



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN QUÍMICA DE
ALIMENTOS**



“Generación de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados, y sus propiedades terapéuticas”

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

Morales García Luis Daniel

DIRIGIDA POR:

M. en C. Juan Carlos Ramírez Orejel; Facultad de Química, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN QUÍMICA DE
ALIMENTOS**



“Generación de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados, y sus propiedades terapéuticas”

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Morales García Luis Daniel

DIRIGIDA POR:

M. en C. Juan Carlos Ramírez Orejel; Facultad de Química, UNAM

SINODALES

Presidente: Sandra Pérez Munguía

Secretario: Juan Carlos Ramírez Orejel

Vocal: José Pedraza Chaverri

1er. Suplente: Francisco Ruíz Terán

2do. Suplente: Maricarmen Quirasco Baruch

Asesor del tema

Sustentable

M. en C. Juan Carlos Ramírez Orejel

Luis Daniel Morales García

Ciudad Universitaria
Ciudad de México
Agosto de 2021

Contenido	
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Índice de abreviaturas	6
Resumen	8
Introducción	9
Objetivos	10
Capítulo 1. Péptidos bioactivos: Definición y características	11
1.1. Productos lácteos	11
1.2. Composición química de la leche	11
1.3. Proteínas lácteas	12
1.4. Péptidos bioactivos en la leche	12
Capítulo 2. Generación de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados	14
2.1. Métodos empleados en la generación de péptidos bioactivos en la leche	14
2.2. Producción de péptidos bioactivos por fermentación microbiana	14
2.2.1. Fermentación microbiana	14
2.2.2. Microorganismos utilizados en procesos fermentativos	15
2.2.3. Generación de péptidos bioactivos mediante fermentación microbiana	16
2.2.4. Péptidos bioactivos generados por fermentación microbiana	18
2.3. Producción de péptidos bioactivos por proteólisis enzimática exógena	19
2.3.1. Enzimas utilizadas en la manufactura de productos lácteos	19
2.3.2. Proteasas y péptidos bioactivos	19
Capítulo 3. Propiedades terapéuticas de los péptidos bioactivos generados en productos lácteos	21
3.1. Actividad de los péptidos bioactivos	21
3.2. Impacto de los péptidos bioactivos reductores de presión arterial	22
3.2.1. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	23
3.2.2. Estructura de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I	24

3.3. Péptidos bioactivos antioxidantes	25
3.3.1. Estrés oxidante	25
3.3.2. Origen de los péptidos bioactivos	26
3.3.3. Estructura y actividad de los péptidos antioxidantes	26
Capítulo 4. Los péptidos bioactivos como alimento funcional	28
4.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos	28
4.1.1. Alimentos nutraceuticos; una nueva oportunidad como tratamiento de enfermedades.	28
4.2. Péptidos bioactivos como alimentos nutraceuticos.....	29
Capítulo 5. Discusión	30
Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	38

Índice de figuras

Figura 1.1.	Propiedades farmacológicas	13
Figura 2.1.	Sistema proteolítico.....	17
Figura 3.1.	Origen, secuencia y función de los péptidos bioactivos.....	21
Figura 3.2.	Mecanismo de acción de los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I.....	23
Figura 5.1.	Sitio de unión ECA con los residuos C-terminal de HLPLP.....	35

Índice de tablas

Tabla 2.1. Productos lácteos fermentados con BAL's.....	15-16
--	-------

Índice de abreviaturas

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Ala – Alanina

ARN – Ácido ribonucleico

CANILEC – Cámara Nacional de Industriales de la Leche

CAT – Catalasa

C-terminal – Carboxilo terminal

DPP-IV – Di-peptidil peptidasa IV

ECA – Enzima convertidora de angiotensina

GIP – Polipéptido inhibidor gástrico, por sus siglas en inglés

GLP-1 – Péptido similar al glucagon tipo 1

Gly – Glicina

GPx-1 – Glutación-peroxidasa-1

HCl – Ácido clorhídrico

HLPLP – Histidina-Leucina-Prolina-Leucina-Prolina

IECA – Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

IPP – Isoleucina-Prolina-Prolina

kg – Kilogramo

LAB – Bacteria ácido lácticas, por sus siglas en inglés

Lys – Lisina

mm Hg – Milímetros de mercurio

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintasa, por sus siglas en inglés

