los IC₅₀ de las leches fermentadas B-599 ($47.43 \pm 0.58 \mu\text{g/mL}$), B-572 ($26.71 \pm 1.33 \mu\text{g/mL}$), B-600 ($22.80 \pm 0.93 \mu\text{g/mL}$), la mezcla M B-571-B-572 (1:1) ($22.13 \pm 0.92 \mu\text{g/mL}$), y Q₃ ($11.83 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$) a las 24 h, disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) después de ser sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*.

En el caso de las leches fermentadas B-600, Q₃ y la mezcla M B-571-B-572 (1:1) a 48 h, los IC₅₀ no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) después de la simulación gastrointestinal; en contraste con el resto de las leches fermentadas a este tiempo donde registraron un aumento del IC₅₀. Se ha reportado que los péptidos que contengan prolina en su estructura, aquellos tripéptidos que contienen Pro-Pro en el carboxilo terminal y aquellas secuencias de cadena corta son resistentes a proteasas digestivas (Maeno et al., 1996; FitzGerald y Meisel, 2000). Aunque no se presentó una disminución del IC₅₀ de las leches fermentadas a 48 h después de la simulación gastrointestinal; las leches fermentadas con menor IC₅₀ fueron: B-572 ($28.45 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$), B-571 ($27.36 \pm 3.90 \mu\text{g/mL}$), y la mezcla M B-571-B572 (1:1) ($18.99 \pm 1.71 \mu\text{g/mL}$).

Es importante mencionar que el IC₅₀ de la leche fermentada Q₃ a 24 h, fue estadísticamente mayor ($p < 0.05$) que todas las leches fermentadas antes de llevar a cabo la simulación gastrointestinal. Sin embargo, después de exponerla a condiciones gastrointestinales simuladas, el IC₅₀ disminuyó significativamente ($p < 0.05$); incluso, presentó el IC₅₀ más bajo ($p < 0.05$) con respecto a todas las leches fermentadas evaluadas. Probablemente, los péptidos liberados a partir de esta leche fermentada, después de la simulación gastrointestinal presentaron mejor actividad inhibidora de la ECA y/o algunas de las

secuencias peptídicas que pudieron estar inactivas incluso después de la fermentación, se activaron mediante la hidrólisis por enzimas gastrointestinales (Rai et al., 2017).

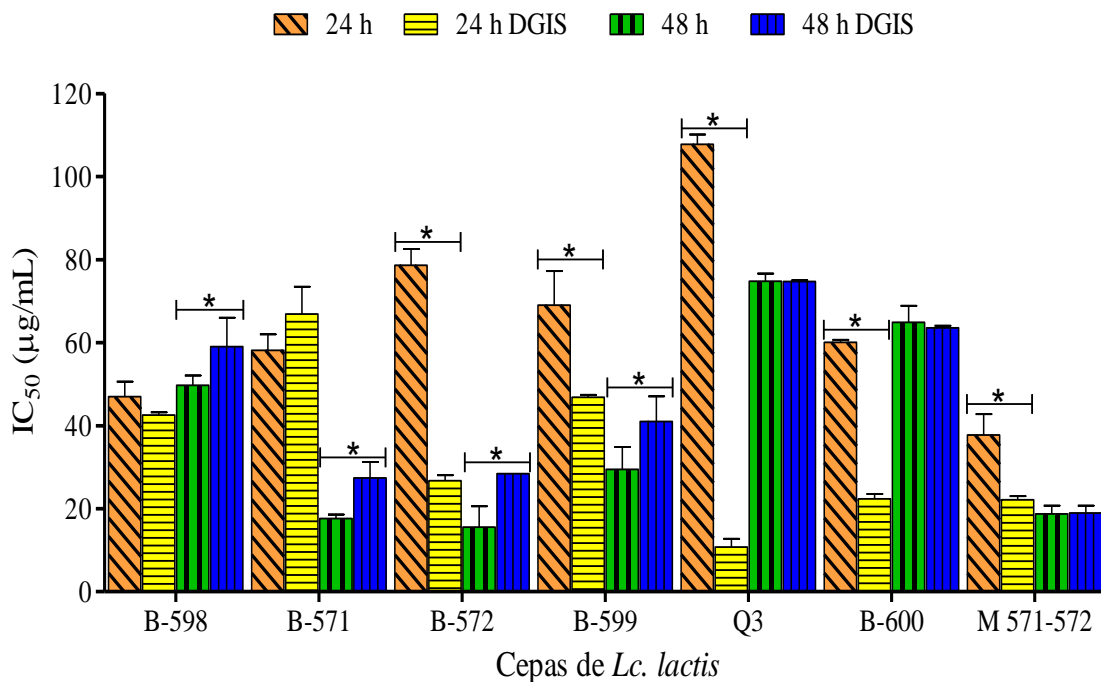


Figura 11. IC₅₀ de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* a 24 y 48 h de incubación antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado (DGIS). * indican diferencia significativa ($p < 0.05$). Medias \pm D.E.

6.5. Perfil de Péptidos de Leches Fermentadas con *Lc lactis* Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Por medio de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa se obtienen cromatogramas con distintas áreas, los cuales representan diferentes péptidos (Ferreira y Eca, 2007). En las Figuras 12-25, se muestran los perfiles cromatográficos de las diferentes leches fermentadas con cepas específicas de *Lc. lactis*. Dichos cromatogramas comparten algunas similitudes, por ejemplo, el primer pico eluyó después de 10 min en todas las muestras. La mayor concentración de péptidos eluyeron entre 10 y 30 minutos.

Esto puede estar relacionado con la naturaleza relativamente hidrofóbica del péptido, ya que primero eluyen aquellos péptidos hidrofílicos, mientras que los hidrófobos tienen afinidad por la columna, la cual también es de naturaleza hidrofóbica. Se ha sugerido que existe una estrecha relación entre la hidrofobicidad y el aminoácido cargado positivamente en la posición C-terminal y los péptidos inhibidores de la ECA derivados de las proteínas lácteas (Pripp et al., 2004).

Expresando en valores numéricos las áreas totales de los perfiles peptídicos de las leches fermentadas a 24 h y las fermentadas a 48 h, la Tabla 6 indica que existió un aumento significativo en las áreas totales antes y después de haber sometido las leches fermentadas a la simulación gastrointestinal. Los resultados mostraron que, a 48 h de incubación, las áreas son mayores, por lo que podría haberse dado la liberación de más péptidos de las proteínas intactas de la leche después de exponer a las leches a condiciones gastrointestinales. Sin embargo, esto no significa que dichos péptidos liberados presenten necesariamente mayor actividad inhibidora de la ECA.

En la Tabla 7 se comparan el área total del perfil peptídico de cada una de las leches fermentadas con su respectivo valor de IC_{50} . Los resultados mostraron que no se encontró una relación significativa entre las áreas y el IC_{50} para las leches fermentadas a ($r = -0.0167$, $p > 0.01$), esto se debe a que no necesariamente la cantidad de péptidos asegura que se tenga un valor bajo de IC_{50} . Un efecto mayor en la inhibición de la ECA, se encuentra relacionado con la conformación del péptido y la secuencia de los aminoácidos que conforman al péptido (Marie-Claude et al., 2004).

Tabla 6. Áreas totales de los perfiles peptídicos de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis*, antes y después de ser sometidas a un modelo gastrointestinal *in vitro*.

Leche fermentada	24 h		48 h	
	Antes	Después	Antes	Después
B-598	1.39E+05 ± 5.75E+02 ^a	3.03E+05 ± 1.09E+03 ^b	1.22E+05 ± 5.36E+02 ^c	3.41E+05 ± 2.59E+02 ^d
B-571	1.17E+05 ± 5.78E+02 ^a	3.38E+05 ± 1.11E+02 ^b	3.70E+05 ± 8.86E+02 ^c	3.41E+05 ± 2.59E+02 ^d
B-572	1.29E+05 ± 4.09E+02 ^a	4.10E+05 ± 1.07E+02 ^b	1.18E+05 ± 8.45E+01 ^c	3.68E+05 ± 1.31E+03 ^d
B-599	1.05E+05 ± 1.33E+03 ^a	3.06E+05 ± 2.51E+03 ^b	3.70E+05 ± 8.86E+02 ^c	3.71E+05 ± 5.16E+02 ^d
Q ₃	1.15E+05 ± 6.08E+02 ^a	3.44E+05 ± 2.80E+03 ^b	1.53E+05 ± 9.86E+02 ^c	3.40E+05 ± 2.69E+02 ^d
B-600	1.08E+05 ± 4.73E+02 ^a	2.72E+05 ± 1.44E+02 ^b	1.08E+05 ± 7.95E+01 ^c	3.13E+05 ± 6.23E+02 ^d
M B-571-B-572	1.18E+05 ± 1.95E+01 ^a	3.66E+05 ± 1.39E+03 ^b	1.38E+05 ± 2.69E+02 ^c	2.67E+05 ± 9.57E+02 ^d

Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después para cada tiempo de incubación. Los resultados son presentados en mAU.

Tabla 7. Áreas totales de los perfiles peptídicos e IC₅₀ de leches fermentadas por cepas de *Lc. lactis* después de ser sometidas en un modelo gastrointestinal *in vitro*.

