



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

**“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE  
DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS AISLADOS DE QUESO CREMA  
DE CHIAPAS”**

---

**POR:**

**JOSÉ ELEAZAR AGUILAR TOALÁ**

**TESIS APROBADA POR LA**

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA 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 José Eleazar Aguilar Toalá, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Adrián Hernández Mendoza  
Director de Tesis



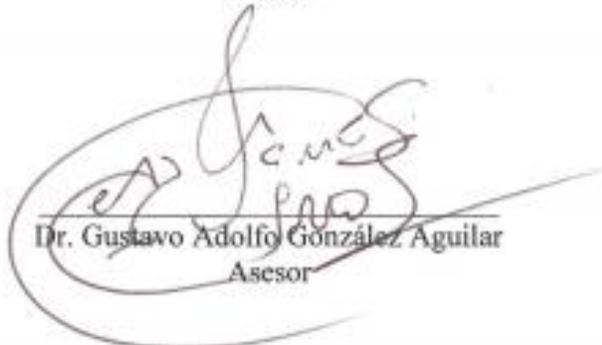
Dra. Belinda Vallejo Galland  
Asesor



Dr. Aarón Fernando González Córdova  
Asesor



Dr. Hugo Sergio García Galindo  
Asesor



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar  
Asesor

## 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, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico otorgado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.** por darme la oportunidad de realizar mis estudios en su programa de maestría.

A **Dios** por permitirme vivir este momento de mi vida.

A mi Director de Tesis, el **Dr. Adrián Hernández Mendoza** por darme la oportunidad de adentrarme en el interesante mundo de la investigación y guiarme durante mi formación como su estudiante. Su confianza, paciencia y apoyo fueron fundamentales.

A mis asesores **Dr. Aarón F. González Córdova** y **Dra. Belinda Vallejo Galland**, por haberme invitado a formar parte del grupo de trabajo en el Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos, por haber creído en mis capacidades y habilidades para poder aprender y desenvolverme durante la maestría y el trabajo de tesis.

Al **Dr. Hugo S. García Galindo** y al **Dr. Gustavo A. González Aguilar** por sus acertados consejos, sugerencias, comentarios y aportaciones al trabajo de tesis, las cuales fueron indispensables para culminar.

Hago un meritorio reconocimiento al **Dr. Aarón F. Gonzáles Córdova** y **Dr. Adrián Hernández Mendoza** ya que además de agradecer su aportación académica, les agradezco profundamente su apoyo en las vicisitudes de la vida, por haberme brindado unos minutos, aunque estuviesen muy ocupados, para escucharme, por los regaños, los consejos y los ánimos para seguir adelante.

Agradezco el apoyo técnico y experiencias brindados en diversas fases del trabajo experimental al **M.C. Ricardo Reyes Díaz, M.C. Carmen Estrada Montoya y Dr. María de Jesús Torres Llanez**. Las facilidades en los laboratorios, asesorías y asistencia en el experimental contribuyeron valiosamente en el proyecto.

Al personal de la biblioteca **Gerardo Reyna y Luis Conde** y secretarias que siempre me atendieron amablemente, en especial a **Faly Gil Lamadrid, Laura García, Verónica Araiza y Argelia Marín**.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí muchas experiencias y horas de trabajo: **Fausto Cantú, Trinidad López, Alejandro Santos, Christian Gómez, Daniel Wicochea, Isidro Méndez, Lourdes Santiago, Karmina Álvarez, Tania García, Priscilia Heredia, Jesús Sosa, Aline Reyes, Sinaí Ojeda, Lilia Beltrán, Olga Lidia, Gesuri Coc** porque su amistad y convivencia hicieron más ameno el trabajo. Cada uno ha puesto un granito de arena y ha aportado en poco o gran medida algo a mi crecimiento personal y profesional, sin duda contribuyeron valiosamente.

## DEDICATORIAS

A mis padres **Eleazar Aguilar** (q.e.p.d.) y **Pilar Toalá** por todo su amor, apoyo y confianza incondicional que siempre me han brindado. Por estar ahí cuando los necesito y apoyarme en las decisiones que he tomado a lo largo de la vida. No ha sido fácil el camino recorrido, pero en este documento queda plasmado un logro más.

A mis hermanos **Milton Manolo** y **Jasive**, quienes me han apoyado en todo y han sabido compartir mis logros con ustedes. Apoyándonos siempre hemos salido adelante y superado muchos obstáculos.

A todos mis **tíos (as)**, **primos (as)** y **abuelas** que han estado al pendiente de mí, que siempre se han interesado en mi bienestar y en el progreso que he tenido, tanto en lo profesional como en lo personal. Mis abuelos, que aunque ya no están con nosotros, nos dejaron muchos recuerdos y enseñanzas para conmigo.

Familia, este trabajo representa un logro más que sin ustedes no hubiese sido posible culminar.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Estrés Oxidativo y Enfermedades Degenerativas.....	3
2.2 Sistema Endógeno Antioxidante .....	6
2.3 Antioxidantes Dietarios .....	8
2.4 Capacidad Antioxidante de la Leche y sus Derivados .....	10
2.4.1 Componentes con Actividad Antioxidante en Leche y sus Derivados .....	10
2.4.1.1 Componentes enzimáticos con actividad antioxidante. ....	11
2.4.1.2 Componentes no-enzimáticos con actividad antioxidante.....	12
2.5 Proteínas Lácteas como Precursores de Péptidos Bioactivos.....	15
2.5.1 Péptidos Bioactivos con Actividad Antioxidante Presentes en los Quesos .	15
III. HIPOTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS .....	20
4.1 Objetivo General .....	20
4.2 Objetivos Específicos .....	20
V. MATERIALES Y METODOS .....	21
5.1 Reactivos .....	21
5.2 Obtención de las Muestras .....	21
5.3 Preparación de las Fracciones Peptídicas a partir de Extractos Acuosaos .....	22

5.4 Contenido Peptídico de las Fracciones Peptídicas y Actividad Proteolítica en Queso.....	22
5.5 Capacidad Antioxidante de las Fracciones Peptídicas .....	23
5.4.1 Capacidad Secuestrante sobre el Radical ABTS.....	23
5.4.2 Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ORAC .....	23
5.6 Análisis estadístico .....	24
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
6.1 Contenido Peptídico de las Fracciones Peptídicas y Actividad Proteolítica en Queso.....	26
6.2 Capacidad Antioxidante de las Fracciones Peptídicas .....	32
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>42</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática del estrés oxidativo y su asociación con la aparición de diversas enfermedades.....	4
2	Contenido peptídico en la fracción <3 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	27
3	Contenido peptídico en la fracción de 3-10 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	27
4	Representación del sistema proteolítico de BAL en la ruptura de caseínas, y la liberación de sus enzimas después de su lisis.....	28
5	Actividad proteolítica de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	32
6	Capacidad antioxidante determinada por el método ABTS en la fracción <3 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	34
7	Capacidad antioxidante determinada por el método ABTS en la fracción de 3-10 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	35
8	Capacidad antioxidante determinada por el método ORAC en la fracción <3 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	38
9	Capacidad antioxidante determinada por el método ORAC en la fracción de 3-10 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.....	38

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales compuestos antioxidantes naturales presentes en diferentes alimentos de origen vegetal y animal.....	9
2	Principales quesos estudiados en relación a su actividad antioxidante por péptidos bioactivos .....	18
3	Principales variables del proceso de elaboración del queso Crema de Chiapas en las tres regiones productoras del estado.....	30
4	Cuenta viable ( $\text{Log}_{10}$ UFC $\text{g}^{-1}$ queso) de los principales géneros de BAL presentes en queso Crema de Chiapas en las tres regiones productoras del estado.....	31

## RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno son generados constantemente en las células. Éstos juegan un papel importante a nivel fisiológico al participar en procesos de protección (*e.g* fagocitosis, detoxificación y apoptosis). Sin embargo, su producción excesiva (estrés oxidativo) puede inducir daño oxidativo a biomoléculas importantes en el cuerpo humano, lo cual se ha asociado al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. En respuesta, los sistemas biológicos previenen el daño mediante antioxidantes endógenos y dietarios. Por lo tanto, los alimentos ricos en antioxidantes pueden ser usados para ayudar a la prevención del daño oxidativo. En este sentido, diversos estudios señalan que el consumo regular de la leche podría mejorar la salud de los consumidores debido a que contiene péptidos antioxidantes. En virtud de lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad antioxidante presente en extractos acuosos de queso Crema de Chiapas. Los quesos fueron colectados de tres diferentes regiones (Norte, Centro-Frailesca y Costa) y almacenados durante 135 d a 4 °C. La capacidad antioxidante (CA) fue evaluada en fracciones peptídicas solubles en agua < 3 kDa y de 3-10 kDa por los métodos ABTS y ORAC y expresada como Trolox equivalentes mL<sup>-1</sup> fracción (TE). Los resultados mostraron que la CA por el método ORAC incremento significativamente (<0.05) después de 135 d de almacenamiento. En general, la CA de la fracción de 3-10 kDa fue 2.5 veces mayor que la fracción < 3 kDa. Adicionalmente, la CA de ambas fracciones fue dependiente de la región, siendo los quesos de la región Costa los que presentaron mayor CA con valores de 2345.4 TE y 1005.2 TE para la fracción 3-10 kDa y < 3 kDa, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron por el método ABTS. En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que las fracciones peptídicas presentes de forma natural en los Queso Crema de Chiapas podrían actuar como antioxidantes dietarios.

**Palabras clave:** Queso artesanal, péptido antioxidante, estrés oxidativo, ORAC

## ABSTRACT

Reactive oxygen and nitrogen species are constantly generated in living cells. They play important roles participating at physiological level in protection processes (*e.g.* phagocytosis, detoxification and apoptosis). However, its excessive production (oxidative stress) can induce oxidative damage to important biomolecules in the human body, which might cause neurodegenerative and cardiovascular diseases. In response, biological systems prevent damage by endogenous antioxidants and dietary antioxidants. Therefore, food rich in antioxidants may be used to help preventing the oxidative damage. In this sense, studies have pointed out that the regular consumption of milk could improve consumer health due to they contain antioxidant peptides. Hence, the aim of the present study was to determine the antioxidant capacity present in water-soluble peptidic fractions from Queso Crema de Chiapas. Cheeses were obtained from three different regions (Norte, Centro-Frailesca and Costa), and stored during 135 d at 4 °C. Antioxidant capacity (AC) was assessed in water-soluble peptidic fractions <3kDa and 3-10 kDa by both ABTS and ORAC methods, and expressed as equivalents Trolox mL<sup>-1</sup> fraction (TE). The results showed that the AC by ORAC assay increased significantly (<0.05) after 135 d of storage time. In general, the AC of the 3-10 kDa fraction was 2.5-fold higher than the < 3 kDa fraction. Additionally, the AC of both fractions was dependent on the sampling region, being the Costa region the one with highest AC with 2345.4 TE and 1,005.2 TE, for 3-10 kDa and < 3 kDa fractions, respectively. Similar results were obtained by the ABTS method. In conclusion, our results suggest that peptidic fractions naturally present in Queso Crema de Chiapas could act as dietary antioxidants.

**Keywords:** Artisanal cheese, antioxidant peptide, oxidative stress, ORAC

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha demostrado el papel que juegan ciertos componentes bioactivos de los alimentos en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades, principalmente las enfermedades crónico degenerativas (Kris-Etherton *et al.* 2002). Esto ha provocado un cambio de la simple concepción de alimento como fuente de nutrientes y de satisfacción sensorial a uno más integral que incluye no solo el potencial que tienen los alimentos de nutrir, sino también de prevenir y curar enfermedades, los llamados alimentos funcionales (Hasler, 2000).

A lo largo de la historia, la leche y sus derivados han sido catalogados como alimentos que tienen un alto valor nutritivo y que además ejercen ciertos efectos positivos en la salud de los consumidores, debido a que contienen diversas sustancias y componentes bioactivos como proteínas (inmunoglobulinas, enzimas), lípidos (ácidos grasos) carbohidratos (oligosacáridos), hormonas, vitaminas, factores de crecimiento y bacterias ácido lácticas (BAL) con función y metabolismo específico (Walther *et al.*, 2008; Bhat y Bhat, 2011). En este último respecto, algunas BAL son capaces de generar ciertos péptidos con actividad biológica tales como: antioxidante, quelante, antimicrobiana, antihipertensiva y antimutagénica, entre otras (Gobbetti *et al.*, 2002; Sah *et al.*, 2014). La generación de dichos péptidos se deriva de la actividad proteolítica de las bacterias, siendo ésta cepa-específica, lo que abre la posibilidad a la producción de un gran número y variedad de péptidos con diferentes actividades.

En la actualidad, los productos lácteos artesanales, principalmente los quesos, han llamado el interés científico como fuente y/o medio de transporte de bacterias productoras de péptidos bioactivos, en particular de aquellos potencialmente antioxidantes (Choi *et al.*, 2012). Dichos péptidos podrían jugar un papel protector a través de la (1) reducción de la formación de radicales libres, por inhibición directa de radicales libres a través de la transferencia de hidrógenos o electrones o por inhibición de generadores de radicales libres, (2) supresión o desactivación de radicales libres (por secuestro de metales), o (3) participación en procesos de reparación de daños oxidativos (Young y Woodside, 2001; Valko *et al.*, 2007).

La importancia fisiológica de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante radica en el potencial que presentan para controlar y prevenir enfermedades degenerativas, tales como aterosclerosis, diabetes, hipertensión y cáncer, que tienen como factor etiológico común al estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN).

Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue determinar *in vitro* la capacidad antioxidante asociada a las fracciones peptídicas presentes en extractos acuosos obtenidos de queso Crema de Chiapas, un queso artesanal mexicano.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Estrés Oxidativo y Enfermedades Degenerativas

Las ERO y ERN ( $O^{\bullet-}$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $RO^{\bullet}$ ,  $ONOO^{\bullet}$ ) juegan un papel importante al participar a nivel fisiológico en el cuerpo humano en diversas reacciones de protección, tales como fagocitosis, detoxificación de xenobióticos y apoptosis (Devasagayam *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007). Su producción se encuentra regulada a nivel celular. No obstante, una producción excesiva conlleva a la alteración del equilibrio entre los mecanismos oxidativos y antioxidantes, en favor de los primeros, lo que se ha denominado estrés oxidativo (Sies, 1997).