O₂ – Oxígeno

PB – Péptido bioactivo

Phe – Fenilalanina

ROS – Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés

SIAP – Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

SOD – Superóxido dismutasa

Tyr – Tirosina

VPP – Valina-Prolina-Prolina

Resumen

Los productos lácteos son un grupo de los alimentos que se producen por diferentes métodos, siendo los principales, la fermentación y maduración mediante el uso de microorganismos y enzimas proteolíticas. Algunos productos lácteos, principalmente productos fermentados, han demostrado tener un efecto benéfico en la salud al ser incorporados a la dieta, atribuyéndoles actividades biológicas como reguladores de la presión arterial, antioxidantes, antigluceimiantes, opioides e hipocolesterolémicos. Estudios revelaron secuencias de aminoácidos, derivadas de las proteínas lácteas, que permanecían activas después de la digestión y tenían la capacidad de desencadenar dichas respuestas biológicas. Estas secuencias de aminoácidos son conocidas como péptidos bioactivos, y son una excelente opción para desarrollar alimentos nutraceuticos; con la posibilidad de fungir como un tratamiento alternativo y/o complementario a los preestablecidos. Sin embargo, la generación, extracción y estudio de los péptidos bioactivos sigue bajo investigación, por lo que el objetivo de este trabajo es promover el conocimiento de las condiciones relacionadas con la generación y aplicación de estos biocompuestos en el desarrollo de alimentos nutraceuticos.

Introducción

Diversos estudios científicos han demostrado que las proteínas propias de la leche (Chalupa-Krebzdak *et al.*, 2018), como las caseínas que han reportado actividades biológicas como antimicrobiana, antilipídica y anticancerígena (Nongonierma *et al.*, 2015). Ahora se sabe que los péptidos bioactivos son derivados de las proteínas de la leche, liberados principalmente por bacterias o enzimas aisladas con actividad intrínseca de proteínasa (proceso aprovechado en la manufactura de una gran gama de productos lácteos comerciales), y que poseen la capacidad de expresar una actividad biológica, que estará definida por la secuencia de aminoácidos que presente el péptido bioactivo liberado (Mohanty *et al.*, 2016).

Por lo anterior, es importante determinar el proceso que origina, y los efectos que proporcionan, dichas secuencias. Reconocidas como péptidos bioactivos, fragmentos específicos de las proteínas que permanecen inactivos en la secuencia original de aminoácidos, y al ser liberados por la acción de enzimas proteolíticas, como en el caso de la maduración y fermentación del alimento, ejercen su actividad biológica (Korhonen, 2009; Mohanty *et al.*, 2016).

De esta manera, se puede aprovechar las propiedades farmacológicas de los péptidos bioactivos, desarrollando alimentos nutracéuticos que puedan ser transportados y distribuidos en el organismo. Facilitando la interacción con receptores fisiológicos capaces de desencadenar funciones terapéuticas en el organismo (Wada & Lönnnerdal, 2014).

Objetivos

Objetivo general

Recopilar información actualizada sobre la generación de lactopéptidos bioactivos en el proceso de fermentación de la leche, y su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos nutraceuticos.

Objetivos

- Definir y establecer las propiedades de los péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche.
- Relacionar los procesos de fermentación con la generación de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados.
- Conocer las propiedades terapéuticas más estudiadas de los péptidos bioactivos encontrados en productos lácteos fermentados.
- Establecer el potencial uso de los péptidos bioactivos para el desarrollo de alimentos nutraceuticos.

