



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

**“ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA  
CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA Y  
ANTIOXIDANTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS  
SOMETIDOS A DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL  
SIMULADA”**

---

POR:

**IBQ. TRINIDAD LÓPEZ ARMENTA**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DE 2014

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Trinidad López Armenta, 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 mi Director de Tesis, el **Dr. Adrián Hernández Mendoza** por todas las observaciones y atenciones durante el trabajo de tesis. Por su apoyo, compromiso con el trabajo y sobre todo por su disponibilidad.

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 la confianza depositada en mí desde el inicio de este trabajo y por las decisiones tan acertadas para culminar esta tesis.

Al **Dr. Hugo S. García Galindo** y al **Dr. Gustavo A. González Aguilar** por ser parte del comité de tesis, por sus aportaciones al trabajo, por sus consejos y sugerencias.

Un agradecimiento especial al **Dr. Aarón F. Gonzáles Córdova**, **Dr. Adrián Hernández Mendoza** y **Dra. Belinda Vallejo Galland**, por las pláticas que en más de una ocasión tuvimos, por sus consejos tan acertados y por siempre preocuparse por mi bienestar.

Al apoyo técnico brindado por el **M.C. Ricardo Reyes Díaz**, **M.C. Carmen Estrada Montoya** y **Dra. María de Jesús Torres Llanez**. Por asesorarme y ayudarme en diversas fases del trabajo así como por las facilidades otorgadas en los laboratorios.

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

A mis compañeros de laboratorio y generación de maestría; **Alejandro Santos**, **Eleazar Aguilar** y **Fausto Cantú**, muchas gracias por su apoyo tanto académico como personal, por su paciencia y por siempre estar disponibles; de igual forma a **Daniel Wicochea**,

**Christian Gómez e Isidro Méndez.** Al equipo de Lácteos, **Lourdes Santiago, Karmina Álvarez, Olga Lida Ramirez, Sinaí Ojeda, Tania García, Erick Valenzuela, Aline Reyes, Priscilia Heredia, Jesús Sosa, Lilia Beltrán y Gesuri Goc.** Sin duda alguna, hacen que el trabajo sea más ameno.

Un agradecimiento especial a **Wendy Lizarraga,** mi compañera de maestría y gran amiga a lo largo de estos últimos años, gracias por todas las experiencias vividas, por soportarme en mis momentos de estrés, por siempre estar disponible y por esas largas horas de café, infinitas GRACIAS.

De la misma manera un agradecimiento especial a **Alma Jesús García Escalante, Alma Frida Yael García Escalante y Selene Galvez Sandoval,** gracias por escucharme, aconsejarme y ayudarme a lo largo de estos últimos años, por abrirme las puertas de su hogar, por siempre confiar en mí y por todo el apoyo otorgado. Las llevaré en mi corazón por siempre.

A **Mario Alberto Romero Ibarra,** por hacer que mi estancia en Hermosillo haya sido más llevadera, por siempre confiar en mí y en mi trabajo; pero sobre todo por todas las sonrisas causadas a lo largo de éste último año.

A **Marlén Guadalupe López Armenta, Efraín Sepulveda González e Ismael López Armenta,** por visitarme y hacer que pasará días muy agradables a su lado.

Y por último pero no menos importante al grupo de jóvenes profesionistas de San Pio X, **Edgardo Gámez, María Elenisse Mendez, Jesús Anaxis Castro, Mario Carrillo, Magdalena Quintero, Aarón Piry, Aline Soto, Juan Carlos Ferrusquilla, Ricardo Ferrusquilla, Yuridia Gutierrez, Ramón Soberanes, Daniel Armando Facundo, Iván López y Perla,** por ser parte de este hermoso grupo en Cristo, por su amistad y apoyo incondicional, por esas pláticas tan productivas y por esas salidas que hicieron que mi estancia en Hermosillo haya sido más placentera.

Gracias a todos ustedes!!!

Trinidad López Armenta

## DEDICATORIAS

A **Dios**, a quien le debo mi vida, **GRACIAS** por ser tú el sendero que me guía.

A mis padres, **Juanita Armenta Escalante y Rito López Peñuelas**, por todo su amor y apoyo, por esa confianza incondicional que siempre han depositado en mí. Por estar cuando más los necesito, por apoyarme en las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida. Los **AMO** con todo mi corazón, en especial este logro está dedicado por y para ustedes. **DIOS** me los conserve por muchos años más.

A mis hermanos **Marlén Guadalupe López Armenta e Ismael López Armenta**, quienes han sido mis amigos y cómplices a lo largo de toda mi vida, gracias por compartir estos momentos conmigo. Los **AMO** demasiado.

Y de manera especial dedico esta tesis a mi abuelo **Domingo Armenta Perez (q.e.p.d)**, segura estoy que comparte este logro con su palomita desde donde se encuentre.

Familia hermosa, este trabajo representa un logro más que sin ustedes no hubiese sido posible culminar. Y con mucha emoción hoy puedo decir: ¡Hemos culminado con éxito!

## CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1 Hipertensión Arterial .....	2
2.1.1 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) .....	3
2.1.2 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) .....	7
2.2 Control de la Hipertensión Arterial .....	8
2.2.1 Tratamientos Farmacológicos.....	8
2.2.2 Tratamientos no Farmacológicos.....	8
2.3 Alimentos Funcionales .....	9
2.4 Leches Fermentadas Como Alimentos Funcionales.....	11
2.5 Péptidos Bioactivos .....	12
2.5.1 Actividad Biológica de los Péptidos bioactivos .....	12
2.5.1.4 Péptidos antioxidantes.....	13
2.5.1.5 Péptidos antihipertensivos.....	14
2.5.2 Estrategias Para la Producción de Péptidos Bioactivos .....	14
2.5.2.1 Hidrólisis con enzimas. ....	15
2.5.2.2 Fermentación.....	16
2.5.3 Relación Estructura-Actividad de los Péptidos Inhibidores de la ECA.....	17
2.5.4 Relación Estructura-Actividad de los Péptidos Antioxidantes .....	19
2.6 Biodisponibilidad de los Péptidos Antihipertensivos y Antioxidantes .....	20
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 General .....	26
4.2 Específicos.....	26
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>

## CONTENIDO (Continuación)

5.1. Reactivos y Materiales .....	27
5.2 Secuencias de Péptidos.....	27
5.2.1 Determinación de la Pureza de Secuencias Péptidicas por RP-HPLC .....	28
5.3 Microorganismo y Condiciones de Propagación.....	29
5.4 Inóculo y Fermentación de la Leche .....	29
5.5 Obtención de Extractos Acuoso < 3 kDa .....	30
5.6 Ensayo <i>in vitro</i> de la Actividad Inhibidora de la ECA del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales. ....	30
5.7 Cuantificación de Proteína del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales .....	31
5.8 Digestión Gastrointestinal Simulada .....	32
5.9 Determinación del Peso Molecular de las Fracciones Peptídicas .....	32
5.10 Identificación de Secuencia de Péptidos .....	33
5.11 Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ABTS .....	35
5.12 Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ORAC .....	35
5.13 Análisis Estadístico .....	36
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>37</b>
6.1 Ensayo <i>in vitro</i> de la Actividad Inhibidora de la ECA del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales. ....	37
6.2 Actividad Antioxidante del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales. ....	42
6.3 Digestión Gastrointestinal Simulada .....	46
6.3.1 Actividad Inhibidora de la ECA de Péptidos Bioactivos.....	46
6.3.2 Determinación del Perfil de Péptidos por RP-HPLC.....	51
6.3.2 Capacidad Antioxidante de Péptidos Bioactivos .....	65
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>71</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Funcionamiento del SRRA en la regulación de la presión arterial.....	6
2	Reacciones catalizadas por la ECA.....	7
3	Modelo de interacción del centro activo de la ECA con los sustratos o inhibidores competitivos.....	19
4	Valores de IC <sub>50</sub> (rombos) y %IECA (barras) de péptidos específicos.....	41
5	Valores de IC <sub>50</sub> (rombos) y % IECA (barras) de péptidos específicos sometidos a simulación gastrointestinal.....	49
6	Cromatogramas de RP-HPLC del extracto < 3 kDa de la leche fermentada por la cepa <i>Lactococcus lactis</i> NRRL B-50571, antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	53
7	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 4 (HHPHLSFMAIPP) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	54
8	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 6 (YDTQAIVQ) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	55
9	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 9 (HIQKEDVPS) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	56
10	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 10 (TVQVTSTAV) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	57
11	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 11 (NAVPITPTLN) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado	58
12	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 12 (SLPQNIPPL) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	59
13	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.	60

Figura	<b>LISTA DE FIGURAS (Continuación)</b>	Página
14	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 16 (YIPIQYVLS) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	61
15	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 17 (TDDIMCVK) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	62
16	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 19 (GYLAVA) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	63
17	Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 20 (DVENLHLPLLL) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.....	64

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de la presión arterial para adultos mayores de 18 años.....	3
2	Péptidos identificados en Leche Fermentada por cepas específicas de <i>Lactococcus lactis</i> asociados a la inhibición de la ECA.....	24
3	Secuencias Peptídicas.....	28
4	Mezcla de reacciones para la actividad IECA.....	30
5	Constituyentes y concentraciones de los diferentes jugos digestivos utilizados en el modelo de digestión <i>in vitro</i> .....	34
6	Capacidad antioxidante por el método ABTS y ORAC del extracto < 3kDa adicionados con los péptidos individuales.....	45
7	IC <sub>50</sub> de péptidos antes y después de ser sometidos a modelo de digestión gastrointestinal simulada.....	50
8	Capacidad antioxidante por el método ABTS de péptidos adicionados con extracto acuoso <3kDa de Leche fermentada, sometidos a simulación gastrointestinal .....	68
9	Capacidad antioxidante por el método ORAC de péptidos adicionados con extracto acuoso <3kDa de Leche fermentada, sometidos a simulación gastrointestinal.....	69

## RESUMEN

Estudios recientes han demostrado que leche fermentada por *Lactococcus lactis* (NRRL B-50571 o NRRL B-50572), presenta un efecto hipotensor significativo en ratas espontáneamente hipertensas. Este efecto ha sido asociado a la inhibición mediada por péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual desempeña un papel clave en la regulación de la presión arterial. Sin embargo, entre los diferentes péptidos formados durante la fermentación de la leche, se desconoce la secuencia (s) específica de péptido responsable de la inhibición de la ECA. Además, el potencial efecto antihipertensivo depende de su capacidad para llegar a los órganos diana, ya que se ha reportado que el proceso digestivo tiene un papel importante en la activación o inactivación de estos péptidos bioactivos, por lo que es difícil establecer una relación directa entre la actividad inhibidora ECA *in vitro* y la actividad antihipertensiva *in vivo*. Por otro lado, actualmente se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en la aparición de la hipertensión arterial, y que péptidos bioactivos pueden presentar diversas actividades biológicas, principalmente actividad antihipertensiva y antioxidante. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad inhibidora de la ECA expresada en IC<sub>50</sub> (concentración de nitrógeno peptídico que inhibe 50% de la conversión de angiotensina I a angiotensina II), y la actividad antioxidante por medio de los métodos ABTS y ORAC de 12 secuencias de péptidos identificados previamente en leche fermentada con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571. Además, se evaluó el efecto de la digestión gastrointestinal simulada (SGI) en la actividad inhibidora de la ECA y la actividad antioxidante. Por otro lado, aquellos péptidos que no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la actividad inhibidora de la ECA, antes y después de la SGI, fueron analizados por RP-HPLC-MS/MS.

Los resultados mostraron valores de IC<sub>50</sub> entre 0.0289 y 0.1059 mg/mL antes de la SGI, siendo DVENLHLPLPLL el péptido de menor IC<sub>50</sub>. Por otro lado, los valores de IC<sub>50</sub> después de la SGI, se encontraron entre 0.0574 y 0.2809 mg/mL, siendo QEPVLPVVRGPFPIIV, el que presentó menor IC<sub>50</sub>.

Del total de péptidos evaluados, GYLAVA, HPHPHLSFMAIPP, HIQKEDVPS y NAVPITPTLN, no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) después de la SGI, a pesar de haber sido fragmentados a péptidos de menor tamaño como lo evidenciaron los resultados de RP-HPLC-MS/MS.

Por otro lado, la actividad antioxidante por el método ABTS reveló que TDDIMCVK presentó 2547.22 Trolox por mL de solución de péptido, y fueron TDDIMCVK TVQVTSTAV, NAVPITPTLN, QEPVLGPVRGPFPIIV, YIPIQYVLS y DVENLHLPLPLL los péptidos que no presentaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en la actividad antioxidante aún después de haber sido sometidos a SGI. Además, por el método ORAC, la mayor actividad antioxidante correspondió a QEPVLGPVRGPFPIIV con 1353.35 Trolox de solución de péptido; sin embargo fueron HPHPHLSFMAIPP y YPSYGL los péptidos que no mostraron diferencias ( $p>0.05$ ) después de la SGI.

Los resultados sugieren que los péptidos que no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en actividad después de la SGI, podrían ejercer actividad antihipertensiva y antioxidante *in vivo*, sin embargo habría que corroborar dichos efectos por medio de un modelo *in vivo*.

**Palabras clave:** Péptido bioactivos, ECA, Simulación gastrointestinal, IC<sub>50</sub>.

## ABSTRACT

Recent studies have shown that milk fermented by *Lactococcus lactis* (NRRL B-50571 and NRRL B-50572) has a significant hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. This effect was associated with inhibition mediated by peptides that inhibit the angiotensin converting enzyme (ACE), which plays a key role in regulating blood pressure. However, among the various peptides formed during fermentation of the milk, the specific sequence (s) responsible for the inhibition of ACE peptide is unknown. Furthermore, the potential antihypertensive effect depends on its ability to reach the target organ, since it has been reported that the digestive process has an important role in the activation or inactivation of these bioactive peptides, making it difficult to establish a direct relationship between ACE inhibitory activity *in vitro* and *in vivo* antihypertensive activity. Moreover, it is now known that oxidative stress plays an important role in the onset of hypertension, and bioactive peptides may have various biological activities, particularly antihypertensive and antioxidant activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the ACE inhibitory activity expressed as IC<sub>50</sub> (concentration of peptide that inhibits nitrogen 50% conversion of angiotensin I to angiotensin II), and the antioxidant activity by the ABTS method ORAC and 12 peptide sequences previously identified in fermented milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571. Furthermore, the effect of simulated gastrointestinal digestion (SGI) in ACE inhibitory activity and antioxidant activity was evaluated. Furthermore, these peptides showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) in ACE inhibitory activity before and after SGI were analyzed by RP-HPLC-MS/MS.

The results showed IC<sub>50</sub> values between 0.0289 and 0.1059 mg / mL before SGI DVENLHLPLPLL being lower IC<sub>50</sub> peptide. On the other hand, the IC<sub>50</sub> values after SGI were found between 0.0574 and 0.2809 mg/mL, being QEPVLGPVRGPFPIIV, which present lower IC<sub>50</sub>.

Of all peptides tested, GYLAVA, HPHPHLSFMAIPP, HIQKEDVPS and NAVPITPTLN showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) after the SGI, despite being fragmented into smaller peptide fragments as evidenced by the results of RP-HPLC-MS/MS.

Furthermore, the antioxidant activity by the ABTS method revealed that Trolox TDDIMCVK introduced 2547.22 per mL of peptide solution and were TDDIMCVK TVQVTSTAV, NAVPITPTLN, QEPVLGPVRGPFPIIV, YIPIQYVLS and DVENLHLPLPLL peptides showed no significant differences ( $p>0.05$ ) antioxidant activity even after being subjected to SGI. Furthermore, the ORAC method, the highest antioxidant activity corresponded to 1353.35 Trolox QEPVLGPVRGPFPIIV with peptide solution; however were HPHPHLSFMAIPP and YPSYGL peptides showed no differences ( $p>0.05$ ) after the SGI.

The results suggest that peptides showed no significant differences ( $p>0.05$ ) in activity after SGI could exert antihypertensive and antioxidant activity *in vivo*, however, these effects should be corroborated by an *in vivo* model.

**Keywords:** bioactive peptide, ACE , gastrointestinal Simulation, IC<sub>50</sub>.

## I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es un trastorno cardiovascular frecuente en diferentes poblaciones del mundo con consecuencias epidemiológicas reconocidas. Además es considerada una de las principales causas de mortalidad en los países de desarrollo (Sanchez *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la HTA es un trastorno en que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta. La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos (arterias) al ser bombeada por el corazón. Cuando la tensión sistólica es igual o superior a 140 mm Hg y/o la tensión diastólica es igual o superior a 90 mm Hg, la tensión arterial se considera alta o elevada (WHO, 2013).

Actualmente, se sabe que si no se lleva a cabo el tratamiento correcto de la HTA, ésta puede contribuir a la aparición de otras enfermedades, como cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, enfermedades arteriales periféricas, insuficiencia cardíaca y enfermedades del riñón y de la retina, entre otras (Orduñez *et al.*, 2010).

Existen diferentes fármacos utilizados para el control de la hipertensión; entre los medicamentos más comunes se encuentran los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), los  $\beta$ -bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II. Sin embargo, este tipo de medicamentos sintéticos, además de ser caros, han sido asociados a diversos efectos secundarios a corto y largo plazo, tales como tos, perturbación en el sabor y salpullido en la piel, entre otros (Matsui *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2006). Debido a esto, diversos trabajos de investigación se han enfocado en estudiar componentes bioactivos, aislados de diversas fuentes naturales, que tengan un efecto antihipertensivo sin presentar efectos adversos para la salud.



Recientemente en un estudio realizado por Rodríguez *et al.*, (2012) se demostró que leches fermentadas con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 o *L. lactis* NRRL B-50572 presentaron un efecto reductor de la presión arterial sistólica ( $23.9 \pm 9.4$  mm Hg) y diastólica ( $17.7 \pm 4$  mm Hg) en un modelo murino; lo que sugirió que estas leches podrían ser consideradas como coadyuvantes para la mejora de la salud cardiovascular.

Por otro lado, actualmente se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en la aparición de la hipertensión arterial, y que péptidos bioactivos pueden presentar diversas actividades biológicas, principalmente actividad antihipertensiva y antioxidante (Cruz *et al.*, 2004; Torruco *et al.*, 2008)

Sin embargo, hacen falta estudios que validen el potencial antihipertensivo y antioxidante de secuencias peptídicas específicas, ya que el efecto biológico de dichos péptidos depende, entre otras cosas, de su capacidad para llegar a órganos diana intactos después de la administración oral.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar *in vitro* la actividad inhibidora de la ECA, así como la actividad antioxidante, de péptidos bioactivos identificados previamente en leche fermentada, y determinar la estabilidad de sus propiedades bioactivas después de su exposición a condiciones gastrointestinales en un modelo *in vitro*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA) es un trastorno cardiovascular altamente frecuente en la población y con consecuencias epidemiológicas reconocidas (Sanchez *et al.*, 2010). Según la OMS, la HTA es un trastorno en que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta. La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos (arterias) al ser bombeada por el corazón (WHO, 2013). Se considera HTA con base en cifras de presión arterial sistólica  $\geq 140$  mm Hg o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mm Hg. En el Tabla 1 se presentan los valores de presión arterial tanto normales como elevados de acuerdo al Séptimo Informe del Comité Nacional para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Presión Arterial Alta (Loscalzo *et al.*, 1996; Chobanian *et al.*, 2003).

La HTA es una condición cardiovascular que aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad de la población humana (FitzGerald *et al.*, 2004; Ricci *et al.*, 2010), provocando que sea responsable de aproximadamente 17 millones de muertes por año (WHO, 2013). Es por ello que representa un problema de salud pública, ya que si no es tratada a tiempo aumenta el riesgo de complicaciones cardio y cerebrovasculares (Kannel, 1996; Orduñez *et al.*, 2010).

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos mayores de 18 años de acuerdo al Séptimo Informe del Comité Nacional para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Presión Arterial Alta.

Categoría	Presión arterial sistólica (mm Hg)	Presión arterial diastólica (mm Hg)
Normal	< 120	< 80
Pre-Hipertensión	120-139	80-89
Hipertensión (Estado 1)	140-159	90-99
Hipertensión (Estado 2)	≥ 160	≥ 100

Fuente: (Chobanian *et al.*, 2003)

Por otro lado, la OMS ha estimado que la HTA es la causa de muerte de 7.5 millones de personas, lo cual representa el 12.8% del total de las defunciones a nivel mundial (WHO, 2011). En este sentido, las estadísticas indican que alrededor de 600 millones de personas padecen hipertensión arterial sistémica (HTAS); de las cuales, 420 millones (70%) corresponden a países en vías de desarrollo, incluyendo a México. Datos proporcionados por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 evidenciaron del 2006 a 2011, que se incrementó la tasa de mortalidad por enfermedades hipertensivas en la población de 15 años y más, la cual pasó de 17.67 por cada 100 mil personas a 23.06 (Gutiérrez *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha informado que más del 25 % de la población en todo el mundo es afectada por la hipertensión, y de acuerdo a las conclusiones de un estudio realizado por Kearney *et al.*, 2005, se estima que esta cifra aumente a 1,56 millones en el año 2025.