Leche fermentada	24 h		48 h	
	Área total (mAU)	IC ₅₀ (µg/mL)	Área total (mAU)	IC ₅₀ (µg/mL)
B-598	3.03E+05 ± 1.09E+03 ^a	42.54 ± 0.67 ^{bcd}	3.41E+05 ± 2.59E+02 ^b	59.06 ± 6.94 ^{abc}
B-571	3.38E+05 ± 1.11E+02 ^b	66.90 ± 12.6 ^{ab}	3.41E+05 ± 2.59E+02 ^b	27.36 ± 3.90 ^{def}
B-572	4.10E+05 ± 1.07E+02 ^c	26.71 ± 1.33 ^{def}	3.68E+05 ± 1.31E+03 ^e	28.45 ± 0 ^{def}
B-599	3.06E+05 ± 2.51E+03 ^a	47.43 ± 0.58 ^{bcd}	3.71E+05 ± 5.16E+02 ^e	40.98 ± 6.09 ^{cde}
Q ₃	3.44E+05 ± 2.80E+03 ^b	11.83 ± 1.09 ^f	3.40E+05 ± 2.69E+02 ^b	74.71 ± 0.28 ^a
B-600	2.72E+05 ± 1.44E+02 ^d	22.80 ± 0.93 ^{def}	3.13E+05 ± 6.23E+02 ^f	64.40 ± 0.54 ^{abc}
M B-571-B-572	3.66E+05 ± 1.39E+03 ^e	22.13 ± 0.92 ^{ef}	2.67E+05 ± 9.57E+02 ^d	18.99 ± 1.71 ^{ef}

Literales diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) entre ambos tiempos de incubación.

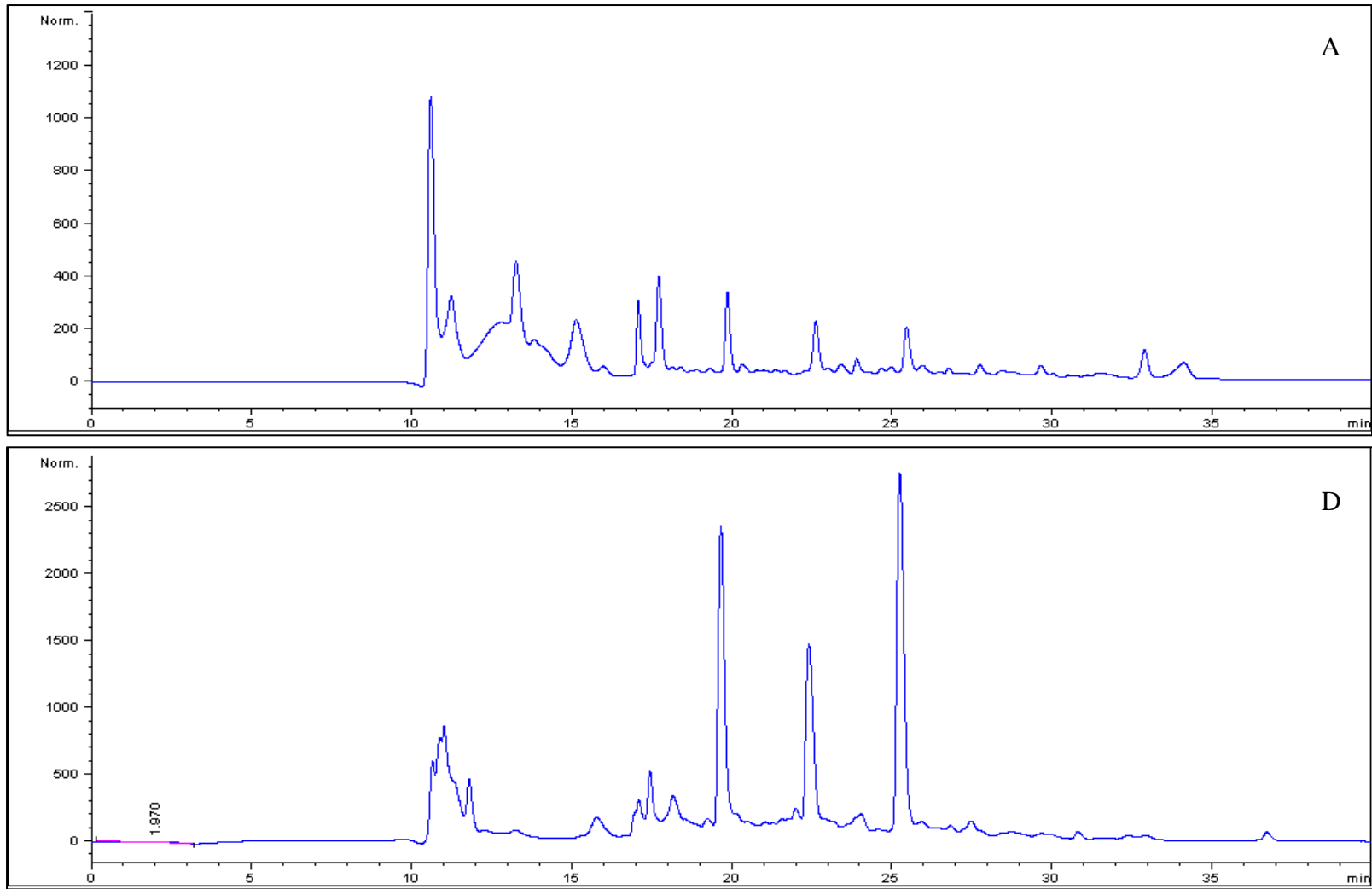


Figura 12. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50598 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

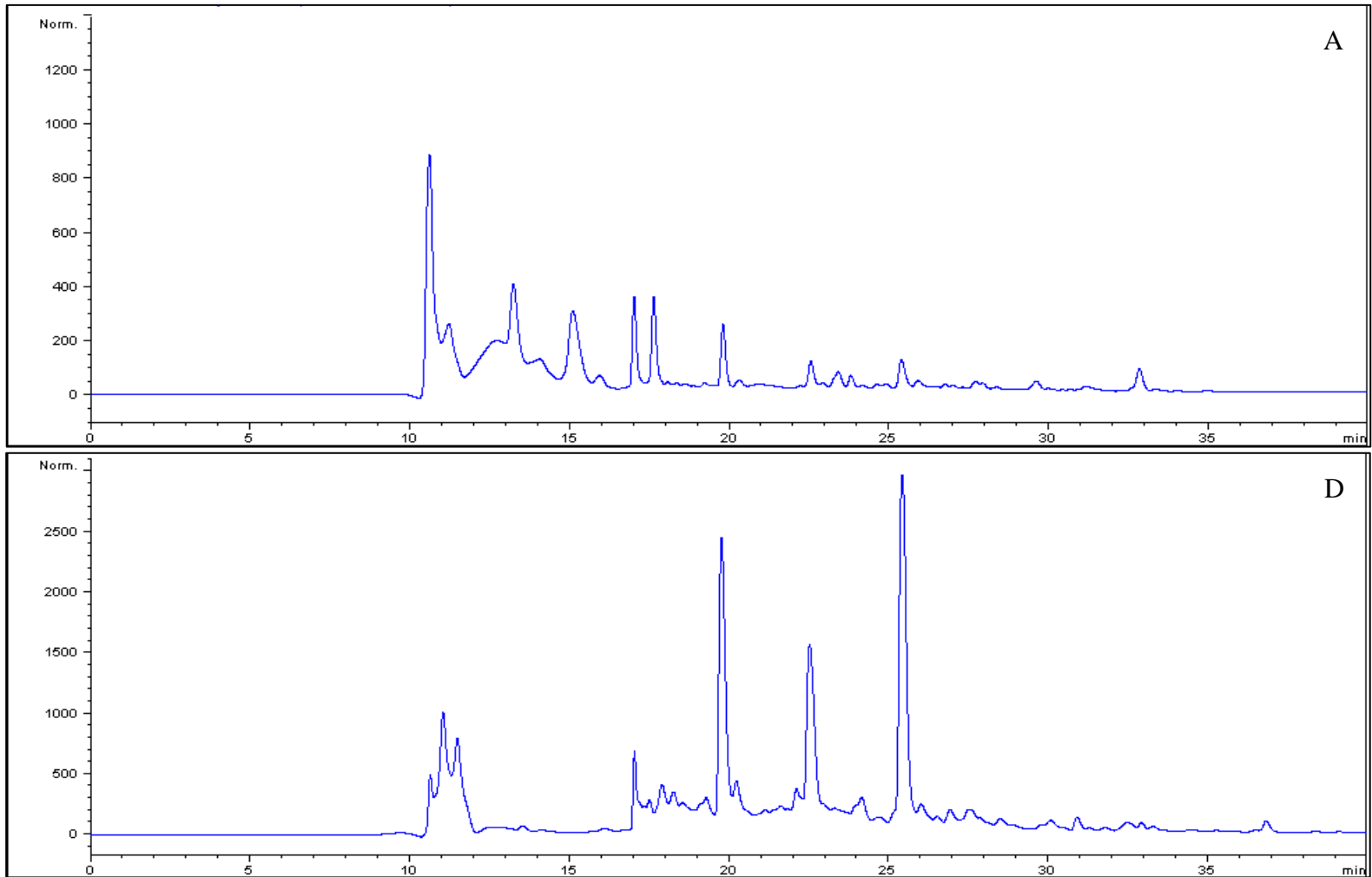


Figura 13. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50571 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