Capítulo 1. Péptidos bioactivos: Definición y características

1.1. Productos lácteos

Los productos lácteos son obtenidos a partir de la leche o sus componentes y otros ingredientes funcionalmente necesarios para su elaboración, incluidos los productos con grasa vegetal, esto con base en la NOM-243-SSA1-2010. En este particular caso, donde se utiliza la leche como materia prima, los productos lácteos generados son: el yogur, kumis, dahi, kéfir, quesos, mantequilla, leche condensada, leche en polvo, nata, sueros y caseína (proteína) (CODEX STAN 206-1999; CANILEC, 2018).

En la transformación tecnológica para el desarrollo de productos lácteos, la composición química de la leche se ve modificada de acuerdo con el producto tecnológico deseado (las especificaciones pueden observarse en la NOM-243-SSA1-2010 y NOM-155-SCFI-2012). La grasa butírica y proteínas de la leche, como caseínas, son los principales componentes que se ven afectados, ya sea aumentando o disminuyendo su concentración (NOM-155-SCFI-2012).

Cabe destacar que la leche es utilizada como materia prima para estos productos lácteos; definida como la secreción natural de las glándulas mamarias de la vaca sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro (NOM-243-SSA1-2010), y es un líquido blanco producido con el objetivo de ser consumido por sus crías en los primeros años de vida (Nongonierma *et al.*, 2015; Hodgkinson *et al.*, 2018). Por lo que, presenta niveles altos de proteínas, lípidos e hidratos de carbono. Macronutrientes que proveen la energía necesaria para mantener las funciones del organismo, y a su vez son fundamentales en la integridad estructural y funcional de las células (Saavedra *et al.*, 2013; Chalupa-Krebzdak *et al.*, 2018).

1.2. Composición química de la leche

La composición química de los alimentos se ha vuelto una herramienta clave para los profesionales en la salud nutricional debido a que provee información con la cual es posible clasificar a los alimentos con base a su valor nutritivo. Favoreciendo la posibilidad de proporcionar una dieta más saludable y proveer los nutrientes necesarios para el mantenimiento apropiado del cuerpo, previniendo trastornos como la obesidad y sobrepeso (Velazquez-Bautista *et al.*, 2017; Lupiañez-Barbero *et al.*, 2018).

La composición química de la leche depende de diversos factores, como son: la raza, la alimentación, el estado de lactación, época del año, entre otros; creando variaciones en su composición. No obstante, existen diversas normas que permiten asegurar el valor nutricional y la proporción de sus nutrientes para la leche y productos lácteos mediante la norma NOM-155-SCFI-2012, NOM-181-SCFI-2010,

NOM-223-SCFI/SAGARPA-2018, que corresponden a las de leche, yogurt y quesos respectivamente. De igual forma se cuenta con estándares internacionales en el Codex Alimentarius.

1.3. Proteínas lácteas

Dentro de los componentes de la leche, las proteínas lácteas son una de las macromoléculas más utilizadas en el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos, debido a que han demostrado poseer propiedades bioactivas (Hafeez *et al.*, 2014). Las cuales han sido atribuidas no sólo a las proteínas sino también, a derivados peptídicos resultado de su hidrólisis (Chalupa-Krebzdak *et al.*, 2018; Toldrá *et al.*, 2018; Giromini *et al.*, 2018).

Cabe destacar, que, aunque existe una gama diversa de proteínas en las cuales se han identificado efectos bio-funcionales, las proteínas de la leche, y sus derivados peptídicos, resaltan debido a la resistencia que poseen a los procesos de manufactura, y digestión. Lo que facilita obtener la concentración necesaria (de derivados peptídicos) para desencadenar un efecto terapéutico en el organismo (Castellano *et al.*, 2016; Toldrá *et al.*, 2018).