Este concepto ha sido redefinido de una manera más precisa como "un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, a favor de los oxidantes, que conducen a una interrupción del control de la señalización redox y/o de daños moleculares" (Halliwell y Gutteridge, 2007). De acuerdo a la definición anterior, el estrés oxidativo está indisolublemente unido a la interrupción de las vías de señalización normales, daños de macromoléculas y la alteración de la homeostasis.

Generalmente, el estrés oxidativo es considerado como la causa principal de los procesos fisiopatológicos que conducen a la aparición y desarrollo de diversas enfermedades (Figura 1), sin embargo otros autores señalan que el estrés oxidativo es el resultado de circunstancias fisiopatológicas (Halliwell y Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2007).

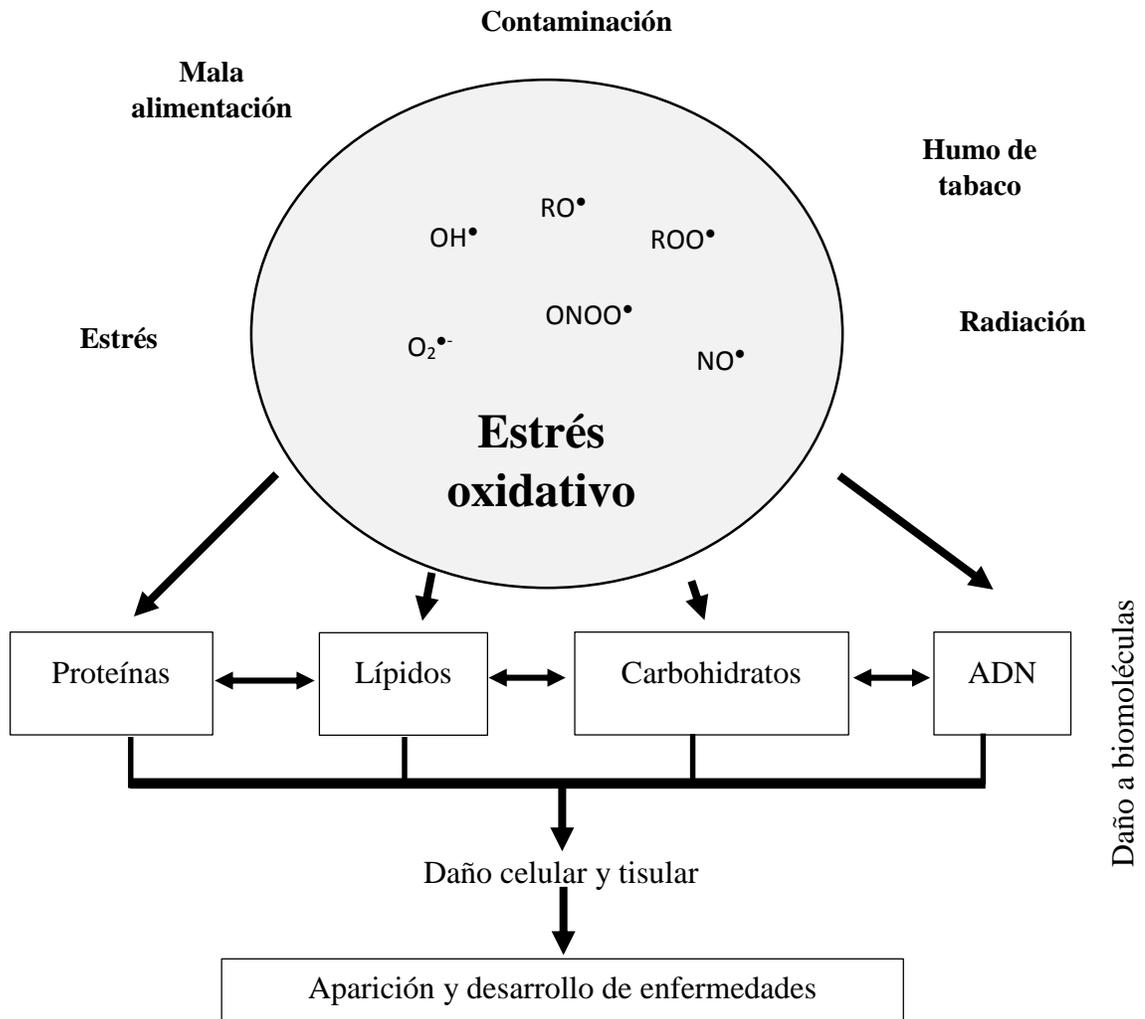


Figura 1. Esquema general sobre la representación del estrés oxidativo y su asociación con la aparición de diversas enfermedades.  $\text{O}_2^{\bullet-}$ : Radical superóxido;  $\text{OH}^\bullet$ : Radical hidroxilo;  $\text{RO}^\bullet$ : Radical alcoxilo;  $\text{ROO}^\bullet$ : Radical peroxilo;  $\text{NO}^\bullet$ : Radical óxido nítrico;  $\text{ONOO}^\bullet$ : Radical peroxinitrilo (Halliwell y Gutteridge, 2007; Valko *et al.*, 2007).

Entre las diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo se encuentran, principalmente la aterosclerosis, diabetes, hipertensión y cáncer. De acuerdo a la teoría del estrés oxidativo, la aterosclerosis es el resultado de la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad, las cuales se depositan en la pared de las arterias (Vogiatzi *et al.*, 2009). Esta deposición conlleva a una proliferación de ciertas células dentro de la pared arterial que inciden gradualmente en la luz del vaso e impiden el flujo sanguíneo (Stocker y Keaney, 2004). Este proceso no solamente reducen el flujo sanguíneo, sino también da lugar a la aparición de procesos inflamatorios que generan radicales superóxidos (Bonomini *et al.*, 2008).

Por otra parte, los radicales  $O_2^\bullet$ ,  $OH^\bullet$  y peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) sobreproducidos en las células endoteliales de los vasos sanguíneos y del miocardio, participan en la oxidación de la glucosa y en la glicación no enzimática de proteínas, lo cual se ha asociado al conjunto de anomalías metabólicas que desencadenan en la diabetes (Niedowicz y Daleke, 2005; Giacco y Brownlee, 2010).

Por otro lado, las células endoteliales juegan un papel importante en la relajación arterial al liberar óxido nítrico, el cual es un relajador vascular. Sin embargo, una producción excesiva del radical  $O_2^\bullet$  en las células endoteliales pueden degradar al óxido nítrico y producir el radical libre  $ONOO^\bullet$ , el cual puede dañar a las propias células endoteliales, dicho desequilibrio puede llevar a una vasodilatación reducida y con ello, contribuir al desarrollo de la hipertensión (Ceriello, 2008). Otro posible mecanismo es la generación de compuestos vasoconstrictores productos de la peroxidación lipídica, tales como los  $F_2$ -isoprostanos (Grossman, 2008; Ward y Croft, 2006).

Adicionalmente, el estrés oxidativo ha sido implicado como una de las principales causas del cáncer (Reuter *et al.*, 2010; Sosa *et al.*, 2013). El cáncer es un término general que se refiere a más de 100 enfermedades diferentes que afectan a diversos tejidos y tipos de células. El principal mecanismo causante del cáncer está relacionado con el daño oxidativo al ácido desoxirribonucleico (ADN), lo cual causa una mutación, lo que conlleva a una inestabilidad del genoma, alteraciones en los eventos epigenéticos y a una

inapropiada expresión de genes. Lo anterior resulta en una proliferación de células dañadas o sin ninguna función específica, resistencia a apoptosis y expansión a otras partes de cuerpo humano (metástasis) (Visconti y Grieco, 2009). Por otro lado, la membrana celular es rica en lípidos poliinsaturados y proteínas que son susceptibles a la oxidación por ERO. Otro evento oxidativo relacionado con la aparición del cáncer, corresponde al daño a la membrana por ERO, lo que modifica su permeabilidad y función estructural lo cual conduce a un inadecuado funcionamiento de la célula, llevándolo a la muerte o pérdida de la función tisular (Halliwell y Chirico, 1993).

Para contrarrestar el efecto nocivo que pueden causar las ERO y ERN, el cuerpo humano cuenta con mecanismos de defensa y protección. El conjunto de dichos mecanismos de defensa son conocidos como sistema endógeno o biológico antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007).

## 2.2 Sistema Endógeno Antioxidante

Este sistema está compuesto principalmente por enzimas que el cuerpo humano sintetiza, e incluyen principalmente a las enzimas glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Valko *et al.*, 2007).

La enzima GPx es un tripéptido compuesto por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina; es importante en el mantenimiento de la homeostasis y protección celular como antioxidante, produciendo la molécula de glutatión (Veskoukis *et al.* 2011). El glutatión actúa como cofactor de ciertas enzimas tal como la glutatión transferasa (GT), la cual elimina al radical  $\text{OH}^\bullet$  y el oxígeno singlete. Además, es capaz de regenerar a su forma activa a las vitaminas C y E (Masella *et al.*, 2005). La GT se localiza principalmente en el citosol y la mitocondria de las células. Si bien la enzima GPx se encuentra distribuida en todos los tejidos del cuerpo humano, una gran actividad se ha encontrado en células de hígado y riñón (Young y Woodside, 2001).

Por otra parte, la enzima CAT cataliza la conversión de  $H_2O_2$  a agua y oxígeno, evitando de esta manera que el  $H_2O_2$  pueda generar ROS (Valko *et al.*, 2007). Dicha enzima se localiza principalmente en los peroxisomas, y en menor proporción en el citoplasma de las células. Una gran actividad de la enzima CAT se ha encontrado en células de hígado y eritrocitos, aunque se encuentra distribuida en todos los tejidos del cuerpo humano (Fox y Kelly, 2006a).

La enzima SOD es otra enzima antioxidante que cataliza la dismutación del radical  $O_2^\bullet$  a  $H_2O_2$  (Veskoukis *et al.*, 2011). El  $H_2O_2$  producido por SOD es eliminado por la enzima CAT, como se describió anteriormente. La enzima SOD se encuentra principalmente en las células de los tejidos mamarios, principalmente en el citoplasma, y en células endoteliales y fibroblastos (Young y Woodside, 2001; Przybylska *et al.*, 2007).

Además de las enzimas GPx, CAT y SOD el humano sintetiza otros compuestos antioxidantes endógenos como coenzima Q, ferritina, ácido úrico, bilirrubina, albúmina y melatonina (Rizzo *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2007).

En ocasiones, el sistema antioxidante no es totalmente eficaz en la neutralización de una producción excesiva de ERO y ERN, por lo cual un suministro exógeno de antioxidantes es requerido para mantener y reforzar dicho sistema. Estos antioxidantes exógenos son obtenidos a través de los alimentos, por lo que son considerados antioxidantes dietarios. En este sentido, estudios epidemiológicos demuestran que el factor nutricional juega un papel importante en la prevención y control de enfermedades degenerativas que etiológicamente están relacionadas con el estrés oxidativo causado por los ERO y ERN (Prior, 2003; Willcox *et al.* 2008).

### 2.3 Antioxidantes Dietarios

Evidencia epidemiológica ha sugerido que el consumo de ciertos alimentos puede reducir el riesgo a padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares. Se ha hipotetizado que esto es debido en parte a la presencia de compuestos antioxidantes en los alimentos. Como resultado, estos compuestos han sido considerados por muchos como antioxidantes dietarios. Sin embargo, estudios han revelado que los diferentes compuestos, típicamente agrupados bajo dicho término, pueden diferir considerablemente uno de otro en cuestión de su comportamiento químico y sus propiedades biológicas. Por lo anterior, se ha definido a un antioxidante dietario como aquella sustancia, presente en los alimentos, que disminuye significativamente los efectos adversos de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la función fisiológica normal en humanos (FNB-IOM, 1998).

Los antioxidantes dietarios (e.g. polifenoles, flavonoides, carotenoides, vitaminas, proteínas y péptidos bioactivos) provienen de diversas fuentes vegetales y animales (Tabla 1), destacando principalmente las frutas, hortalizas y los productos lácteos (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000; Hernández-Ledesma y Amigo, 2004; Dimitrios, 2006; Noziere *et al.*, 2006; Gülcin, 2012).

Los antioxidantes dietarios de los alimentos de origen vegetal han sido exhaustivamente estudiados (Dimitrios, 2006). Recientemente, el interés de muchas investigaciones se ha centrado en la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales o bien en la exploración del contenido de compuestos antioxidantes de los alimentos *per se*, tal es el caso de los productos lácteos. Estos alimentos además de que presentan una elevada calidad nutrimental, poseen una gran diversidad de compuestos con actividad biológica tales como antitrombótica, antihipertensiva, hipocolesterolémica y antioxidante. El conocimiento de los compuestos constituyentes y de las características que le dan su bioactividad característica, en particular su potencial antioxidante, se ha convertido en objetivo de especial relevancia, tanto para la industria como para los consumidores (Hernández-Ledesma y Amigo, 2004).