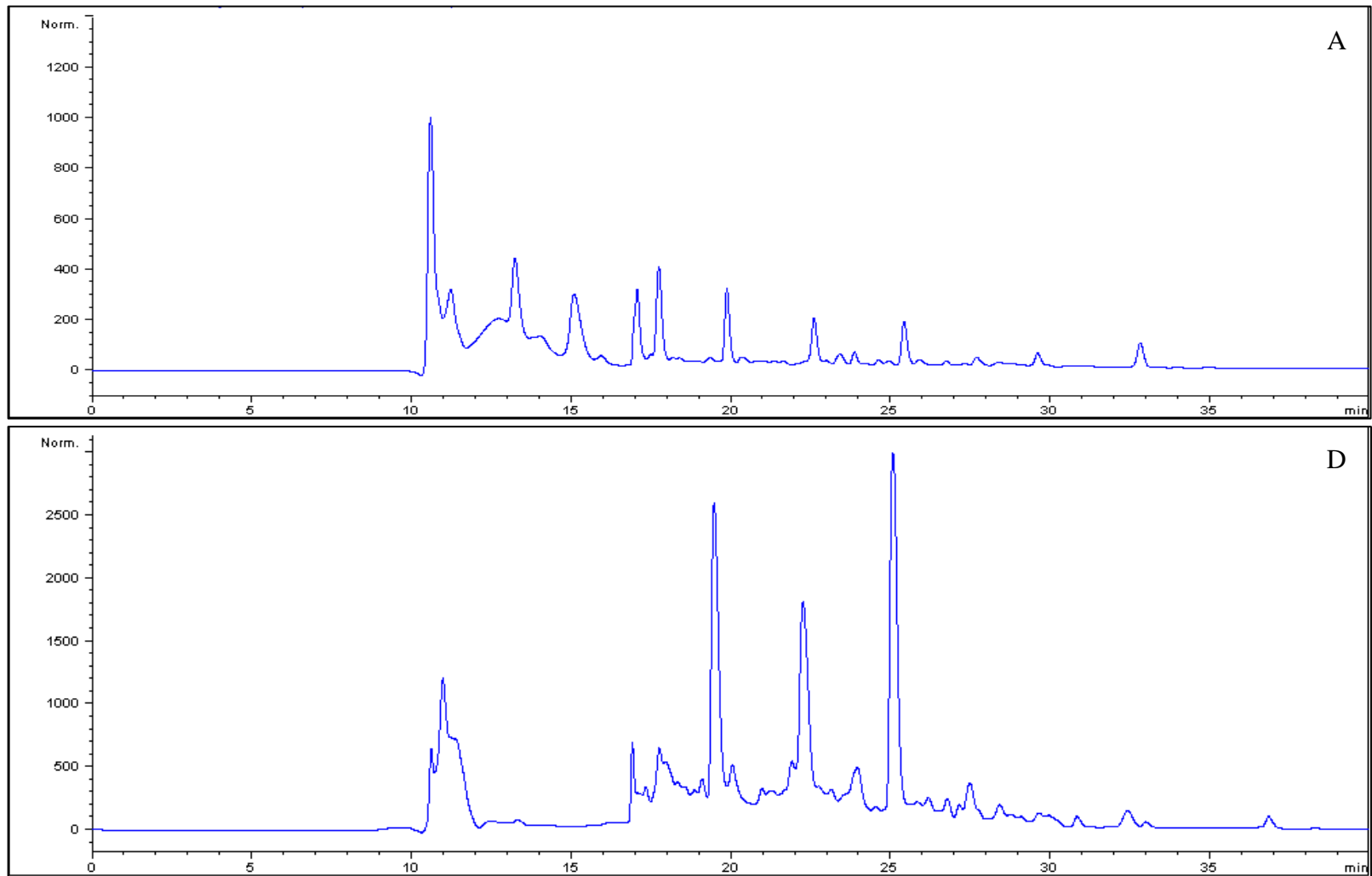


Figura 14. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

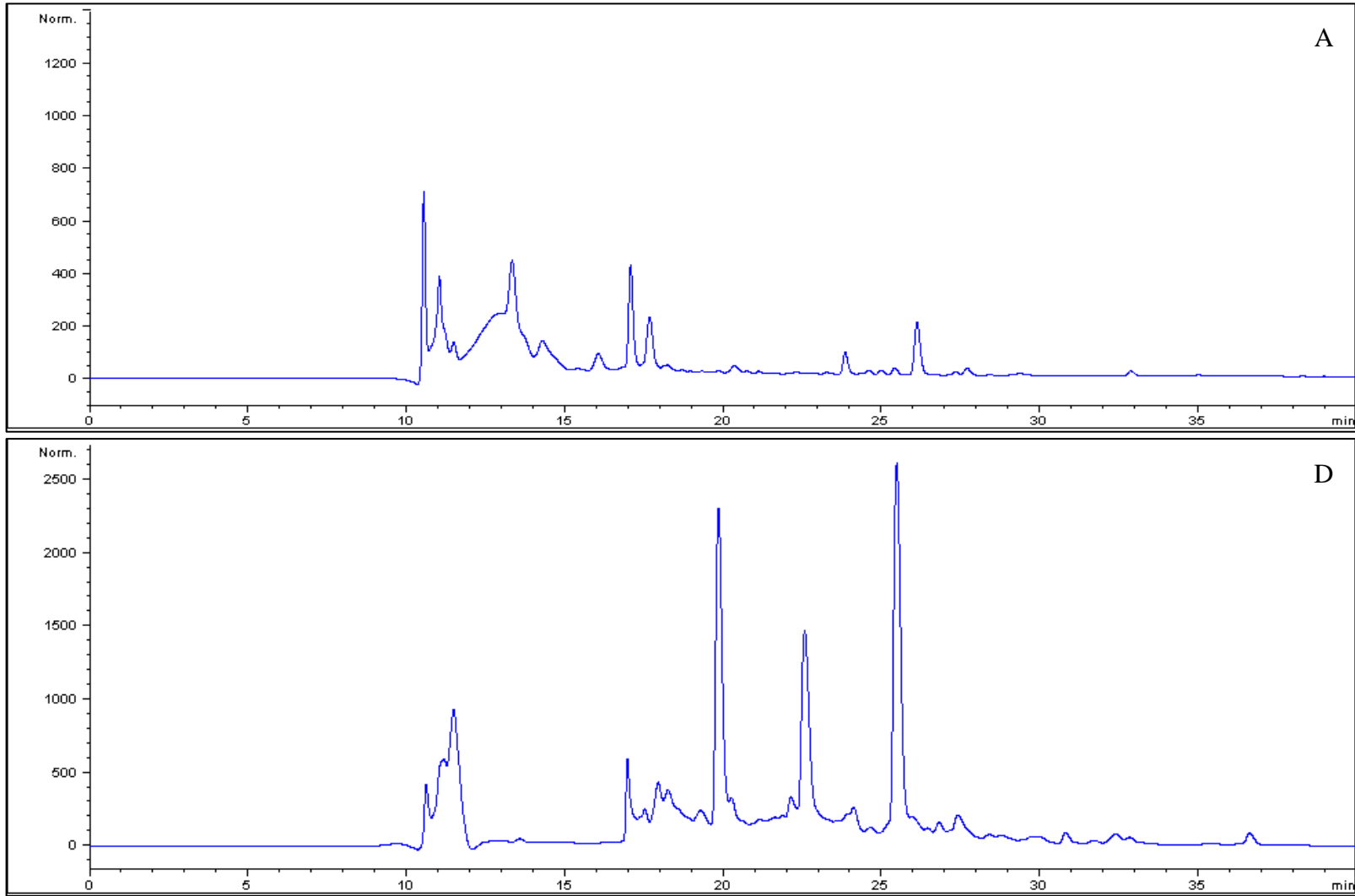


Figura 15. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50599 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

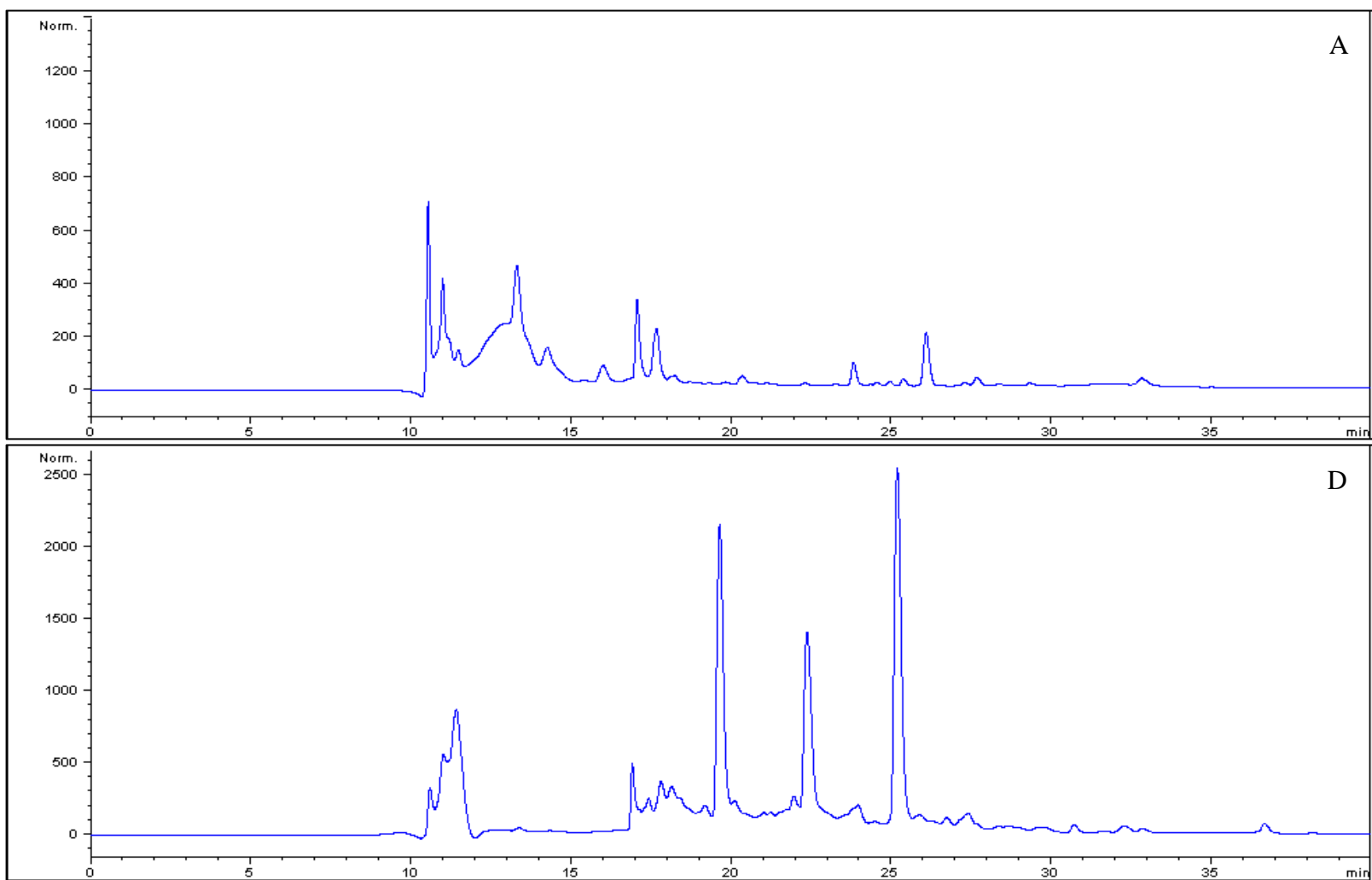


Figura 16. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50600 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