Algunos de los procesos que ocasionan cambios o pérdida de la actividad biológica en proteínas, o sus derivados, son lo que modifican la estructura, tales como: pH (acidificación), tratamientos químicos o enzimáticos (proteólisis, acilación, glicosilación y fosforilación), tratamientos térmicos (pasteurización, ultrapasteurización, etc.) y procesos de fermentación (Toldrá *et al.*, 2018; Johansen *et al.*, 2018). Los derivados con actividad biológica, aún después de ser sometidos a dichos procesos, son conocidos como “péptidos bioactivos o péptidos crípticos” (Castellano *et al.*, 2016; Udenigwe, 2017).

1.4. Péptidos bioactivos en la leche

Los péptidos bioactivos (PB) son fragmentos específicos de la proteína que permanecen inactivos mientras forman parte de la secuencia original de aminoácidos, pero que al ser liberados por la acción de enzimas proteolíticas como en el caso de la maduración y fermentación del alimento, o por enzimas durante el proceso de digestión, ejercen su actividad biológica (Figura 1.1) (Korhonen, 2009; Mohanty *et al.*, 2016). Además, presentan propiedades conservadas: el tamaño, la baja toxicidad y acumulación en tejidos, una alta actividad y amplio espectro de acción (Agyei *et al.*, 2016; Udenigwe *et al.*, 2017), lo que ha permitido su caracterización (Egger *et al.*, 2017).

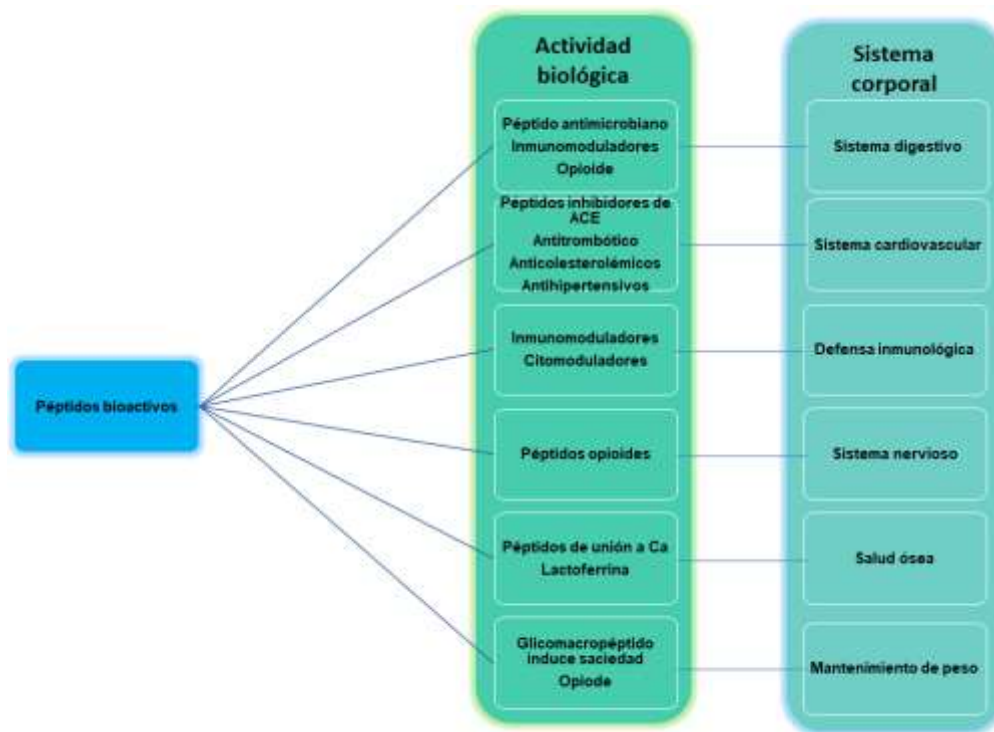


Figura 1.1. Propiedades farmacológicas reportadas en péptidos bioactivos obtenidos de la leche. Adaptado de Mohanty *et al.*, 2016.