Tabla 1. Principales compuestos antioxidantes naturales presentes en diferentes alimentos de origen vegetal y animal

<b>Grupo de alimento</b>	<b>Alimento</b>	<b>Compuestos antioxidantes</b>
<b>Frutas</b>	Bayas	Ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, ácidos benzoicos, flavonoides
	Cerezas	Antocianinas
	Frutos cítricos	Ácidos fenólicos, flavononas, ácido ascórbico
<b>Hortalizas y vegetales</b>	Manzanas y peras	Catequinas, ácidos hidroxicinámicos
	Espinaca	Ácido p-cumárico, flavonoides
	Perejil, Col	Flavonas
	Cebolla	Flavonoides
	Berenjena	Ácidos hidroxicinámicos, antocianinas
<b>Harinas</b>	Avena, trigo y arroz	Ácido cafeico y ferúlico
<b>Tés</b>	Negro y verde	Catequinas, flavonoides
<b>Bebidas alcohólicas</b>	Vinos	Antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, flavonoides
	Sidra	Ácidos hidroxicinámicos
<b>Bebidas no alcohólicas</b>	Café	Ácidos hidroxicinámicos
	Chocolate	Flavonoides
<b>Hierbas y especias</b>	Romero	Ácido carnósico, ácido rosmarínico
	Orégano	Ácidos fenólicos, flavonoides
	Tomillo	Timol, carvacrol, lubeolin
<b>Productos lácteos</b>	Leche	Vitaminas C y E, carotenoides, CAT, SOD, GPx
	Leches fermentadas	Péptidos bioactivos, ácido linoleico conjugado, exopolisacáridos, vitaminas

---

	del grupo B, aminoácidos libres, vitamina C y E, carotenoides, CAT, SOD, GPx
Quesos	Péptidos bioactivos, ácido linoleico conjugado, exopolisacáridos, vitaminas del grupo B, aminoácidos libres, vitamina C y E, carotenoides, CAT, SOD, GPx
Mantequilla	Ácido linoleico conjugado, carotenoides
Bebidas de suero fermentada	Péptidos bioactivos, vitaminas del grupo B, aminoácidos libres

---

(Lindmark-Mansson y Akesson, 2000; Hernández-Ledesma y Amigo, 2004; Dimitrios, 2006; Noziere *et al.*, 2006; Gülcin, 2012).

## 2.4 Capacidad Antioxidante de la Leche y sus Derivados

Diversos métodos *in vitro* han permitido describir la potente capacidad antioxidante de la leche y destacar la influencia del método empleado sobre la capacidad detectada (Cloetens *et al.*, 2013). Otros estudios señalan que dicha capacidad está influenciada por otros factores como la especie, raza y tipo de alimentación del animal de procedencia de la leche (VanderJagt *et al.*, 2001). Tal capacidad antioxidante no solamente beneficia al consumidor al aumentar su estatus antioxidante a nivel de plasma, sino que además, ayuda a mantener una mayor estabilidad oxidativa del alimento, lo que conlleva a una vida útil de la leche más prolongada y al mantenimiento de su calidad sensorial (Chen *et al.* 2002).

### 2.4.1 Componentes con Actividad Antioxidante en Leche y sus Derivados

La leche es una fuente valiosa de nutrientes como lípidos (*e.g.* ácido linoleico conjugado), minerales (*e.g.* calcio y fósforo), vitaminas (*e.g.* A y del grupo B) y proteínas de alta calidad, que aportan para el correcto funcionamiento de órganos y tejidos (Walther *et al.*, 2008; Ash y Wilbey, 2010). Sin embargo, más allá del punto de vista nutricional, la leche contiene ciertos componentes bioactivos como inmunoglobulinas, enzimas hormonas, factores de crecimiento, así como compuestos derivados de las proteínas (péptidos), lípidos (ácido grasos) y carbohidratos (oligosacáridos) generados por la función y metabolismo de ciertas bacterias ácido lácticas, que ejercen un efecto benéfico (Bhat y Bhat, 2011; Walther *et al.*, 2008). Algunos de estos compuesto bioactivos exhiben capacidad antioxidante, y pueden ser clasificados en componentes enzimáticos y no-enzimáticos.

2.4.1.1 Componentes enzimáticos con actividad antioxidante. Estos antioxidantes son formados dentro del organismo y transferidos a la leche. Los componentes enzimáticos con actividad antioxidante más importantes son las enzimas SOD, GPx, CAT y lactoperoxidasa (LPx) (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000).

La enzima SOD, como se mencionó en otro apartado, cataliza la dismutación del radical  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ . Ésta existe en tres metaloformas diferentes de acuerdo al cofactor metálico incorporado en su sitio activo (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, y Fe-SOD); en la leche se encuentra principalmente la forma Cu/Zn (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000). El  $Cu^{2+}$  localizado en el sitio activo es la responsable, en parte, de su actividad antioxidante al actuar como donante de electrones. Por otra parte, el  $Zn^{2+}$  juegan un papel estructural y de estabilidad a la enzima (Przybylska *et al.*, 2007). A pesar de que la leche contiene bajos niveles de SOD, esta enzima es muy termoestable y se mantiene durante la pasteurización de la leche y elaboración de diversos productos lácteos que son sometidos a tratamientos térmicos (Fox y Kelly, 2006b). La actividad media de la SOD en leche de bovino fluctúa en un rango de 0.89 a 1.27 U/mL (Hoolbrook y Hicks, 1978; Kankare y Antila, 1982).

Por otro lado, la enzima GPx juega un papel importante al actuar en concordancia con la actividad de SOD, ya que remueve el  $H_2O_2$  proveniente de la actividad de SOD y otros

peróxidos a H<sub>2</sub>O (Halliwell y Gutteridge, 1995). Al igual que con la enzima SOD, GPx requiere de Selenio para llevar a cabo correctamente su actividad (Ren *et al.*, 1997). Otra enzima antioxidante es la CAT, la cual contiene hierro en el sitio activo de la enzima (Przybylska *et al.*, 2007). La actividad media de la CAT en leche de bovino es de 1.95 U/mL (Hoolbrook y Hicks, 1978; Kankare y Antila, 1982). Esta enzima es termolábil y es usada como indicador de la pasteurización de la leche (Fox y Kelly, 2006a).

La LPx actúa de manera similar a la GPx al descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (Fox y Kelly, 2009a). Adicionalmente a la actividad antioxidante que se atribuye a esta enzima, la LPx es conocida por generar sustancias reactivas con actividad antimicrobiana (Przybylska *et al.*, 2007). La LPx es una de las enzimas cuya concentración en la leche se incrementa cuando disminuye la concentración de otras enzimas protectoras. Sin embargo, el factor limitante en la actividad de la LPx en leche es la concentración de los sustratos de reacción. Es estable a 72 °C por 15 s (Fox y Kelly, 2009a,b).

2.4.1.2 Componentes no-enzimáticos con actividad antioxidante. Estos antioxidantes son formados dentro del cuerpo del animal o son provistos en la alimentación y ambos transferidos a la leche. Entre estos compuestos se incluyen a la lactoferrina, ácido linoleico conjugado (CLA), vitaminas, selenio, polifenoles, coenzima Q10, bacterias ácido lácticas, carotenoides y péptidos bioactivos (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000).

Uno de los componentes no-enzimático con actividad antioxidante en la leche es el CLA, cuyo término se refiere a un conjunto de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (McDonald, 2000). Los principales isómeros son los ácidos cis-9, trans-11-; trans-9, cis-11-; trans-9, trans-11-; trans-10, trans-12 and trans-10, cis-12-octadecadienoico (Lin *et al.*, 1995). Sin embargo, el isómero que ha sido sugerido como el más biológicamente activo es el ácido cis-9, trans-11-octadecadienoico (Ham *et al.*, 2002; Van Nieuwenhove *et al.*, 2007). El CLA se encuentra de forma natural en la leche, es formado como el resultado de la biohidrogenación incompleta de los ácidos grasos dietarios en el rumen. En el rumen, los lípidos provenientes de la dieta son rápidamente hidrolizados y resultan ácidos grasos insaturados libres los cuales son sujetos a la

biohidrogenación por parte de los microorganismos del rumen. Consecuentemente, una parte es absorbida por el rumen y otra parte es absorbida en el tracto gastrointestinal y pasa a las glándulas mamarias en donde es transferida a la leche (Lin *et al.*, 1995; Sieber *et al.*, 2004). En cuanto a su capacidad antioxidante, Ha *et al.* (1990) reportaron que el CLA es un efectivo antioxidante, tan potente como el butil-hidroxitolueno (BHT) y más potente que el  $\alpha$ -tocoferol. El principal mecanismo antioxidante del CLA es como eliminador de radicales libres por donación de átomos de hidrogeno (Yu *et al.*, 2002).

Por otra parte, la lactoferrina es una glicoproteína, presente en el suero de la leche, que está compuesta de una cadena polipeptídica con dos sitios de unión para iones  $\text{Fe}^{2+}$  (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000). Tal propiedad le da la posibilidad de fungir como quelante de iones  $\text{Fe}^{2+}$  y fungir como antioxidantes con un mecanismo indirecto, al disminuir la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a radicales  $\text{OH}^\bullet$  inhibiendo así la reacción de Fenton (Rodrigues *et al.*, 2008).

Las vitaminas son micronutrientes precursores de varias enzimas que son necesarias para llevar a cabo reacciones bioquímicas vitales en las células vivas (LeBlanc *et al.*, 2011). Las vitaminas presentes en la leche y productos lácteos fermentados son las vitaminas del grupo B, vitamina C y E, las cuales exhiben actividad antioxidante (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000; Gliszczynska-Świgło, 2006; 2007). La vitamina C y las del grupo B son vitaminas hidrosolubles cuyo mecanismo antioxidante es mediante la donación de electrones. Una peculiaridad de la vitamina C, es que cada molécula de esta sustancia puede donar un par de electrones (Heitzer *et al.*, 1996). Por su parte, la vitamina E, es liposoluble por lo que puede prevenir la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados protegiendo a las membranas celulares (Seefeldt y Bennet, 2011). La concentración de las vitaminas en la leche y los productos lácteos es variable, la vitamina C es termolábil, mientras que la vitamina E y las del grupo B presentan cierta estabilidad térmica (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000). Por otra parte, las vitaminas del grupo B pueden aumentar durante el proceso de fermentación de la leche, ya que algunas BAL son capaces de sintetizarlas (LeBlanc *et al.*, 2011).

Existe otro grupo de antioxidantes no-enzimáticos poco explorado, pero que también tienen una aportación importante en la capacidad antioxidante total de la leche y de los productos lácteos, los cuales son de origen fitoquímico y comprenden a los polifenoles y carotenoides. Tales compuestos son transferidos de la dieta del animal directamente a la leche, ya que se ha encontrado una relación entre el consumo de forraje del animal y el contenido de compuestos fitoquímicos bioactivos en la leche (Puga *et al.*, 2009; Hilario *et al.*, 2010). Los carotenoides y polifenoles tienen capacidad antioxidante debido a los grupos OH que tienen en sus estructuras (van den Berg *et al.*, 2000). Ambos compuestos son una familia grande de moléculas sintetizadas por las plantas que cumplen funciones de protección y color en las mismas (O'Connell y Fox, 2001). Cuando se encuentran en los productos lácteos pueden impartir diferentes características sensoriales como color (carotenoides) y sabor (polifenoles) (Noziere *et al.*, 2006; O'Connell y Fox, 2001).

Un nuevo enfoque sobre la exploración de componentes antioxidantes de la leche y los alimentos lácteos fermentados, está centrado en la investigación de la actividad antioxidante de las BAL *per se* (Amaretti *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Dicha actividad antioxidante puede ser desarrollada durante el proceso de fermentación de los productos lácteos, atribuible a la liberación de enzimas intracelulares, incluyendo SOD y GPx, o a los componentes de la pared celular al sufrir lisis celular en la matriz del alimento (Kullisar *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009; Amaretti *et al.*, 2013). Sin embargo, aún existe poca información en este respecto, y es necesario desarrollar nuevas investigaciones para esclarecer la existencia de otros compuestos responsables y los mecanismos de acción de los mismos.

Otro de los compuestos antioxidantes presentes en la leche y en los productos lácteos fermentados son los péptidos bioactivos (Choi *et al.*, 2012). Se ha sugerido que dichos péptidos pueden representar una alternativa a los tratamientos convencionales contra diversas enfermedades degenerativas (Hoskin y Ramamoorthy, 2008; Perez Espitia *et al.*, 2012). Las principales ventajas comparadas con otras sustancias, como los fármacos, es que estos péptidos presentan bajo peso molecular, estructura relativamente simple, pocas reacciones adversas y fácil absorción (Mulder *et al.*, 2013; Thundimadathil, 2012). Por

ellos las proteínas de la leche han llamada la atención del interés científico como fuente de compuestos bioactivos en forma de péptidos (Choi *et al.*, 2012).

## 2.5 Proteínas Lácteas como Precursores de Péptidos Bioactivos

Las proteínas, además de ser de alto valor biológico y ser altamente digeribles, pueden funcionar como precursores de péptidos bioactivos que pueden ejercer diversos efectos biológicas en el cuerpo humano, tales como efectos antihipertensivo, antimicrobiano, inmunomodulatorio y antioxidante, entre otros (López-Expósito *et al.*, 2012).

Los péptidos bioactivos son fragmentos específicos de proteínas (secuencias inactivas de aminoácidos) que están encriptados dentro de la proteína precursora, pero que ejercen determinadas funciones fisiológicas en el organismo tras su liberación. Generalmente son péptidos de tamaño pequeño, de 2 a 20 aminoácidos (Meisel *et al.*, 1989) pero en algunos casos pueden ser constituidos por más de 20 aminoácidos (Erdmann *et al.*, 2008). Diversos estudios evidencian que los quesos son fuente de péptidos bioactivos que presentan capacidad antihipertensiva, antimicrobiana, anticarcinogénica, opioide y antioxidante, entre otros (López-Expósito *et al.*, 2012).

### 2.5.1 Péptidos Bioactivos con Actividad Antioxidante Presentes en los Quesos

Durante la elaboración, almacenamiento y/o maduración de los quesos existe una gran liberación de péptidos derivados de las caseínas, ya que tienen una estructura abierta y flexible lo cual las hace muy susceptibles a la hidrólisis. Estas proteínas se componen de alrededor de 200 aminoácidos en sus secuencias y tienen la capacidad de liberar unos 20,000 tipos de péptidos a partir de sus moléculas, muchos de los cuales podrían presentar alguna actividad biológica que podrían contribuir a las propiedades benéficas atribuidas a los quesos (Yamamoto y Takano, 1999; Silva *et al.*, 2006).

La formación de los péptidos en el queso se debe a que existen diferentes sistemas proteolíticos en la matriz alimenticia, los cuales incluyen (1) enzimas proteolíticas propias de la leche (como la plasmina, catepsina D), (2) la actividad proteolítica del agente coagulante residual y (3) las proteasas y peptidasas provenientes de las BAL. Esta última es la más importante, debido a la fermentación que llevan a cabo las BAL, principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* durante el almacenamiento y/o maduración de los quesos (Choi *et al.*, 2012).