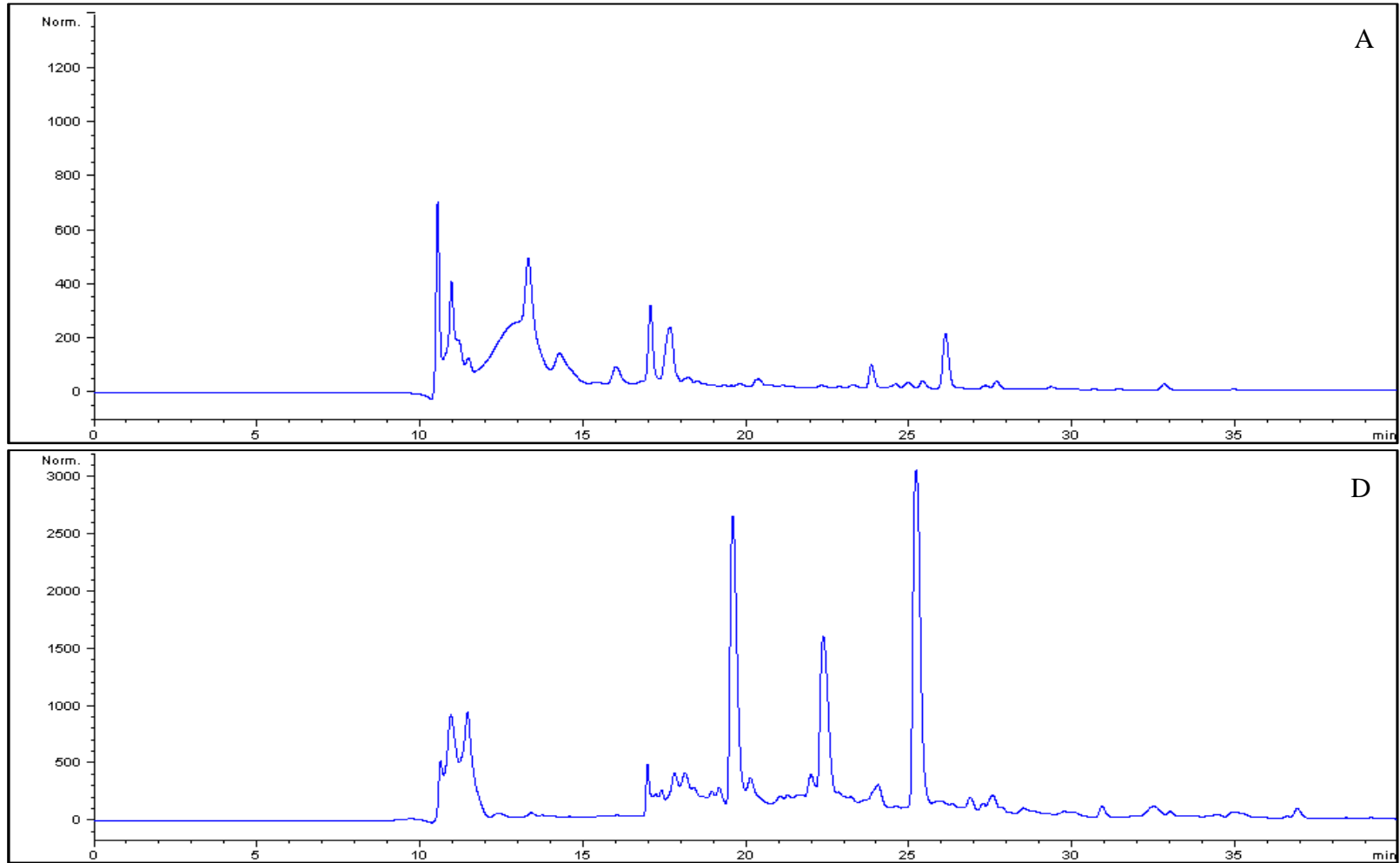


Figura 17. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por cepas de *Lc. lactis* Q₃ antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

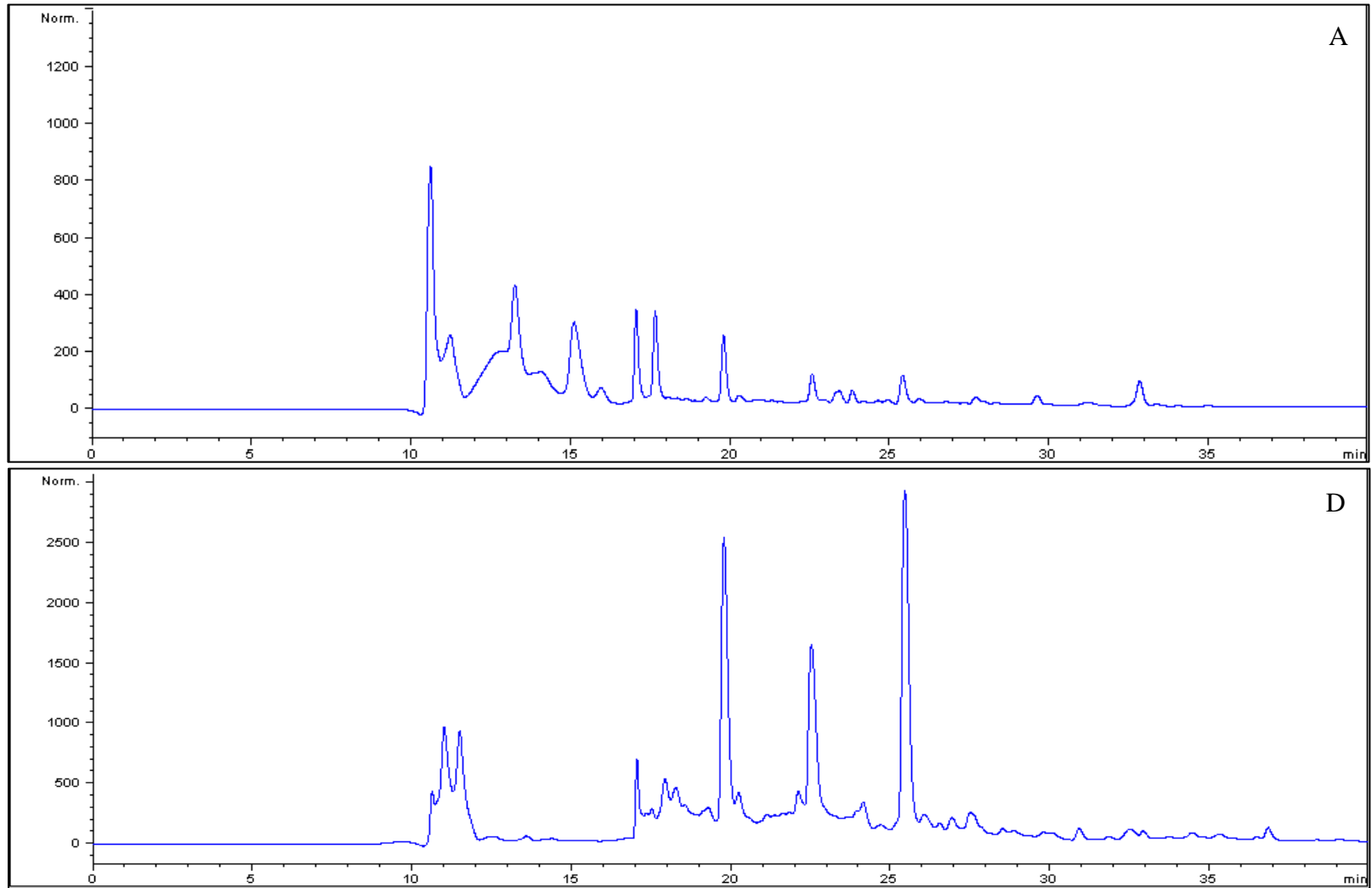


Figura 18. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 24 h por la mezcla de cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