### 2.1.1 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

Existen diversos mecanismos para el control de la presión arterial; por ejemplo el control a corto plazo, llevado a cabo por el sistema nervioso, el cual consiste en el control del gasto cardiaco y la resistencia periférica, y por otro lado para la regulación prolongada

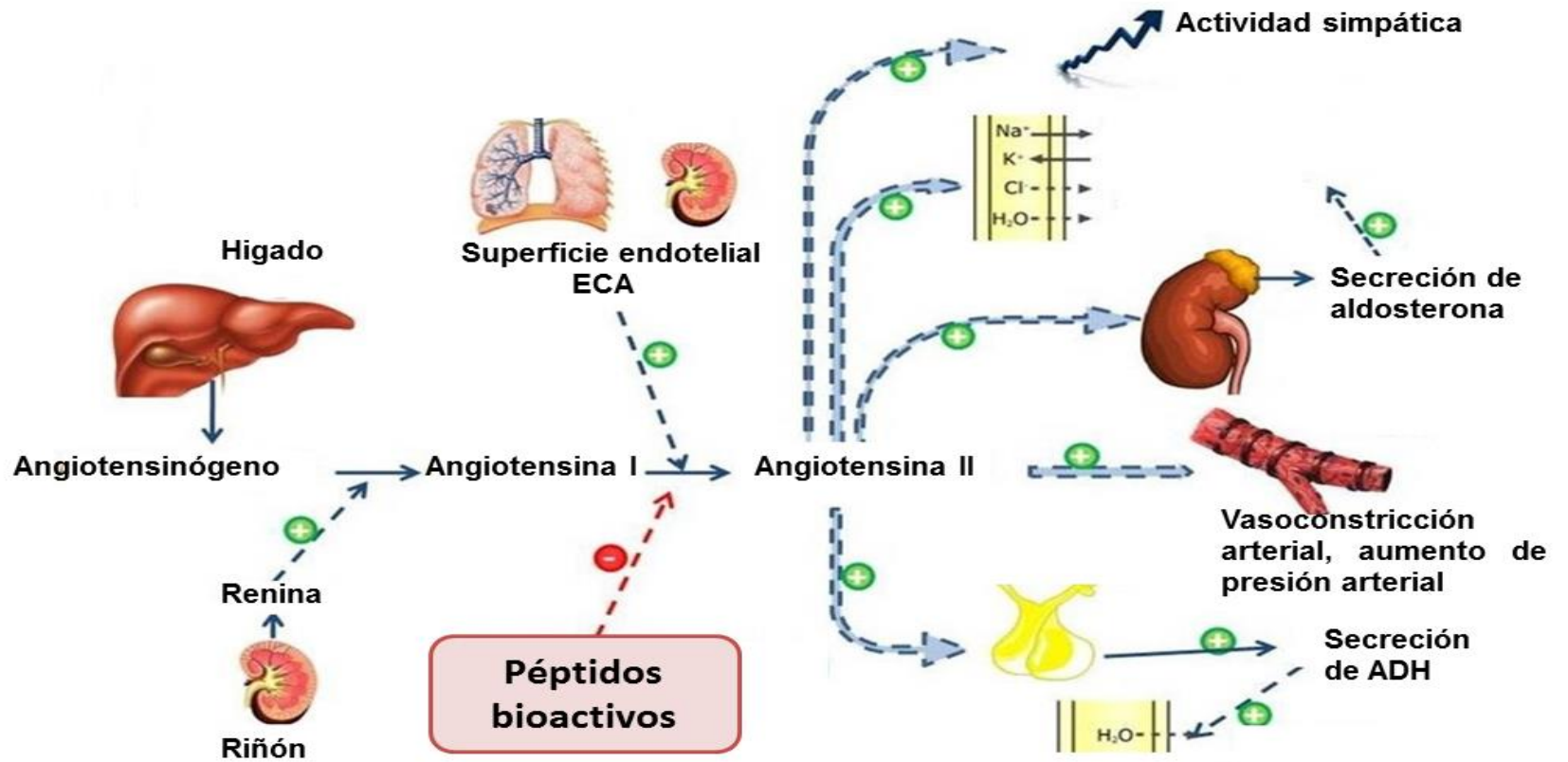
de la presión arterial se requiere de otros sistemas, entre los que se encuentra el sistema de control renal y de los líquidos corporales, así como los mecanismos hormonales, dentro de los cuales se encuentra el SRAA, el sistema quinina-callicreína, el sistema de la enzima convertidora de endotelina y el sistema de endopeptidasa neutra (Guyton, 1996; Fitzgerald *et al.*, 2004).

El SRAA es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales, y cumple dentro de sus principales funciones un papel crítico en la homeostasis de la presión arterial, del balance hidroelectrolítico, y en el desarrollo de los riñones en los mamíferos; se trata de un sistema complejo de regulación que desempeña un importante papel en el mantenimiento de la presión arterial de la sangre, así como también en el balance de fluidos salinos en los mamíferos (Feldstein *et al.*, 2007; Contra *et al.*, 2008). Según Gómez *et al.*, (2007), la renina, el angiotensinógeno, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub> de angiotensina II (Ang-II) son los componentes clásicos que integran el SRAA.

En la Figura 1 se esquematiza el funcionamiento del SRAA, el cual funciona de la siguiente manera: cuando la presión arterial disminuye, se libera al torrente sanguíneo la renina, proteasa sintetizada principalmente en el riñón. La renina actúa sobre el angiotensinógeno, péptido de 14 aminoácidos sintetizado en el hígado, liberando la angiotensina I, posteriormente se escinde el dipéptido carboxilo terminal de la Ang I por acción de la ECA, formándose la Ang II, que permanece en la sangre hasta ser inactiva por angiotensinasas (Fitzgerald *et al.*, 2004).

La Ang-II, influye significativamente en la absorción de sodio y agua por su capacidad de estimular a las células de la zona glomerulosa de la corteza suprarrenal para que sinteticen y segreguen aldosterona. La aldosterona provoca un aumento de la reabsorción de sal y agua por parte de los túbulos renales, lo cual aumenta el volumen del líquido extracelular, provocando el aumento de la presión arterial. Además en los segundos posteriores a la síntesis de Ang II, ésta se une a los receptores de angiotensina tipo I situados en el músculo liso, lo cual provoca una vasoconstricción de las arteriolas, aumentando con ello la presión arterial (Feldstein *et al.*, 2007).

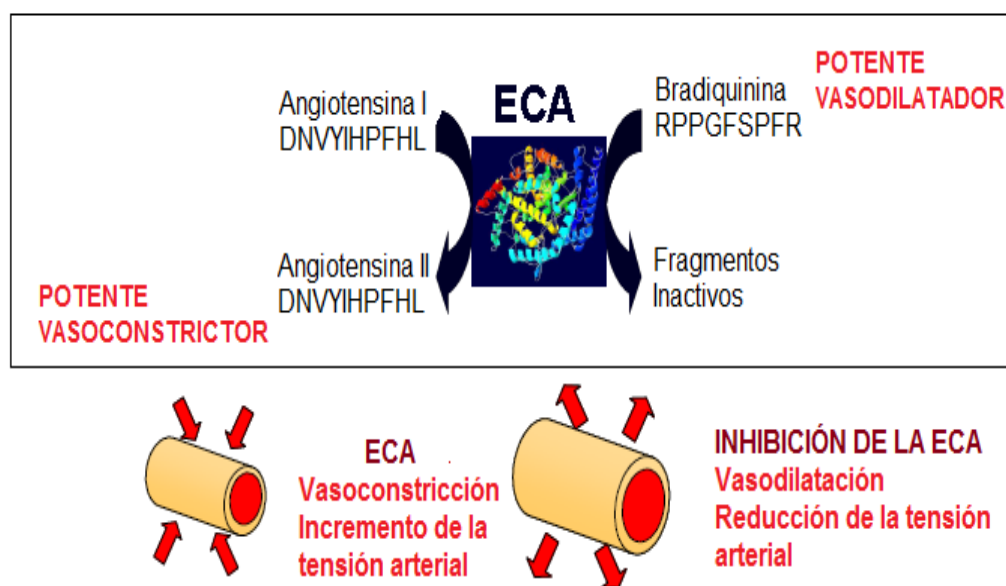
Por lo anterior, el SRAA es considerado como uno de los principales reguladores de la presión arterial (FitzGerald *et al.*, 2004), por lo que la mayoría de los estudios dirigidos al tratamiento de la hipertensión están basados en este sistema, y específicamente en la ECA, por ser uno de los componentes principales (Gómez *et al.*, 2007)



**Figura 1.** Funcionamiento del SRRA en la regulación de la presión arterial.

### 2.1.2 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La ECA conocida como dipeptidil-dipeptidasa A, es uno de los componentes principales del SRAA (Touyz, 2005). La ECA es estructuralmente una metalopeptidasa de zinc y funcionalmente una ectoenzima unida a membrana que representa el paso enzimático final en la producción de Ang II a partir de Ang I, y al ser uno de los componentes principales del SRAA juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial en el organismo (Acharya *et al.*, 2003). La ECA aumenta la presión sanguínea al catalizar la conversión del decapeptido Ang-I en el octapéptido Ang-II, el cual es un potente vasoconstrictor, por lo que la inhibición de ésta inhibirá el incremento de la presión sanguínea (Figura 2) (Pereira *et al.*, 2006). Además la ECA también actúa en el sistema quinina caliceína catalizando la degradación del nonapéptido vasodilatador bradiquinina (Tzacos *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Reacciones catalizadas por la ECA (Quirós *et al.*, 2007).

## 2.2 Control de la Hipertensión Arterial

El objetivo del control de la hipertensión arterial es disminuir los eventos cardiovasculares y la mortalidad asociados a esta, llevando las cifras tensionales a niveles normales (<140/90 mm Hg). En general la HTA se puede tratar por medio de tratamientos farmacológicos y no farmacológicos (Sellén, 2008).

### 2.2.1 Tratamientos Farmacológicos

Existen diversos fármacos para el tratamiento de la hipertensión arterial, de los cuales destacan: diuréticos, betabloqueantes, alfabloqueadores, bloqueadores de canales de calcio, IECA (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), ARA II (antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II) y los bloqueadores directos de renina (Galiana, 1997).

Actualmente el uso de estos fármacos ha demostrado que reduce la morbilidad y mortalidad cardiovascular; sin embargo, algunos autores señalan que el uso continuado de éstos ha sido asociado a consecuencias desfavorables. Por ejemplo, se han observado reacciones secundarias, tales como tos seca que puede ser tan debilitante que en ciertos casos tiene como consecuencia el cese del tratamiento (Riordan, 2003). Otros efectos negativos identificados en pacientes tratados con estos fármacos han sido hipotensión, incremento de los niveles de potasio, reducción de la función renal y erupciones cutáneas (FitzGerald *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Tratamientos no Farmacológicos

Consisten principalmente en intervenciones en el estilo de vida. En general las recomendaciones no farmacológicas fundamentales son: una dieta balanceada, control del peso corporal, evitar hábitos tóxicos y el sedentarismo (Soca *et al.*, 2009).



Una dieta equilibrada que contenga los principales nutrientes en las cantidades necesarias es un requisito básico para una buena nutrición y el mantenimiento de la salud. Razón por la cual diversos científicos e investigadores están prestando mayor atención a los componentes bioactivos de fuentes naturales que tengan un efecto antihipertensivo sobre el organismo humano (Baltar *et al.*, 2004), tal es el caso de péptidos derivados de proteínas de alimentos con actividad antihipertensiva que no presentan efectos adversos para la salud (Takano, 2002), de hecho se ha demostrado por medio de estudios toxicológicos que no existe evidencia de toxicidad en ningún órgano tras la administración por vía oral de altas dosis de péptidos, tanto de forma aguda como prolongada (Li *et al.*, 2005; Cadee *et al.* 2007), presentando mayor auge aquellos péptidos derivados de proteínas lácteas que pudieran ser utilizados en la elaboración de alimentos funcionales.

### 2.3 Alimentos Funcionales

Avances recientes en ciencia de los alimentos sostienen el concepto de que la dieta puede tener un papel importante en la modulación de varias funciones del organismo. Esto implica que la dieta y/o sus componentes pueden contribuir a un mejoramiento del estado de bienestar, una reducción de riesgos relacionados con ciertas enfermedades e incluso un mejoramiento en la calidad de vida. Estos nuevos conceptos han llevado a la introducción de una nueva categoría de los alimentos comestibles promotores de la salud, es decir, los alimentos funcionales (Korhoen *et al.*, 2002).

De acuerdo a la definición presentada por el ILSI Europe (por sus siglas en inglés, Internacional Life Science Institute) en el proyecto FUFOSSE (por sus siglas en inglés, Functional Food Science in Europe) un alimento puede ser considerado “funcional” si se ha demostrado de forma satisfactoria que afecta benéficamente una o más actividades o funciones fisiológicas del cuerpo, más allá de un efecto nutricional; favoreciendo la salud y/o reduciendo el riesgo de padecer enfermedades (Diplock, 1999).

Debido a esto, actualmente los alimentos no sólo son destinados a satisfacer sólo el hambre y proporcionar los nutrientes necesarios, sino que también contribuyen a evitar enfermedades relacionadas con la nutrición y mejora de la salud tanto física como mental (Menrad *et al.*, 2003).

Mäkinen-Aakula, en el 2006 propone la siguiente clasificación para los alimentos funcionales en base al propósito de éstos: alimentos funcionales que mejoran la vida de los niños, encontrándose dentro de esta clasificación los prebióticos y probióticos; alimentos funcionales que reducen el riesgo de problemas de salud como el colesterol alto o la presión arterial alta; y los alimentos funcionales que hacen la vida más fácil, como los productos sin lactosa o gluten.

Una de las áreas de investigación más importantes dentro del mundo de los alimentos funcionales es la relacionada con la leche y los productos lácteos. Entre las principales razones se encuentra la relativa facilidad para añadir componentes y conseguir que éstos se mezclen de forma homogénea con la leche (Martínez, 2008). De hecho, muchos productos lácteos tradicionales poseen actividad fisiológica (Shi *et al.*, 1998). Esta característica de ir más allá del efecto nutrimental ordinario, podría ser atribuida a una gran variedad de los constituyentes de la leche como algunas proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, carbohidratos e incluso derivados de estos (Steijns *et al.*, 2001), lo que además las hace interesantes desde el punto de vista tecnológico ya que pueden emplearse como ingredientes para desarrollar nuevos alimentos funcionales (Quirós, 2007).

Es por ello que los lácteos son los que más aportaciones han hecho al mercado de los alimentos funcionales, ofreciendo una amplia gama de productos entre los que se encuentran los yogures, quesos, leches fermentadas, etc. (Martínez, 2008). Además existen estudios epidemiológicos que sugieren que el consumo de leche y de productos lácteos está inversamente relacionado con el riesgo de hipertensión, y actualmente se ha observado que algunos productos lácteos poseen también actividad antioxidante (Jauhiainen *et al.*, 2005).

Aunado a ello, en los últimos años se ha visto que leches fermentadas contienen numerosas secuencias peptídicas que determinan funciones fisiológicas importantes y modulan diferentes procesos regulatorios (Torres-Llanez, 2005), por lo que, las investigaciones realizadas sobre péptidos bioactivos en productos lácteos y derivados, indican que aunque el mecanismo fisiológico de estos péptidos aún no es claro, se presentan como una opción con gran potencial para el desarrollo de alimentos funcionales, y actualmente son las leches fermentadas, las que están recibiendo especial atención en la investigación (Rodríguez *et al.*, 2012).

#### 2.4 Leches Fermentadas como Alimentos Funcionales

Según la Norma del Codex Alimentarius para leches fermentadas, estas se definen como aquellos productos lácteos obtenidos mediante fermentación de la leche, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación.

Desde hace varios años las leches fermentadas se han considerado productos benéficos para la salud. Investigaciones recientes señalan que estos beneficios se deben a metabolitos y moléculas biológicamente activas que son liberadas durante el proceso de fermentación (Leroy *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2010). Es debido a estas características especiales que la industria ha encontrado la base idónea sobre la que incorporar ingredientes y/o nutrientes que otorgan al producto final propiedades más allá de las puramente nutricionales, convirtiéndolas en verdaderos alimentos funcionales (Fitzgerald y Murray, 2006).

Aunado a esto, en los últimos años las investigaciones están encaminadas a la reducción de los niveles de presión arterial por medio del consumo de leches fermentadas y a la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de la capacidad antioxidante de diferentes productos lácteos. Al respecto, existen reportes en los que por medio de una combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*; se ha logrado la inhibición de la ECA y por lo tanto una reducción en los niveles de presión

arterial (Contreras *et al.*, 2009), lo mismo ha sido demostrado por González-Cordova *et al.*, (2010) y Rodríguez-Figueroa (2010), ya que por medio de la fermentación de leche con bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, respectivamente, demostraron que poseen actividad inhibidora de la ECA.

Lo mismo sucede para la actividad antioxidante, ya que se ha demostrado que durante la fermentación de la leche por cepas de bacterias ácido lácticas altamente proteolíticas, como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, son liberados péptidos antioxidantes debido a la hidrólisis de las caseínas (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Adicionalmente, se ha evidenciado que la mayoría de los péptidos bioactivos producidos durante la fermentación de la leche, son péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva y antioxidante (Nakashima *et al.*, 2002; Fitzgerald y Murray, 2006) Todo esto indica que diferentes bacterias lácticas son capaces de producir péptidos bioactivos durante el proceso de fermentación y durante el almacenamiento en refrigeración (Phelan *et al.*, 2009).

## 2.5 Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen propiedades biológicas al liberarse por procesos de hidrólisis enzimática *in vitro* o *in vivo* o por procesos fermentativos. Usualmente tienen una longitud de 3-20 residuos por molécula (Erdmann *et al.*, 2008). Estos péptidos tienen efectos beneficiosos para el organismo y pueden influir positivamente en la salud de la población.

### 2.5.1 Actividad Biológica de los Péptidos Bioactivos

Actualmente, las proteínas más estudiadas como fuente de péptidos bioactivos son las proteínas lácteas. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, los péptidos bioactivos

pueden exhibir diversas actividades biológicas, como: la actividad opiácea, anticancerígena, antimicrobiana, inmunomoduladora, antitrombótica, antihipertensiva y antioxidante.

Muchos de los péptidos bioactivos conocidos son multifuncionales y pueden ejercer más de uno de los efectos mencionados, de hecho algunos autores señalan que, en productos fermentados, péptidos con actividad inhibitoria de la ECA podrían, también, presentar actividad antioxidante. Es por ello, que actualmente han recibido especial atención en la investigación (Trompete *et al.*, 2003; Wang y González de Mejía, 2005; Chang *et al.*, 2006; Phelan y Kenns, 2011).

2.5.1.4 Péptidos antioxidantes. Los péptidos antioxidantes son compuestos de bajo peso molecular, inocuos, alta actividad biológica y de fácil absorción. Si se comparan con los antioxidantes enzimáticos, los péptidos presentan ciertas ventajas, ya que al ser simples, les confiere propiedades nutricias y funcionales, así como mayor estabilidad adicional a la actividad antioxidante. Investigaciones señalan además, que existe una mayor actividad in vivo debido a la hidrolisis por proteasas gastrointestinales.

Actualmente éstos péptidos se muestran como atrapadores de radicales libres, inhibidores de la peroxidación lipídica, compuestos quelantes de iones metálicos de transición o inductores de la expresión génica. En lo que respecta a péptidos aislados de leche, se han obtenidos péptidos del suero de leche que contribuyen a la síntesis de glutatión, el cual es un potente antioxidante intracelular (Martínez *et al.*, 2006; Sarmadi *et al.*, 2010).

Una de las características de los péptidos antioxidantes es la presencia de ciertos residuos de aminoácidos; como, prolina, cisteína, histidina, lisina, triptófano, tirosina y metionina (Chen *et al.*, 2003; Virtanen *et al.*, 2007). La actividad antioxidante de péptidos que contienen histidina está relacionada con la donación de átomos de hidrógeno, habilidad de quelación debido a su grupo imidazol y al atrapamiento de radicales peroxilo. Los aminoácidos con residuos aromáticos pueden donar protones a

radicales deficientes de electrones, con lo cual se mejora la propiedad de atrapadores de radicales libres. Por otro lado los grupos sulfhidrilo (SH) de péptidos que contienen Cys presentan una acción independiente debido a su interacción directa con los radicales. Sin embargo independientemente de la presencia de estos aminoácidos, la secuencia que presenten, es la que delimita la actividad antioxidante, siendo la secuencia Pro-His-His la que hasta el momento ha presentado la mayor actividad (Korhonen *et al.*, 2006; Vioque *et al.*, 2006; Sarmadi *et al.*, 2010).

2.5.1.5 Péptidos antihipertensivos. Los péptidos inhibidores de la ECA más estudiados son los derivados de las proteínas lácteas, principalmente de las caseínas, aunque también de aquellos derivados de los hidrolizados de las proteínas del suero. De acuerdo a la procedencia de estos péptidos son denominados casoquininas y lactoquininas, cuando son derivados de las caseínas y proteínas del suero, respectivamente.

En cuanto a las características de este tipo de péptidos, son generalmente de pequeño tamaño y pueden ser absorbidos fácil y rápidamente en el intestino pudiendo inhibir a la ECA, y por lo tanto generar que la presión arterial baje. Algo importante de este tipo de péptidos es que hasta el momento no han mostrado ningún efecto secundario (Korhonen & Pihlanto, 2003), incluso Anadón *et al.*, (2010) llegaron a la conclusión por medio de un estudio de toxicidad oral aguda y de dosis repetidas (4 semanas) de dos péptidos antihipertensivos, RYLGY y AYFYPEL, que corresponden a fragmentos (90-94) y (143-149) de as1-caseína, que son seguros para su consumo, ya que no encontraron toxicidad relacionada al consumo de éstos hidrolizados incluso en cantidades altas, lo que deja en evidencia que éste tipo de péptidos bioactivos se presentan como una opción viable para el tratamiento de la hipertensión arterial.

## **2.5.2 Estrategias para la Producción de Péptidos Bioactivos**

Para que los péptidos bioactivos lleven a cabo su función en el organismo es necesario que estos sean liberados de sus secuencias precursoras. Como se ha venido mencionando

previamente, en las últimas décadas, diversas investigaciones han mostrado que los péptidos bioactivos pueden ser derivados de las proteínas de la dieta y estos pueden estar presentes como entidades independientes o codificadas en la proteína original y que durante la digestión gastrointestinal o por un procesamiento previo de los alimentos, por ejemplo mediante una hidrólisis enzimática o fermentación, estos péptidos son liberados de la proteína precursora (Vioque *et al.*, 2000, Vioque *et al.*, 2006).

2.5.2.1 Hidrólisis con enzimas. Para obtener péptidos con actividad biológica a través de la hidrólisis de proteínas se han utilizado diversas enzimas; entre las cuales se encuentran tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, termolisina, entre otras. La elección de la enzima y las condiciones de proceso influyen en la composición de péptidos en el hidrolizado y por lo tanto en sus propiedades funcionales (Van der Ven *et al.*, 2002), éstas han sido aplicadas tanto en caseínas como en proteínas del lactosuero provenientes de especies como la vaca, oveja y cabra (Hernández-Ledesma *et al.*, 2002; Contreras *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2012; Ruiz-Gimenez *et al.*, 2012).

Actualmente existe evidencia científica que muchos péptidos bioactivos han sido producidos *in vitro* por medio de las enzimas gastrointestinales, principalmente pepsina y tripsina. Algunos ejemplos del uso de diversas enzimas para obtener una variedad de péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA, han sido los aislados proteínicos obtenidos de diversas fuentes. Así por ejemplo, Contreras *et al.*, (2009) identificaron tres secuencias peptídicas RYLGY, AYFYPEL, y YQKFPQY a partir de la hidrólisis de la caseína con pepsina, los cuales presentaron actividad antihipertensiva tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otro lado Mizuno *et al.* (2004) obtuvieron péptidos cortos con actividad antihipertensiva ricos en prolina a partir de hidrolizados de la caseína de la leche por medio de la utilización de una proteasa de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*).