Las BAL no solo son responsables de la formación de compuestos que imparten características organolépticas deseables por los consumidores, sino que producen péptidos bioactivos a través su complejo sistema proteolítico. Las BAL empleadas en cultivos iniciadores o la flora nativas de la leche, son incapaces de sintetizar aminoácidos, por lo que requieren tomarlas del medio en el cual se desarrollen para poder llevar a cabo su crecimiento (Savijoki *et al.*, 2006).

Por otra parte, el sistema proteolítico de las BAL está constituido por proteinasas unidas a la pared celular y peptidasas intracelulares, capaces de hidrolizar a las caseínas, y en menor medida a las proteínas séricas presentes en los quesos, en forma de péptidos y aminoácidos libres (Law y Haandrikman, 1997; Kunji *et al.*, 1996). Las proteinasas están involucradas en la ruptura inicial de las caseínas; las peptidasas son las responsables de hidrolizar péptidos de cadena larga. Además, las BAL cuentan con su propio sistema de transporte de tri- y dipéptidos, tales oligopéptidos que fueron transportados al interior de la célula bacteriana, pueden ser degradados por peptidasas a péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Por otra parte, péptidos de cadena larga que no pueden ser transportados al interior de la célula, también pueden ser fuente de péptidos bioactivos tras su degradación por las peptidasas intracelulares liberadas durante la lisis celular (Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

Los péptidos antioxidantes derivados de las proteínas lácteas están compuestos de 2 a 20 aminoácidos y son generalmente de tamaño pequeño (Kamau *et al.*, 2010; Pihlanto, 2006). Las propiedades antioxidantes de los péptidos se deben a que en su composición se encuentran aminoácidos antioxidantes y su efectividad se debe a el posicionamiento de

éstos dentro de su estructura, y en menor magnitud, a su carácter hidrofóbico (Arcan y Yemenicioğlu, 2007; Sarmadi y Ismail, 2010). A pesar del hecho de que los 20 aminoácidos procedentes de fuentes biológicas son potencialmente oxidables, existen aminoácidos más reactivos y susceptibles de ser oxidados, y por lo tanto, de tener mayor potencial antioxidante; esto depende de la cadena lateral de la cual este compuesto el aminoácido (Elias *et al.*, 2008).

Los aminoácidos con mayor potencial antioxidante son aquellos de cadenas laterales que contienen azufre (cisteína y metionina), cadenas laterales aromáticas (triptófano, tirosina y fenilalanina), cadena lateral pirrolidina (prolina) y con cadena lateral imidazol (histidina). La actividad antioxidante de tales péptidos se deben a su habilidad para donar hidrógenos o electrones de las cadenas laterales que tienen en su estructura (Pihlanto, 2006; Elias *et al.*, 2008; Erdmann *et al.*, 2008).

Estudios recientes (Tabla 2) han reportado la capacidad antioxidante *in vitro* por péptidos bioactivos en queso Cheddar (Gupta *et al.*, 2009; Pritchard *et al.*, 2010), queso tipo Feta, tipo Roquefort, tipo Pecorino, tipo Pecorino Sardo, Cerrillano (Meira *et al.*, 2012), queso Fresco (Paul *et al.*, 2012) y queso Coalho (Silva *et al.*, 2012); dichos estudios sugieren, que los quesos podrían ser una fuente de antioxidantes dietarios e influir significativamente en la prevención y control de diversas enfermedades en donde la fuente etiológica es el estrés oxidativo. Es importante destacar que, hasta donde es de nuestro conocimiento, solo existen un estudio realizado con quesos artesanales, específicamente con uno de origen brasileño (Silva *et al.*, 2012); por lo que existe un nicho de estudio con gran potencial en el caso de los quesos artesanales Mexicanos.

Tabla 2. Principales quesos estudiados en relación a su actividad antioxidante por péptidos bioactivos.

Bioactividad	Queso	Referencia
Antioxidante	Cheddar	Gupta <i>et al.</i> 2009

---

Cerrillano, Pecorino, Feta,	
Roquefort	Meira <i>et al.</i> 2012
Coalho	Silva <i>et al.</i> 2012
Fresco	Paul <i>et al.</i> 2012
Cottage	Abadía-García <i>et al.</i> 2013
Parmigiano	Bottesini <i>et al.</i> 2013

---

Debido al importante papel que juegan los alimentos como fuente de antioxidantes dietarios en el control y prevención de diversas enfermedades y a que estudios recientes han demostrado la capacidad antioxidante que presentan diversos péptidos derivados de quesos, y al ser México un país con una diversidad y consumo considerable de quesos, particularmente los artesanales, permanece manifiesto el posible papel protector que ha desempeñado su consumo. Dado que en México no existe ningún estudio sobre la capacidad antioxidante de los quesos artesanales, se hace evidente la necesidad de explorar tal nicho de estudio así como otras bioactividades relacionados con la prevención y control de enfermedades degenerativas. En virtud de lo anterior, este trabajo tiene como hipótesis y objetivos:

### **III. HIPOTESIS**

El queso Crema de Chiapas es fuente de fracciones peptídicas con capacidad antioxidante, cuya actividad está influenciada por la región de origen y el tiempo de almacenamiento.

## **IV. OBJETIVOS**

### 4.1 Objetivo General

Determinar la capacidad antioxidante asociada a las fracciones peptídicas presentes en extractos acuosos de queso Crema de Chiapas.

### 4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar la capacidad antioxidante de dos fracciones peptídicas obtenidas de queso Crema de Chiapas de diferentes regiones.
- ✓ Evaluar el efecto de la región de origen y el tiempo de almacenamiento sobre la capacidad antioxidante.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos del proveedor Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox); 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH); ácido 2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); O-phthaldialdehído (OPA) y fluoresceína. El kit DC Protein Assay la fue obtenido de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) y la albumina sérica bovina de Research Organics (Cleveland, OH, USA).

### 5.2 Obtención de las Muestras

Se recolectaron 27 muestras de Queso Crema de Chiapas de un mismo lote de tres regiones del estado de Chiapas: Norte, Centro-Frailesca y Costa. Dando un total de 81 unidades experimentales las cuales fueron recolectadas en la época de abril. Las muestras fueron recolectadas inmediatamente después de ser elaborados los quesos, y fueron transportadas en refrigeración (4 °C) al laboratorio de Biotecnología de Productos Lácteos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD A.C.). Las muestras se mantuvieron a 4 °C y protegidos de la luz hasta el análisis de cada unidad experimental. El análisis de las muestras se llevó a cabo cada 5 días, a partir de la recolección, durante un periodo total de 135 días.

### 5.3 Preparación de las Fracciones Peptídicas a partir de Extractos Acuosa

Los extractos acuosa se obtuvieron siguiendo la metodología establecida por Torres-Llanez *et al.* (2011) con modificaciones menorea. Mueatraa de queso de 40 g se homogenizaron con 80 mL de agua destilada con agitación mecánica utilizando un agitador magnético en una placa de calentamiento PC-420D (Corning Inc., NY, USA) a 300 rpm durante 15 min a una temperatura de 6 °C. El homogenizado resultante se conservó a 4 °C durante 1 h. El material insoluble fue separado por centrifugación a 4,700 g durante 30 min en una centrifuga Sorvall ST 16R (Thermo Scientific, MA, USA) a 4 °C, y el sobrenadante se filtró a través de fibra de vidrio, para eliminar la grasa residual, y en papel filtro Whatman No. 42, para quitar impurezaa insolublea.

El extracto acuoso total obtenido fue fraccionado por ultrafiltración para lo cual se utilizaron membranaa de 3 kDa y 10 kDa. Primero, el extracto acuoso fue ultrafiltrado utilizando la membrana de 10 kDa. La fracción obtenida fue nuevamente ultrafiltrado utilizando una membrana de 3 kDa, obtenido así la < 3kDa. El residuo que no pasó por la membrana de 3 kDa fue resuspendido en el mismo volumen de agua destilada, para obtener así la fracción de 3-10 kDa. La fraccióna obtenidaa fueron almacenadaa a -80 °C para su posterior análisis.

### 5.4 Contenido Peptídico de laa Fraccióna Peptídicaa y Actividad Proteolítica en Queso

El contenido de nitrógeno peptídico de laa fraccióna <3 kDa y 3-10 kDa se determinó por el método de Lowry mediante el kit DC Protein Assay cuantificando la concentración peptídica a partir de una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina como patrón siguiendo laa indicacionea del proveedor.

La proteólisis desarrollada durante el almacenamiento del queso se cuantificó por medio de la determinación espectrofotométrica de grupoa aminoa librea utilizando el método del OPA (Church *et al.*, 1983). Brevemente, 0.5 mL de agua destilada y 5 mL de ácido tricloroacético al 12 % se mezclaron con 2.5 mL del extracto acuoso, se agitó con un

vortex durante 1 min. La mezcla fue filtrada después de 10 min de reposo, utilizando papel Whatman No. 2. Los filtrados conteniendo la fracción peptídica soluble se almacenaron a -80 °C hasta su análisis posterior.

El reactivo OPA se preparó cada vez que se realizaron las mediciones espectrofotométricas, mezclando tetraborato de sodio, docecil sulfato de sodio, y o-phthaldialdehído en metanol y 2-mercaptoetanol. Para determinar la proteólisis, se tomó una alícuota (150 µL) de las fracciones peptídicas solubles y se les añadió 3 mL del reactivo OPA. Después de 2 min de reposo se leyó la absorbancia de la disolución a 340 nm utilizando un espectrofotómetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (Donkor *et al.*, 2007).

## 5.5 Capacidad Antioxidante de las Fracciones Peptídicas

### 5.4.1 Capacidad Secuestrante sobre el Radical ABTS

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos acuosos mediante este ensayo se siguió la metodología descrita por Re *et al.* (1999), la cual consistió en producir en oscuridad el radical ABTS mediante la solución de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM (1:0.5, v/v). Se mezcló y se incubó en oscuridad durante 16 h a una temperatura de 30 °C. Una vez formado el radical, este fue diluido con PBS (0.05 mM, pH 7.2) hasta obtener una  $DO_{734nm}$  de  $0.7 \pm 0.02$  en un espectrofotómetro SpectraMax M3. Posteriormente, se tomó una alícuota (5 µL) de la fracción peptídica y se mezcló con 200 µL de la solución diluida del ABTS. La mezcla formada fue leída a los 7 min a 734 nm.

Los resultados fueron expresados como µM Trolox equivalentes, para lo cual se construyó una curva estándar de cinco puntos con Trolox como patrón (0-100 µM).

### 5.4.2 Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ORAC

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos acuosos mediante este ensayo se siguió la metodología de Paul *et al.* (2012). El ensayo consistió en mezclar 80  $\mu\text{L}$  de la fracción peptídica con 60  $\mu\text{L}$  de una solución de fluoresceína 70 nM en un pozo de una microplaca (96 pocillos). La mezcla anterior se incubó a 37 °C por 15 min. Rápidamente se le agregaron 60  $\mu\text{L}$  de una solución de AAPH 12 mM usando una micropipeta multicanal. Inmediatamente después se leyó la fluorescencia de la placa cada minuto durante 80 min a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 527 nm. La placa fue automáticamente agitada (10 s) previo a cada lectura y se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C. Los datos de fluorescencia obtenidos fueron normalizados con respecto a la curva del blanco, multiplicando los datos originales por el factor  $\text{fluorescencia}_{\text{blanco}, t=0} / \text{fluorescencia}_{\text{muestra}=0}$  (Dávalos *et al.*, 2004). Posteriormente, los datos normalizados de fluorescencia fueron graficados con respecto al tiempo a fin de obtener las áreas bajo la curva de decaimiento de fluorescencia. El área bajo la curva (S) se calculó de la siguiente manera:

$$S = (0.5 + f_4/f_0 + f_8/f_0 + f_{12}/f_0 + f_{16}/f_0 + f_{20}/f_0 + \dots + f_{72}/f_0 + f_{76}/f_0 + f_{80}/f_0 +)$$

En donde  $f_0$  es la fluorescencia inicial a tiempo cero y  $f_i$  medidas de fluorescencia al tiempo  $i$ .

Los valores de ORAC se refieren al área de protección neta de la fluoresceína bajo la curva debido a la presencia los péptidos antioxidantes en los extractos acuosos. Por lo tanto, las áreas netas de protección de la muestra se calcularon restando el S del blanco. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes, para lo cual se construyó una curva estándar de cinco puntos con Trolox como patrón (0-100  $\mu\text{M}$ ).

## 5.6 Análisis estadístico

El diseño estadístico que se utilizó fue un diseño completamente al azar, mediante un análisis de varianza de una sola vía. La comparación de medias se realizó por el método Tukey-Kramer a un 95% de confianza. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico NCSS, 2007 (Kaysville, UT, USA).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Contenido Peptídico de las Fracciones Peptídicas y Actividad Proteolítica en Queso

En las Figuras 1 y 2, se presenta el comportamiento a través de los días de almacenamiento del contenido peptídico de las fracciones <3 kDa y 3-10 kDa, respectivamente, obtenida de los diferentes extractos acuosos del queso Crema de Chiapas. En general se observó, un aumento del contenido peptídico para los quesos obtenidos de las tres regiones (Norte, Centro-Frailesca y Costa) a través del tiempo en ambas fracciones, siendo mayor para la fracción 3-10 kDa en comparación a la fracción < 3 kDa.

Inicialmente, en las fracciones peptídicas < 3 kDa los quesos del Norte, Centro-Frailesca y Costa mostraron diferencia significativa (<0.05) en el contenido de nitrógeno peptídico ( $0.58 \pm 0.02$ ,  $0.72 \pm 0.05$  y  $1.22 \pm 0.02$  mg péptidos mL<sup>-1</sup> fracción, respectivamente). De manera similar, al final de los días de almacenamiento, el contenido de nitrógeno peptídico fue diferente (<0.05) para los quesos Norte, Centro-Frailesca y Costa con valores de  $2.59 \pm 0.12$ ,  $2.98 \pm 0.02$  y  $3.7 \pm 0.04$  mg péptidos mL<sup>-1</sup> fracción, respectivamente.