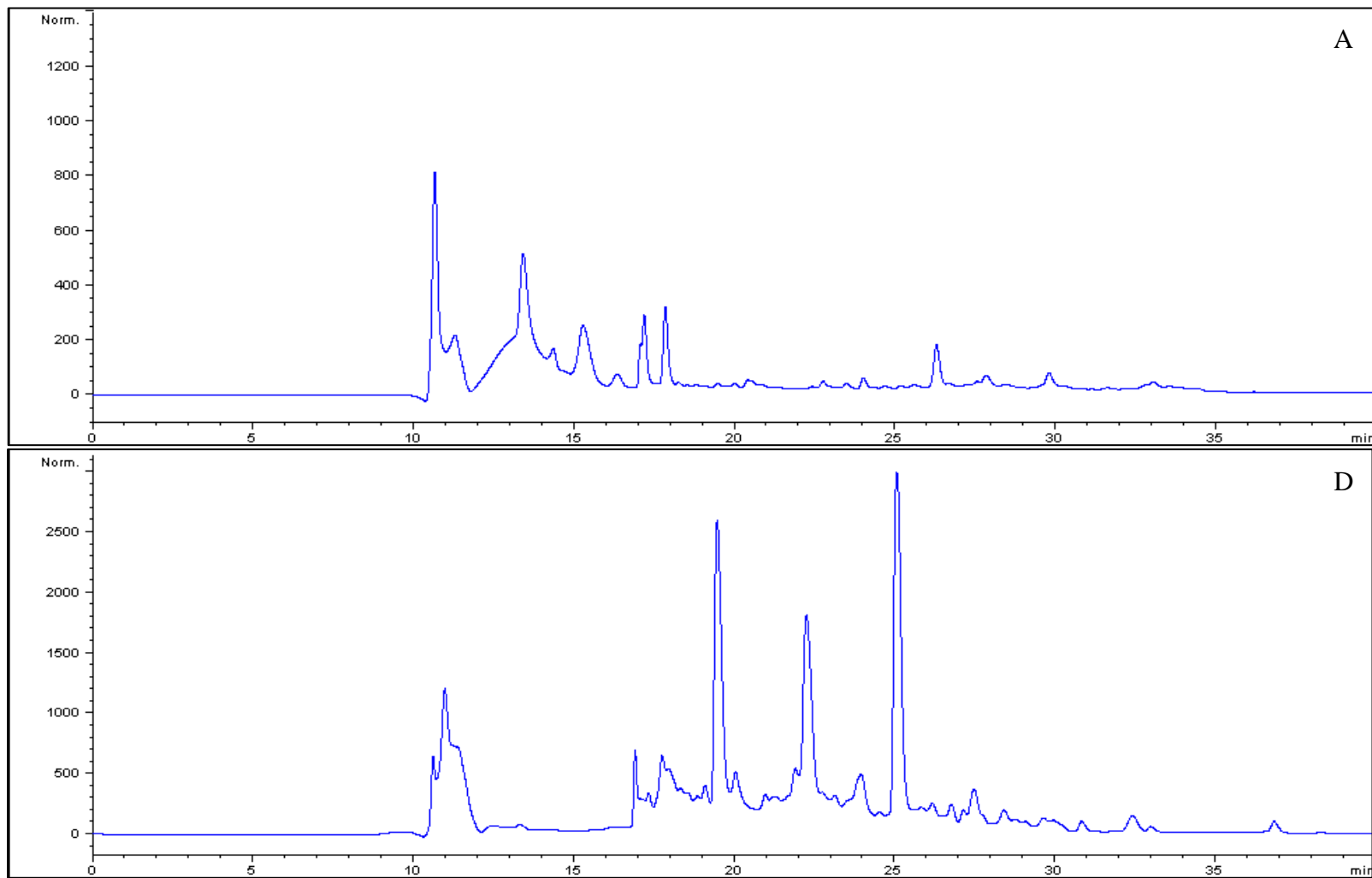


Figura 19. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50598 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

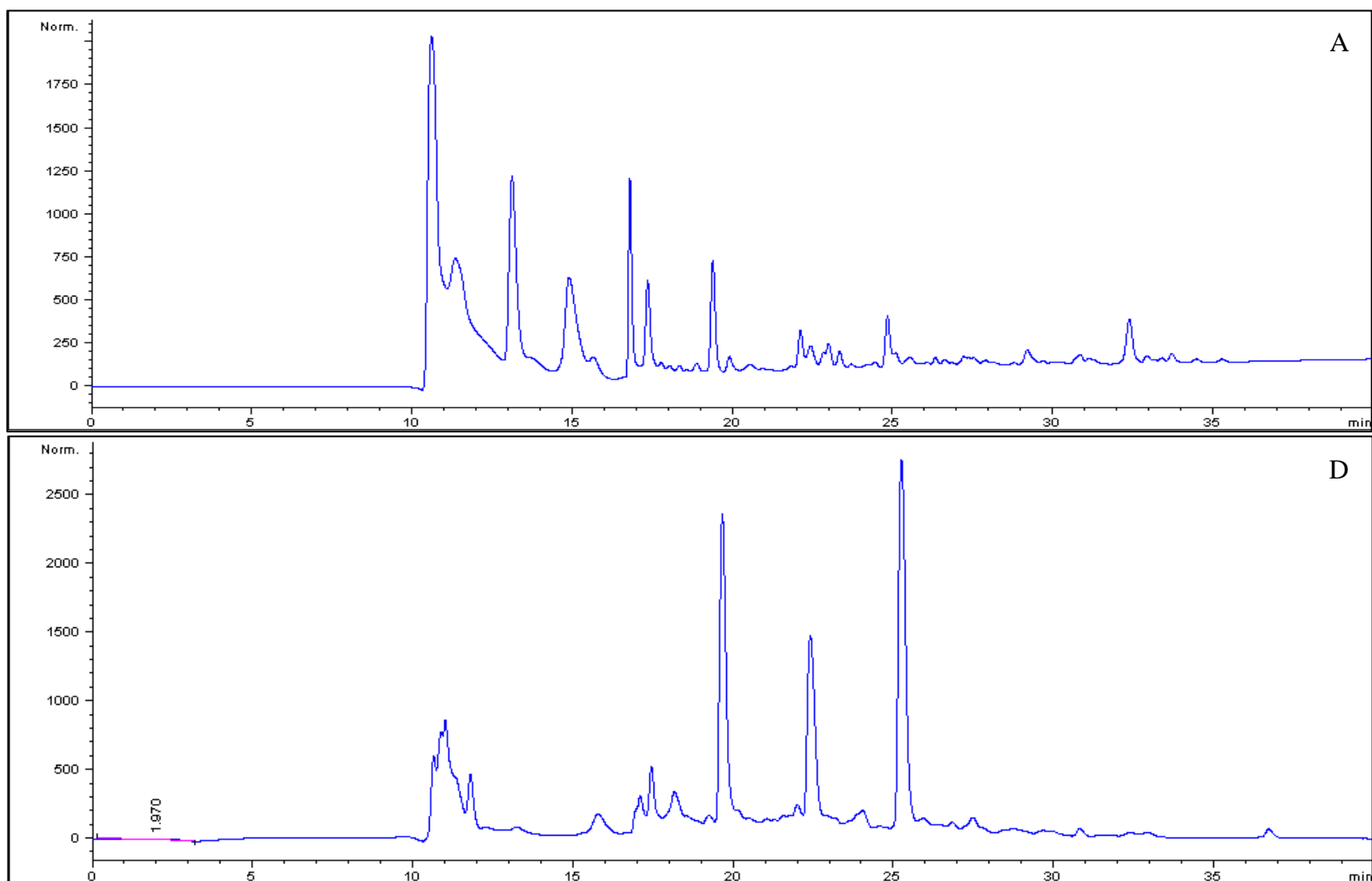


Figura 20. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50571 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