Respecto a los péptidos antioxidantes Peng *et al.*, (2009) obtuvieron cuatro fracciones de péptidos de diferentes pesos moleculares a partir de un hidrolizado aislado de proteína

de suero mediante tratamiento enzimático con Alcalasa. Encontrando un mayor efecto reductor de radicales libres en la fracción con péptidos en el rango de 0,1 a 2,8 kDa.

Sin embargo, a pesar de que la hidrólisis enzimática es un método eficaz para la producción de péptidos bioactivos, frecuentemente conduce a la producción de un intenso sabor amargo, debido a la presencia de péptidos fuertemente hidrofóbicos, lo que hace necesaria la utilización de otros métodos para la producción de péptidos bioactivos (Tardioli *et al.*, 2003).

2.5.2.2 Fermentación. La fermentación natural o controlada se viene utilizando a lo largo de los años con el fin de preservar distintos alimentos, o bien para obtener características deseadas. Una de las formas tradicionales de fermentación de productos lácteos es la utilización de cultivos iniciadores, por medio de los cuales se pueden obtener péptidos bioactivos; siendo *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, las principales cepas proteolíticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos (Nakamura *et al.*, 1995; Fitzgerald; 2006).

La evidencia científica señala que dependiendo de la capacidad proteolítica de los cultivos iniciadores va ser la producción de péptidos bioactivos, ya que influye en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres. Es por ello que se recomienda utilizar cepas de bacterias ácido lácticas altamente proteolíticas en la fermentación de productos lácteos (Matar *et al.*, 2003; Gobbetti *et al.*, 2004; Papadimitriou *et al.*, 2007).

Por otro lado, diversas investigaciones señalan que la fermentación láctea se ha empleado con éxito para la producción de péptidos inhibidores de la ECA y de péptidos antioxidantes; existen estudios en los que se demuestra una relación proporcional entre el nivel de proteólisis de distintas leches fermentadas y la inhibición de la ECA *in vitro* (Fuglsang *et al.*, 2003).

Algunas investigaciones, como la realizada por Contreras *et al.*, (2009), comprobaron que la leche fermentada por cepas específicas de *Lactobacillus helveticus* y



*Saccharomyces cerevisiae* presenta actividad inhibidora de la ECA ya que contiene los tripéptidos VPP e IPP (reportados como tripéptidos inhibidores de la ECA). Además, investigaciones científicas dejan en evidencia que durante la fermentación de la leche pueden ser liberados péptidos bioactivos, que en algunas ocasiones son multifuncionales, pudiendo presentar más de una actividad biológica (Yamamoto *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2002; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004).

Sin embargo es importante tomar en cuenta que además de la cepa empleada durante la fermentación, el tiempo de fermentación es de crucial importancia, ya que es éste el que determina el grado de hidrolisis; de hecho, en algunos casos existe una correlación directa con el porcentaje de inhibición de la ECA (Pihlanto *et al.*, 2010).

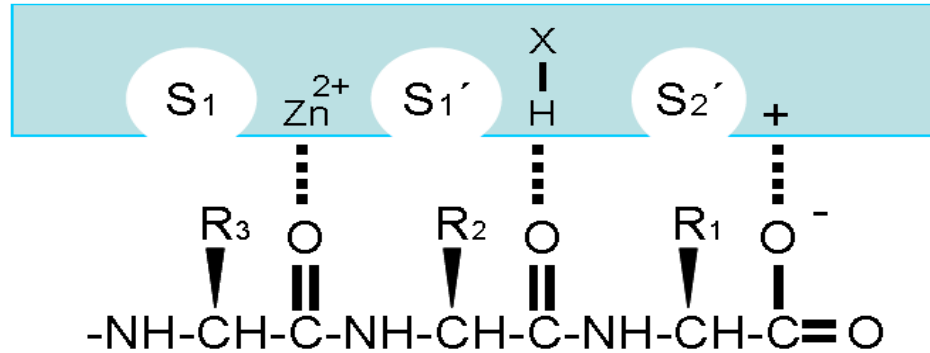
### **2.5.3 Relación Estructura-Actividad de los Péptidos Inhibidores de la ECA**

Existe evidencia científica que la mayoría de los péptidos bioactivos descritos hasta la fecha presentan algunas propiedades estructurales en común, entre las cuales se encuentran, cadena corta de aminoácidos, cuentan con residuos de aminoácidos hidrofóbicos, así como también son resistentes a la acción de peptidasas digestivas, lo que permite su absorción y paso al torrente sanguíneo (Kitts *et al.*, 2003).

A pesar de que el mecanismo concreto por medio del cual los péptidos bioactivos inhiben a la ECA aún no ha sido clarificado, la literatura científica señala que este tipo de péptidos actúan como inhibidores competitivos y que la unión de los péptidos a la ECA está influenciada por la secuencia tripeptídica C-terminal de los mismos, y que puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ECA (Araujo *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004). Así, los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como triptófano, tirosina, fenilalanina o prolina, en la cadena C-terminal con los cuales se unen a los sitios activos de la ECA favorecen la unión a estas zonas, bloqueando su actividad (Artiñano, 2009; Murakami *et al.*, 2004), adicionalmente, si existe la presencia de Lys (grupo  $\epsilon$ -amino) y Arg (grupo guanidino) en la posición C-terminal, puede incrementar la actividad inhibidora (Lignitto *et al.*, 2010).

Por otro lado, la evidencia científica señala que por lo general estos péptidos contiene de 2 a 12 aminoácidos, aunque también se han determinado péptidos bioactivos de más de 27 aminoácidos y respecto al peso molecular, los péptidos cortos (<3 kDa), presentan una mayor actividad inhibidora de la ECA (Hong *et al.*, 2008). Fitzgerald y Meisel (2000) mencionan que debido a que la ECA posee dos sitios catalíticos, puede existir diferencia en la afinidad por el sustrato, por lo que los péptidos bioactivos solamente pueden inhibir uno de los dos sitios; sin embargo, hacen falta elementos para reforzar esta afirmación.

La región del sitio activo a la cual se une el tripéptido C-terminal se designa como sitio de unión obligatorio, tal y como se describe en la Figura 3. En él destacan los subsitios S1, S1' y S2' donde específicamente interaccionan las cadenas laterales de los aminoácidos. El subsitio S1 es un bolsillo hidrofóbico con una buena afinidad por las cadenas aromáticas como las de la fenilalanina, el subsitio S1' no interacciona de manera efectiva con la prolina, mientras que el subsitio S2' no acepta las cadenas ácidas de los aminoácidos dicarboxílicos. Estos estudios también establecieron que en el sitio activo de la enzima existe un grupo cargado positivamente que forma un enlace iónico con el grupo C-terminal del sustrato cargado negativamente lo que provoca el alineamiento correcto del tripéptido C-terminal del sustrato con los subsitios de la ECA. Así mismo, se estableció que el ión  $Zn^{2+}$  de la ECA se localizaba entre los subsitios S1 y S1' y que participaba en la hidrólisis del enlace peptídico entre los residuos antepenúltimo y penúltimo del sustrato, liberándose el dipéptido C-terminal (Cushman *et al.*, 1981; Ondetti y Cushman, 1982).



**Figura 3.** Modelo de interacción del centro activo de la ECA con los sustratos o inhibidores competitivos.

#### 2.5.4 Relación Estructura-Actividad de los Péptidos Antioxidantes

Los péptidos antioxidantes pueden ejercer dicha actividad debido a la capacidad para eliminar radicales, a las propiedades de quelación de iones metálicos y/o a la inhibición de la peroxidación lipídica (Sarmadi y Ismail, 2010).

Investigaciones científicas han demostrado que péptidos antioxidantes presentan algunas características en común. Por ejemplo, se ha observado la presencia de histidina en secuencias peptídicas que han presentado actividad antioxidante, dicha actividad ha sido atribuida a la habilidad de donación del hidrógeno, a la habilidad de quelación metálica del grupo imidazol y/o al atrapamiento del radical peroxil de lípidos (Chen *et al.*, 1998).

Los 20 aminoácidos pueden interactuar con radicales libres si la energía del radical es alta (Elías *et al.*, 2008). Existe evidencia científica que señala que los péptidos más reactivos comparten algunas características en común, entre las cuales, incluyen aminoácidos nucleófilos como la cisteína y metionina ya que contienen azufre, aminoácidos aromáticos cuyo grupo funcional es el imidazol, como el triptófano, tirosina, fenilalanina y la histidina (Sarmadi *et al.*, 2010). Se ha comprobado que los aminoácidos aromáticos pueden donar protones a los electrones deficientes del radical, mejorando con ello la capacidad de captación de radicales (Rahapakse *et al.*, 2005), lo

mismo con los residuos que contienen cisteína, ya que al contener el grupo SH, puede tener una interacción directa con radicales (Qian *et al.*, 2008), y en cuanto a los péptidos que contienen histidina en su secuencia, se ha demostrado que la capacidad antioxidante es debida al atrapamiento de radicales peroxilo, a la habilidad de quelación de iones metálicos y/o a la habilidad del grupo imidazol de donación de hidrogeno (Rajapakse *et al.*, 2005)

Por otro lado, también se ha reportado que péptidos antioxidantes incluyen dentro de sus secuencias aminoácidos hidrofóbicos, tales como valina o leucina en el extremo N-terminal. La hidrofobicidad incrementa la presencia del péptido en interfaces agua-lípidos y con ello facilita el acceso para eliminar los radicales libres generados en la fase lipídica (Qian *et al.*, 2008).

Aunque la actividad antioxidante ha sido asociada a distintos aminoácidos, se sabe que la presencia de éstos no es suficiente para exhibir la actividad, sino que la secuencia de aminoácidos del péptido así como la hidrofobicidad pueden afectar dichas propiedades (Saiga *et al.*, 2003; Rajapakse *et al.*, 2005).

## 2.6 Biodisponibilidad de los Péptidos Antihipertensivos y Antioxidantes

Las proteínas y péptidos de la dieta están sujetos a cambios drásticos en su estructura durante los procesos de ingestión, digestión y absorción (Shimizu, 2004). Cheung *et al.*, (2008), llegaron a la conclusión de que la biofuncionalidad de los péptidos bioactivos depende de sus propiedades estructurales; así los péptidos de cadena larga (10-51 aminoácidos) pueden ser absorbidos intactos a través del intestino y producir alguno de los efectos fisiológicos, aunque la potencia de éstos disminuye entre más grande sea la longitud de la cadena. A diferencia de los péptidos cortos (2-3 aminoácidos), los cuales son absorbidos más rápidamente que los aminoácidos libres.

Se sabe que para que un péptido sea efectivo no basta ser un buen inhibidor de la ECA sino que necesita, además, llegar activo a los órganos diana. De hecho, el potencial inhibidor de la ECA de péptidos no siempre está relacionado con su efecto antihipertensivo. Se conocen algunos péptidos con gran potencial inhibidor de ECA *in vitro* que no muestran actividad al administrarse por vía oral o intravenosa. Por ejemplo, YGGY (IC<sub>50</sub>= 16.2 µM) un potente inhibidor aislado del sake, no tiene efecto hipotensivo cuando se administra oralmente incluso en dosis de 100 mg/kg (Saito *et al.*, 1994).

La biodisponibilidad de los péptidos depende de la actividad enzimática de las diferentes áreas del tracto gastrointestinal. La primera barrera de los péptidos es el lumen del intestino delgado, el cual contiene gran cantidad de proteasas secretadas por el páncreas y proteasas de las células de la mucosa. La segunda barrera enzimática son las proteasas de la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales, las cuales contienen al menos quince peptidasas que en conjunto tienen una amplia especificidad pudiendo degradar tanto proteínas como péptidos (Lee *et al.*, 2002).

La simulación *in vitro* de la digestión fisiológica con proteasas gastrointestinales es una herramienta muy útil para evaluar la estabilidad de los péptidos frente a las enzimas digestivas (Matsui *et al.*, 2002). De esta manera se emula en dos etapas el proceso de digestión que tiene lugar en el organismo, efectuando en primer lugar una hidrólisis con pepsina a pH ácido y a continuación una digestión con extracto pancreático a pH básico (Roufik *et al.*, 2006).

En este sentido, la literatura señala que en muchas ocasiones los péptidos no resisten la digestión y son degradados por las enzimas digestivas. El estudio de Tavares *et al.*, (2011) muestra algunos de los posibles efectos de la digestión sobre los péptidos activos. En él, se estudiaron 11 péptidos inhibidores de la ECA (entre 6 y 11 aminoácidos) identificados en un hidrolizado de concentrado de proteínas de lactosuero. Ninguno de los péptidos resistió la digestión simulada a la que fueron sometidos.

Otro de los posibles efectos que se pueden encontrar es que el péptido con actividad inhibidora de la ECA *in vitro* pierda totalmente sus propiedades inhibidoras al ser atacado por las enzimas gastrointestinales. Aunque el caso contrario también ha sido descrito, es decir, péptidos que inicialmente no presentan actividad *in vivo* son degradados a péptidos con mejor actividad inhibidora *in vitro* (Manso *et al.*, 2003). En otros estudios sin embargo, se identificaron péptidos capaces de soportar la digestión gastrointestinal sin sufrir ninguna alteración, es el caso del péptido LHLPLP (IC<sub>50</sub>= 4µg/mL) obtenido a partir de la fermentación de caseínas (Quirós *et al.*, 2009). Asimismo, Chen *et al.*, (2012) identificaron el tripéptido Val-Ala-Pro, el cual presentó actividad inhibidora de la ECA (IC<sub>50</sub>, valor de 0.00534 mg/mL), así como también demostraron que es resistente a enzimas gastrointestinales de pepsina y quimotripsina.

Recientemente se ha evaluado la resistencia a la digestión gastrointestinal de diferentes secuencias peptídicas derivados de la caseína, entre las que se incluyen péptidos antihipertensivos como RYLGY, AYFYPEL y YQKFPQY, con esta investigación se demostró que después de la digestión dichos péptidos fueron parcialmente hidrolizados por el aparato digestivo, además los péptidos RYLGY y AYFYPEL mantienen una actividad inhibidora de la ECA potente, con valores de IC<sub>50</sub> de sólo 9.3 y 4.7 µg mL<sup>-1</sup> (Contreras *et al.*, 2013); con lo cual se puede verificar que los péptidos sintetizados pueden tener un efecto importante una vez que han sido digeridos, razón por la cual resulta importante estudiar el comportamiento que pudieran tener nuevas secuencias peptídicas frente a enzimas gastrointestinales.

Por otro lado, Majumder *et al.*, (2011) llevaron a cabo una investigación para verificar si los péptidos obtenidos a partir de hidrolisis presentaban la misma actividad que los péptidos sintéticos, así como también determinaron la estabilidad de los péptidos bajo condiciones gastrointestinales simuladas, llegando a la conclusión que las secuencias analizadas presentaban comportamiento similar, sin embargo frente a las condiciones gastrointestinales presentaban comportamiento diferente.

Respecto a la actividad antioxidante, Quiros *et al.*, (2007), obtuvieron 11 péptidos, y de ellos el péptido WSVPQPK, mostró una importante actividad neutralizante del radical ABTS+ (valor del TEAC 1,297  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/ $\mu\text{mol}$  de péptido).

También se ha determinado que péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimáticas a partir de caseína y suero de leche, han exhibido actividad antioxidante *in vitro* (Tong *et al.*, 2000; Rival *et al.*, 2001). Además Hernández-Ledesma *et al.*, (2005), llegaron a la conclusión que el péptido Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile, posee actividad sobre radicales libres, incluso más alta que el butilato de hidroxianisola (BHA), un antioxidante sintético. En cuanto a la identificación de este tipo de péptidos, existe evidencia que los péptidos antioxidantes pueden ser liberados de las caseínas durante la hidrólisis por enzimas digestivas (Pihlanto, 2006).

Todos estos estudios indican que la digestión gastrointestinal es un factor esencial en la determinación de la actividad antihipertensiva y antioxidante de péptidos bioactivos. Puesto que hay péptidos que pierden o reducen considerablemente su capacidad inhibidora al ser administrados oralmente mientras que otros péptidos que mostraban actividad inhibidora baja o nula, se convierten en buenos inhibidores al ser hidrolizados por las enzimas gastrointestinales.

Por lo tanto, la simulación de la digestión gastrointestinal es una alternativa viable para evaluar no solo la biodisponibilidad de los péptidos sino también la forma activa y el mecanismo de acción de los mismos (Miguel *et al.*, 2006).

Recientemente Rodríguez *et al.*, (2012) llevaron a cabo la identificación de nuevos péptidos bioactivos, mostrados en el Tabla 2, a los cuales se les atribuye actividad inhibidora de la ECA; sin embargo, hacen falta estudios que validen que secuencia específica es la responsable de dicho efecto, así como también resulta interesante evaluar si dichas secuencias peptídicas presentan actividad antioxidante. De esta manera, además, se estudiará la relación secuencia-actividad de los péptidos con la ECA y con la actividad antioxidante.

Tabla 2. Péptidos identificados en leche fermentada por cepas específicas de *Lactococcus lactis* asociadas a la inhibición de la ECA.

Muestra	Masa experimental	Masa Teórica	Ión molecular (m/z) seleccionado para MS/MS (con carga)	Fragmento de proteína	Secuencia	
NRRL B-50571	F1	723.9	724.3	362.9 (+2)	$\alpha$ -LA (f63-68)	DDQNP
		1032.8	1033.5	517.4 (+2)	$\alpha$ -LA (f82-89)	LDDDLTDDI
		698.6	698.3	350.3 (+2)	$\kappa$ -CN(f35-40)	YPSYGL
		1479	1479.7	740.5 (+2)	$\kappa$ -CN(f98-110)	HPHPHLSFMAIPP
		1035.7	1035.5	518.8 (+2)	$\alpha$ -La (f55-62)	YDTQAIQ
		1386.8	1387.7	462.3 (+3)	$\alpha$ -La (f100-111)	DDDLTDDIMCV
		585.9	585.2	586.7 (+1)	$\kappa$ -CN(f35-39)	YPSYGL
	F2	505.9	585.2	506.9 (+1)	$\alpha$ s1-CN(f62-f66)	AESIS
	F3	830.1	830.5	416.1 (+2)	$\beta$ -CN (f22-28)	SITRINK
		1051.4	1051.5	526.7 (+2)	$\alpha$ s1-CN(f80-f88)	HIQKEDVPS
		904.1	904.5	453.0 (+2)	$\kappa$ -CN(f161-169)	TVQVTSTAV
	F4	904.3	904.5	453.2 (+2)	$\kappa$ -CN(f161-169)	TVQVTSTAV
		1038.4	1038.6	520.2 (+2)	$\alpha$ s2-CN(f115-124)	NAVPIPTLN
		977.1	977.6	489.6 (+2)	$\beta$ -CN (f69-77)	SLPQNIPPL
	F5	1716.9	1717	859.4 8 (+2)	$\beta$ -CN (f194-209)	QEPVLGPVRGPFPIIV
		1150.4	1150.7	576.2 (+2)	$\beta$ -CN (f199-209)	GPVRGPFPIIV
		977.2	977.6	489.7 (+2)	$\beta$ -CN (f69-77)	SLPQNIPPL
		1094.4	1094.6	548.2 (+2)	$\kappa$ -CN(f25-33)	YIPIQYVLS
F6	904.4	904.5	453.5 (+2)	$\kappa$ -CN(f161-169)	TVQVTSTAV	
	1356.7	1357.7	453.2 (+3)	$\kappa$ -CN(f157-169)	PEINTVQVTSTAV	
	591.8	592.3	189.3 (+3)	Serotransferina (f448-453)	GYLAVA	
NRRL B-50572	F1	1371.53	1372.7	686.6 (+2)	$\beta$ -CN (f129-140)	DVENLHLPLPLL
		698.6	698.3	350.2 (+2)	$\beta$ -CN (f35-40)	YPSYGL
		549.8	550.2	550.9 (+1)	$\beta$ -LG (f60-64)	ENGEC
	F2	904.2	904.5	453.1 (+2)	$\kappa$ -CN(f161-169)	TVQVTSTAV
	F3	904.2	904.5	453.1 (+2)	$\kappa$ -CN(f161-169)	TVQVTSTAV
	F5	1150.5	1150.7	576.3 (+2)	$\beta$ -CN (f199-209)	GPVRGPFPIIV
	F6	922.4	922.4	922.4 (+1)	$\alpha$ -LA (f86-93)	TDDIMCVK

(Rodriguez *et al.*, 2012)



### **III. HIPÓTESIS**

Los péptidos identificados en leche fermentada con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 inhiben la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y presentan actividad antioxidante; aún después de ser sometidos a digestión gastrointestinal simulada.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y antioxidante de péptidos específicos y su estabilidad en condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

### 4.2 Específicos

1. Evaluar la actividad inhibidora de la ECA de péptidos bioactivos específicos aislados de leche fermentada con con cepas específicas de *Lactococcus lactis* NRRL B-50571.
2. Evaluar la actividad antioxidante de péptidos específicos por el método ABTS y ORAC.
3. Determinar la estabilidad de los péptidos en condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos y Materiales

Las microplacas plásticas y estériles de 96 pocillos se obtuvieron de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ), los viales plásticos de 2 mL con tapa con rosca para micro centrifuga se obtuvieron de BioSpec Products Inc. (Bartlesville, OK), el reactivo de Bradford y albúmina sérica bovina (ASB) se obtuvieron de Bio Rad Laboratories INC (Hércules, CA, EE.UU.).

Todos los reactivos empleados se obtuvieron de Sigma (Chemical Co., St. Louis, MO. EE.UU.). Ácido 2, 2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH), acetonitrilo, ácido trifluoroacético, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, citrato trisódico dihidratado, metaborato de sodio tetrahidratado, ácido acético, ácido clorhídrico, acetato de etilo, hipuril-histidil-leucina (HHL), ECA de pulmón de conejo (EC. 3.4.15.1, 5 unidades) y fluoresceína.

### 5.2 Secuencias de Péptidos

Para este estudio se emplearon doce secuencias peptídicas (Tabla 3) seleccionadas a partir de 21 secuencias con actividad antihipertensiva identificadas en un estudio previo (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012). El criterio de selección se basó en las características estructurales de las secuencias peptídicas, por lo que se eligieron aquellas que contenían aminoácidos que han sido previamente reportadas con afinidad por la ECA (Cushman *et al.*, 1977; Gómez-Ruiz *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011)

Los péptidos fueron obtenidos en forma liofilizada con una pureza >95% a partir de la casa comercial GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EE.UU.). Dichos liofilizados se emplearon para preparar soluciones de trabajo (10 mg/mL) con extractos de leche fermentada <3kDa.