Por otra parte, en las fracciones peptídicas de 3-10 kDa de los quesos Norte y Costa mostraron un contenido de nitrógeno peptídico inicial igual (>0.05) de  $0.59 \pm 0.02$ ,  $0.61 \pm 0.03$  mg péptidos mL<sup>-1</sup> fracción, respectivamente; mientras que el queso Centro-Frailesca mostro el mayor contenido de nitrógeno peptídico (<0.05) con una valor de  $0.70 \pm 0.05$  mg péptidos mL<sup>-1</sup> fracción. Al final de los días de almacenamiento los quesos Crema de Chiapas Norte, Centro-Frailesca y Costa mostraron una contenido de nitrógeno peptídico diferente (<0.05) de  $2.76 \pm 0.11$ ,  $3.21 \pm 0.09$  y  $3.48 \pm 0.08$  mg péptidos mL<sup>-1</sup> fracción, respectivamente.

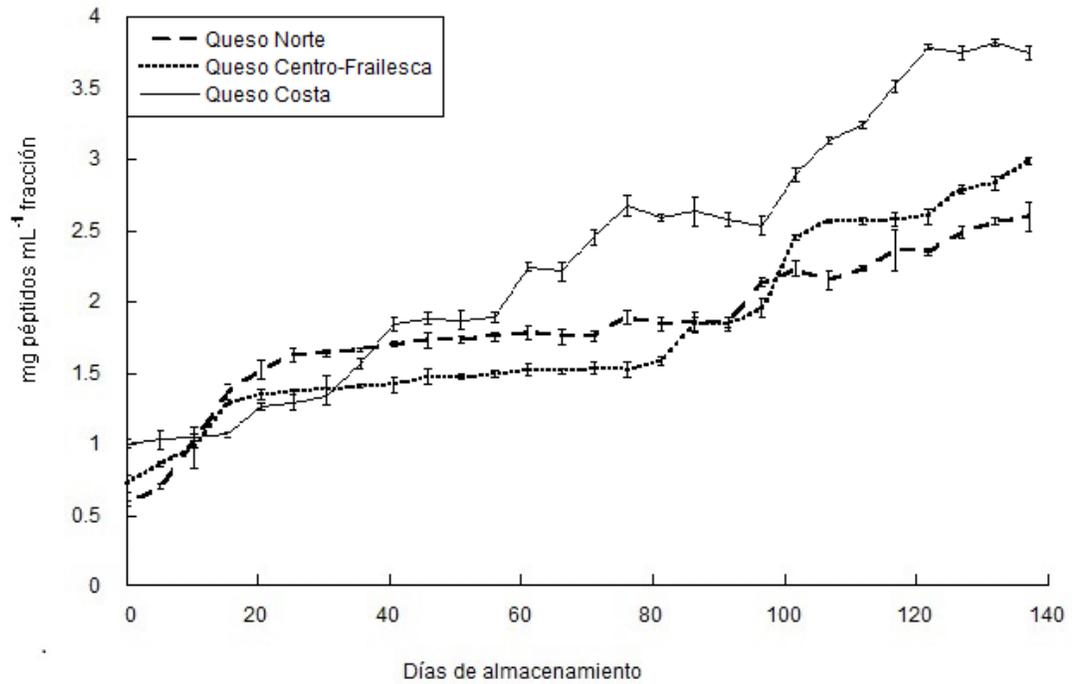


Figura 2. Contenido de nitrógeno peptídico en la fracción  $<3\text{ kDa}$  de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

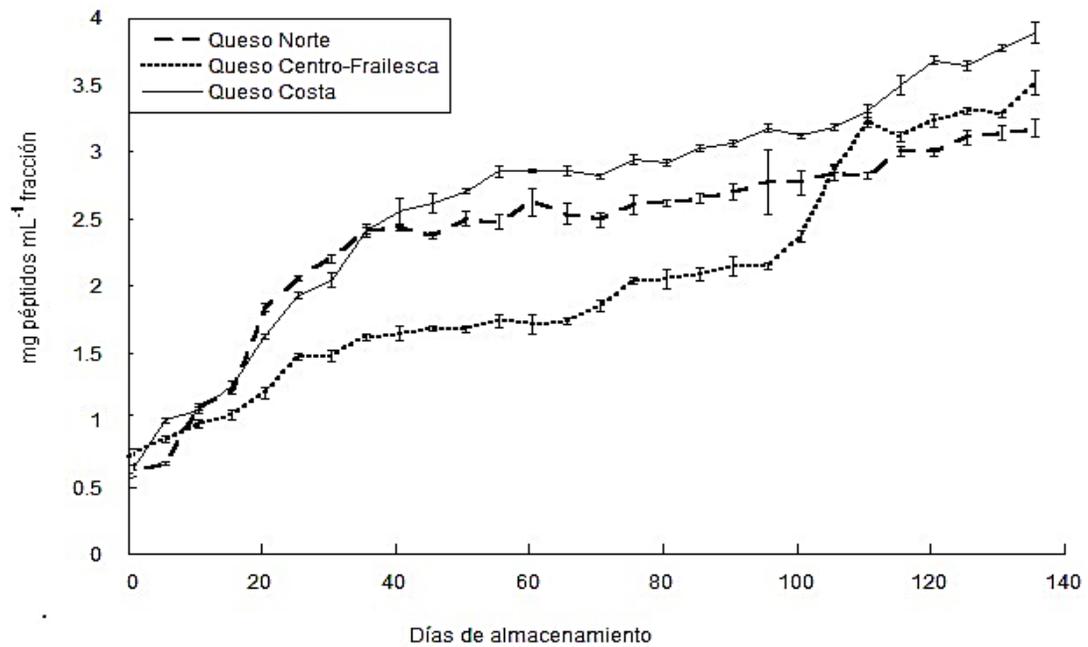


Figura 3. Contenido de nitrógeno peptídico en la fracción  $3\text{-}10\text{ kDa}$  de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

Las diferencias observadas en el comportamiento de contenido peptídico a través del tiempo para ambas fracciones podrían deberse a los distintos sistemas proteolíticos de las diferentes comunidades de BAL que están presentes en los diferentes quesos. Se ha reportado que las BAL poseen un robusto y activo sistema proteolítico que utilizan para degradar a las proteínas de la leche, en especial las caseínas, y obtener los aminoácidos necesarios para su desarrollo y crecimiento (Kunji *et al.*, 1996). El sistema proteolítico de casi todas las BAL (Figura 3), está compuesto de: 1) Peptidasas intracelulares: endopeptidasas (PepO y PepF), aminopeptidasas (PepN, PepC, PepP, PepX y PepL), dipeptidasas (PepV, y PepD), tripeptidasas (PepT) y peptidasas prolina-específicas (PepV, PepI, PepR, PepQ y PepP); 2) Proteinasas extracelulares, que se encuentran asociadas a la membrana celular (CEP) y de un 3) Sistema de transporte de péptidos y aminoácidos (Opp, Dpp y DtpT) (Kunji *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006). Si bien el sistema proteolítico de las BAL es muy similar, las principales diferencias se dan en el contenido de las peptidasas, en cuanto a las variaciones de cantidad y tipo de peptidasas presente (Mierau *et al.*, 1997).

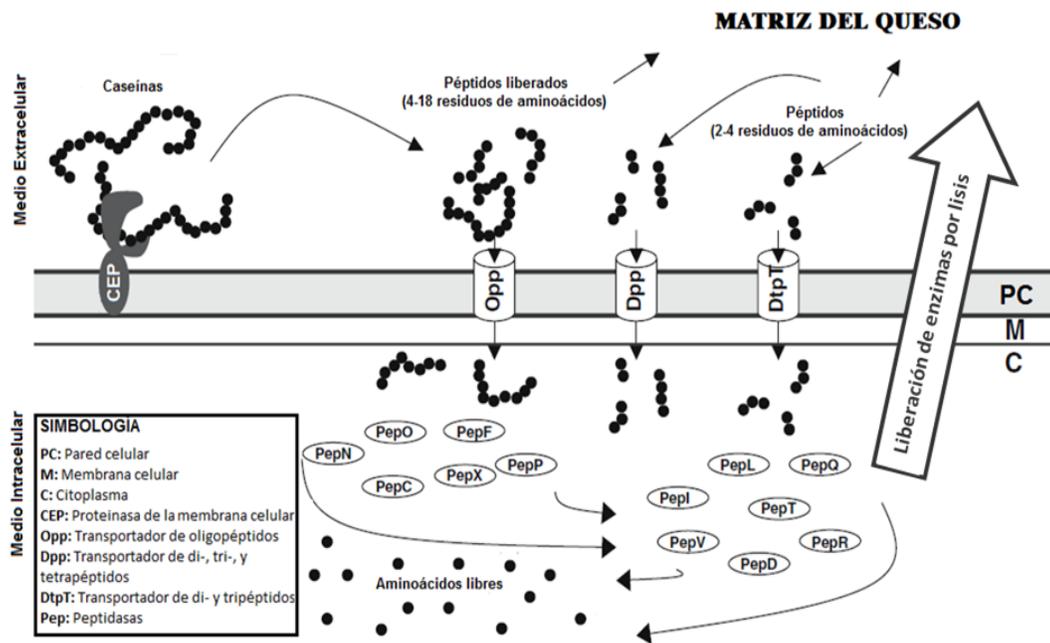


Figura 4. Representación del sistema proteolítico de BAL en la ruptura de caseínas, y la liberación de sus enzimas después de su lisis (Modificado de Kunji *et al.*, 1996; Savijoki *et al.*, 2006).

Lo anterior sugiere que durante el procesado y almacenamiento del queso, las proteinasas de la pared celular de las bacterias son capaces de hidrolizar las proteínas y formar péptidos de diversos tamaños. Los di-, tri- y oligopéptidos de pequeños tamaño pueden ser transportados, mediante el sistema de transporte de la bacteria, hasta el interior de la célula, en donde las peptidasas intracelulares los hidrolizan formándose péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. Además, los péptidos de mayor tamaño que no pueden ser transportados al interior de la célula también pueden ser fuente de péptidos bioactivos tras su degradación por las peptidasas intracelulares liberadas por lisis celular (Kunji *et al.*, 1996; Mierau *et al.*, 1997).

Por otra parte, la actividad proteolítica presente en el queso Crema de Chiapas se muestra en la Figura 4. En general, se observó un aumento a través del tiempo, siendo significativamente mayor para el queso Costa ( $p < 0.05$ ), seguido del queso Centro-Frailesca y Norte. Dicha proteólisis está en concordancia con el contenido de nitrógeno peptídico de cada queso, en especial del queso Costa, en donde se observó un mayor contenido de nitrógeno peptídico, en ambas fracciones, y proteólisis. Esto debido a que durante el proceso de degradación de las proteínas de la leche, al haber una mayor liberación de péptidos, resulta en un aumento en la cantidad de grupos amino libre (Donkor *et al.* 2007).

Adicionalmente, algunos autores (Bonetta *et al.* 2008; Marino *et al.* 2003) han señalado que las etapas del proceso de manufactura influyen en la composición microbológica del queso, y por tanto, en la actividad proteolítica desarrollada por las BAL en la matriz proteica del producto. En este respecto, Villegas de Gante *et al.* (2010) señaló que las principales diferencias en el proceso de manufactura del queso Crema de Chiapas entre las regiones Norte, Centro-Frailesca y Costa, es el tiempo entre la ordeña y la adición del cuajo, el tiempo de manteado o bolseado, y el contenido de sal (Tabla 3). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la región Costa y Centro-Frailesca presentaron un mayor tiempo entre la ordeña y la adición del cuajo (5.4 y 5.1 h respectivamente), comparado con la región Norte (3.9 h). Adicionalmente, la región Costa mostró el mayor tiempo de manteado o bolseado de la cuajada (11 h) y el menor contenido de sal (0.8 %),

siendo estos parámetros cinco veces mayor al tiempo de manteado y bolseado (*ca.* 2 h) y la mitad del contenido de sal (*ca.* 1.6 %) al que presenta las otras dos regiones. Por lo anterior, es razonable suponer que el tiempo entre la ordeña y la adición del cuajo, así como el tiempo de manteado o bolseado de la cuajada influyeron en la composición microbiológica del queso Costa, y por lo tanto, en la actividad proteolítica desarrollada por las BAL.

Tabla 3. Principales variables del proceso de elaboración del queso Crema de Chiapas en las tres regiones productoras del estado.

<b>Variable</b>	<b>Región costa</b>	<b>Región Centro-Frailesca</b>	<b>Región Norte</b>
Tiempo entre ordeño y adición del cuajo ( <b>h</b> )	5.4 ± 0.5	5.1 ± 2.7	3.9 ± 2.1
Tiempo entre adición de cuajo y rallado ( <b>h</b> )	4.9 ± 0.7	5.2 ± 2.3	4.7 ± 3.5
Tamaño de corte de cuajada ( <b>cm</b> )	8.8 ± 3.3	8.5 ± 7.0	5.9 ± 4
Tiempo entre el rallado y el levantado de la cuajada ( <b>h</b> )	10.3 ± 2.5	12 ± 3	11.9 ± 4
Tiempo de manteado o bolseado ( <b>h</b> )	11 ± 5.7	2.2 ± 2.1	1.9 ± 1.2
Sal adicionada en base a la cuajada (%)	0.82 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.45 ± 1.1

(Villegas de Gante *et al.*, 2010)

La inferencia antes mencionada es congruente con lo reportado por Rangel-Ortega (2011), quien caracterizó la microbiota del queso Crema de Chiapas de las tres regiones bajo estudio y reportó diferentes concentraciones de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* para las tres regiones, siendo la región Costa y la Centro-Frailesca las que presentaron los mayores conteos celulares de *Lactobacillus* (Tabla 4). El género *Lactobacillus* ha sido reportado como uno de los géneros que presenta múltiples auxotrofías de aminoácidos (aminoácidos necesarios para su crecimiento que no puede sintetizar), por lo que muchas especies de este género desarrollaron un robusto sistema proteolítico, lo cual representa un alto potencial para producir péptidos y aminoácidos derivados de las proteínas de la leche (Herbert *et al.* 2002; Savijoki *et al.* 2006). Si bien,

esta actividad es cepa-dependiente, de forma general los género *Lactobacillus* y *Lactococcus* son consideradas géneros altamente proteolíticos (Savijoki *et al.* 2006). Adicionalmente, Rangel-Ortega (2011) reportó que el queso de la región Costa presenta un alto contenido de ácido láctico (1.25-2.31 %) en comparación al encontrado en el de la región Norte (0.87-2.11 %) y Centro-Frailesca (1.52-1.75 %), lo cual se considera indicador indirecto de la actividad metabólica de las BAL presentes en el queso de la región Costa. Estos hechos podrían explicar, al menos parcialmente, la mayor actividad proteolítica que se detectó en el queso Crema de Chiapas de la región Costa.