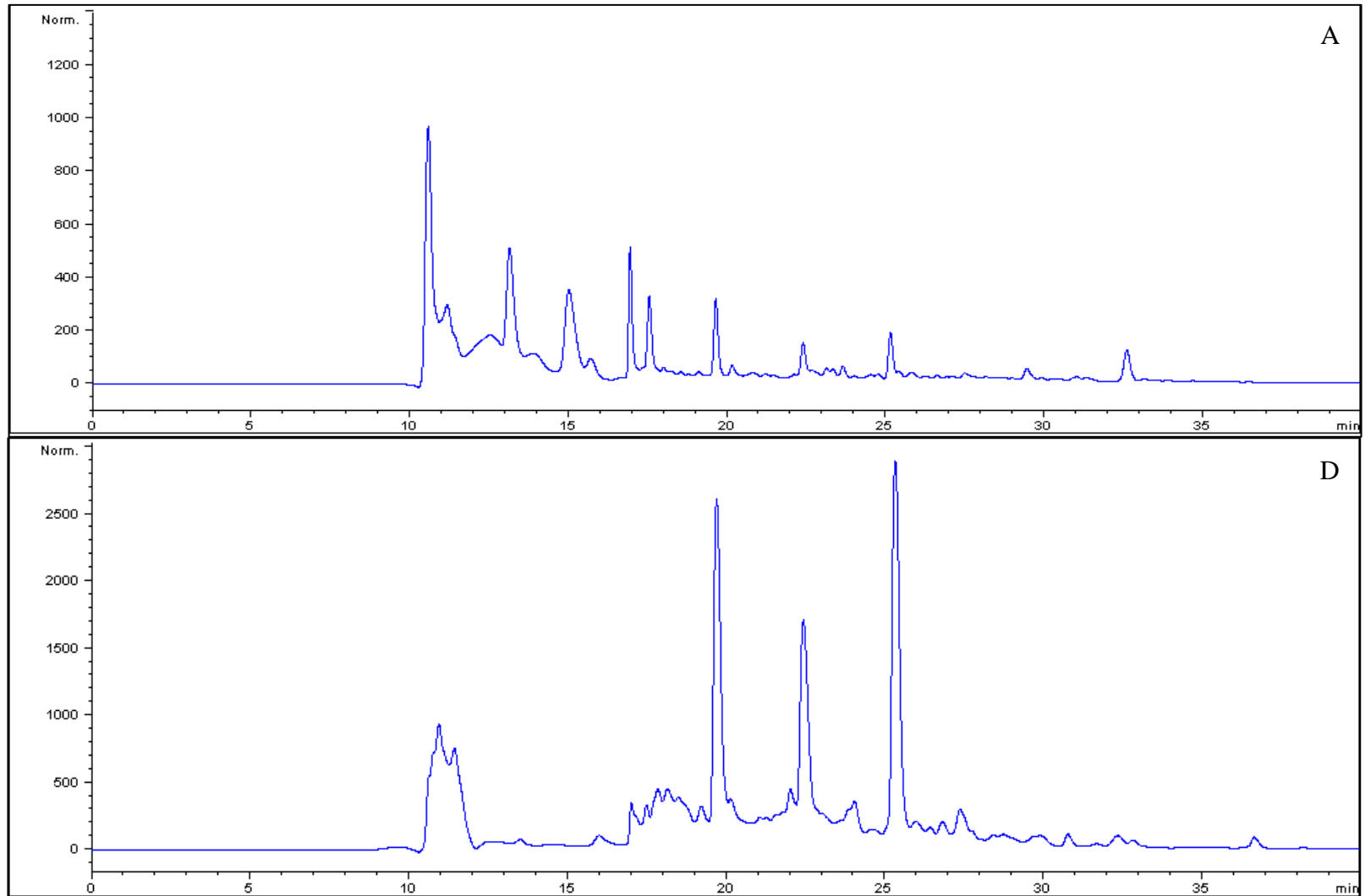


Figura 21. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

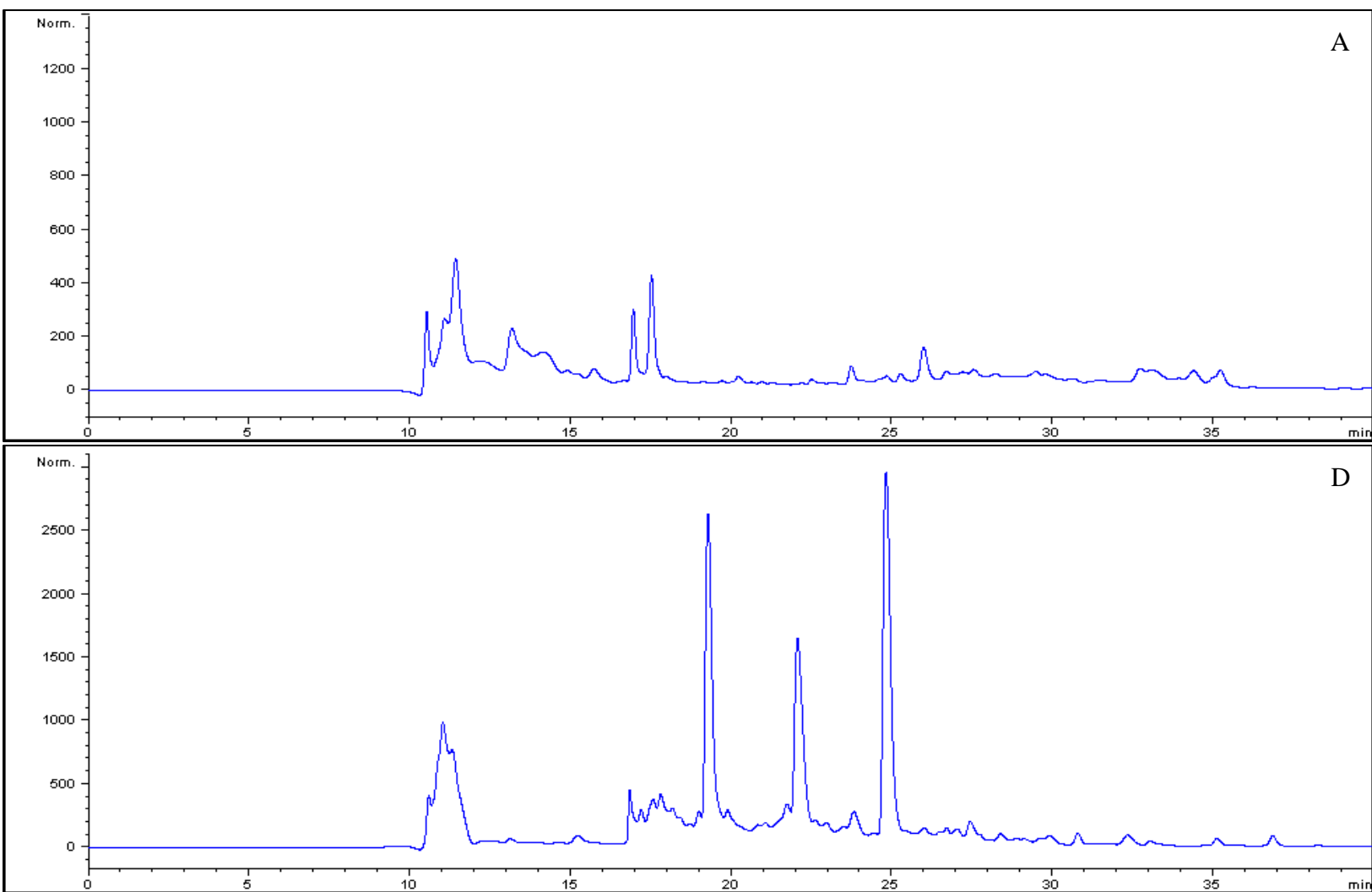


Figura 22. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50599 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

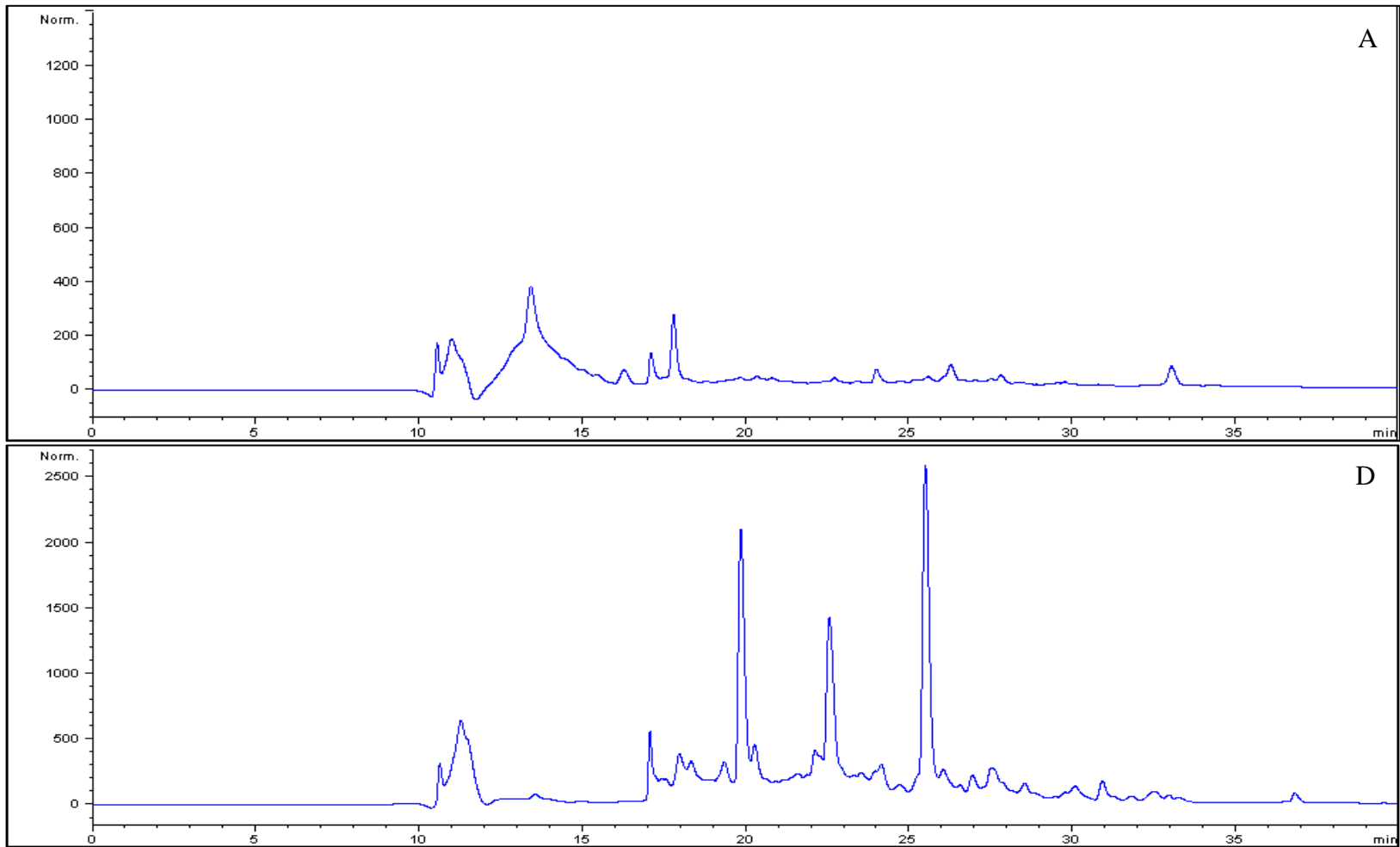


Figura 23. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50600 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