Se ha planteado que el tamaño, que poseen los PB, proporciona la versatilidad suficiente para que puedan ser transportados y distribuidos en el organismo a través del torrente sanguíneo, haciendo posible la interacción con las diversas dianas moleculares; asociadas con efectos benéficos en el sistemas gastrointestinal, cardiovascular, inmune y nervioso (Udenigwe *et al.*, 2017; Fitzgerald *et al.*, 2020). La presencia de pequeñas secuencias aisladas provenientes de caseínas y proteínas de lactosuero asociadas con actividades a receptores opioides, antimicrobianos, -inflamatorios, -diabéticos, -cancerígenos e -hipertensivos confirman esta idea (Giacometti, & Buretić-Tomljanović., 2017; Fitzgerald *et al.*, 2020).

Por otra parte, existen reportes afirmando que los procesos de manufactura y digestión en la leche facilitan la proteólisis (Castellano *et al.*, 2016; Toldrá *et al.*, 2018), lo que facilita la liberación de péptidos bioactivos. Por lo que, en el caso específico de la leche, las proteínas lácteas como caseínas y proteínas de lactosuero presentes en un 3.5 % de la composición total funcionan como materia prima para generar PB. De la cual el 80 % pertenece a caseínas, clasificadas como α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ - caseína, mientras que el otro 20 % restante está constituido principalmente por α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, lactoferrina e inmunoglobulinas, conocidas como proteínas de lactosuero (Mohanty *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2017).

Capítulo 2. Generación de péptidos bioactivos en productos lácteos fermentados

2.1. Métodos empleados en la generación de péptidos bioactivos en la leche

En la industria láctea, los procesos de fermentación son de gran interés debido a la capacidad que poseen para liberar péptidos bioactivos. Dichos procesos provocan la hidrólisis de las proteínas lácteas, ya sea por medio de la fermentación con microorganismos proteolíticos (I) o enzimas exógenas provenientes de plantas, animales o microorganismos con métodos *in vitro* (II) (Agyei *et al.*, 2017).

Cada ruta proteolítica presenta ventajas que deben ser investigadas. Por ejemplo, para la ruta I y II es posible escalar la producción de PB a nivel industrial; haciendo accesible la adición del PB a un alimento y, por ende, a un número significativo de consumidores (Agyei *et al.*, 2017, Dupont, 2017; Egger *et al.*, 2017).

Sin embargo, existen diversos obstáculos antes de emplear esta tecnología, como la presencia de otras biomoléculas. Entre las cuales están presentes bacterias vivas/muertas, exo-polisacáridos y/o bacteriocinas que pueden ejercer funciones biológicas interfiriendo en la caracterización de la actividad biológica por PB en alimentos fermentados (Egger *et al.*, 2017).

2.2. Producción de péptidos bioactivos por fermentación microbiana

2.2.1. Fermentación microbiana

El proceso de fermentación es una técnica de uso común en la manufactura de productos alimentarios (García *et al.*, 2019), el cual desarrolla características como sabor y aroma, mejora aspectos como la inocuidad, vida de anaquel y aumenta la absorción de lípidos y proteínas en el ser humano (Sierra *et al.*, 2006). Estas cualidades se desarrollan por fermentación láctica, butírica, acética, alcohólica, entre otras, por medio del crecimiento y acción enzimática de los microorganismos utilizados, así como, al substrato y condiciones del proceso (Bamforth, 2005).

En productos lácteos la técnica más utilizada es la fermentación láctica; proceso metabólico que realizan ciertas bacterias en el cual convierten hidratos de carbono, principalmente lactosa, en ácido láctico y dióxido de carbono. El ácido láctico se encarga de disminuir el pH de la leche, permitiendo que ocurran los cambios acordes al producto lácteo deseado y microorganismos empleados (Hansen, 2018). De hecho, al de microorganismos empleados se le conoce como consorcios de bacterias y están constituidos principalmente por bacterias ácido lácticas o LAB's por sus siglas en inglés (Mora *et al.*, 2018; García *et al.*, 2019).