Tabla 4. Cuenta viable ( $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{g}^{-1}$  queso) de los principales géneros de BAL presentes en queso Crema de Chiapas en las tres regiones productoras del estado.

<b>Género</b>	<b>Región Costa</b>	<b>Región Centro-Frailesca</b>	<b>Región Norte</b>
<i>Lactobacillus</i>	7.04	7.86	6.91
<i>Lactococcus</i>	6.78	7.59	7.59
<i>Streptococcus</i>	5.82	6.71	6.50

(Rangel-Ortega, 2011)

El comportamiento del contenido peptídico y actividad proteolítica observados en este trabajo son consistentes a los reportados por Meira *et al.* (2012) quienes observaron un aumento progresivo del contenido peptídico en extractos acuosos para el queso Pecorino evaluado a los 180 días ( $10.8 \pm 0.2$  mg contenido peptídico  $\text{mL}^{-1}$  extracto total) hasta los 270 días ( $12.8 \pm 0.1$  mg contenido peptídico  $\text{mL}^{-1}$  extracto total) y para el queso Cerrillado evaluado a los 90 días ( $12.7 \pm 0.2$  mg contenido peptídico  $\text{mL}^{-1}$  extracto total) hasta los 120 días ( $16.2 \pm 0.1$  mg contenido peptídico  $\text{mL}^{-1}$  extracto total). De igual manera, Gupta *et al.* (2009), reportaron un aumento del contenido peptídico en extractos acuosos de queso Cheddar evaluados a los 0 días ( $157.7 \pm 1$  mg contenido peptídico  $\text{mL}^{-1}$  extracto total) hasta los 270 días ( $241.0 \pm 1$  mg contenido peptídico  $\text{mL}^{-1}$ ). Ambos parámetros están en relación con las comunidades de BAL presentes en cada queso, ya que existe variación de la actividad proteolítica entre las diversas especies de BAL presentes en cada queso (Donkor *et al.* 2007).

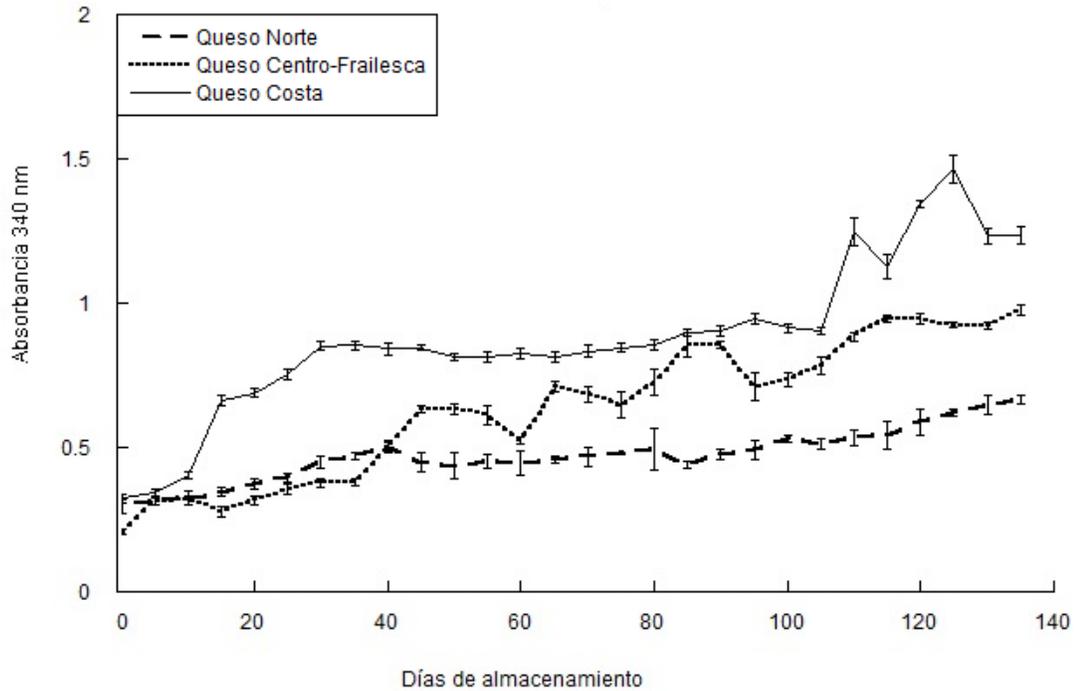


Figura 5. Actividad proteolítica de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

## 6.2 Capacidad Antioxidante de las Fracciones Peptídicas

Existen diversos métodos *in vitro* para evaluar la capacidad antioxidante, los cuales están basados en diferentes principios (transferencia de electrones o hidrógenos, o ambos) (Prior *et al.*, 2005). Por otra parte, en los métodos antioxidantes los compuestos antioxidantes y los radicales pueden responder de diferente manera dependiendo del sistema de reacción del método (Alam *et al.*, 2013). Por lo tanto, el resultado de un solo método antioxidante puede dar información limitada acerca de las propiedades antioxidantes de los extractos. Asumiendo lo anterior, la capacidad antioxidante de las fracciones <3 kDa y 3-10 kDa fue evaluada mediante los métodos ABTS y ORAC.

En las Figura 5 y 6, se presenta el comportamiento a través del tiempo de la capacidad antioxidante de la fracción peptídica <3 kDa y 3-10 kDa, respectivamente, por el método ABTS. Los resultados mostraron que ambas fracciones peptídicas tuvieron capacidad para

neutralizar al radical estable ABTS<sup>-•</sup>, por lo cual se asume que los quesos de las tres regiones contenían péptidos antioxidantes. De forma general se observó un aumento de la capacidad antioxidante para los quesos a través del tiempo en ambas fracciones, siendo mayor para la fracción 3-10 kDa en comparación a la fracción < 3 kDa. La importancia de evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones peptídicas de bajo peso molecular <3 kDa y 3-10 kDa es su relevancia fisiológica, ya que tienen mayor probabilidad de ser absorbidos en el tracto gastrointestinal y de llegar a actuar a nivel sistémico (Cao y Zhang, 2006).

Inicialmente, las fracciones peptídicas < 3 kDa de los quesos Norte y Centro-Frailesca mostraron una capacidad antioxidante estadísticamente igual (>0.05) de  $38.74 \pm 6.38$  y  $48.54 \pm 4.43$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción, respectivamente; mientras que el queso Costa fue *ca.* 2.5 y 2 veces mayor (<0.05) con una capacidad antioxidante de  $95.09 \pm 2.66$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción. Al final de los días de almacenamiento, la capacidad antioxidante fue diferente (<0.05) para los quesos Norte, Centro-Frailesca y Costa con valores de  $453.14 \pm 2.8$ ,  $523.56 \pm 2.11$  y  $549 \pm 0.55$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción, respectivamente. Es importante resaltar, que el queso Crema Costa mostró la mayor capacidad antioxidante tanto inicial como al final del periodo de almacenamiento.

Por otra parte, las fracciones peptídicas de 3-10 kDa de los quesos Crema de Chiapas Norte, Centro-Frailesca y Costa mostraron una capacidad antioxidante inicial significativamente diferente (<0.05) con valores de  $93.05 \pm 1.51$ ,  $68.67 \pm 1.12$ ,  $136.34 \pm 2.03$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción, respectivamente. De manera similar a la fracción < 3 kDa en el queso Costa, la capacidad antioxidante de éste queso fue 1.4 y 1.9 veces mayor a la de los quesos Norte y Centro-Frailesca, respectivamente. Al final del periodo de almacenamiento, los quesos Crema de Chiapas Norte, Centro-Frailesca y Costa mostraron una capacidad antioxidante significativamente diferente (<0.05) entre sí, con valores de  $658.97 \pm 8.65$ ,  $738.83 \pm 7.43$ ,  $918.90 \pm 6.59$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción, respectivamente.

Comparativamente en un estudio realizado por Abadía-García *et al.* (2013) en queso Cottage, los autores reportaron una capacidad antioxidante progresiva a través del tiempo con valores de 250 (7 días) a 380 (28 días)  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  extracto total. Un comportamiento ascendente de la capacidad antioxidante similar a la que se observó en el presente estudio. Además, dichos valores son similares a los obtenidos en el presente estudio para la fracción  $<3$  kDa, pero menores a los mostrados para la fracción 3-10 kDa en días similares analizados en el presente estudio. Esto debido quizás a que en el presente estudio se evaluaron fracciones peptídicas y no extractos acuosos como el estudio de Abadía García *et al.* (2013).

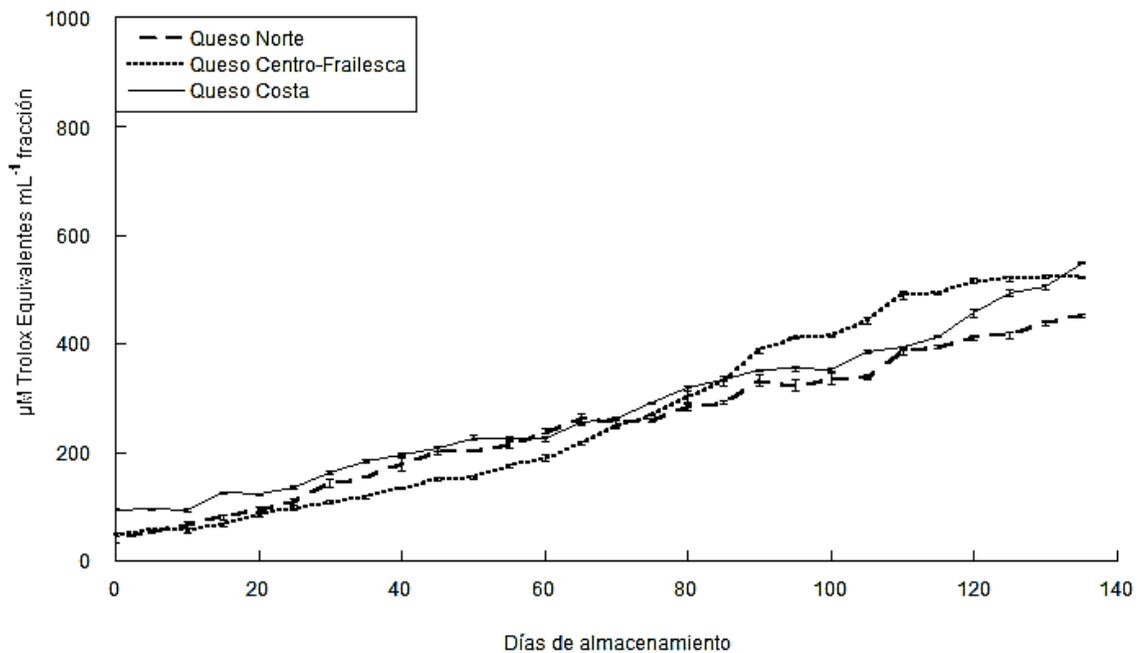


Figura 6. Capacidad antioxidante determinada por el método ABTS en la fracción  $<3$  kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

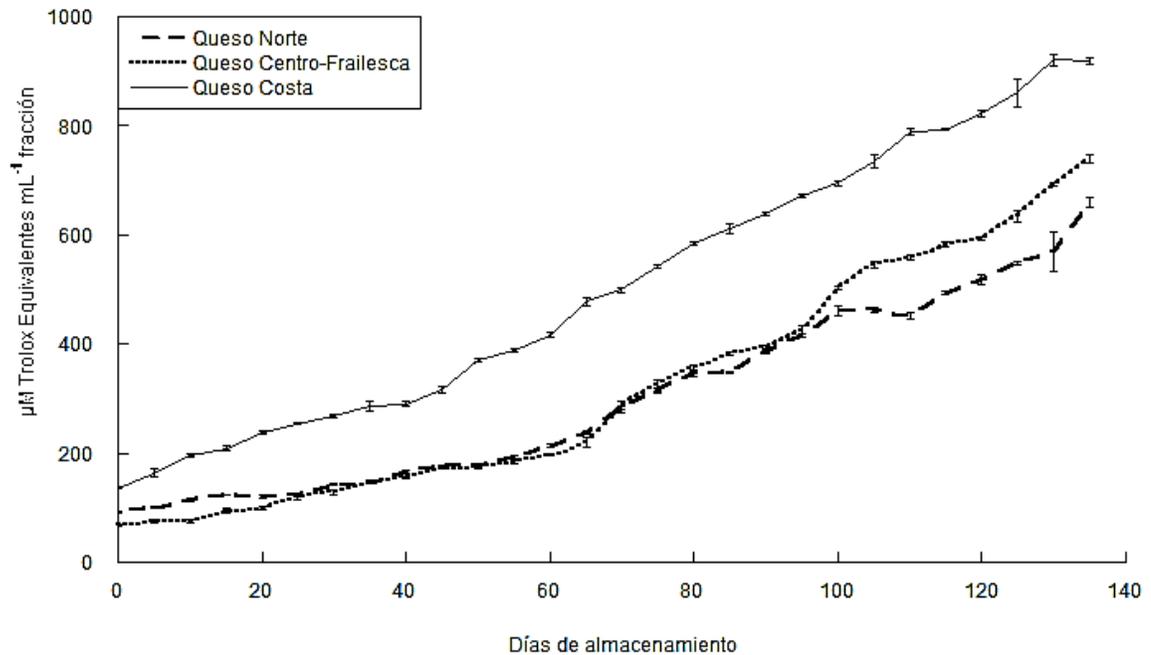


Figura 7. Capacidad antioxidante determinada por el método ABTS en la fracción 3-10 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

Por otra parte, Meira *et al.* (2012) evaluaron la capacidad antioxidante de diversos quesos a diferentes meses de maduración. En dicho estudio se encontró que para el queso Cerrillano se observó un aumento progresivo a través del tiempo con valores de 1,730  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  extracto total (90 d) a 1,890  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  extracto total (120 d), valores que se encuentran por encima de los encontrados en el presente estudio para ambas fracciones peptídicas. Por lo cual se asume que los quesos tienen un gran potencial antioxidante como alimentos funcionales. Adicionalmente, los autores también evaluaron la capacidad antioxidante del queso Pecorino. Los resultados mostraron una disminución de la capacidad a través del tiempo con valores de 1,560  $\mu\text{M}$  (80 y 120 d) a 1,250  $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  extracto total (160 d).