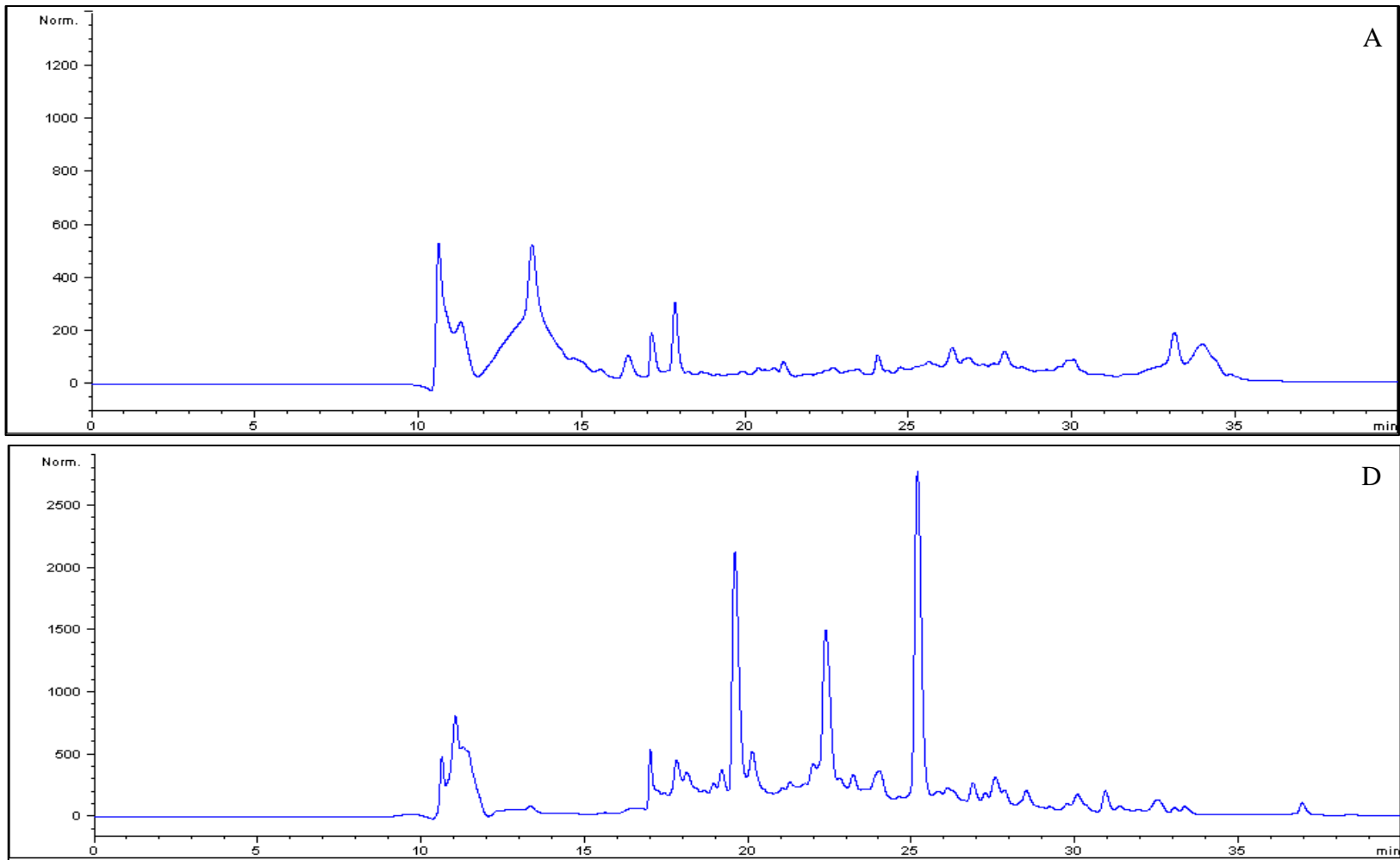


Figura 24. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por cepas de *Lc. lactis* Q3 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

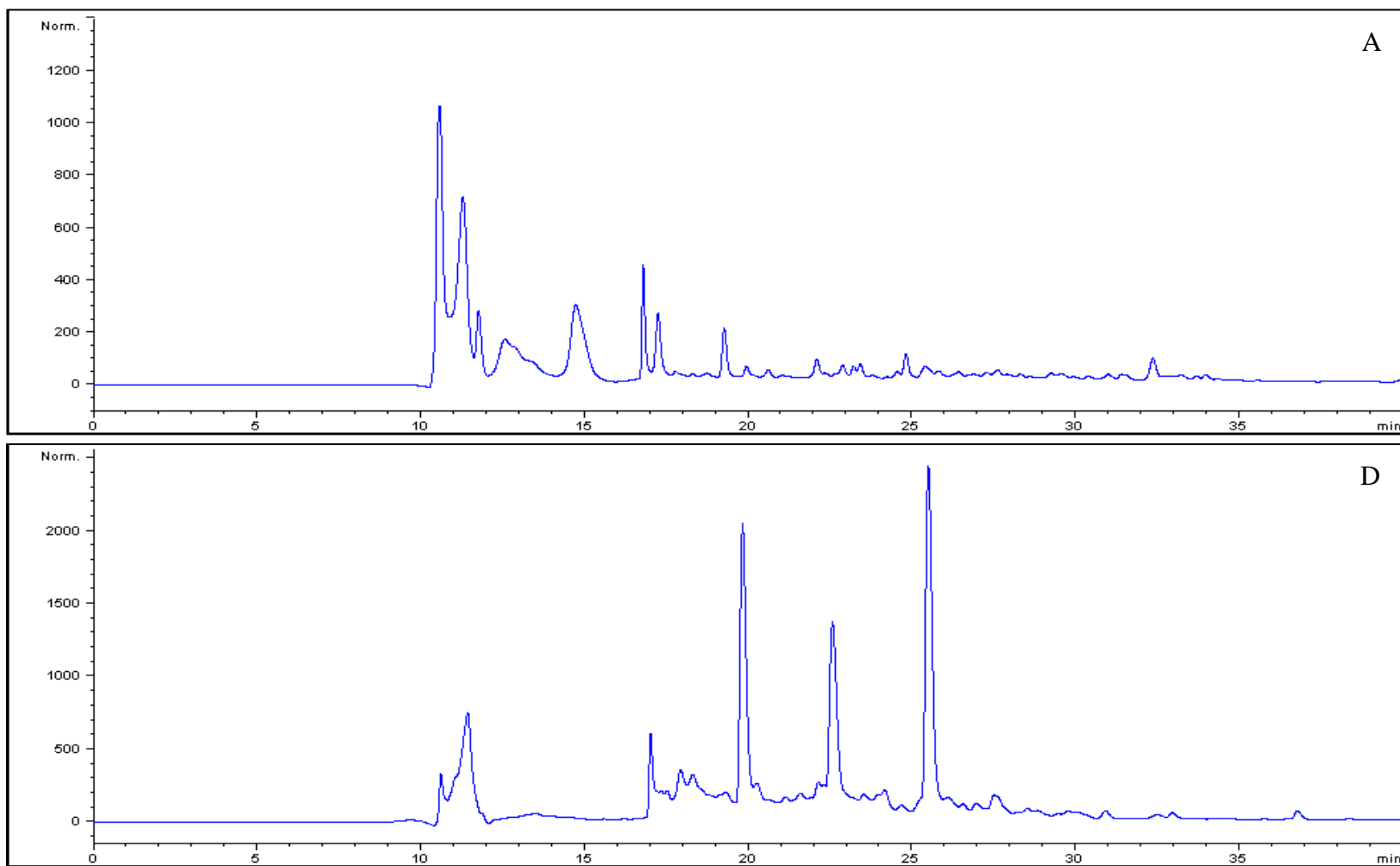


Figura 25. Perfil de péptidos de leches fermentadas a 48 h por la mezcla de cepas de *Lc. lactis* NRRL B-50571-B-50572 antes (A) y después (D) de ser sometidas a un modelo gastrointestinal simulado.

7. CONCLUSIONES

Las leches fermentadas a las 24 y 48 h por cepas específicas de *Lc. lactis* mostraron actividad inhibidora de la ECA, siendo las leches fermentadas B-571, B-572 y la mezcla M B-571-B-572 (1:1) a las 48 h las que mostraron menor IC₅₀ antes de ser sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas. No obstante, las leches fermentadas mezcla M B-571-B-572 (1:1) a 48 h de fermentación, y Q₃ a 24 h de fermentación, presentaron los menores IC₅₀ después de la simulación gastrointestinal *in vitro*. Por lo anterior, es importante realizar estudios donde se evalúe el efecto antihipertensivo de las leches fermentadas por la cepa Q₃ a 24 h y la mezcla de cepas B-571-B-572 en un modelo *in vivo*.

8. REFERENCIAS

- Agyei D. y Danquah M.K. 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*. 29(3):272-277.
- Ahn C.B., Jeon Y.J., Kim Y.T. y Je J.Y. 2012. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochemistry*. 47(12):2240-2245.
- Alvarado C. y Guerra M. 2010. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 23(1):42-49.
- Arhewoh I., Ahonkhai E. y Okhamafe A. 2005. Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides. *African Journal of Biotechnology*. 4(13):1591-1597.
- Baeza-Jiménez R. 2013. Desarrollo de procesos enzimáticos selectivos para aplicaciones nutricionales. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular. Pp. 34.
- Baqueiro-Peña I. 2004. Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas comerciales. Tesis profesional de Licenciatura en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México.
- Beltrán-Barrientos L.M. (2013). Estudio clínico controlado aleatorizado del efecto antihipertensivo asociado al consumo de leche fermentada. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. México.
- Beltrán-Barrientos L.M., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A., Torres-Inguanzo E.H., Astiazarán-García H., Esparza-Romero J. y Vallejo-Córdoba B. (2018). Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure lowering effect of fermented milk with *Lactococcus lactis*: A pilot study. *Journal Dairy Science*. 101:1-7.
- Borja-Lozano J.E. 2014. Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* (“tarwi”) mediante proteasas de *Bacillus* sp. Tesis de Licenciatura Químico farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. Pp. 24.
- Brack M. 2009. La hipertensión arterial: salud y vitalidad. Editorial Hispano Europea S.A. Barcelona, España. P. 96.
- Buffa M., Morais J., Jiménez-Belenguer A., Hernández-Giménez E. y Guamis B. 2006. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes’ milk for cheese making. *Milchwissenschaft*. 61:404-407.

- Campos-Nonato I., Hernández-Barrera L., Rojas-Martínez R., Pedroza A., Medina-García C. y Barquera-Cervera S. 2013. Hipertensión arterial: prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública*. 55(2):144-150.
- Caridi P., Micari P., Caparra P., Cufari A. y Sarullo V. 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*. 13(3):191-200.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. y Catignani G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66(6):1219-1227.
- Clemente A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Science Technology*. 11(7):254-262.
- Cushman D.W., y Cheung H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemistry and Pharmacology*. 20:1637-1648.
- Dal Bello B., Cocolin L., Zeppa G., Field D., Cotter P., y Hill C. 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 153:58-65.
- Domínguez-González K.N., Cruz-Guerrero A.E., González-Márquez H., Gómez-Ruíz L.C., García-Garibay M. y Rodríguez-Serrano G.M. 2014. El Efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista Argentina de Microbiología*. 46(1):58-65.
- Donkor O.N., Henriksson A., Singh T.K., Vasiljevic T. y Shah N.P. 2007a. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*. 17(11):1321-1331.
- Donkor O.N., Henriksson A., Singh T.K., Vasiljevic T. y Shah N. P. 2007b. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait*, INRA Editions. 87(1):21-38.
- Feldstein C.A. y Romero J.C. 2007. El sistema renina angiotensina. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2(2):49-58.
- Ferreira I. y Eca R. 2007. Development and validation of an HPLC/UV method for quantification of bioactive peptides in fermented milks. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*. 30:2139-2147.
- Flambard B., y Johansen E. 2007. Developing a functional dairy product: from research on *Lactobacillus helveticus* to industrial application of Cardi-04™ in novel antihypertensive drink yogurts M. Saarela (Ed.), *Functional dairy products*, 2, CRC Press LLC, Boca Raton, FL. Pp. 506-520.