Tabla 3. Secuencias peptídicas seleccionadas

No.	Secuencia de aminoácidos
19	GYLAVA
04	HPHPHLSFMAIPP
03	YPSYGL
06	YDTQAIVQ
09	HIQKEDVPS
10	TVQVTSTAV
11	NAVPITPTLN
12	SLPQNIPPL
13	QEPVLGPVRGPFPIIV
16	YIPIQYVLS
20	DVENLHLPLPLL
17	TDDIMCVK

### 5.2.1 Determinación de la Pureza de Secuencias Péptidicas por RP-HPLC

Para verificar la pureza de cada uno de los péptidos, se realizó un análisis con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) serie 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba cuaternaria, un sistema de detección de onda variable, un sistema de desgasificación, un inyector, un colector de fracciones y un software para la adquisición y análisis de datos. Se utilizó una columna analítica ZORBAX 300 Extended-C18 de 4.6 x 250 mm, 5 µm (Agilent Technologies, EE.UU.). La fase móvil consistió de el disolvente A, una mezcla de agua y ácido trifluoroacético (1000:1 v/v), y el disolvente B una mezcla de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (1000:1 v/v), con una velocidad de flujo de 6 mL/min con un gradiente lineal de disolvente B en A que va de 5 % a 50 % de B en 60 min, 60 % a 100 % de B en

10 min y 10 min con 100 % de B. El volumen de inyección de 20  $\mu$ L de la muestra. La detección se realizó en una longitud de onda de 214 nm (Gomez-Ruiz *et al.*, 2004).

### 5.3 Microorganismo y Condiciones de Propagación

La cepa utilizada en el presente trabajo fue *Lactococcus lactis* NRRL B-50571, la cual pertenece a la colección de bacterias ácido lácticas del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) (Hermosillo, Sonora, México). Dicha cepa fue aislada previamente de alimentos lácteos elaborados con leche cruda (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008).

La cepa fue propagada inoculando (1% v/v) 10 mL de caldo M17 estéril suplementado con lactosa (0.5% p/v). El medio de cultivo se incubó 24 h a 30 °C. Posteriormente, con el fin de obtener un pre-inóculo fresco, la cepa se subcultivo 2 veces de acuerdo a lo descrito por Rodríguez-Figueroa *et al.*, (2010).

### 5.4 Inóculo y Fermentación de la Leche

El inóculo se preparó inoculando una alícuota (1 %, v/v) en 35 mL de leche en polvo reconstituida (10 %, p/v) y estéril (110 °C, 10 min). La leche inoculada se incubó a 30 °C durante 18 h. Posteriormente, una alícuota (3 %, v/v) del inóculo fue transferido a 70 mL de leche reconstituida estéril. La leche se incubó a 30 °C durante 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de fermentación, se le aplicó un tratamiento térmico (75 °C, 1 min) con el fin de detener la fermentación por inactivación de la cepa. La leche fermentada se congeló (-20°C) para su posterior análisis (Muguerza *et al.*, 2006; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010).

### 5.5 Obtención de Extractos Acuoso < 3 kDa

Leches fermentadas obtenidas como se describió anteriormente fueron descongeladas y homogeneizadas durante 20 minutos antes de su uso (Braun, Modelo 4169, Barcelona, España). Posteriormente, fueron centrifugadas a 20,000 x g (J2-21 el rotor; Beckman Coulter Inc., Brea, CA) durante 10 min a 4 °C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se ultrafiltró usando una membrana de exclusión de 3 kDa (Pall life Sciences, Ann Arbor, MI). El filtrado se utilizó para resuspender los péptidos individuales con el fin de realizar análisis posteriores.

### 5.6 Ensayo *in vitro* de la Actividad Inhibidora de la ECA del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales

Los péptidos fueron resuspendidos de manera individual con el extracto < 3kDa obtenido de la leche fermentada para evaluar la actividad IECA. Para ello se utilizó el método espectrofotométrico propuesto por Cushman y Cheung (1971), con algunas modificaciones. Se utilizó ECA en una concentración de 0.1 U mL<sup>-1</sup>. Se preparó una solución del sustrato de la ECA que contenía: HLL (5 mM), metaborato de sodio tetrahidratado (100 mM) y NaCl (300 mM); el pH del sustrato se ajustó a 8.3. La solución amortiguadora, las muestras y el agua milli-Q (blanco) se mantuvieron a 37 °C. Posteriormente se prepararon cuatro tubos como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 4. Mezcla de reacciones para la actividad IECA

<b>Tubo</b>	<b>Solución amortiguadora</b>	<b>Agua Milli-Q</b>	<b>Solución peptídica</b>	<b>ECA</b>
A	100 µL	40 µL	---	20 µL
B	100 µL	20 µL	40 µL	---
C	100 µL	---	40 µL	20 µL
D	100 µL	60 µL	---	---

Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 30 min. Posteriormente la reacción se detuvo agregando 250 µL de HCL 1M. Con el objetivo de extraer el ácido hipúrico liberado se agregaron 1000 µL de acetato de etilo a cada tubo y se homogeneizaron por agitación. Cada tubo fue centrifugado durante 10 min (1500 x g, 25 °C); a continuación, 750 µL de los sobrenadantes fueron transferidos a otros tubos y el acetato de etilo se evaporó empleando un rotavapor ajustado a 75 °C 15 min (Centrivap, Labconco, EE.UU.). Acto seguido, se agregó a cada tubo 1000 µL de agua Milli-Q y se homogeneizó para disolver el residuo de ácido hipúrico. Finalmente, se registró la absorbancia ( $\lambda= 228$  nm) en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000c Thermo Scientific, Bancroft Building Wilmington, EE.UU.), y se obtuvo el promedio de absorbancia de cada tipo de mezcla de reacción. Para cada muestra evaluada se calculó el % de actividad IECA con la siguiente formula:

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

Donde las literales indican el promedio de las absorbancias obtenidas, correspondientes a las reacciones de la Tabla 3.

### 5.7 Cuantificación de Proteína del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales

Para cuantificar la proteína de los extractos adicionados con cada uno de los péptidos se usó el método de Bradford (1976). La concentración de proteína se cuantificó a partir de una curva de calibración con ASB como testigo. Al mismo tiempo se estimó el porcentaje de la actividad IECA estableciendo una regresión lineal con ambos resultados para finalmente extrapolar los datos y obtener el IC<sub>50</sub> (Concentración necesaria de sustancia inhibitoria para inhibir el 50 % de actuación de la ECA).

## 5.8 Digestión Gastrointestinal Simulada

Los péptidos sintéticos previamente identificados en leche fermentada con *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 fueron sometidos a un proceso digestivo simulado continuo de tres etapas de acuerdo al método propuesto por Versantvoort *et al.* (2005), con algunas modificaciones. Se preparó una solución acuosa de cada uno de los péptidos sintéticos (10 mg/mL). La digestión se llevó a cabo a una temperatura controlada y agitación orbital constante (55 rpm,  $37 \pm 2$  °C) empleando una incubador de baño maría (Shaker Bath Lab Line, EE.UU.). El proceso se inició en la etapa de simulación bucal mediante la adición de 3 mL de saliva (tomada por la mañana, antes del consumo de alimentos, a partir de muestra humana, ésta fue centrifugada a  $5000 \times g$ , 20 °C, 10 min y esterilizada por medio de filtro (0.2µm) , se matuvo en condiciones de congelación (-20 °C), hasta su uso) a 2 mL de la solución acuosa de cada uno de los péptidos y se incubó durante 5 min, se ajustó el pH a 6.8. Posteriormente, en la fase gástrica se añadieron 6 mL de jugo gástrico y la mezcla se agitó durante 2 h ajustando el pH a 2-3. Por último, en la fase intestinal (intestino delgado) se añadieron 6 mL de jugo duodenal, 3 mL de bilis y 1 mL de bicarbonato 1 M, a dicha mezcla se le ajusto el pH a 6.5-7 y fue incubada por 2 h con recirculación peristáltica (2 cm/min) empleando una bomba peristáltica P1 (GE, Health Care, Biosciences). En la Tabla 4 se describen la constitución de los fluidos digestivos empleados.

Al final del proceso de digestión, los hidrolizados fueron centrifugados ( $2750 \times g$ , 5 min) y los sobrenadantes fueron colectados para su posterior análisis.

## 5.9 Determinación del Peso Molecular de las Fracciones Peptídicas

Las diferentes fracciones peptídicas colectadas después del proceso de simulación gastrointestinal fueron analizadas con un sistema de cromatografía líquida de nano-flujo acoplado a espectrometría de masas (LC/MS/MS) equipado con trampa de iones y fuente de ionización por electroespreado (Agilent 1100 Series LC/MSD Trap, Waldronn, Alemania). Se disolvieron las fracciones más activas después de la simulación



gastrointestinal de la etapa de RP-HPLC en agua Milli-Q a una concentración de 3 mg/mL y 100 mL de esta solución se aplicaron sobre una nano-columna Zorbac 300SB-C18 (150 mm x 0.75  $\mu$ m, 3.5  $\mu$ m) (Agilent Technologies, EE.UU.).

A partir de la inyección de la muestra, se inició un gradiente de solvente B (10% H<sub>2</sub>O, 90% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% y solvente A (97% H<sub>2</sub>O, 3% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 97%. La concentración del solvente B se mantuvo al 3% durante los primeros 10 min, para posteriormente incrementar linealmente de 3 a 45% en un tiempo de 10 a 20 min, de 46 a 65% entre los 20 y 33 min y de 65 a 3% entre los 33 y 40 min. El tiempo total de corrida fue de 45 min. El flujo de la columna utilizado fue de 0.2  $\mu$ L/min con un volumen de inyección de 1  $\mu$ L. Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango de 50 a 2200 masa/carga (m/z). Este procedimiento de purificación se repitió hasta obtener muestras suficientes para llevar a cabo la identificación de secuencias.

#### 5.10 Identificación de Secuencia de Péptidos

El análisis para la identificación de la secuencia de aminoácidos de las fracciones más activas de la RP-HPLC se realizó por medio de cromatografía de nano-flujo acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS). Los espectros de masas fueron obtenidos para una relación masa/carga de 300/2500 m/z. El límite de señal para los análisis de MS<sup>n</sup> fue de 30000. Los iones precursores se aislaron con una ventana de 4 m/z y se fragmentaron con una rampa de voltaje de 0.35 a 1.1. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos bajo estudio fueron obtenidas por comparación de espectros masas/masas, utilizando el servidor MASCOT (Perkins *et al.*, 1999) acoplado con la biblioteca de secuencias UniProtKB/Swiss-prot.

Tabla 5. Constituyentes y concentraciones de los diferentes jugos digestivos utilizados en el modelo de digestión *in vitro*.

	<b>Jugo Gástrico</b>	<b>Jugo Duodenal</b>	<b>Jugo Biliar</b>
<b>Solución inorgánica</b>	15.7 mL NaCl 175.3 g/L 3.0 mL NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 88.8 g/L 9.2 mL KCL 89.6 g/L 18 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22.2 g/L 10 mL NH <sub>4</sub> Cl 30.6 g/L 6.5 mL HCL 37 % g/g	40 mL NaCl 175.3 g/L 40 mL NaHCO <sub>3</sub> 84.7 g/L 10 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g/L 6.3 mL KCL 89.6 g/L 180 µL HCL 37 % g/g	30 mL NaCl 175.3 g/L 68.3 mL NaHCO <sub>3</sub> 84.7 g/L 4.2 mL KCL 89.6 g/L 150 µL HCL 37 % g/g
<b>Solución orgánica</b>	10 mL de glucosa 65 g/L 10 mL de ácido Glucorónico 2/L 3.4 mL de urea 25 g/L	4 mL de Urea 25 g/L	10 mL de urea 25 g/L
<b>Agregar a la solución orgánica + la inorgánica</b>	1 g de BSA 2.5 g de pepsina 3 g de mucina	9 mL de CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22.2 g/L 1 g de BSA 9 g de pancreatina 1.5 g de lipasa	10 mL CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 22.2 g/L 1.8 g BSA 30 g de bilis
<b>pH</b>	1.30 ± 0.02	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2

Versantvoort *et al.*, (2005)

### 5.11 Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ABTS

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos acuosos adicionados con los diferentes péptidos siguiendo la metodología propuesta por Re *et al.* (1999), antes y después de la simulación gastrointestinal. El método consistió en producir en oscuridad el radical ABTS mediante la solución ABTS 7mM con persulfato de potasio 2.45 mM (1:0.5, v/v). Se mezcló y se incubó en oscuridad durante 16 h a 30 °C. Una vez formado el radical, este fue diluido con PBS (0.05 mM, pH 7.2) hasta obtener una  $DO_{734nm}$  de  $0.7 \pm 0.02$ . Posteriormente, se tomaron 10  $\mu$ L del extracto de la muestra y se le adicionó 200  $\mu$ L de la solución diluida del ABTS. Finalmente la mezcla fue leída a los 7 min a 734 nm en un espectrofotómetro multimodal (SpectraMax M3, Molecular Devices, USA).

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

### 5.12 Capacidad Antioxidante Mediante el Ensayo ORAC

Adicionalmente, se determinó la actividad antioxidante de los extractos acuosos adicionados con los diferentes péptidos siguiendo la metodología propuesta por Dávalos *et al.*, (2004), con algunas modificaciones. El ensayo consistió en mezclar 20  $\mu$ L de los extractos acuosos antes y después de la simulación gastrointestinal con 120  $\mu$ L de una solución de fluoresceína 70 nM en un pozo de una microplaca negra (96 pocillos). La cual fue incubada a 37 °C por 15 min. Una vez transcurrido el periodo de incubación, rápidamente se agregaron 60  $\mu$ L de una solución de 2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro (AAPH; Sigma Chemical Co. 12 mM usando una micropipeta multicanal. Acto seguido se registró el cambio de fluorescencia tomando una lectura 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  $\text{fluorescencia}_{\text{blanco}=0} / \text{fluorescencia}_{\text{muestra}=0}$ . Subsecuentemente, los datos

normalizados de fluorescencia fueron graficados con respecto al tiempo con el 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  $f_0$  corresponde a la fluorescencia inicial a tiempo cero y  $f_i$  corresponde a la fluorescencia al tiempo  $i$ .

Las áreas netas de protección de la muestra se calcularon restando el S del blanco. Los resultados se expresaron como equivalentes Trolox, para lo cual se construyó una curva estándar de cinco puntos con Trolox como patrón (0-100  $\mu\text{M}$ ).

### 5.13 Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar de una ANOVA de una vía para cada uno de los análisis (evaluación de la ECA *in vitro*, actividad antioxidante y simulación gastrointestinal). Se llevó a cabo un análisis de t-pareada para verificar el efecto en la actividad inhibidora de la ECA y la actividad antioxidante antes y después de la simulación gastrointestinal. Las diferencias significativas fueron comparadas por la prueba de Tukey-Kramer al 95 % de confianza, utilizando el paquete estadístico NCSS, 2007 (Kaysville, UT, EE.UU.). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Ensayo *in vitro* de la Actividad Inhibidora de la ECA del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales

En este ensayo se evaluó la actividad inhibidora de la ECA de los péptidos seleccionados para el estudio adicionados con el extracto acuoso obtenido de la leche fermentada por la cepa *Lactococcus lactis* NRRL B-50571. Se obtuvo el porcentaje de inhibición de cada uno de los péptidos (%IECA), y el IC<sub>50</sub> de cada uno de ellos. Los valores del % de inhibición de la ECA estuvieron en un rango de 53.8-96.3 %; mientras que los valores de IC<sub>50</sub> estuvieron en un rango de 0.0289-0.1059 mg/mL. En la Figura 4 se representan los diferentes valores de inhibición de la ECA así como el IC<sub>50</sub> obtenido para los diferentes péptidos.

Existen investigaciones previas en las que se ha evaluado la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas por diferentes bacterias; tal es el caso de González-Córdova *et al.*, (2011), quienes evaluaron la inhibición de la ECA de extractos de leche obtenidos tras la fermentación con cepas específicas de *Lactobacillus* encontrando valores que oscilaron entre 42.04% y 86.66%, mientras que Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010) evaluaron la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos de leche fermentada por cepas específicas de *Lactococcus*, encontrando valores de 74% a 98% de inhibición; lo cual sugiere que la actividad puede ser no solo genero- sino también cepa-dependiente.

El péptido 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV), presentó el % IECA más bajo (53.8 %), esto puede ser atribuido al número de aminoácidos que conforman la secuencia peptídica, ya que en estudios previos se ha observado que entre más larga sea la cadena de aminoácidos la actividad inhibitora de la enzima puede disminuir, asimismo la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica como es el caso de glutamina y ácido glutámico disminuyen o anulan la actividad inhibitora de la ECA (Cushman *et al.*, 1977), lo cual pudo contribuir en este péptido. Asimismo, existen estudios en los que se evaluó la actividad de diferentes péptidos, encontrando que aquellos péptidos de mayor número de aminoácidos presentaron la actividad más baja de inhibición; por ejemplo, Marie-Claude *et al.* (2004) sintetizaron diferentes péptidos, y dentro de los resultados obtenidos se observó que el péptido HKEMPFPKYPVEPF, no presentó valores de IC<sub>50</sub>, por lo que estos autores sugieren que la actividad de la IECA es altamente dependiente de la estructura y número de aminoácidos.

Por otro lado, el péptido 19 (GYLAVA), presentó el valor de inhibición más alto (96.3%), esto puede ser atribuido a que los aminoácidos que lo constituyen son hidrofóbicos; ya que se ha demostrado en otros estudios que aminoácidos hidrofóbicos compiten por el centro activo de la ECA y pueden inhibir su actividad, logrando con ello la disminución de la presión arterial (Cushman *et al.*, 1977).

En lo que respecta a los péptidos 4 (HPHPLSFMAIPP), 3 (YPSYGL), 10 (TVQVTSTAV), 16 (YIPIQYVLS), 20 (DVENLHLPLPLL) y 17 (TDDIMCVK), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para el % de inhibición de la ECA. Analizando los aminoácidos que constituyen a dichas secuencias peptídicas, se pudo observar la presencia de aminoácidos hidrofóbicos, entre los que destacaron, prolina, leucina, valina e isoleucina, los cuales pueden interactuar con algunos de los tres sitios activos de la ECA, competir con el sustrato e inhibirla. Por otro lado, se pudo observar la presencia de aminoácidos como la prolina en las diferentes secuencias peptídicas, y el tripéptido IPP en el péptido 4, pudiendo atribuir el efecto reductor a la presencia de estos ya que estudios previos han puesto en evidencia que los tripéptidos IPP y VPP, tienen un alto potencial en la reducción de la presión arterial (Nakamura *et al.*, 1995).

En el caso de los péptidos 4 (HPHPHLSFMAIPP) y 20 (DVENLHLPLPLL), el efecto inhibitorio de la enzima podría atribuirse principalmente a la presencia de prolina, ya que la prolina como aminoácido en el extremo C-terminal ha sido reconocido como uno de los residuos más favorables para la unión del péptido al sitio activo de la ECA, además se ha postulado que la estructura del anillo de la prolina es la que permite la interacción con el residuo positivo del sitio activo de la enzima (Cushman *et al.*, 1977).

Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de la ECA del extracto menor a 3 kDa de leche fermentada por la cepa *Lactococcus lactis* NRRL B-50571, obteniendo el valor más alto de inhibición (97.1%) comparándolo con el de los péptidos individuales, esto puede atribuirse al efecto de todos los péptidos contenidos en el extracto. Sin embargo, los péptidos 4 (HPHPHLSFMAIPP), 3 (YPSYGL), 6 (YDTQAIVQ), 11 (NAVPITPTLN) y 12 (SLPQNIPPL), también presentaron porcentajes de inhibición por encima del 90%, lo que los posiciona como potenciales inhibidores de la enzima

Por otro lado, en la Figura 5 también se muestran los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para cada uno de los péptidos evaluados. Valores de IC<sub>50</sub> bajos se traducen en una potente actividad IECA ya que es necesaria una concentración muy pequeña de sustancia inhibitoria para disminuir la actuación de la enzima.

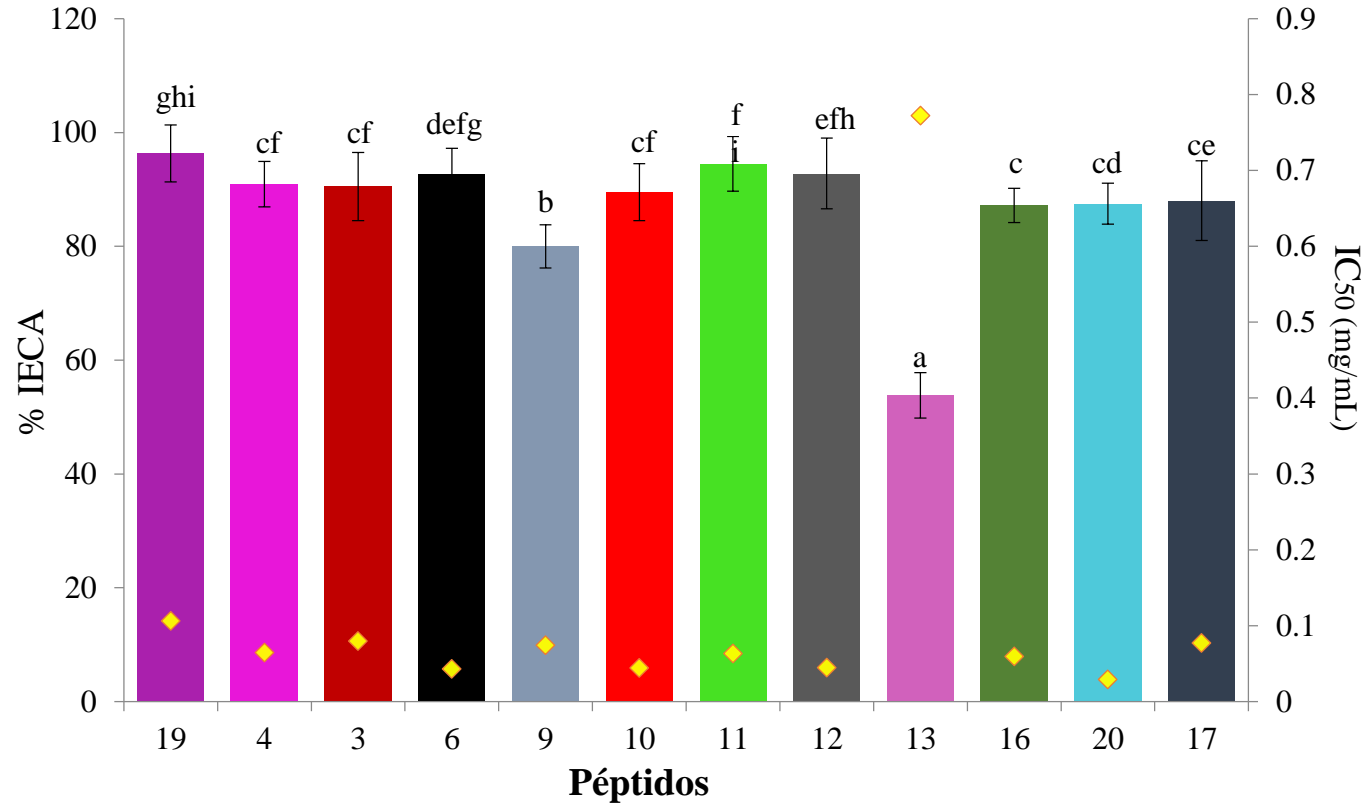
Los péptidos 20 (DVENLHLPLPLL), 12 (SLPQNIPPL), 6 (YDTQAIVQ) y 10 (TVQVTSTAV), fueron los que presentaron los menores valores de IC<sub>50</sub> (0.0289, 0.0433, 0.0427 y 0.0442 mg/mL, respectivamente). Existen estudios que han reportado valores de IC<sub>50</sub> mayores a los obtenidos en la presente investigación; por ejemplo, Quirós *et al.*, 2007 evaluaron diferentes péptidos, obteniendo IC<sub>50</sub> de 2.24 mg/mL para el péptido VLGPVRGPFPIIV y 0.770 mg/mL para el péptido VVVPPF. Ren *et al.*, (2011) reportó valores de IC<sub>50</sub> de 0.368, 0.226, y 0.254 mg/mL para los péptidos WVPSV, YTVF, y VVYPW, respectivamente.