A este último respecto, Gupta *et al.* (2009), evaluaron la actividad antioxidante de quesos Cheddar. Los resultados obtenidos indicaron que la capacidad antioxidante de los extractos acuosos del queso fue dependiente del periodo de maduración. Para el mes del almacenamiento inicial (0), se obtuvieron valores de 0-2  $\mu\text{M}$  de Trolox  $\text{mg}^{-1}$  de proteína,

los cuales aumentaron progresivamente hasta registrar los valores más altos a los 4 meses de maduración (9.7-16.6  $\mu\text{M}$  de Trolox  $\text{mg}^{-1}$  de proteína). Sin embargo, se observó una reducción de la capacidad antioxidante, manteniendo valores similares (0-4.5  $\mu\text{M}$  de Trolox  $\text{mg}^{-1}$  de proteína) desde el mes 7 hasta el mes 9 de maduración. Es notable destacar que este comportamiento no se presentó en los quesos analizados en el presente estudio, lo cual sugiere que el almacenamiento de los quesos influye positivamente en la generación de péptidos antioxidantes, por lo cual es recomendable consumir quesos madurados o almacenados por lo menos 135 días, periodo en el cual la capacidad antioxidante aun muestra una tendencia de ascenso.

Por otro lado, en las Figuras 7 y 8, se presenta el comportamiento de la capacidad antioxidante de la fracción peptídica <3 kDa y 3-10 kDa, respectivamente, por el método ORAC. Similar a los resultados obtenidos por el método ABTS, se observó de forma general, un aumento de la capacidad antioxidante para los quesos de las tres regiones a través del tiempo en ambas fracciones, siendo estadísticamente diferentes (<0.05) las capacidades antioxidantes en ambas fracciones. Hasta donde es de nuestro conocimiento, este es el primer reporte que evalúa la capacidad antioxidante de quesos artesanales mexicanos a través del tiempo de almacenamiento mediante el método ORAC, ya que la única evidencia científica con dicho método fue realizada en queso Fresco elaborado a nivel piloto por Paul et al. (2012). Comparativamente con el método ABTS, el método ORAC tiene ventajas y una mayor relevancia biológica, debido a que utiliza un radical de origen fisiológico  $\text{ROO}^\bullet$  (el radical ABTS no se encuentra en sistemas biológicos), y además es considerado un método directo que mide el efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema con un componente biológico como las proteínas (fluoresceína), debido a la importancia de su oxidación en el desarrollo de enfermedades (Dávalos *et al.*, 2004). Por otra parte, debido a que el método ORAC se basa en el concepto de área bajo la curva determinado por fluorescencia, permite integrar el tiempo y nivel de protección de los antioxidantes sobre el sistema biológico de oxidación, mientras que el método ABTS se realiza a un tiempo fijo y se determina la inhibición del radical espectrofotométricamente, dando lugar a posibles interferencias (Huang *et al.*, 2005; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Inicialmente, en las fracciones peptídicas <3 kDa los quesos Norte, Centro-Frailesca y Costa mostraron una capacidad antioxidante estadísticamente igual ( $>0.05$ ) con valores de  $77.82 \pm 42.01$ ,  $95.79 \pm 9.94$ ,  $120.82 \pm 23.12$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción, respectivamente. Por otra parte, las fracciones peptídicas de 3-10 kDa mostraron una capacidad antioxidante diferente entre sí ( $<0.05$ ) con valores de  $151.26 \pm 9.75$ ,  $63.76 \pm 21.13$ ,  $215.32 \pm 37.20$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción respectivamente. La fracción peptídica del queso Costa mostro 1.4 y 3.3 veces mayor capacidad antioxidante que el queso Norte y Centro-Frailesca, respectivamente. Adicionalmente, en concordancia con los resultados obtenidos con el método ABTS, la capacidad antioxidante mostrada por la fracción peptídica 10-3 kDa fue mayor en comparación con la obtenida a la fracción <3 kDa.

Al final del periodo de almacenamiento, la capacidad antioxidante de la fracción <3 kDa fue significativamente diferente ( $<0.05$ ) para los quesos Norte, Centro-Frailesca y Costa con valores de  $562.56 \pm 16.32$ ,  $783.45 \pm 5.64$  y  $1,005.2 \pm 6.3$   $\mu\text{M}$  Trolox equivalentes  $\text{mL}^{-1}$  fracción, respectivamente. De igual manera, las fracciones peptídicas 10-3 kDa de los quesos Crema de Chiapas Norte, Centro-Frailesca y Costa mostraron una capacidad antioxidante significativamente diferente ( $<0.05$ ) con valores de  $2045.4 \pm 14.77$ ,  $1623.6 \pm 13.54$ ,  $2345.4 \pm 23.4$ , respectivamente; siendo el queso Crema Costa, aquel que mostró la mayor capacidad antioxidante, tanto inicial como final, en ambas fracciones peptídicas. Cabe señalar que la capacidad antioxidantes determinada por ambos métodos estuvo en concordancia con la actividad proteolítica, es decir, a mayor actividad proteolítica, mayor capacidad antioxidante.

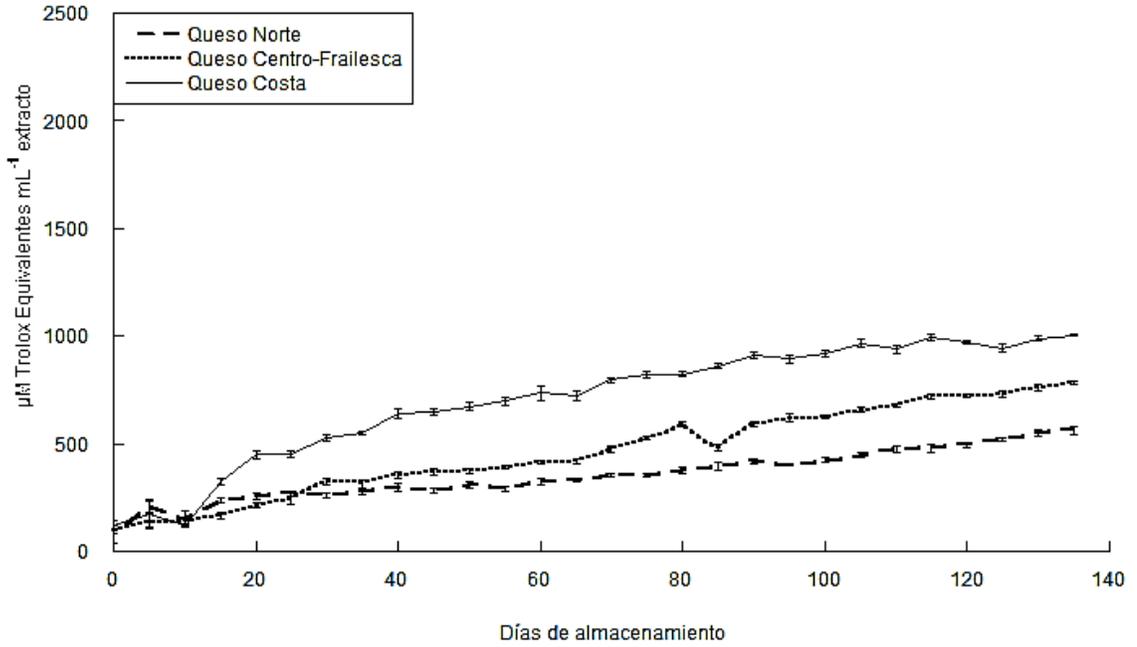


Figura 8. Capacidad antioxidante determinada por el método ORAC en la fracción <3 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

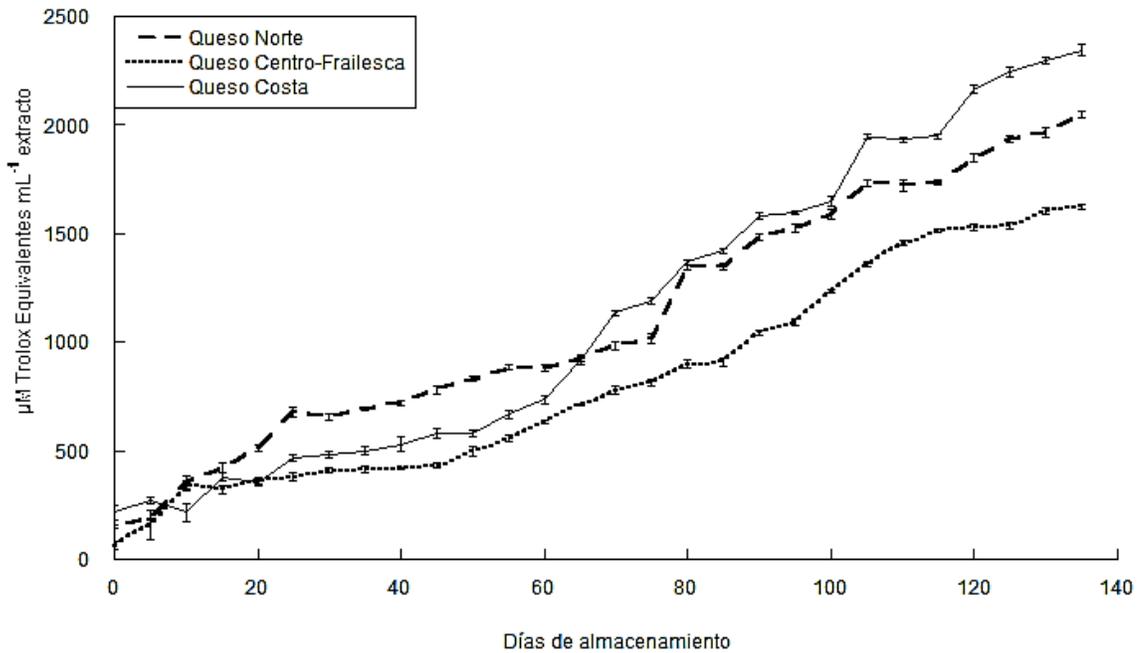


Figura 9. Capacidad antioxidante determinada por el método ORAC en la fracción 3-10 kDa de extractos acuosos de diferentes quesos Crema de Chiapas.

Por otra parte, en el presente estudio se observó una capacidad antioxidante mayor para la fracción 3-10 kDa comparada con la de <3 kDa, por lo que se asume que es un factor que influye en la capacidad antioxidante de los péptidos. Estos resultados concuerdan con los observados por Farvin *et al.* (2010) quienes encontraron, al analizar cuatro fracciones peptídicas (>30, 30-10, 10-3 y <3 kDa) obtenidas de extractos acuosos de yogur, una mayor capacidad antioxidante en las fracciones de alto peso molecular (>30 y 30-10 kDa). En contraste, Qian *et al.* (2011) analizaron la capacidad antioxidante de cuatro fracciones peptídicas (10-5, 5-3, 3-1 y 1 kDa) obtenidas de extractos acuosos de leches fermentadas con *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340, encontrando que las fracciones moleculares de bajo peso molecular (5-3 y 3-1 kDa) poseían mayor capacidad antioxidante.

Las diferencias entre los resultados obtenidos pueden deberse principalmente a dos factores, entre ellos los métodos de evaluación de la capacidad antioxidante y a los microorganismos utilizados en la fermentación, lo que resulta en una composición aminocídica de los péptidos en los extractos específica. Por ello es difícil realizar una comparación precisa entre los estudios, y es aún más difícil realizar una conclusión apropiada acerca de la influencia del tamaño peptídico sobre la capacidad antioxidante debido a la poca evidencia científica que existe al respecto.

De forma general se observó un aumento de la capacidad antioxidante para los quesos a través del tiempo en ambas fracciones, siendo mayor para la fracción 3-10 kDa en comparación a la fracción <3 kDa. La importancia de evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones peptídicas de bajo peso molecular <3 kDa y 3-10 kDa es su relevancia fisiológica, ya que tienen mayor probabilidad de ser absorbidos en tracto gastrointestinal y de llegar a actuar a nivel sistémico (Cao y Zhang, 2006).

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos en el presente estudio podrían indicar que existe un mayor potencial de péptidos antioxidantes presentes en las fracciones del queso Crema de Chiapas artesanal, en comparación a los industrializados como el queso Cottage (Abadía García *et al.* 2013), Cerrillano (Meira *et al.* 2012), Cheddar (Pritchard *et*

*al.* 2010) o Pecorino (Meira *et al.* 2012). No obstante, es difícil comparar la capacidad antioxidante de los quesos con la información encontrada en la literatura debido a la diversidad de metodologías usadas y a la forma de expresar los resultados.

Además, otro estudio (Gupta *et al.*, 2009) sugiere que los péptidos antioxidantes presentes en los quesos se encuentran en un proceso dinámico de formación-degradación a través del tiempo, lo que implica que continuamente se forman péptidos con una posible bioactividad, mientras que se degradan otros formados anteriormente y pierden dicha bioactividad. Sin embargo, otros se acumulan conservado o incrementado la actividad antioxidante. En el presente estudio, se demostró que la capacidad antioxidante de los quesos Crema de Chiapas analizados se incrementa cuando menos hasta los 135 días de almacenamiento y que ésta actividad depende del origen del queso.