- Figuroa-Hernández C., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruíz L., García-Garibay M. y Jiménez-Guzmán J. 2012. Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 11(2):259-267.
- Fitzgerald R.J. y Meisel H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. British Journal of Nutrition. 84(1):S33-S37.
- Fitzgerald R.J., Murray B.A. y Walsh D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. The Journal of Nutrition. 134(4):980-988.
- Fitzgerald R.J. y Murray B.A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. International Journal Dairy Technology. 59:118-125.
- Foltz M., Meynen E., Bianco V., Van Platerink C., Koning T. y Kloek J. 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. The Journal of Nutrition. 137(4):953-958.
- Fuglsang A., Rattray F.P., Nilsson D. y Nyborg N.C.B. 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. Antonie van Leeuwenhoek. 83:27-34.
- Fujita H., Yokoyama K. y Yoshikawa M. 2000. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins Food Chemistry and Toxicology. 65:564-56
- Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. y Addeo, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. Applied and Environmental Microbiology. 66(9):3898-3904.
- Gómez-Ruíz J.A., Ramos M. y Recio I. 2002. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. International Dairy Journal. 12(1):697-706
- Gómez-Ruiz J.A., Ramos M. y Recio I. (2004). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. International Dairy Journal. 14:1075-1080
- González-Córdova A.F., Torres-Llenez M.J., Rodríguez-Figueroa J.C., Espinosa de los Monteros J.J., García H.S. y Vallejo-Córdoba B. 2011. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. Journal of Food. 9(2):146-151.
- Hernandez J. y Anderson S. 2012. Prehypertension: A literature-document public health concern. Journal of the American Academy of Nurse Practitioners. 24:3-10.

- Hernández-Ledesma B., Amigo L., Ramos M. y Recio, I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(6):1504-1510.
- Hernández-Ledesma B., Contreras M. y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165(1):23-35.
- Hernández-Rojas M. y Vélez-Ruiz L.F. 2014. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 8(2):13-22.
- Herrera C.F., Betancur A.D. y Segura C.M.R. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición hospitalaria*. 29(1):10-20.
- Juillard V., Laan H., Kunji E.R.S., Jeronimus Stratingh C.M., Bruins A.P. y Konings W.N. 1995. The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes β -casein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*. 177:3472-3478.
- Kopf-Bolanz K.A., Schwander F., Gijs M., Vergères G., Portmann R. y Egger L. 2012. Validation of an *in vitro* digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *The Journal of Nutrition*. 142:245-250.
- Korhonen H. y Pihlanto A. 2006. Bioactive Peptides: Production and Functionality. *International Dairy Journal*. 16:945-960.
- Korhonen H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *Journal of functional foods*. 1(1):177-187.
- Kunji E., Mierau I., Poolman B., Konings W., Venema G., y Kok J. 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70:187-227.
- Kuwabara Y., Nagai S., Yoshimitsu N., Nakagawa I., Watanabe Y. y Tamai, Y. 1995. Antihypertensive effect of the milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80(1):294-295.
- Leclerc P.L., Gauthier S.F., Bachelard H., Santure M. y Yoy D. 2002. Antihypertensive activity of casein enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 12(12):995-1004.
- Lim S.S., Vos T., Flaxman A.D. y Danaei G.I. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380(9859):2224-60.

- López-Armenta T. 2014. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y antioxidante de péptidos bioactivos sometidos a digestión gastrointestinal simulada. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Madureire A.R., Tavares T., Gomes A.M.P., Pintado M.E. y Malcata F. 2010. Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 93:437-455.
- Maeno M., Yamamoto N. y Takano T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 79(8):1316-1321.
- Matsui T., Yuki Yoshi A., Doi S., Sugimoto H., Yamada H. y Matsumoto K. 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(2):80-86.
- Mulero-Cánovas J., Zafrilla-Rentero P., Martínez-Cachá A., Leal-Hernández M., y Abellán-Alemán J. 2011. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 23(5):219-227.
- Muguerza B., Ramos M., Sanchez E., Manso M.A., Miguel M., Alexandre A., Delgado M.A. y Recio I. 2006. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*. 16:61-69.
- Muro-Urista C., Álvarez-Fernández R., Riera-Rodríguez F., Arana-Cuenca A. y Téllez-Jurado A. 2011. Review: Production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*. 17(4):293-317.
- Najafian L. y Babji A.S. 2014. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal Functional Foods*. 9:280-289.
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. y Shahidi F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*. 124(4):1354-1362.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., y Takano T. 1995. Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal Dairy Science*. 78(1):777-783.
- Nielsen M.S., Martinussen T., Flambard B., Sørensen K. y Otte J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effects of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*. 19:155-165.

- Olivera J. 2011. Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas comerciales. Tesis profesional. Licenciatura en Bioquímica. Unidad de Tecnología de Alimentos. Facultad de Agronomía. Universidad de la República.
- Pihlanto-Leppala A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T. y Korhonen, H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*. 67(1):53-64.
- Pihlanto A., Virtanen T. y Korhonen H. 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*. 10:3-10
- Pereira M.A., Parker E.D. y Folsom A.R. 2006. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: an 11-year prospective study of 28 812 postmenopausal women. *Archives of internal medicine*. 166(12):1311-1316.
- Prupp, A.H., Isaksson T., Stepaniak L. y Sørhaug T. 2004. Quantitative structure-activity relationship modeling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*. 219:579-583.
- Quirós A., Del Mar M., Ramos M., Amigo L. y Recio I. 2009. Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of β -casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides*. 30:1848-1853.
- Rai A.K., Sanjukta S. y Jeyaram K. 2017. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory (ACE-I) peptides during milk fermentation and their role in reducing hypertension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(13):2789-2800.
- Roberts P.R., Burney J.D., Black K.W. y Zaloga, G.P. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*. 60(4):332-337.
- Rodríguez-Figueroa J.C., Reyes-Díaz R., González-Córdova A.F., Troncoso-Rojas R., Vargas Arispuro I. y Vallejo-Córdoba B. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal Dairy Science*. 93:5032-5038.
- Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A.F., Astiazaran-García H., y Vallejo-Córdoba B. 2013a. Hypotensive and heart rate lowering effects in rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *British Journal Nutrition*. 109:827-833.
- Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A.F., Astiazaran-García H., Hernández-Mendoza A. y Vallejo-Córdoba B. 2013b. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Journal Dairy Science*. 96:4094-4099.

- Rojas-Ronquillo R., Cruz A., Flores A., Rodríguez G., Gómez L., Reyes P., Jiménez J. y García M. 2012. Antithrombotic and antihypertensive properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International Dairy Journal*. 26:147-154
- Rokka T., Syvoja E.L., Tuominen J. y Korhonen H. 1997. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT milk. *Milchwissenschaft*. 52:675-678.
- Roufik S., Gauthier S.F. y Turgeon S.L. 2006. *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*. 16(4):294-302.
- Saadi S., Saari N., Anwar F., Hamid A.A. y Ghazali H.M. 2015 Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*. 33(1):80-116.
- Sánchez-Mendoza N.A., Cruz-Castellanos M., Dávila-Ortiz G., y Jiménez-Martínez C. 2016. Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España. OmniaScience. 117-142.
- Santos-Espinosa A. 2014. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina de leches fermentadas con *Lactococcus lactis* en un modelo de digestión *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. México.
- Sasaki M., Boukje W. y Paris, T. 1995. Immunological and electrophoretic study of the proteolytic enzymes from various *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Research*. 62:611-620.
- Savijoki K., Ingmer H. y Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:394-406.
- Segura-Campos M., Chel-Guerrero L. y Betancur-Ancona D. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista Chilena de Nutrición*. 37(3):386-391.
- Soltero R. y Ekwuribe N. 2005. The oral delivery of protein and peptide drugs. In: *Drug delivery, principles and applications*. 106-110.
- Tamine A.Y., Skriver A., y Nilsson L.E. 2006. Starter cultures. In A. Y. Tamine (Ed.), *Fermented milks* (pp. 11-52). Oxford, UK: Blackwell.
- Torres-Llenez M.J., Vallejo-Cordoba B., y González-Córdova A.F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55(2):111-117.

- Torrucó-Uco J.G., Domínguez-Magaña M.A., Dávila-Ortíz G., Martínez-Ayala A., Chel-Guerrero L.A. y Betancur-Ancona D.A. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(2):158-168.
- Román J., Vázquez V., Loera J., Cantú O., Cervantes D. y Bernabé C. 2016. Panorama epidemiológico del paciente con hipertensión arterial sistémica no controlada en una unidad de medicina familiar de Reynosa, Tamaulipas. *Atención Familiar*. 23(1):14-18.
- Sathya P., Radha K., Sathia C.T. y Srinivasan C. 2017. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity from fermented goat milk produced with different lactic acid bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(12):1670-1676.
- Skribc R. y Igc R. 2009. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides*. 30(1):1945-1950.
- Sosa-Rosado J.M. 2010. Tratamiento no farmacológico de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina*. 71(4):241-244.
- Vargas-Lucero W.E. (2018). Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas por cepas específicas de *Lactococcus lactis* sometidas a los procesos de liofilización y secado por aspersión. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Vasek O.M., Fusco A.J.V., y De Giori G.S. 2004. Elaboración de queso artesanal correntino con cepas salvajes seleccionadas. I.F.A.C.E.N.A-U.N.N.E.
- Vermeirssen V., Van Camp J. y Verstraete W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*. 92:357-366.
- Whelton P.K., Carey R.M., Aronow W.S., Casey D.E., Collins K.J., Himmelfarb C.D., DePalma S.M., Gidding S., Jamerson K.A., Jones D.W., MacLaughlin E.J., Muntner P., Ovbigele B., Smith S.C., Spencer C.C., Stafford R.S., Taler S.J., Thomas R.J., Williams K.A., Williamson J.D., y Wright J.T. 2017. Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 72(2):1-283.
- Yamamoto N., Maeno M. y Takano, T. 1999. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal Dairy Science*. 82(1):1388-1393.