Quirós *et al.* (2007) previamente describió el péptido LHLPLP con un valor de IC<sub>50</sub> de 0.004 mg/mL. Dicho fragmento coincide con un segmento del péptido 12

(DVENLHLPLPLL). Sin embargo, este péptido presentó un valor de  $IC_{50}$  de 0.0433 mg/mL, lo cual evidencia la importancia del extremo N-terminal, ya que se pudo observar la posible influencia que tiene el fragmento DVEN, pues hace que el valor de  $IC_{50}$  aumente considerablemente. Esta observación concuerda con lo reportado por Hernández-Ledesma *et al.* (2002), quienes concluyeron que aunque el extremo N-terminal no es un factor determinante, si juega un papel importante en la inhibición de la ECA.

En el caso de los péptidos 3 (SLPQNIPPL) y 5 (YIPIQYVLS) con valores de  $IC_{50}$  de 0.4401 y 0.1537 mg/mL, respectivamente, al ser valores bajos, concuerda con lo reportado por Gómez-Ruiz *et al.*, 2004, ya que señalan que la presencia de un residuo de Leucina en la posición C-terminal es favorable para la inhibición de la ECA.





**Figura 4.** Valores de IC<sub>50</sub> (rombos) y % IECA (barras) de péptidos específicos. Los resultados representan la media ± DE. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre péptidos (p<0.05).

## 6.2 Actividad Antioxidante del Extracto < 3kDa Adicionado con los Péptidos Individuales.

En general los métodos para determinar la capacidad antioxidante se basan en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia de antioxidantes, siendo los más usados aquéllos que generan radicales libres en medios específicos y son fácilmente detectados por técnicas fotométricas (Ghiselli *et al.*, 2000). Frankel y Meller (2000) indican que la medida de la capacidad antioxidante depende de diferentes factores, por lo que es necesario utilizar distintos métodos con diferentes condiciones de oxidación para obtener información más amplia y completa.

Por lo anterior, la capacidad antioxidante del extracto < 3kDa de la leche fermentada por la cepa *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 adicionada con cada uno de los péptidos individuales fue evaluada mediante los métodos ABTS y ORAC.

En el Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos a través del método ABTS (ácido 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolino-6-sulfónico), en el cual éste es oxidado para formar el radical coloreado ABTS <sup>•+</sup> el cual es reducido nuevamente a un compuesto incoloro si la muestra de interés contiene antioxidantes donadores de hidrógeno (Hernández-Ledesma *et al.*, 2007; Quirós *et al.*, 2007; Virtanen *et al.*, 2007). Asimismo permite calcular la actividad neutralizadora del radical libre previamente formado comparándolo con una sustancia estándar antioxidante.

Los valores de TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) obtenidos en este estudio para los diferentes péptidos, se encontraron en un rango de 838.03  $\mu\text{mol/g}$  y 2547.22  $\mu\text{mol/g}$ , siendo el péptido 17 (TDDIMCVK), el que presentó la mejor actividad antioxidante con un alto valor de equivalentes trolox y el péptido 4 (HPHPHLSFMAIPP), el que presentó la actividad más baja con un valor de 838.03  $\mu\text{mol/g}$  equivalentes trolox.

La mayor actividad antioxidante del péptido 17 (TDDIMCVK), puede ser atribuida a las características de los aminoácidos que lo componen, ya que en su mayoría son aminoácidos hidrofóbicos, y pudieran ser éstos los que captan el radical y por lo tanto producen un efecto antioxidante. Al respecto existen estudios sobre la relación estructura-actividad de los péptidos antioxidantes, y se ha evidenciado el papel fundamental de ciertos aminoácidos hidrofóbicos en el desarrollo de esta actividad (Cushman y Cheung, 1980).

Quirós *et al.* (2007) demostraron, por medio de péptidos sintéticos, que tanto la tirosina como el triptófano se comportan como donadores de hidrógeno debido al grupo fenol e indol que contienen, por medio del cual presentan actividad neutralizante de radicales libres. En este estudio los péptidos 19 (GYLAVA), 3 (YPSYGL), 6 (YDTQAIVQ) y 16 (YIPIQYVLS), son los únicos que contenían tirosina y triptófano en su secuencia, y presentaron actividad antioxidante moderada, con valores de TEAC comprendidos entre 861.56 y 1015.14  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox/ $\mu\text{mol}$  de péptido, por lo que la actividad podría ser atribuida a la presencia de estos aminoácidos.

Por otro lado los resultados obtenidos por el método ORAC se muestran en la Tabla 6, este método modificado por Ou *et al.*, (2001), mide la inhibición antioxidante de las reacciones de oxidación inducidas por radicales peróxido, es decir, rompiendo la reacción en cadena de transferencia de átomos de hidrógeno (Cao y Prior, 1998). La cuantificación se lleva a cabo mediante la técnica del área bajo la curva de descenso de fluorescencia del sustrato oxidable, que integra los porcentajes de inhibición del radical libre con el tiempo completo de reacción. Como patrón y para la expresión de resultados se utiliza el antioxidante estándar Trolox (Ou *et al.*, 2001).

Para los péptidos evaluados en este estudio se obtuvieron valores entre 543.27 y 1353.35  $\mu\text{mol/g}$  de equivalentes trolox, siendo los péptidos 12 (SLPQNIPPL) y 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV) los que obtuvieron los valores mínimos y máximos, respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo ORAC fueron diferentes en comparación con los resultados obtenidos para el ensayo ABTS; sin embargo es necesario mencionar que entre las ventajas del método ORAC está el proveer una fuente controlable de radicales libres, que se puede cambiar, junto con el solvente, según se desee detectar antioxidantes hidrofílicos o hidrofóbicos; además el mecanismo de reacción es similar al de los oxidantes fisiológicos (Bisby *et al.*, 2008).

Se observó también que los péptidos 19 (GYLAVA9), 4 (HHPHLSFMAIPP) y 9 (HIQKEDVPS), cuyos valores de equivalentes trolox fueron de 721.02, 702.1 y 732.22  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente; fueron los que obtuvieron los valores más bajos y no se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ )

Tabla 6. Capacidad antioxidante por el método ABTS y ORAC del extracto < 3kDa adicionados con los péptidos individuales.

Péptido	ABTS	ORAC
	TEAC ± DE (µmol/g)	TEAC ± DE (µmol/g)
GYLAVA	1002.75 ± 57.68 <sup>a</sup>	721.02 ± 8.35 <sup>b</sup>
HPHPHLSFMAIPP	838.03 ± 36.08 <sup>a</sup>	702.1 ± 11.06 <sup>b</sup>
YPSYGL	861.56 ± 31.74 <sup>a</sup>	1298.8 ± 37.48 <sup>f</sup>
YDTQAIVQ	954.45 ± 58.39 <sup>a</sup>	1139.52 ± 20.21 <sup>e</sup>
HIQKEDVPS	1000.27 ± 9.35 <sup>a</sup>	732.22 ± 9.11 <sup>b</sup>
TVQVTSTAV	887.57 ± 113.85 <sup>a</sup>	872.88 ± 23.32 <sup>c</sup>
NAVPITPTLN	924.72 ± 39.32 <sup>a</sup>	959.9 ± 3.06 <sup>d</sup>
SLPQNIPPL	899.95 ± 34.52 <sup>a</sup>	543.27 ± 7.68 <sup>a</sup>
QEPVLGPVRGPFPIIV	964.36 ± 82.61 <sup>a</sup>	1353.35 ± 22.51 <sup>g</sup>
YIPIQYVLS	1015.14 ± 15.01 <sup>a</sup>	1254.84 ± 18.02 <sup>f</sup>
DVENLHLPLPLL	923.49 ± 47.34 <sup>a</sup>	896.07 ± 3.51 <sup>c</sup>
TDDIMCVK	2547.22 ± 465.5 <sup>b</sup>	1296.53 ± 14.50 <sup>f</sup>

Los valores representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Diferente literal indica diferencias significativas (p<0.05) entre péptidos.

## 6.3 Digestión Gastrointestinal Simulada

### 6.3.1 Actividad Inhibidora de la ECA de Péptidos Bioactivos

En este ensayo todos los péptidos fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada para evaluar la resistencia a las diferentes condiciones del tracto gastrointestinal. Se llevó a cabo una hidrólisis con saliva, jugo gástrico y jugo duodenal, en las condiciones que se describen en la sección de metodología. El sobrenadante obtenido después de la simulación se ultrafiltró y se obtuvo el extracto menor a 3 kDa.

Del extracto menor a 3 kDa se obtuvo el % de inhibición de la ECA, el  $IC_{50}$ , la actividad antioxidante y un análisis mediante RP-HPLC. Los resultados de cada actividad fueron comparados con los obtenidos antes de la digestión gastrointestinal.

En la Figura 6 se muestra el %IECA e  $IC_{50}$  de los péptidos sometidos al proceso gastrointestinal simulado, obteniendo valores en el rango de 19.1 a 97.7 % de inhibición de la ECA y valores de  $IC_{50}$  de 0.0574 a 0.2809 mg/mL.

En cuanto al % de inhibición de la ECA, se observó que todos los péptidos fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) en comparación con el porcentaje obtenido antes de ser sometidos al proceso gastrointestinal, siendo el péptido 3 (YPSYGL) el que obtuvo el valor más bajo (19.1 %) y el péptido 10 (TVQVTSTAV) el que obtuvo el valor más alto (97.7 %).

Por otra parte, para el péptido 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV) se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición de la ECA (de 53.8 a 94.9 %) y una disminución del  $IC_{50}$  (de 0.0772 a 0.0574 mg/mL), después de ser sometidos al proceso gastrointestinal simulado. De manera similar en la investigación realizada por Tavares *et al.* (2011), se observó el mismo comportamiento al evaluar 11 péptidos de los cuales ninguno fue resistente a la actividad de las diferentes enzimas utilizadas en la simulación gastrointestinal. Los autores observaron que el péptido DAQSAPLRVY disminuyó su

IC<sub>50</sub> de 13.0 ± 1.0 a 9.0 ± 0.9 µg/mL después de ser sometidos al proceso de simulación. Dicho comportamiento podría ser atribuido a la presencia de prolina en el extremo C-terminal, ya que se ha demostrado que este aminoácido mejora la unión con la enzima (Cheung *et al.*, 1980). Se postula que la superioridad de la prolina es debido a la estructura del anillo rígido de este aminoácido que puede bloquear al grupo carboxilo en una conformación favorable para la interacción con el residuo cargado positivamente en el sitio activo de la enzima (Cushman *et al.*, 1977).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los valores de IC<sub>50</sub> para los péptidos 19 (GYLAVA), 4 (HPHPHLSFMAIPP), 9 (HIQKEDVPS), 11 (NAVPITPTLN) y 17 (TDDIMCVK) (0.1111, 0.0808, 0.078, 0.0633 y 0.0854 mg/mL, respectivamente) después de haber sido sometidos a la simulación gastrointestinal, por lo que éstos péptidos fueron seleccionados para análisis mediante RP-HPLC-MS/MS con el objetivo de identificar los fragmentos liberados por la acción de las enzimas gastrointestinales (Tabla 7).

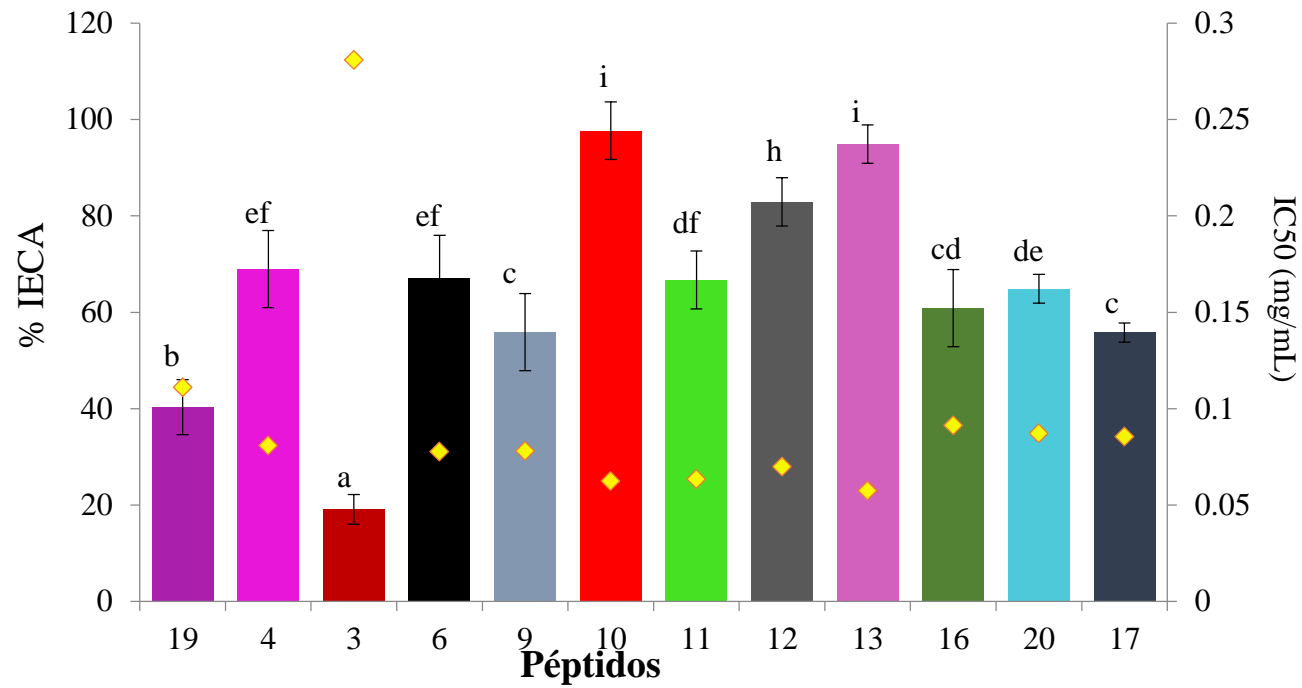
Al no encontrar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) antes y después de la simulación gastrointestinal en los péptidos mencionados anteriormente, resulta conveniente evaluar dicho efecto por medio de un modelo *in vivo*, y posteriormente podrían ser utilizados para la elaboración de alimentos funcionales ya que permanecieron activos durante la digestión gastrointestinal (Lee, 2002). Además en el caso del péptido 4 (HPHPHLSFMAIPP), 9 (HIQKEDVPS) y 11 (NAVPITPTLN), la prolina podría ser la que provoque la resistencia de los péptidos a las enzimas digestivas, ya que se ha observado en tripéptidos con PP en el extremo C-terminal que son resistentes a determinadas peptidasas (Fitzgerald y Meisel, 2000). Otro autores, también concluyeron que algunos péptidos que contenían Prolina en el extremo C-terminal o en penúltima posición resistieron la incubación con pepsina y extracto pancreático (Gómez-Ruiz *et al.*, 2004).

En el caso de los péptidos 3 (YPSYGL), 16 (YIPIQYVLS) y 20 (DVENLHLPLPLL), cuyos valores de IC<sub>50</sub> fueron de 0.2809, 0.0913 y 0.0871 mg/mL, respectivamente, se

observó un aumento considerable en comparación con el  $IC_{50}$  obtenido inicialmente, probablemente debido a que los péptidos fueron fragmentados por las enzimas gastrointestinales a péptidos con menor % inhibición de la enzima.

Este ensayo arrojó resultados significativos en cuanto al comportamiento de los péptidos frente a las enzimas gastrointestinales, ya que se sabe que una forma de garantizar que los péptidos tengan efecto *in vivo* es probar su resistencia a las enzimas gástricas y en general a las condiciones gastrointestinales (Vermeirssen *et al.*, 2003; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004).





**Figura 5.** Valores de IC<sub>50</sub> (rombos) y % IECA (barras) de péptidos específicos sometidos a simulación gastrointestinal. Los resultados representan la media ± DE. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre péptidos (p<0.05),

Tabla 7. IC<sub>50</sub> de Péptidos antes y después de ser sometidos a modelo de digestión gastrointestinal simulada (SGI)

Fragmento de la proteína	Péptido	IC <sub>50</sub> (mg/mL)		Fragmentos liberados después de la digestión
		antes de SGI	después de SGI	
Serotransferrin (f448–453)	GYLAVA	0.1059*	0.1111*	GYLAVA, GYLAV, GYLA, GYL, GY, YLAVA, YLAV, YLA, YL, LAVA, LAV, LA, AVA
κ-CN (f98–110)	HPHPHLSFMAIPP	0.0641*	0.0808*	FMAIPP, MAIPP, HLSF, SMFA, PHLS, MAIP, AIPP, HPH, SFM, FMA, LSF, PHL, MAI, IPP, AIP, FM, HL, SF, PH, HP, IP
αS1-CN (f80–88)	HIQKEDVPS	0.0738*	0.078*	HIQK, HIQ, IQKED, IQKE, QKEDVP, QKED, KEDVPS, KEDVP, KEDV, KED, EDVPS, EDVP, DVPS, VPS, EDV, DVP, DV, PS, S
αS2-CN (f115–124)	NAVPITPTLN	0.0631*	0.0633*	NAVPIT, NAVPI, NAVP, AVPITP, AVPIT, VPITPT, PITPTL, ITPTLN, TPTLN, PTLN, TPTL, PITP, VPIT, ITPT, AVPI, TLN, ITP, VPI, PIT, PTL, TPT, NAV, AVP, LN, IT, TL, PI, VP, PT, TP, VP, AV, NA.

\*No existen diferencias significativas antes y después de ser sometidos a simulación gastrointestinal ( $p > 0.05$ ).

### 6.3.2 Determinación del Perfil de Péptidos por RP-HPLC

Con el objetivo de caracterizar los péptidos evaluados en el estudio, verificar la pureza y el tiempo de retención, todos los péptidos adicionados con el extracto acuoso obtenido de la leche fermentada por la cepa *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 fueron sometidos a un análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución. De la Figura 8 a la 18 se muestran los cromatogramas de los diferentes péptidos.

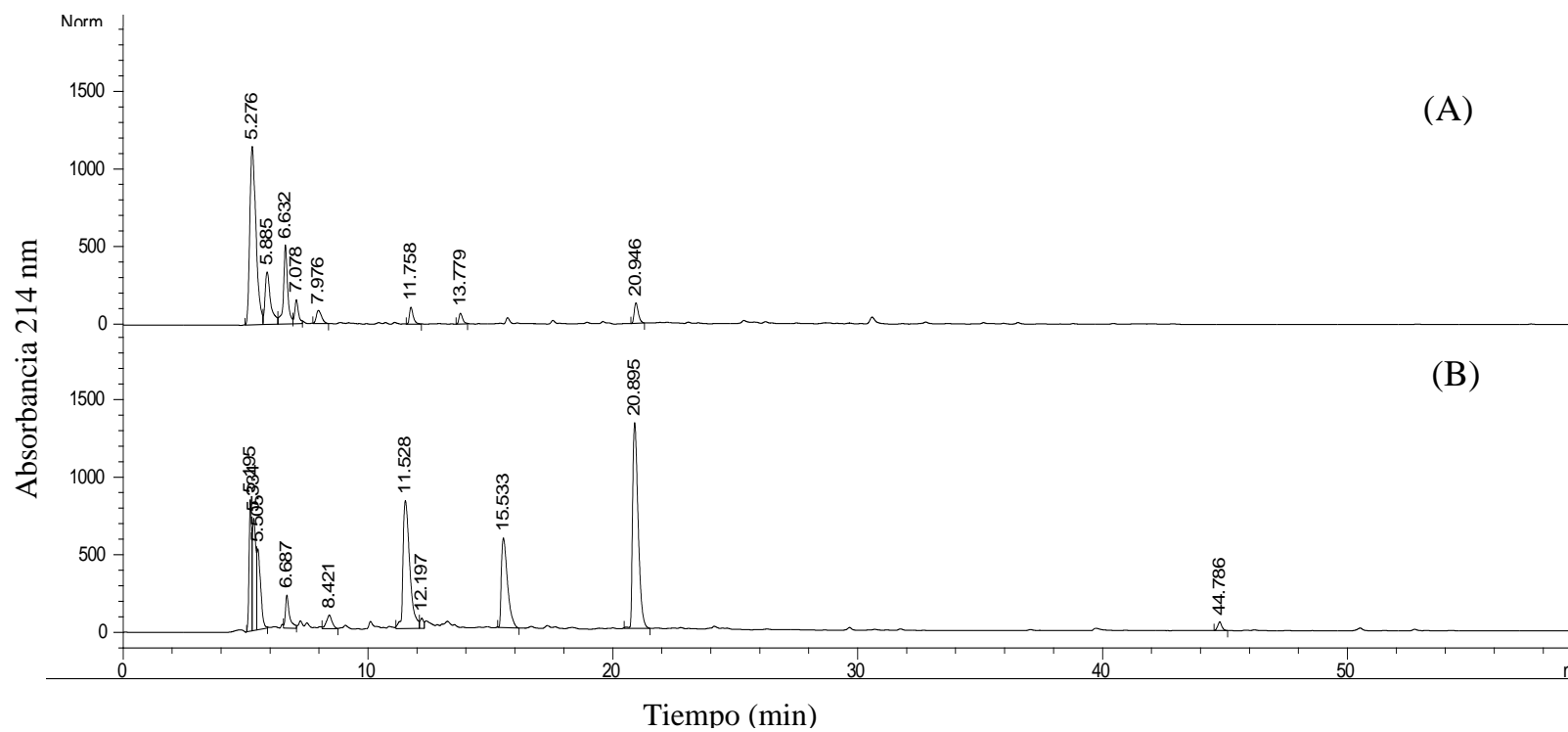
Adicionalmente se llevó a cabo el análisis del extracto < 3kDa de la leche fermentada con la cepa *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 (Figura 7) para comparar con los demás péptidos. Se pudo observar la presencia de péptidos en el extracto; sin embargo cuando se comparó el cromatograma obtenido para el extracto con el de los diferentes péptidos, se pudo observar que todos los péptidos evaluados mostraron un tiempo de retención mayor, y es muy evidente la presencia de cada uno de ellos en el extracto.