## VII. CONCLUSIONES

El incremento significativo, así como la diferencia de la capacidad antioxidante, el contenido peptídico y actividad proteolítica indican que el tiempo de almacenamiento y la región de origen del queso influyen sobre dichos parámetros, lo cual sugiere que es recomendable consumir un queso con mayor tiempo de almacenamiento. Se encontró adicionalmente, que la capacidad antioxidante del queso Crema de Chiapas, fue mayor en la fracción peptídica 3-10 kDa que en la <3 kDa.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que las fracciones peptídicas presentes de forma natural en los quesos artesanales Mexicanos podrían actuar como antioxidantes dietarios.

## IX. LITERATURA CITADA

- Abadía-García L., Cardador A., Martín del Campo S.T., Arvizú S.M., Castaño-Tostado E., Regalado-González C., García-Almedarez B. y Amaya-Llano S. 2013. Influence of probiotic strains added to Cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*. 33: 191-197.
- Alam M.N., Bristi N.J. y Rafiquzzaman M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21(2): 143-152.
- Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M. y Bordoni A. 2013. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 809-817.
- Arcan I. y Yemenicioğlu A. 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*. 103(2): 301-312.
- Ash A. y Wilbey A. 2010. The nutritional significance of cheese in the UK diet. *International Journal of Dairy Technology*. 63(3): 305-319.
- Bhat Z.F. y Bhat H. 2011. Milk and dairy products as functional foods: A review. *International Journal of Dairy Science*. 6: 1-12.
- Bonetta S, Carraro E., Rantsiou K y Cocolin K. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*. 25(6): 786-792.

- Bonomini F., Tengattini S., Fabiano A., Bianchi R. y Rezzani R. 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*. 23: 381-390.
- Bottesini C., Paoletta S., Lambertini F., Galavema G., Tedeschi T., Dossena A., Marchelli R. y Sforza S. 2013. Antioxidant capacity of water soluble extracts from Parmigiano-Reggiano cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 64(8): 953-958.
- Cao W. H. y Zhang C. H. 2006. Absorption mechanism of peptides in the gastrointestinal tract. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 384-388.
- Ceriello A. 2008. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*. 31(2): 181-184.
- Chen J., Gorton L. y Akesson B. 2002. Electrochemical studies on antioxidants in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*. 474: 137-146.
- Choi J., Sabikhi L., Hassan A. y Anand S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 65 (1): 1-12.
- Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J. A. y Steele J. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76: 217-246.
- 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.
- Cloetens L., Panee J. y Akesson B. 2013. The antioxidant capacity of milk- the application of different methods *in vitro* and *in vivo*. *Cellular and Molecular Biology*. 59: 43-57.
- Dávalos A., Gómez-Cordovés C. y Bartolomé B. 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 48-54.

- Devasagayam T.P., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S. y Lele R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 52: 794-804.
- Dimitrios B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*. 17: 505-512.
- Donkor O.N., Henriksson A., Singh T.K., Vasiljevic T. y Shah, N.P. 2007. ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*. 17(11): 1321-1331
- Elias R.J., Kellerby S.S. y Decker E.A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(5): 430-441.
- Erdmann K., Cheung B.W.Y. y Schröder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 19(10): 643-654.
- Farvin S.K.H., Baron C.P., Nielsen N.S., Otte J. y Jacobsen C. 2010. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2 – Characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*. 123(4): 1090-1097.
- FNB-IOM (Food and Nutrition Board - Institute of Medicine). 1998. Dietary Reference Intakes: Proposed Definition and Plan for Review of Dietary Antioxidants and Related Compounds. Washington, DC: The National Academies Press. Disponible en: [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=6252&page=1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=6252&page=1)
- Fox P. F. y Kelly A. L. 2006a. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects- Part 1. *International Dairy Journal*. 16: 500-516.
- Fox P. F. y Kelly A. L. 2006b. Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects- Part 2. *International Dairy Journal*. 16: 517-532.
- Giacco F. y Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*. 107: 1058-1070.

- Gliszczyńska-Świgło A. 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*. 96: 131-136.
- Gliszczyńska-Świgło A. 2007. Folates as antioxidants. *Food Chemistry*. 101: 1480-1483.
- Gobbetti M., Stepaniak L., De Angelis M., Corsetti A. y Di Cagno R. 2002. Latent bioactive peptides in milk proteins: Proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 42(3): 223-239.
- Grossman E. 2008. Does increased oxidative stress cause hypertension?. *Diabetes Care*. 31(2): 185-189.
- Gülcin I. 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 86(3): 345-391.
- Gupta A., Mann B., Kumar R. y Sangwan R.B. 2009. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 62(3): 339-347.
- Ha Y. L., Storkson J. y Pariza M. W. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research*. 50: 1097-1101.
- Halliwel B. y Chirico S. 1993. Lipid Peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*. 57: 715-724.
- Halliwel B. y Gutteridge J.M. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 18:125-126.
- Halliwel B. y Gutteridge J.M. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4ta edición. Clarendon, Oxford. 888 pp.
- Heitzer T., Just H. y Munzel T. 1996. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*. 94:6-9.
- Ham J. S., In Y. M., Jeong S.G., Kim J. G., Lee E. H., Kim H. S., Yoon S. K. y Lee B. H. 2002. Screening of conjugated linoleic acid producing lactic acid bacteria from

- fecal samples of healthy babies. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 15: 1031-1035.
- Hasler C.M. 2000. The changing face of functional foods. *Journal of the American College of Nutrition*. 19(5): 499-506.
- Hebert, E.M, Raya, R.R. y de Giori, G.S. 2002. Modulation of the cell-surface proteinase activity of thermophilic lactobacilli by the peptide supply. *Current Microbiology*. 45(6): 385-389.
- Hernández-Ledesma B. y Amigo L. 2004. La leche como fuente de antioxidantes naturales. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 11(3): 61-65.
- Hilario M. C., Puga C. D., Ocaña A. N. y Romo F. P. 2010. Antioxidant activity, bioactive polyphenols in Mexican goats' milk cheeses on summer grazing. *Journal of Dairy Research*. 77: 20-26.
- Hoolbrook J.J. y Hicks C.L. 1978. Variation of superoxide dismutase in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 61: 1072-1077.
- Hoskin D.W. y Ramamoorthy A. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778: 357-375.
- Huang D., Ou B. y Prior R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Kamau S. M., Cheison S. C., Chen W., Liu X.-M. y Lu R.-R. 2010. Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9(2): 197-212.
- Kankare V. y Antila V. 1982. The effect of xanthine oxidase and superoxide dismutase as well as cell counts on the oxidation of fat in bovine milk. *Finnish Journal of Dairy Science*. 2: 32-40.
- Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griel A. E. y Etherton T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in

- the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*. 113(9): 71-88.
- Kullisar T., Zilmer M., Mikelsaar M., Vihalemm T., Annuk H., Kairane C. y Kilk A. 2002. Two lactobacilli strains as promising probiotic. *International Journal of Food Microbiology*. 72: 215-224.
- Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B. y Konings W. N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70: 187-221.
- Law J. y Haandrikman A. 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 7: 1-11.
- LeBlanc J. G., Laiño J. E., del Valle M. J., Vannini V., van Sinderen D., Taranto M. P., de Valdez G. F., de Giori G. S. and Sesma F. 2011. B-group vitamin production by lactic acid bacteria – current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 1297-1309.
- Lin H., Boylston T. D., Chang M. J., Luedecke L. O. y Shultz T. D. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *Journal of Dairy Science*. 78: 2358-2365.
- Lindmark-Mansson H. y Akesson B. 2000. Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*. 84: 103-110.
- López-Expósito I., Amigo L. y Recio I. 2012. A mini-review on health and nutritional aspects of cheese with a focus on bioactive peptides. *Dairy Science and Technology*. 92: 419-438.
- MacDonald H. B. 2000. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. *Journal of the American College of Nutrition*. 19: 111-118.
- MacDonald-Wicks L. K., Wood L. G. y Garg M. L. 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 2046-2056.

- Marino M., Maifreni M. y Rondinini G. 2003. Microbiological characterisation of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 229: 133-140.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C. y Giovannini C. 2005. Novel mechanism of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 16(10): 577-586.
- Meira S.M.M., Daroit D.J., Helfer V.E., Corrêa A.P.F., Segalin J., Carro S. y Brandelli A. 2012. Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*. 48(1): 322-329.
- Meisel H., Frister H. y Schlimme E. 1989. Biologically active peptides in milk proteins. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 28(4): 267-278.
- Mierau I., Kunji E.R.S., Venema G. y Kok J. 1997. Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 14: 279-301.
- Mulder K.C.L., Lima L.A., Miranda V.J., Dias S.C. y Franco O.L. 2013. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in Microbiology*. 4: 1-23.
- Niedowicz D.M. y Daleke D.L. 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 43: 289-330.
- Noziere P., Graulet B., Lucas A., Martin B., Grolier P. y Doreau M. 2006. Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology*. 131: 418-450.
- O'Connell J.E. y Fox P.F. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*. 11: 103-120.

- Paul M., Brewster J., Hekken D. y Tomasula P. 2012. Measuring the antioxidative activities of Queso Fresco after post-packaging high-pressure processing. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3: 297-303.
- Perez Espitia P.J., Ferreira Soares N.F., Reis Coimbra J.S., de Andrade N.J., Souza Cruz R. y Alves Medeiros E. 2012. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11:187-204.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16(11): 1306-1314.
- Pritchard S. R., Phillips M. y Kailasapathy K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research International*. 43(5): 1545-1548.
- Prior R.L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 78: 570-578.
- Prior R.L. Wu X. y Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4290-4302.
- Przybylska J., Albera E. y Kankofer M. 2009. Antioxidants in bovine colostrum. *Reproduction in Domestic Animals*. 42: 402-409.
- Puga D. C., Galina H. M., Bonilla C. A., Cuchillo H. M., Montaña B. S., Castillo D. R., Villareal E. y Pérez-Gil R. F. 2009. Effect of feeding management on the Nutritional composition of Mexican artisan soft cheese made with raw or pasteurized goats' milk. *Indian Journal of Animal Science*. 79: 321-326.
- Qian B., Xing M, Cui L., Deng Y., Xu Y., Huang M. y Zhang S. 2011. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*. 78: 72-79.

- Rangel-Ortega S. 2011. Identificación y caracterización de los consorcios microbianos del queso crema tropical. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, Sonora, México.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.
- Ren B., Huang W., Akesson B. y Ladensteins R. 1997. The crystal structure of seleno-glutathione peroxidase from human plasma at 2.9 Å resolution. *Journal of Molecular Microbiology*. 268: 869-885.
- Reuter S., Gupta S.C, Chaturvedi M.M. y Aggarwal B.B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine*. 49: 1603-1616.
- Rizzo A.M., Berselli P., Zava S., Montorfano G., Negroni M., Corsetto P. y Berra B. 2010. Endogenous antioxidant and radical scavengers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 698: 52-67.
- Rodrigues L., Teixeira J., Schmitt F., Paulsson M. y Lindmark Mansson H. 2008. Lactoferrin and cancer disease prevention. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49: 203-217.
- Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S. y Donkor O.N. 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*. 156: 264-270.
- Sarmadi B. H. y Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31(10): 1949-1956.
- Savijoki K., Ingmer H. y Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.
- Seefeldt T. M. y Bennet L. L. 2011. The role of antioxidant vitamins in cardiovascular disease. *Journal of Pharmaceutical Technology*. 27: 19-26.

- Sieber R., Collomb M., Aeschlimann A., Jelen P. y Eyer H. 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. *International Dairy Journal*: 14: 1-15.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82: 291-295.
- Silva S.V., Pihlanto A. y Malcata F.X. 2006. Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cyanara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*. 89: 3336-3344.
- Silva R.A., Lima M.S.F., Viana J.B.M., Bezerra V.S., Pimentel M.C.B., Porto A.L.F., Cavalcanti M.T.H. y Lima Philo J.L. 2012. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food?. *Food Chemistry*. 135: 1533-1538.
- Sosa V., Moliné T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H. y Lleonart M.E. 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*. 12: 376-390.
- Stocker B. y Keaney J. F. 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*. 84: 1381-1478.
- Thundimadathil J. 2012. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *Journal of Amino Acids*. 2012: 1-13.
- Torres-Llenez M.J., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A. y García H.S. 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 94: 3794-3800.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. y Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39: 44-84.
- VanderJagt D.J., Okolo S.N., Costanza A., Blackwell W. y Glew R.H. 2001. Antioxidant content of the milk of Nigerian women and the sera of their exclusively breast-fed infants. 21: 121-128.

- Van den Berg G. J., Faulks R., Fernando Granado H., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon G. y Stahl S. The potential for the improvement of carotenoid level in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 880-912.
- Van Nieuwenhove C. P., Oliszewski R., González S. N. y Pérez Chaia A. B. 2007. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *Letters in Applied Microbiology*. 44: 467-474.
- Veskoukis A.S., Tsatsakis A.M. y Kouretas D. 2011. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones*. 17(1): 11-21.
- Villegas de Gante, A.Z., Hernández-Montes, A. y Santos-Moreno, A. 2010. El Queso Crema de Chiapas: un acercamiento a su caracterización. *Claridades Agropecuarias*. 206: 33-38.
- Visconti R. y Grieco D. 2009. New insights on oxidative stress in cancer. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 12:240-245.
- Vogiatzi G., Tousoulis D. y Stefanadis C. 2009. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic Journal of Cardiology*. 50: 402-409.
- Walther B., Schmid A., Sieber R. y Wehrmüller K. 2008. Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*. 88: 389-405.
- Wang A. N., Yi X. W., Yu H. F., Dong B. y Qiao S. Y. 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 1140-1148.
- Ward N.C. y Croft K.D. 2006. Hypertension and oxidative stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 33: 872-876.
- Willcox B.J., Curb J.D. y Rodriguez B.L. 2008. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *The American Journal of Cardiology*. 101(10): 75-86.

- Yamamoto N. y Takano T. 1999. Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung*. 3: 159-164.
- Young I.S. y Woodside J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54: 176-186.
- Yu L. 2001. Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3452-3456.