2.2.2. Microorganismos utilizados en procesos fermentativos

Las LABs son microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), y actualmente, se han identificado alrededor de 380 especies agrupadas en 40 géneros, dentro de los cuales los más utilizados son: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (García *et al.*, 2019; Kocak *et al.*, 2020). El kéfir, kumis, dahi, yogur, yakult y queso son algunos de los productos lácteos distribuidos y vendidos alrededor del mundo, los cuales son manufacturados por un proceso fermentativo mediante LAB's (Tabla 2.1) con el objetivo de propiciar características organolépticas inherentes del producto.

Más allá de las características sensoriales otorgadas por las LAB's, se han encontrado diversas propiedades funcionales y farmacológicas en estos productos; actividades como antimicrobianas, inmunomoduladoras, antioxidantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), opioides y anticancerígenos. Actividades atribuidas principalmente a diversos PB, detectados después del proceso de fermentación (Tojo-Sierra *et al.*, 2006; Toldrá *et al.*, 2018; García *et al.*, 2019).

Tabla 2.1. Productos lácteos fermentados con LAB's

Producto lácteo	Origen	Microorganismo	Características	Referencias
Kéfir	China	<i>L. casei</i> , <i>S. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , etc.	Producto espumoso con gusto ácido y alcohólico. Elaborada con leche de cabra, vaca o búfalo.	Hafeez <i>et al.</i> , 2014; Mohanty <i>et al.</i> , 2016; Toldrá <i>et al.</i> , 2018; Karami <i>et al.</i> , 2019.
Kumis	Rusia	<i>L. casei</i> , <i>S. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>Mycoderma</i> sp., <i>Saccharomyces lactis</i>	Bebida alcohólica láctica espumosa. Elaborada comúnmente con leche de caballo.	Hafeez <i>et al.</i> , 2014; Mohanty <i>et al.</i> , 2016; Toldrá <i>et al.</i> , 2018; Karami <i>et al.</i> , 2019.
Dahi	India	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S.</i>	Leche agria coagulada, intermediario de	Hafeez <i>et al.</i> , 2014;

		<i>cremoris</i> , <i>thermophilus</i> , <i>delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i>	S. L. subsp.	mantequilla y ghee. Elaborada con leche de cabra, vaca o búfalo	Mohanty <i>et al.</i> , 2016; Toldrá <i>et al.</i> , 2018; Karami <i>et al.</i> , 2019.
Yogur	Turquía	<i>L. delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i> <i>sp. thermophilus</i>	sp. S. <i>salivarius</i>	Natilla agria fermentada. Comúnmente elaborada con leche de vaca.	Hafeez <i>et al.</i> , 2014; Mohanty <i>et al.</i> , 2016; Toldrá <i>et al.</i> , 2018; Johansen <i>et al.</i> , 2018; Karami <i>et al.</i> , 2019.
Yakult	Japón	<i>L. casei</i> sp. <i>shirota</i>		Leche fermentada ultrapasteurizada. Elaborada con leche de vaca.	Hafeez <i>et al.</i> , 2014
Queso	Irak	<i>L. delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , S. <i>thermophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , etc.	sp.	Concentrado sólido que involucra la grasa y proteínas lácteas obtenido por coagulación enzimática o acidificación. Elaborado con leche de vaca, cabra, búfalo, oveja o camello.	Hafeez <i>et al.</i> , 2014; Mohanty <i>et al.</i> , 2016; Toldrá <i>et al.</i> , 2018; Karami <i>et al.</i> , 2019

2.2.3. Generación de péptidos bioactivos mediante fermentación microbiana

La capacidad de generar PB en el proceso fermentativo es debido a la incapacidad que poseen las LABs de producir todos los aminoácidos necesarios para su crecimiento (Hansen, 2018). Lo que las ha propiciado a desarrollar estrategias para contrarrestar este déficit por medio de la hidrólisis de proteínas, generando péptidos y aminoácidos libres (Hafeez *et al.*, 2014).