En los diferentes cromatogramas se observó que las muestras analizadas contenían péptidos cuyas masas están por debajo de los 3 kDa.

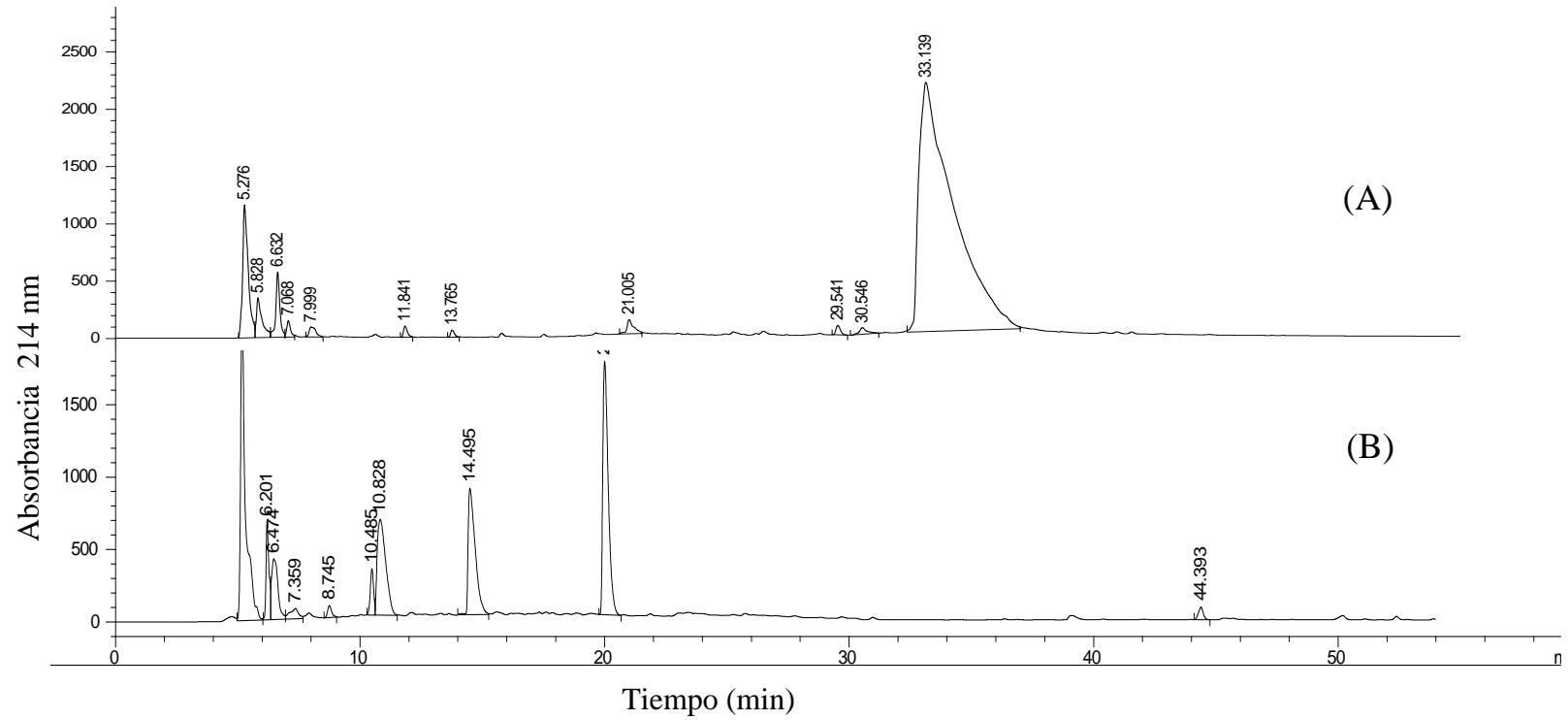
Por otro lado, mediante el análisis de RP-HPLC se pudieron observar los picos correspondientes a los diferentes péptidos, los cuales variaron en el tiempo de retención, encontrando valores desde 18.268 min para el péptido 9 (HIQKEDVPS) y 41.234 min para el péptido 20 (DVENLHLPLPLL), siendo estos los valores máximos y mínimos. Por los tiempos de retención obtenidos en RP-HPLC, se pudo notar que 10 de los péptidos evaluados eluyeron después de la mitad del gradiente (minuto 20), lo que indicó que son moléculas hidrófobas

Todos los cromatogramas mostrados en las Figuras con la letra (A), sirvieron para comparar con el análisis por RP-HPLC después de la simulación gastrointestinal (B).

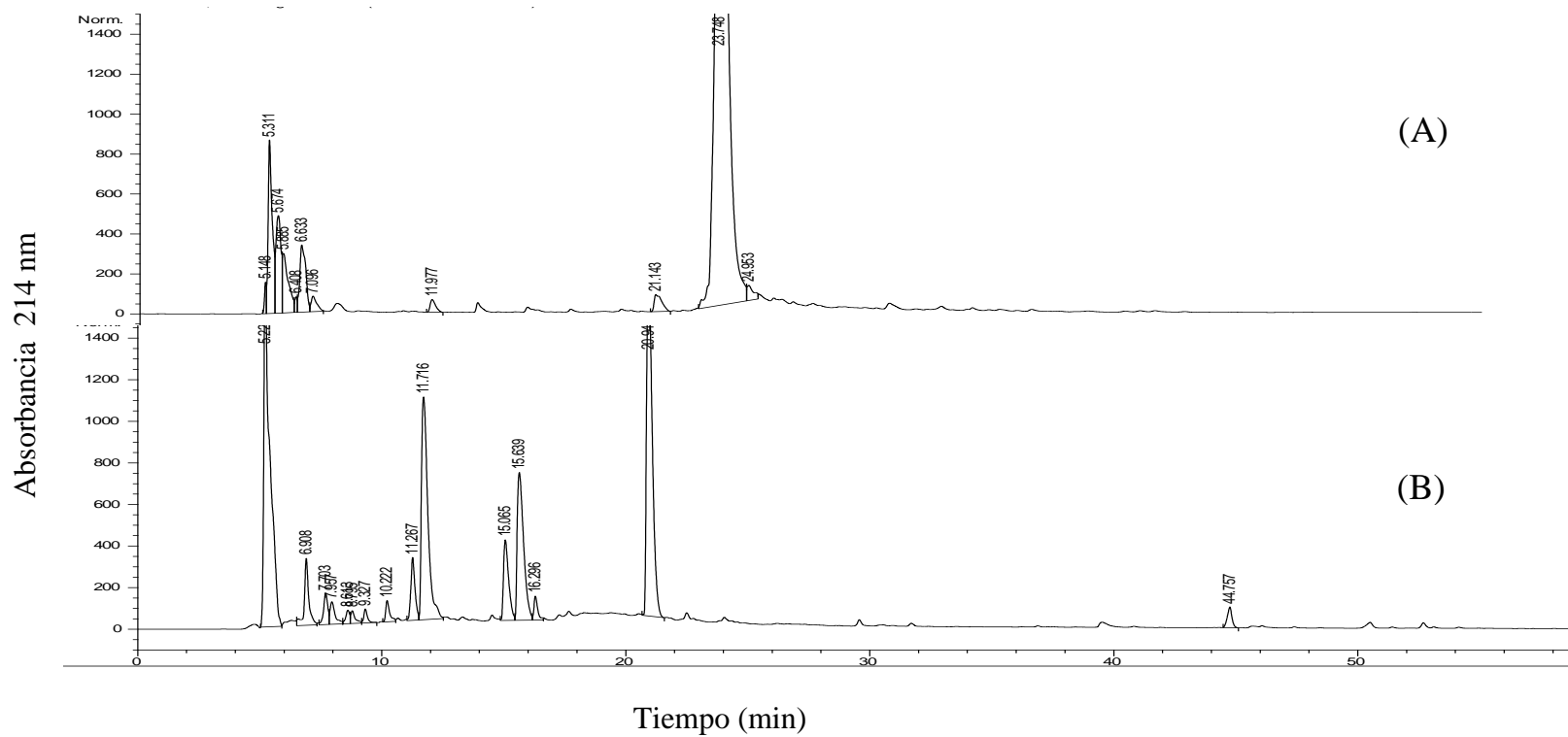
Como se puede apreciar en las distintas Figuras la mayoría de los cromatogramas presentaron una mezcla compleja de péptidos. Asimismo, todos los péptidos (Figura 7B-18B) fueron fragmentados como resultado de la exposición a las enzimas gastrointestinales.



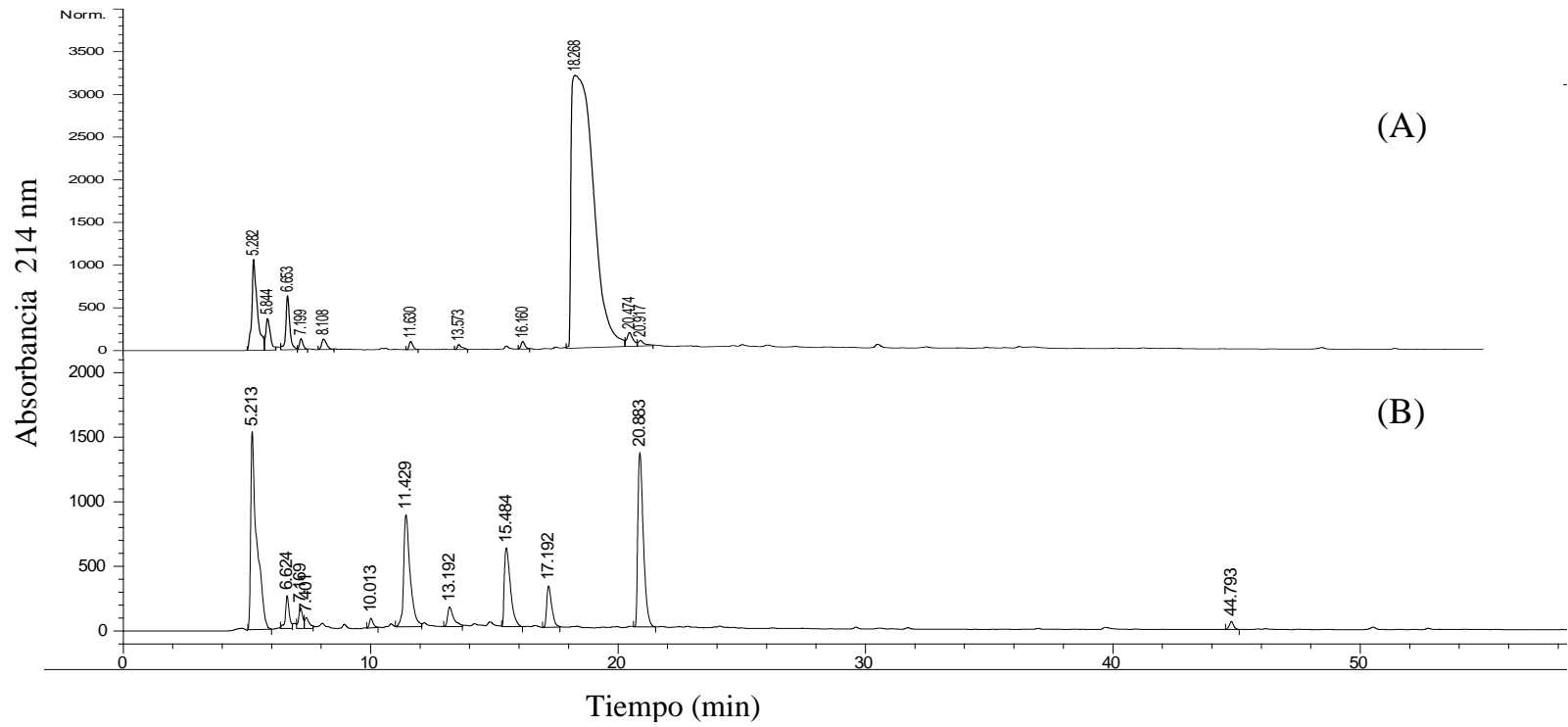
**Figura 6.** Cromatogramas de RP-HPLC del extracto < 3 kDa de la leche fermentada por la cepa *Lactococcus lactis* NRRL B-50571, antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



**Figura 7.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 4 (H<sub>2</sub>N-HPHPLSFMAIPP) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.

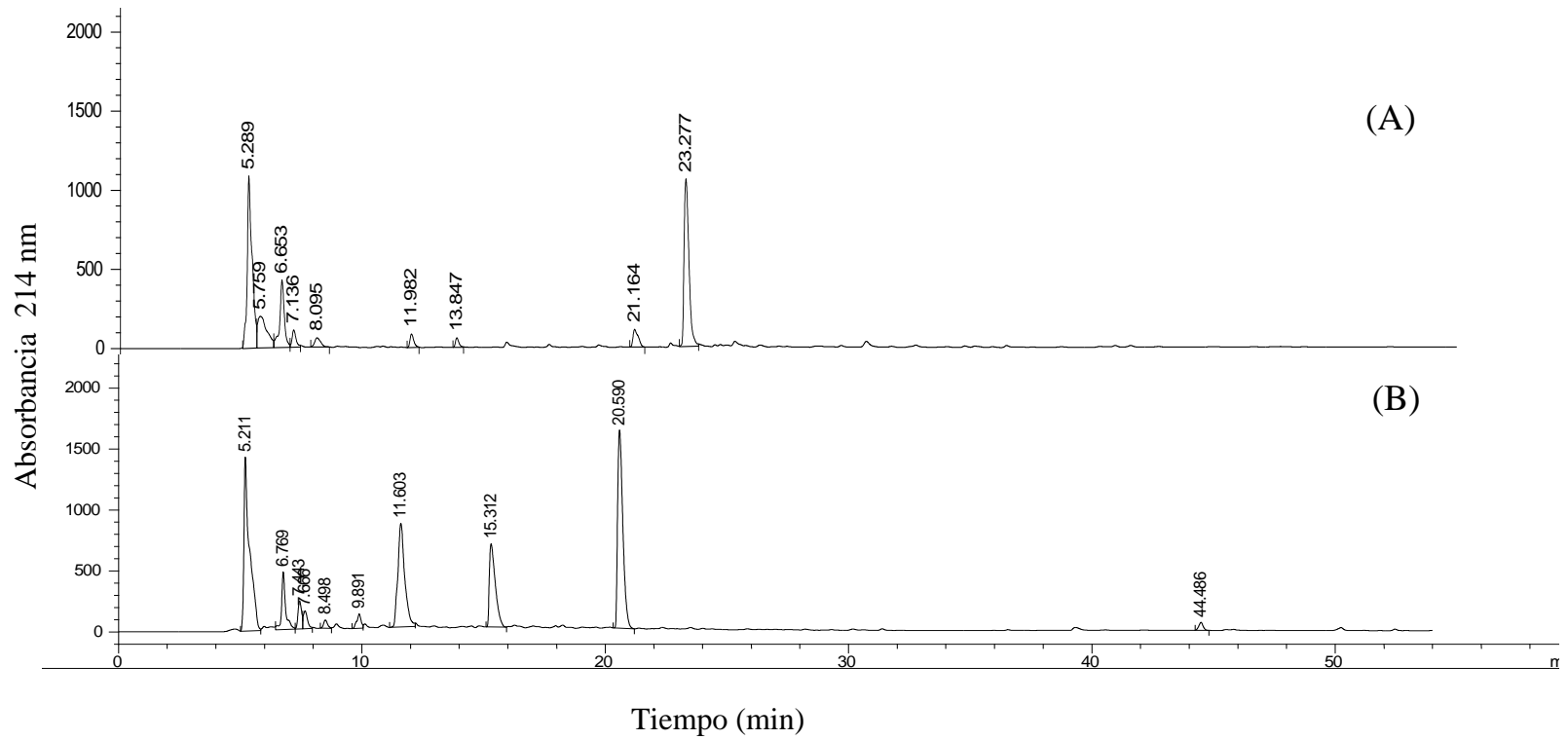


**Figura 8.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 6 (YDTQAIVQ) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.

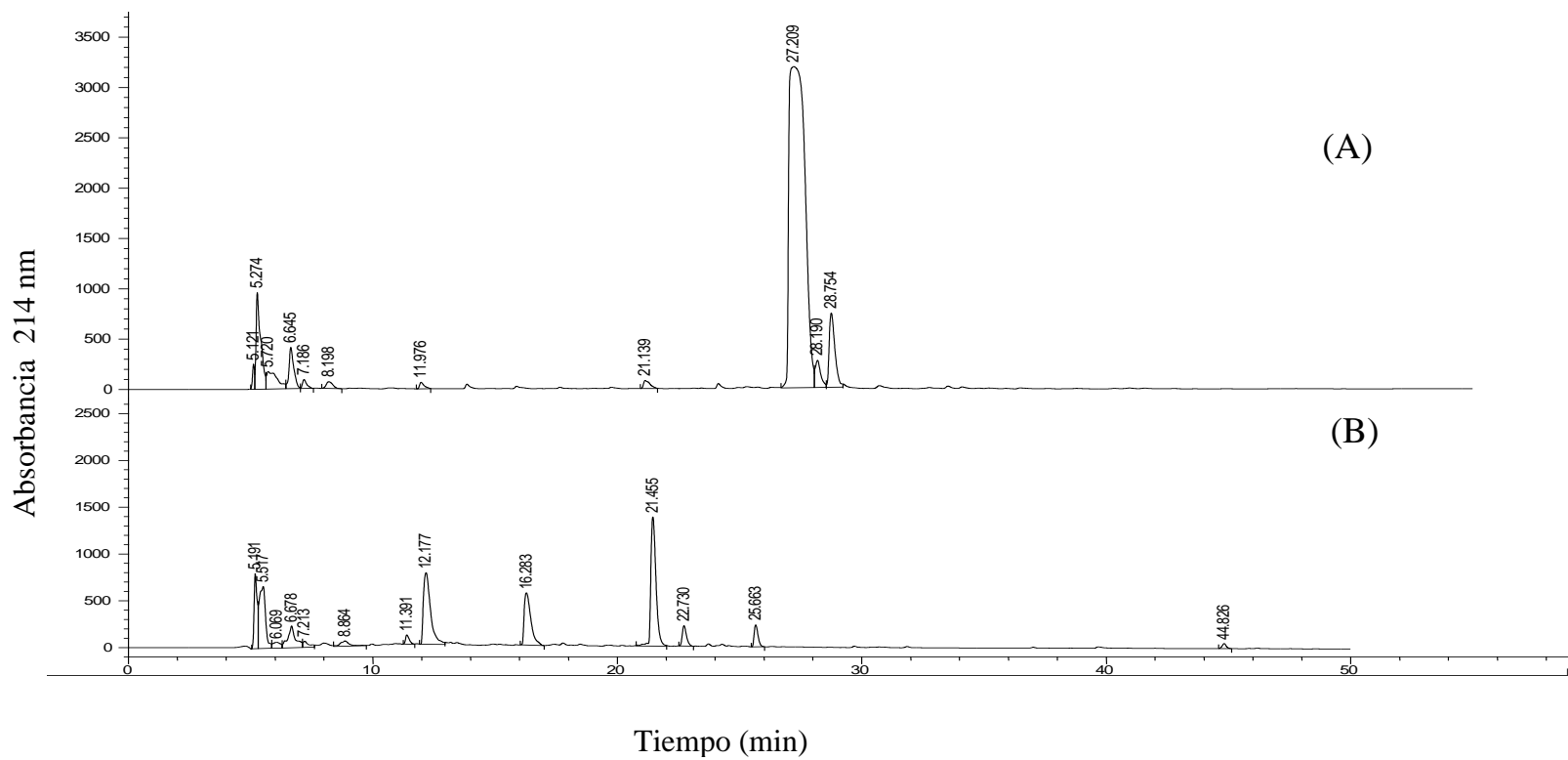


**Figura 9.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 9 (HIQKEDVPS) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.

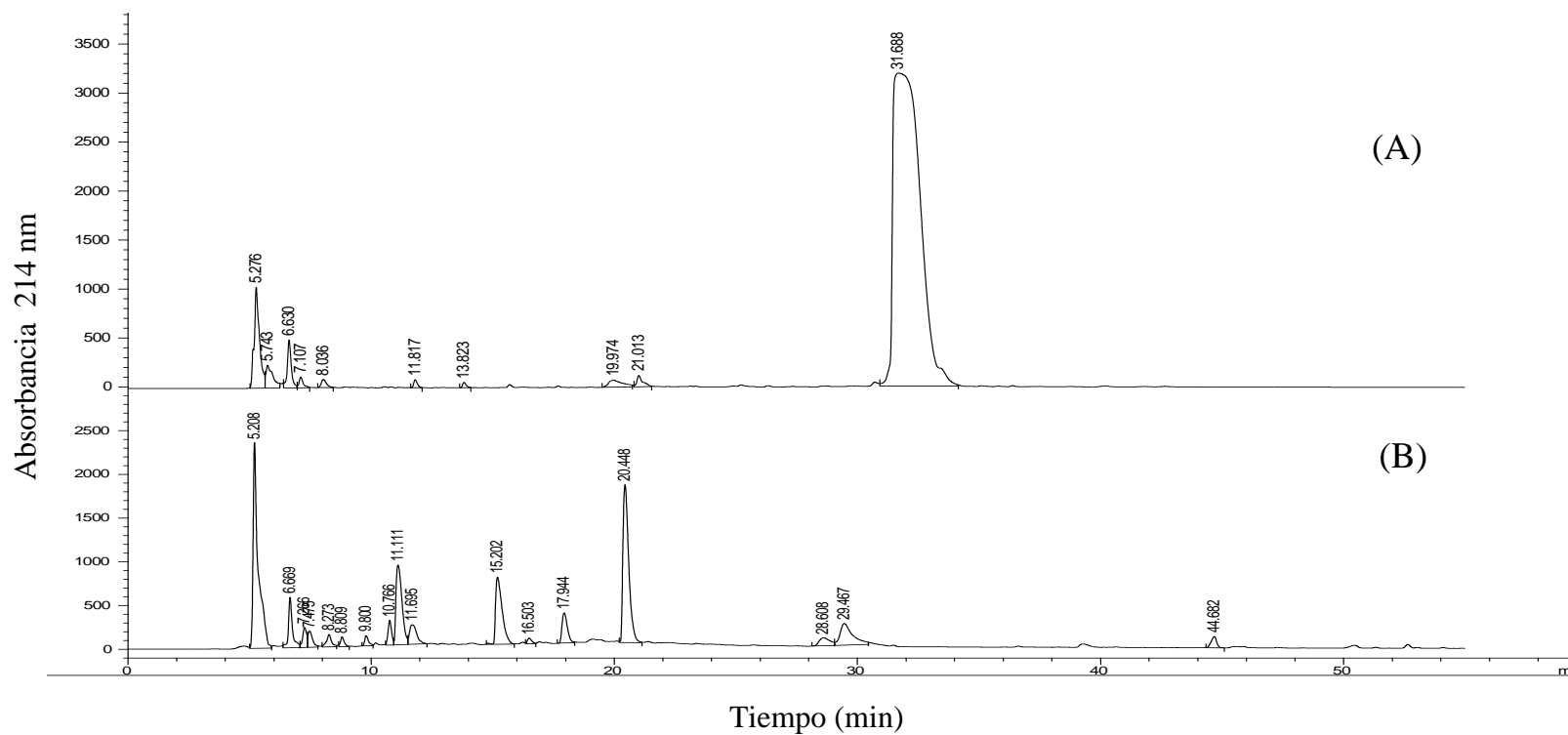




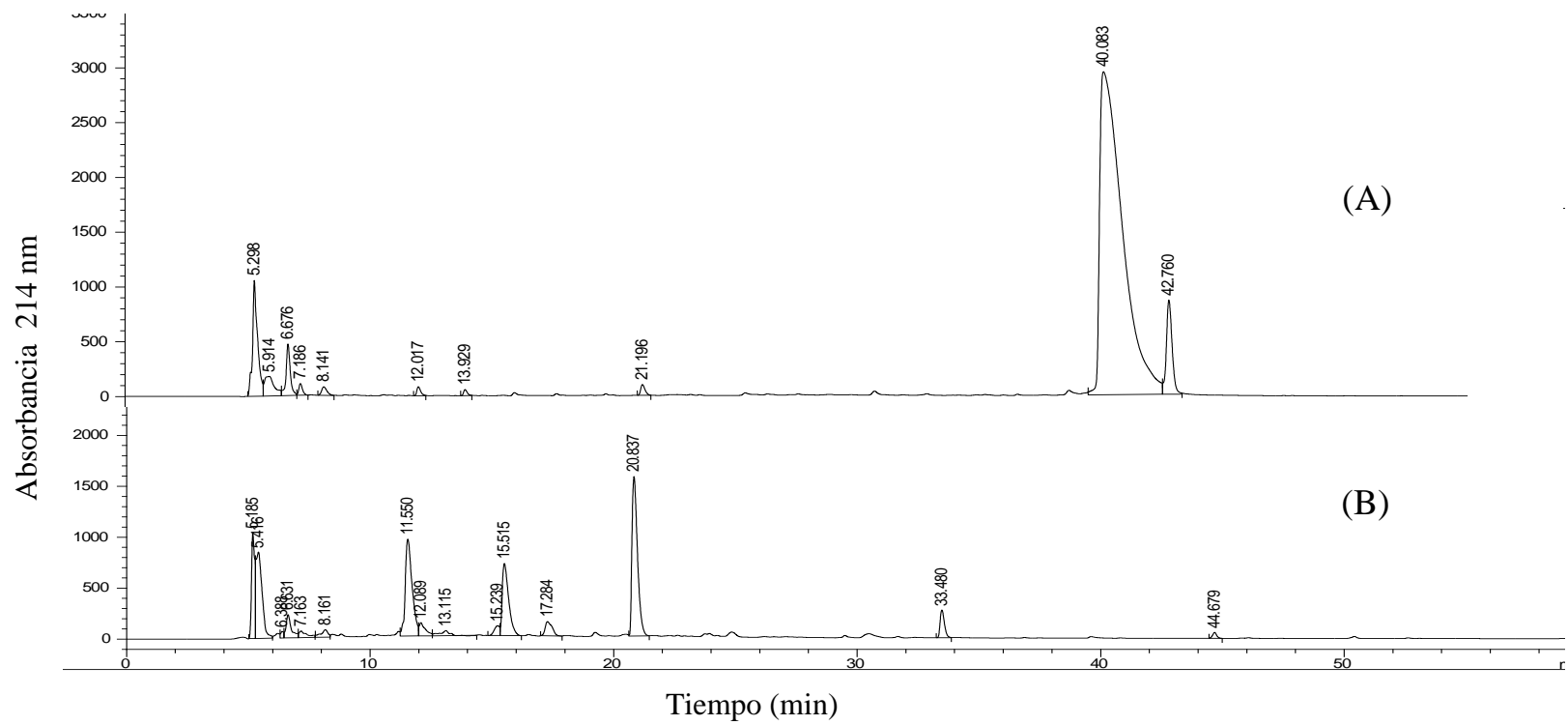
**Figura 10.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 10 (TVQVTSTAV) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



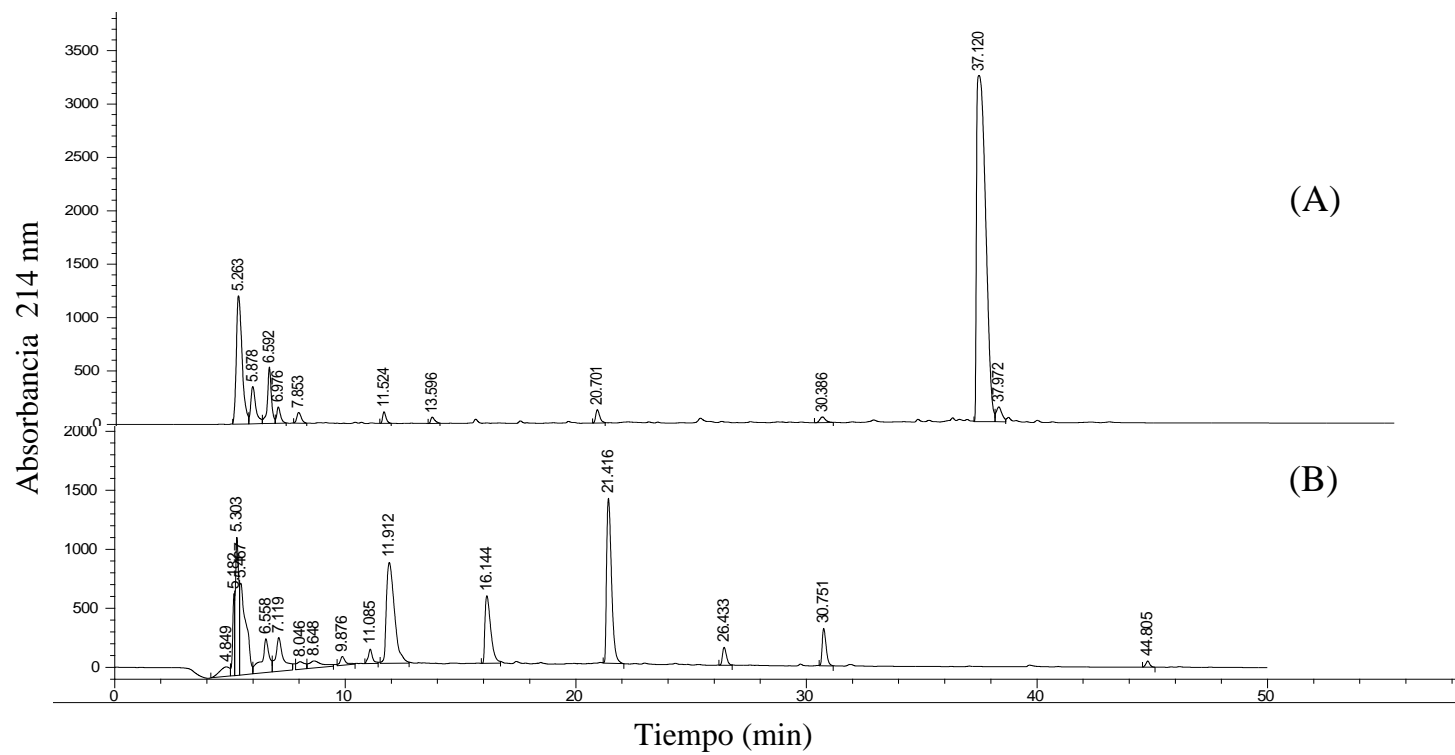
**Figura 11.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 11 (NAVPITPTLN) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



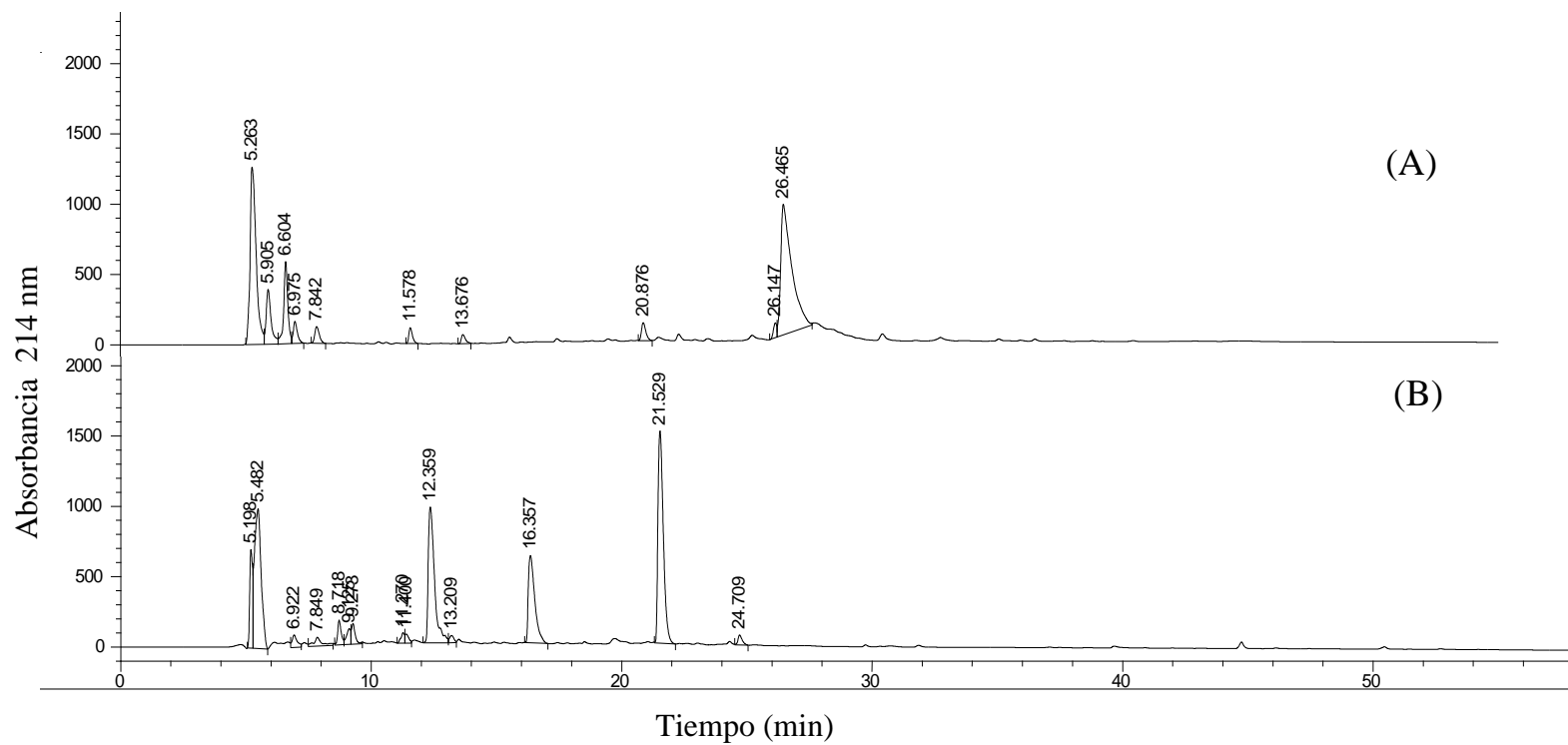
**Figura 12.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 12 (SLPQNIPPL) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



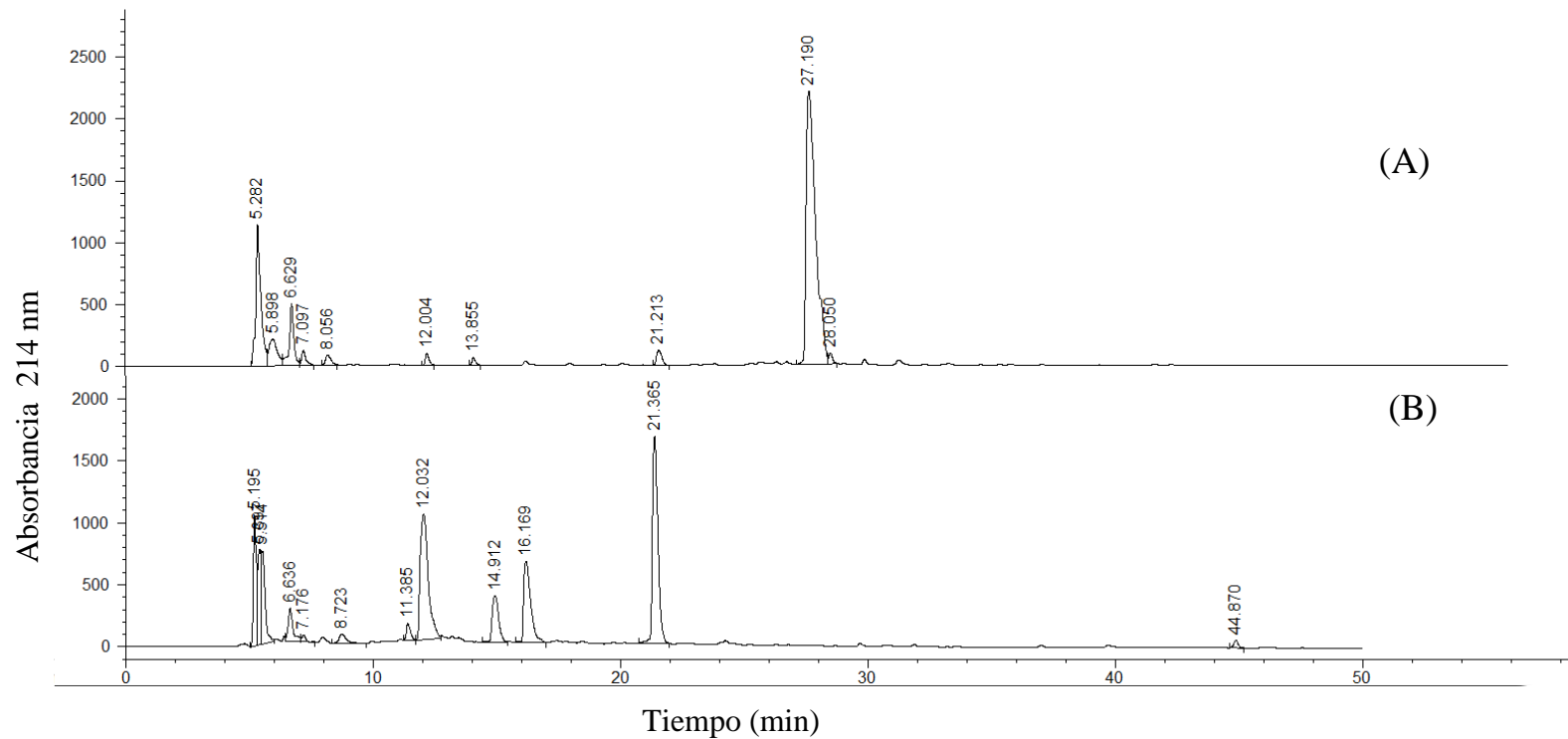
**Figura 13.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



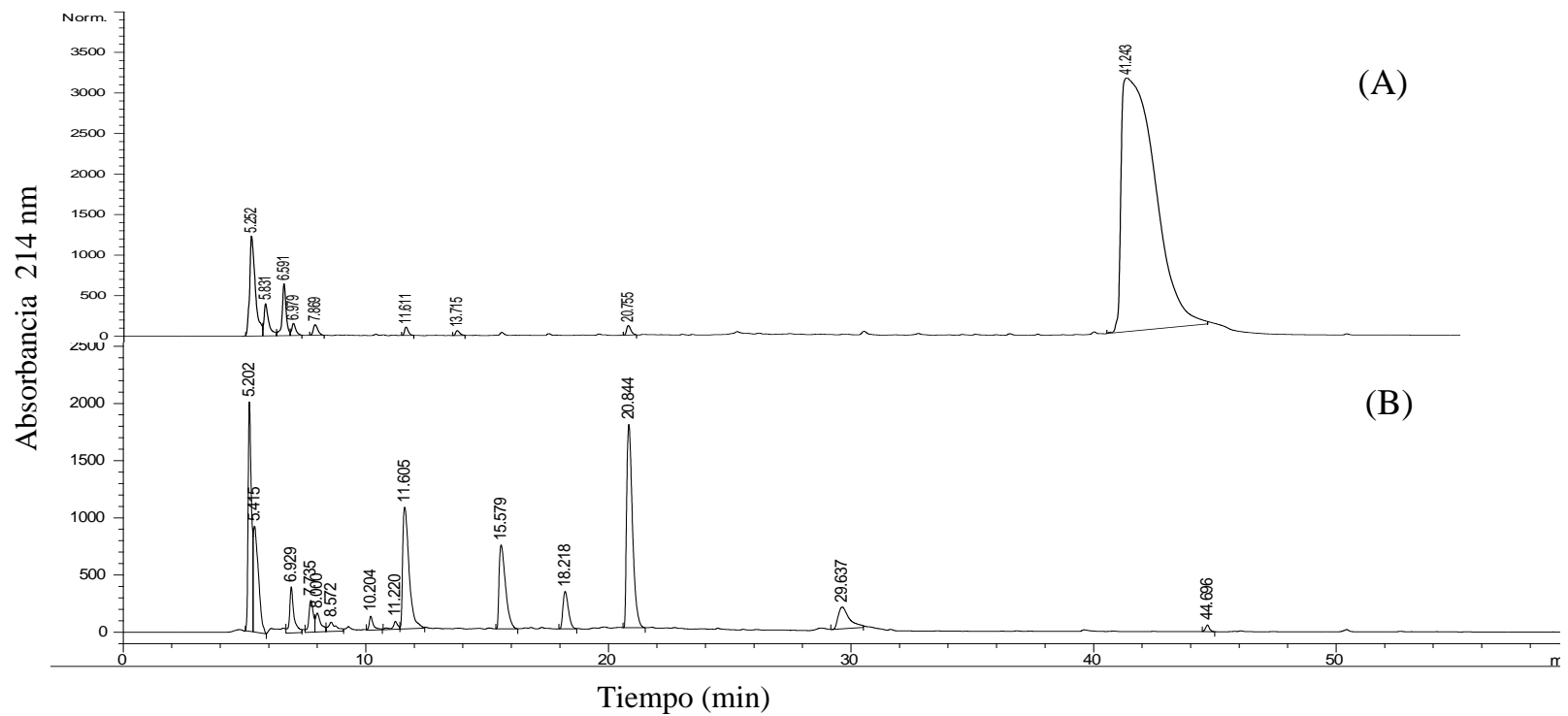
**Figura 14.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 16 (YIPIQYVLS) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



**Figura 15.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 17 (TDDIMCVK) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



**Figura 16.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 19 (GYLAVA) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



**Figura 17.** Cromatogramas de RP-HPLC del péptido 20 (DVENLHLPLPLL) antes (A) y después (B) del proceso gastrointestinal simulado.



### 6.3.2 Capacidad Antioxidante de Péptidos Bioactivos

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante por el método ABTS. De manera resumida se muestran los valores obtenidos antes de ser sometidos al proceso de simulación gastrointestinal. El análisis estadístico demostró que los péptidos 10 (TVQVTSTAV), 11 (NAVPITPTLN), 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV), 16 (YIPIQYVLS), 20 (DVENLHLPLPLL) y 17 (TDDIMCVK) conservaron la actividad antioxidante antes y después de ser sometidas a simulación ya que no observó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Los péptidos 19 (GYLAVA), 03 (YPSYGL) y 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV), cuyos valores de equivalentes trolox fueron de 1179.86, 1173.67 y 1130.32  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente, fueron los que presentaron la mayor actividad antioxidante después de ser sometidos a digestión *in vitro*, además cabe señalar que dos de éstos péptidos aumentaron la actividad antioxidante, de 1002.75 a 1179.86  $\mu\text{mol/g}$  para el péptido GYLAVA y de 861.56 a 1173.67  $\mu\text{mol/g}$  para el péptido YPSYGL.

De la misma manera, los péptidos 4 (HHPHLSFMAIPP), 19 (HIKEDVPS) y 12 (SLPQNIPPL), con valores de equivalentes trolox de 657.20, 598.99 y 689.40  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente, también conservaron su actividad antes y después del proceso de digestión *in vitro*.

Es notable que en el caso del péptido 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV) la actividad antioxidante por medio del método ABTS también se vio favorecida, ya que se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con un valor de equivalentes trolox de 964.36 a 1130.32  $\mu\text{mol/g}$  después de la digestión *in vitro*.

Del total de péptidos evaluados, 6 secuencias peptídicas disminuyeron la actividad antioxidante después de ser sometidas a digestión *in vitro*.

Por otro lado, en la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante por el método ORAC, de manera resumida se muestran los valores obtenidos antes y después de ser sometidos al proceso de simulación gastrointestinal.

De manera general, solo dos de los péptidos evaluados conservaron la actividad antioxidante por este método antes y después de ser sometidos al proceso de digestión *in vitro*, siendo los péptidos 4 (HPHPHLSFMAIPP) y 3 (YPSYGL) con valores de equivalentes trolox de 724.64 y 1341.29  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente, los que no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) después de la simulación gastrointestinal. Dicha actividad podría atribuirse a la presencia de ciertos aminoácidos como tirosina, metionina, histidina y lisina, ya que existe evidencia que éstos aminoácidos pueden quelar iones metálicos prooxidantes, capturar radicales libres y/o extinguir el oxígeno reactivo (Virtanen *et al.*, 2007; Erdmann *et al.*, 2008).