Las proteínas son hidrolizadas por un sistema que poseen las LABs: sistema proteolítico (Udenigwe *et al.*, 2017). El producto final del proceso son aminoácidos

que utiliza la bacteria como nutrimento, sin embargo, los péptidos que no pueden ser digeridos (Figura 2.1) tienen la capacidad de promover funciones fisiológicas al ser ingeridos por otros organismos complejos (Hafeez *et al.*, 2014).

Este sistema se conforma de una o más proteasas de pared celular denominadas Cell Envelope Proteinase (I), encargadas de hidrolizar las proteínas lácteas del medio circundante en péptidos de 4-30 residuos; Un sistema de transporte de péptidos (II), que incluye una proteína de unión de oligopéptidos, dos permeasas formadoras de poros y ATPasas, encargado de internalizar los péptidos liberados del espacio extracelular al citoplasma; y un grupo de di-peptidasas intracelulares (III), necesarias para degradar los péptidos internalizados en aminoácidos (Chaves-López *et al.*, 2014 ; Hafeez *et al.*, 2014).

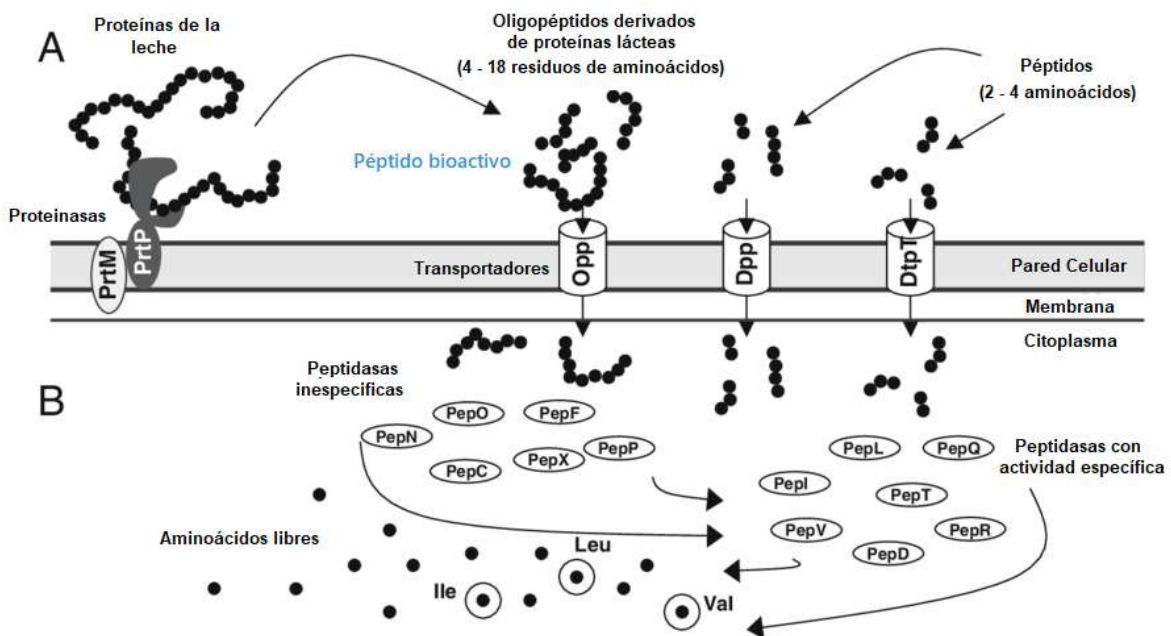


Figura 2.1. Sistema proteolítico. A) Acción de las proteasas de la envoltura celular sobre las proteínas lácteas y sistema de transporte de oligopéptidos (entre los cuales se encuentran potenciales péptidos bioactivos). B) Una vez internalizados, los péptidos u oligopéptidos son posibles blancos moleculares de las diversas peptidasas intracelulares con la finalidad de obtener aminoácidos libres los cuales funcionarían como nutrimentos (Udenigwe *et al.*, 2017). *Opp*-Oligopéptido permeasa, *Dpp*-Transportador ABC para péptidos que contienen de 2 a 9 residuos de aminoácidos, *DtpT*-Transportador ligado a iones para di- y tripéptidos, *PepN/PepC/PepP*-aminopeptidasas generales, *PepX*-X-prolil dipeptidyl aminopeptidasa, *PepT*-Tripeptidasa, *PepQ*-Prolidasa, *PepR*-Prolinasa, *PepI*-Prolina iminopeptidasa, *PepD* y *PepV* – *Dipeptidasas* D y V respectivamente (por sus siglas en inglés). Adaptado de Savijoki *et al.*, 2006.

2.2.4. Péptidos bioactivos generados por fermentación microbiana

En otras palabras, la liberación de péptidos por acción de microorganismos proteolíticos o fermentación microbiana consiste en el uso de proteasas extracelulares y peptidasas intracelulares (incluidas las endo-, amino-, di- y tri-peptidasas) contenidas en los consorcios de las LABs utilizados durante el proceso de fermentación (Mohanty, *et al.*, 2016; Kocak *et al.*, 2020). Los consorcios microbianos son importantes, y utilizados comúnmente, en el desarrollo de aspectos sensoriales deseados para el producto lácteo (García *et al.*, 2019).