Dentro de los resultados obtenidos, se observó que los péptidos 9 (HIQKEDVPS), 11 (NAVPITPTLN) y 12 (SLPQNIPPL), con valores de equivalentes trolox de 886.60, 1384.28 y 954.01  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente, incrementaron la actividad antioxidante después de la simulación gastrointestinal.

Del total de péptidos evaluados, solo los péptidos 19 (GYLAVA), 6 (YDTQAIVQ), 10 (TVQVTSTAV), 13 (QEPVLGPVRGPFPIIV), 16 (YIPIQYVLS), 20 (DVENLHLPLPL) y 17 (TDDIMCVK) disminuyeron la actividad antioxidante después de la digestión *in vitro*, con valores de equivalentes trolox de 549.9, 895.31, 637.53, 1278.71, 930.06, 876.69 y 1158.97  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente. Dicha actividad podría atribuirse a la presencia de ciertos aminoácidos, además de la posición dentro de la secuencia peptídica, ya que se ha reportado que cualquier cambio en la distribución de aminoácidos en la secuencia de tripéptidos resultaba en diferentes actividades antioxidantes (Saito *et al.*, 2003).

Por otro lado, a pesar de que los resultados obtenidos por los diferentes métodos no se pueden comparar entre sí, debido a que las condiciones utilizadas son diferentes, es importante destacar que el método ORAC presenta ventajas ya que el mecanismo de reacción es similar al de los oxidantes fisiológicos; además de que los antioxidantes reaccionan con una carga y estado de protonación similar a la del cuerpo humano (Bisby *et al.*, 2008).

Por todo lo anterior, los péptidos evaluados mostraron buena actividad antioxidante, y dada la tendencia actual de utilizar productos naturales antioxidantes cuya actividad se lleve a cabo no sólo en los alimentos envasados, sino una vez que el alimento ha sido ingerido, los péptidos bioactivos se pueden incluir como componentes de muchos productos o ingredientes comercializados como alimentos funcionales (Saiga *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2008).

Tabla 8. Capacidad antioxidante por el método ABTS de péptidos adicionados con extracto <3 kDa de Leche fermentada, sometidos a simulación gastrointestinal.

<b>Péptido</b>	<b>TEAC antes de SGI (<math>\mu\text{mol/g}</math>)</b>	<b>TEAC después de SGI (<math>\mu\text{mol/g}</math>)</b>
GYLAVA	1002.75 $\pm$ 57.68 <sup>a</sup>	*1179.86 $\pm$ 16.75 <sup>g</sup>
HPHPHLSFMAIPP	838.03 $\pm$ 36.08 <sup>a</sup>	*657.20 $\pm$ 37.71 <sup>a</sup>
YPSYGL	861.56 $\pm$ 31.74 <sup>a</sup>	*1173.67 $\pm$ 19.31 <sup>g</sup>
YDTQAIVQ	954.45 $\pm$ 58.39 <sup>a</sup>	*598.99 $\pm$ 50.72 <sup>a</sup>
HIQKEDVPS	1000.27 $\pm$ 9.35 <sup>a</sup>	*867.75 $\pm$ 31.60 <sup>de</sup>
TVQVTSTAV	887.57 $\pm$ 113.85 <sup>a</sup>	733.99 $\pm$ 60.41 <sup>bc</sup>
NAVPITPTLN	924.72 $\pm$ 39.32 <sup>a</sup>	982.94 $\pm$ 32.46 <sup>f</sup>
SLPQNIPPL	899.95 $\pm$ 34.52 <sup>a</sup>	*689.40 $\pm$ 30.26 <sup>ab</sup>
QEPVLGpVRGPFPIIV	964.36 $\pm$ 82.61 <sup>a</sup>	1130.32 $\pm$ 18.33 <sup>g</sup>
YIPIQYVLS	1015.14 $\pm$ 15.01 <sup>a</sup>	959.40 $\pm$ 17.56 <sup>ef</sup>
DVENLHLPLPLL	923.49 $\pm$ 47.34 <sup>a</sup>	852.89 $\pm$ 36.66 <sup>cd</sup>
TDDIMCVK	2547.22 $\pm$ 465.51 <sup>b</sup>	2149.64 $\pm$ 104.13 <sup>h</sup>

Literales diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los péptidos evaluados. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre péptidos antes y después de la simulación gastrointestinal.

Tabla 9. Capacidad antioxidante por el método ORAC de péptidos adicionados con extracto <3 kDa de Leche fermentada, sometidos a simulación gastrointestinal.

<b>Péptido</b>	<b>TEAC antes de SGI (<math>\mu\text{mol/g}</math>)</b>	<b>TEAC después de SGI (<math>\mu\text{mol/g}</math>)</b>
GYLAVA	721.02 $\pm$ 8.35 b	*549.9 $\pm$ 32.68 a
HHPHLSFMAIPP	702.1 $\pm$ 11.06 b	724.64 $\pm$ 10.48 c
YPSYGL	1298.8 $\pm$ 37.48 f	1341.29 $\pm$ 26.80 gh
YDTQAIVQ	1139.52 $\pm$ 20.21 e	*895.31 $\pm$ 3.84 de
HIQKEDVPS	732.22 $\pm$ 9.11 b	*886.60 $\pm$ 60.36 de
TVQVTSTAV	872.88 $\pm$ 23.32 c	*637.53 $\pm$ 5.57 b
NAVPITPTLN	959.9 $\pm$ 3.06 d	*1384.28 $\pm$ 7.19 h
SLPQNIPPL	543.27 $\pm$ 7.68 a	*954.01 $\pm$ 26.44 e
QEPVLGPVRGPFPIIV	1353.35 $\pm$ 22.51 g	*1278.71 $\pm$ 10.31 g
YIPIQYVLS	1254.84 $\pm$ 18.02 f	*930.06 $\pm$ 16.53 de
DVENLHLPLPLL	896.07 $\pm$ 3.51 c	*876.69 $\pm$ 6.69 d
TDDIMCVK	1296.53 $\pm$ 14.50 f	*1158.97 $\pm$ 24.07 f

Literales diferentes entre columnas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los péptidos evaluados. \*Indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre péptidos antes y después de la simulación gastrointestinal.

## VII. CONCLUSIONES

Las diferencias ( $p < 0.05$ ) observadas antes y después de la simulación gastrointestinal, tanto en la actividad inhibidora de la ECA como en la actividad antioxidante, sugieren que la mayoría de los péptidos evaluados no resisten las condiciones de las diferentes áreas del tracto gastrointestinal. Sin embargo, los péptidos GYLAVA, HPHPHLSFMAIPP, HIQKEDVPS, NAVPITPTLN y TDDIMCVK, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en actividad inhibidora de la ECA o antioxidante, antes y después de la digestión.

Los resultados obtenidos mostraron que los péptidos que mantuvieron la actividad inhibidora de la ECA y/o la actividad antioxidante, en el modelo de digestión *in vitro*, podrían ser los responsables de los efectos antihipertensivo y/o antioxidante en un modelo *in vivo*. Por lo que, podría ser importante, estudiar dichos efectos en un modelo murino.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F. y Ehlers, M. R. 2003. ACE revisited: a new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2(11): 891-902.
- Anadon, A. Martínez MA, Ares I, Ramos E, Martínez-Larrañaga MR, Contreras MM, Ramos M. y Recio I. 2010. Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLGY and AYFYPEL, that correspond to fragments (90–94) and (143–149) from  $\alpha$ s1-casein. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 1836–45.
- Araujo, M.C.; Melo, R.L.; Cesari, M.H.; Juliano L. y Carmona, A.K. 2000. Peptidase specificity Characterization of C- and N- terminal catalytic sites of angiotensin-I converting enzyme. *Biochemistry*. 39: 8519-8525.
- Baltar, M. J.; Marín, I. R. y Álvarez, G. J. 2004. Toxicidad Fetal de los Fármacos Antihipertensivos. *Hipertensión*. 21(9): 455-465.
- Bisby, R., Brooke, R. y Navaratnam, S. 2008. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (orac) assay. *Food Chemistry*. 108(3): 1002-1007.
- Cadée, J. A., Chang, C. Y., Chen, C. W., Huang, C. N., Chen, S. L. y Wang, C. K. 2007. Bovine Casein Hydrolysate (C12 Peptide) Reduces Blood Pressure in Prehypertensive Subjects\*. *American Journal of Hypertension*. 20(1): 1-5.
- Cao, G. y Prior, R. L. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 44(6): 1309–1315.

- Copper, O. W.; Hernandez-Diaz, S.; Arbogast, G. P.; Dudley, A. J.; Dyer, S.; Gideon, S.P.; Hall, K. y Ray, A. W. 2006. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *New England Journal of Medicine*. 34(23): 2443-2451.
- Chan, D.I.; Prenner, E.J. y Vogel, H.J. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *BBA Biomembranes*. 1758: 1184-1202.
- Chen, H.M.; Muramoto, K; Yamauchi, F.; Fujimoto, K. y Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 49-53.
- Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L. y Roccella, E. J. 2003. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*. 42(6): 1206-1252.
- Contra, H. S. y Estrada, L. R. 2008. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*. 19(1): 21-29.
- Contreras, M. D. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M. y Recio, I. 2009. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*. 19(10): 566-573.
- Cruz Manzano, E., Sanfiel Vasseur, L. y Palacio Omar, M. 2004. Estrés oxidativo e hipertensión esencial: una realidad clínica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 23(3): 190-196.
- Cushman, DW., Cheung HS, Sabo EF. y Ondetti MA. 1977. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry*. 16: 5484-91.



- 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.
- Diplock, A. T. 1999. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document: CABI. *British Journal of Nutrition*. 81: S1-S27
- Erdmann, K., Cheung, B. W. y Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19(10): 643-654.
- Feldstein, C. A. y Romero, J. C. 2007. El sistema renina angiotensina. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. 2(2): 49-58.
- Figueroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. y Cruz-Guerrero A. 2010. Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 9: 11-16.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A. y Walsh, D. J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of Nutrition*. 134(4): 980-988.
- Fitzgerald, R. J. y Murray, B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*. 59(2): 118-125.
- FitzGerald, R. J. y Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*. 84(1): 33-37.
- Frankel, E. N. y Meyer, A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(13): 1925-1941.
- Galiana, J. y Gil, M. 1997. Fármacos antihipertensores. *Farmacología Humana*, 4: 671-684.

- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. y Scaccini, C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*. 29(11): 1106-1114.
- Gobbetti, M.; Minervini, F. y Grizzello, C. 2004. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57 (2/3): 173-188.
- González-Olivares, L., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz., L. y García-Garibay, M. 2011. Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10: 179-188.
- Gonzalez-Gonzalez, C., Gibson, T. y Jauregi, P. 2013. Novel probiotic-fermented milk with angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced by *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5. *International Journal of Food Microbiology*. 167(2): 131-137.
- González-Córdova, A. F., Torres-Llanez, M. J., Rodríguez-Figueroa, J. C., Espinosa-de los-Monteros, J. J., Garcia, H. S. y Vallejo-Córdoba, B. 2011. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus* Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in milks fermented by *Lactobacillus* strains. *CyTA-Journal of Food*. 9(2): 146-151.
- Gómez-García, A., Manuel, V. y Álvarez-Aguilar, C. 2007. Implicaciones del sistema renina-angiotensina en la nefropatía diabética. *Revista Medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 45(6): 601-610.
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., López-Caballero, M. E. y Montero, M. P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids*. 25 (8): 1813-1827.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M. y Recio, I. 2004. Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1054(1): 269-277.

- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa J. C., González-Córdova, A. F., Nevárez-Moorillón, G. V., Rivera-Chavira B. y Vallejo-Córdoba, B. 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Can. J. Microbiol.* 56: 432–439.
- Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M. y Hernández-Ávila, M. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. 2: 163-167
- Guyton, A. C., Hall, J.E. *Textbook of Medical Physiology*, 9th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996. 897-900.
- He, R., Malomo, S. A., Alashi, A., Girgih, A. T., Ju, X. y Aluko, R. E. 2013. Purification and hypotensive activity of rapeseed protein-derived renin and angiotensin converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Functional Foods.* 5: 781-789.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M. y Amigo, L. 2002. Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal.* 12: 805-812.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. 2004. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion on infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 14: 889-898.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M. y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science.* 165(1): 23-35.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L. y Recio, I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal.* 17(1): 42-49.
- Jauhiainen, T., Collin, M., Narva, M., Cheng, Z. J., Poussa, T., Vapaatalo, H. y Korpela, R. 2005. Effect of long-term intake of milk peptides and minerals on blood

- pressure and arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Milchwissenschaft*. 60(4): 358-363.
- Jiang, Z., Tian, B., Brodkorb, A. y Huo, G. 2010. Production, analysis and *in vivo* evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*. 74(1): 18-25.
- Jimsheena, V. K. y Gowda, L. R. 2010. Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: structure–activity relationship. *Peptides*. 31(6): 1165-1176.
- Kannel, W. B. 1996. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *Jama*, 275(20): 1571-1576.
- Kearney, P. M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P. K. y He, J. 2005. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *The Lancet*. 365(9455): 217-223.
- Kitts, D.D. y Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9: 1309-1323.
- Korhonen, H. 2002. Technology options for new nutritional concepts. *International Journal of Dairy Technology*. 55(2): 79-88.
- Korhonen., H. y Pihlanto, A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16): 1297-1308.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*. 16(9): 945-960.
- Leclerc, P. L., Gauthier, S. F., Bachelard, H., Santure, M. y Roy, D. 2002. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Journal of dairy technology*. 12: 995-1004.
- Leroy, F. y De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 67–78.

- Li, G. H., Liu, H., Shi, Y. H. y Le, G. W. 2005. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 37(2): 219-224.
- Lin, L., Lv, S. y Li, B. 2012. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*. 131(1): 225-230.
- Lignitto, L., Cavatorta, V., Balzan, S., Gabai, G., Galaverna, G., Novelli, E. y Segato, S. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago dallevo cheese. *International Dairy Journal*. 20(1): 11-17.
- Loscalzo, J.; Creager, M. A. y Dzau, V. 1996. *Vascular Medicine, a textbook of vascular biology and diseases*. 2nd. Edition, Little, Brown and Company, Boston, New York, Toronto & London. 1-30.
- Menrad, K. 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food engineering*. 56(2): 181-188.
- Martínez O, Aguilera A. y Gil A. Los productos lácteos. En: *Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación*. J. M. Barberá Mateos y A. Marcos, eds. Dirección General de Salud Pública y Alimentación, Comunidad de Madrid. Madrid: Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios (Inuticam); 2008; pp: 128-155.
- Matar, C. y Goulet, J. 2003.  $\beta$ -casomorphin 4 milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *International Journal of dairy technology*. 6: 383-397.
- Matsui, T. Hayashi, A. Tamaya, K. Matsumoto, K. Kawasaki, T. Murakami, K. y Kimoto, K.I. 2003. Depression effect induced by dipeptide, Val-Tyr, in hypertensive transgenic mice is due, in part, to the suppression of human circulating renin-angiotensina system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 30: 262-265.
- Meisel, H. 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*. 12(16): 1905-1919.

- Meisel, H., Walsh, D. J., Murray, B., FitzGerald, R. J., Mine, Y. y Shahidi, F. 2006. ACE inhibitory peptides. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. 2: 269-315.
- Mendis, E., Rajapakse, N. y Kim, S.K. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 581-587.
- Monzón-Bensojo, J. F. 2012. Actividades enzimáticas de *Lactococcus lactis* relacionadas con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora.
- Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y. y Negishi H I. 2004. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide ( $\beta$ -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *International Journal of Dairy Technology*. 87: 1967-74.
- Nakashima, Y., Arihara, K., Sasaki, A., Mio, H., Ishikawa, S. y Itoh, M. 2002. Antihypertensive activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats. *Journal of food science*, 67(1), 434-437.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. y Takano, T. 1995. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*. 78(4): 777-783.
- Norma de Codex para leches fermentadas. CODEX STAN 243-2003.
- Orduñez García, P. O., La Rosa Linares, Y., Espinosa Brito, A. D. y Álvarez Li, F. C. 2010. Hipertensión arterial: Recomendaciones básicas para la prevención, detección, evaluación y tratamiento. *Revista Finlay*. 2: 7-26.
- Ou, B.; Hampsch Woodill, M. y Prior, R, L. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4619-26.

- Pan, D., Cao, J., Guo, H. y Zhao, B. 2012. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 130: 121-126.
- Papadimitriou, C. G., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Silva, S. V., Gomes, A. M., Malcata, F. X. y Alichanidis, E. 2007. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*. 105(2): 647-656.
- Pereira, M. A., Parker, E. D. y Folsom, A. R. 2006. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus: an 11-year prospective study of 28 812 postmenopausal women. *Archives of internal medicine*, 166(12), 1311-1316.
- Peng, X., Xiong, Y. L. y Kong, B. 2009. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*. 113(1): 196-201.
- Phelan, M y Kenns, D. 2011. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food and Function*. 2: 153-167.
- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T. y Korhonen, H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*. 67(01): 53-64.
- Pihlanto, A., Virtanen, T. y Korhonen, H. 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*. 20(1): 3-10.
- Pins, J. J. y Keenan, J. M. 2002. The antihypertensive effects of a hydrolyzed whey protein isolate supplement (Biozate 1®). *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1: 16-68.
- Quirós del Bosque, A. 2007. Leches fermentadas con actividad antihipertensiva: identificación de péptidos y evaluación de su biodisponibilidad.

- Ren Y., Wan DG, Ren XD, Zhang ZD. y Guo JL. 2010. Study on the basis of medicinal substances of porcine blood (II)-Choice of enzyme type. *Amino acids & biotic resources*. 32(1): 31-33.
- Ricci, I., Artacho R. y Olalla M. 2010. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Critical reviews in food science and nutrition*. 50: 390-402.
- Riordan, J. F. 2003. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology*. 4(8): 225.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A. F., Troncoso-Rojas, R., Vargas-Arispuro, I. y Vallejo-Cordoba, B. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 93(11): 5032-5038.
- Rodríguez-Figueroa, JC., González-Córdova AF, Torres-Llanez MJ, Garcia HS. y Vallejo-Cordoba B. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 95: 5536-43.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Astiazaran-García, H. y Vallejo-Cordoba, B. 2012. Hypotensive and heart rate-lowering effects in rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *British Journal of Nutrition*. 1(1): 1-7.
- Rodríguez-Figueroa, J. C., González-Córdova, A. F., Astiazaran-García, H. y Vallejo-Cordoba, B. 2013. Hypotensive and heart rate-lowering effects in rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *British Journal of Nutrition*. 109(05): 827-833.
- Rohrbach, M. S.; Williams, E. B. y Rolstad, R. A. 1981. Purification and Substrate-Specificity of Bovine Angiotensin Converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1: 225-230.



- Ruiz-Giménez, P., Salom, J.B., Marcos, J.F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Torregrosa, G., Alborch, E. y Manzanares, P. 2012. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chemistry*. 131: 266-273.
- Saiga, A., S. Tanabe y T. Nishimura. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3661-3667.
- Sánchez, R. A., Ayala, M., Baglivo, H., Velázquez, C., Burlando, G., Kohlmann, O. y Jiménez, J. 2010. Guías Latinoamericanas de Hipertensión Arterial. *Revista Chilena de Cardiología*. 29(1): 117-44.
- Sarmadi, B. H. y A. Ismail 2010. "Antioxidant peptides from food proteins: A review." *Peptides*. 31: 1949-1956.
- Sato, H. y Feix, J. B. 2006. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1758(9): 1245-1256.
- Sellén, Crombet, J. 2008. Hipertensión arterial: diagnóstico, tratamiento y control. Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria.
- Silva, S. y Malcata X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*. 15: 1-15.
- Shi, J. y Le Maguer, M. 1998. Functional foods: biochemical & processing aspects (Vol. 1). CRC Press. 135-167
- Soca, M.; Enrique, P. y Sarmiento. 2009. Hipertensión arterial, un enemigo peligroso, Habana: Acimed. 2: 1561-2880.
- Steijns, J. M. 2001. Milk ingredients as nutraceuticals. *International Journal of Dairy Technology*. 54(3): 81-88.

- Thomä-Worringer C, Sorensen J. y López-Fandiño R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *International Journal of Dairy Technology*. 16: 1324-33.
- Torres Llenez, M. D. J., Vallejo Cordoba, B. y González Cordova, A. F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche; Bioactive peptides derived from milk proteins. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55(2): 111-117.
- Torruco-Uco, J.G., Dominguez-Magaña, M.A., DavilaOrtiz, G., Martinez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L.A. y Betancur-Ancona, D.A. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6 (2): 158-168.
- Touyz, R. M. 2005. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Experimental physiology*. 90(4): 449-455.
- Tuomilehto, J., Hu, G., Bidel, S., Lindström, J. y Jousilahti, P. 2004. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus among middle-aged Finnish men and women. *Journal of the American Medical Association* , 291(10): 1213-1219.
- Trompette, A., Claustre, J.; Caillon, F.; Jourdan, G.; Chayvialle, J.A. y Plaisancie, P. 2003. Milk Bioactive peptides and  $\beta$ -casamorphine induced mucus release in rat jejunum. *Journal of Nutrition*. 133: 3499-3503.
- Tzakos, G. A.; Galanis, S. A.; Spyroulias, A. G.; Cordopatis, P.; Manessi-Soupas, E., y Gerothanassis, P. I. 2003. Structure-function discrimination of the N- and C-catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: Implications for Cl- activation and peptide hydrolysis mechanisms. *Proteins Engineering*. 16 (2): 993-1003.
- Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. y Korhonen, H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102(1): 106-115.

- Vioque, J.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Yust, M. M. y Millán, F. 2001. Obtención y Aplicaciones de Hidrolizados Proteícos. *Grasas y Aceites*. 52(2): 132-136.
- Vioque, J.; Pedroche, J.; Yust, M. M.; Lqari, H.; Megías, C.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M. y Millán, F. 2006. Peptídos Bioativos em Proteínas Vegetais de Reserva. *Brazilian Journal of Food Technology*. 4: 99-102
- Wang, W., y González de Mejía, E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related cronic diseases. *Comprehesive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4: 63-78.
- WHO, 2013. World Health Organization. *The World Health Report 2013: Reducing Risks, Promoting Healthy Life*. Ginebra. pp 13-15.
- Yamamoto, N., Maeno, M. y Takano, T. 1999. Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*. 82(7): 1388-1393.