Sin embargo, la coexistencia de microorganismos en un mismo nicho influye en factores como: el patrón de crecimiento, adaptación y desarrollo, morfología y habilidad para sintetizar proteínas (enzimas) y metabolitos secundarios necesarios para modificar la composición química del alimento (García *et al.*, 2019). Lo que implica un obstáculo en el estudio farmacológico de las sustancias bioactivas, especialmente en PB, forzando a realizar un proceso de extracción, purificación y caracterización antes de evaluar la actividad biológica por ensayos *in vitro* o *in vivo* del componente de interés, siendo un proceso complejo con elevados costos (Mora *et al.*, 2018; García *et al.*, 2019).

No obstante, dicho proceso ha permitido encontrar diferentes sitios de escisión, o acción, de las proteasas del sistema proteolítico, así como, la estructura de PB; demostrando que cada microorganismo proteolítico tiene la capacidad de liberar diferentes péptidos bioactivos. Por ejemplo, *L. paracasei* es capaz de liberar dipéptidos mediante la dipeptidil peptidasa con residuos, en la parte del carboxilo terminal, Ala-Phe, Pro-Leu, Lys-Leu, Leu-Gly y Lys-Phe.

Cepas como *Leuconostoc mesenteroides* y *L. curvatus* por la actividad de la X-prolil di-peptidil peptidasa libera particularmente dipéptidos que contienen prolina y Gly-Phe, *L. paracasei* subsp *casei* libera péptidos con residuos Gly-Pro, mientras que en *L. helveticus* diversos dipéptidos X (péptidos de colágeno), Pro- y tripéptidos X-Pro-Pro hidrolizados de caseína (Toldrá *et al.*, 2018). Cabe destacar que los aminoácidos terminales de la secuencia peptídica son importantes debido a que influyen en la unión con receptores, favoreciendo una actividad biológica u otra (Egger *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019).

Por otra parte, se ha observado que algunos de los dipéptidos liberados podrían ser hidrolizados por la actividad de dipeptidasas, siendo probable perder la actividad biológica (Hafeez *et al.*, 2014). Dentro de los microorganismos reportados con actividad dipeptidasa se encuentran *L. plantarum* y *L. paracasei* con la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos entre Leu-Leu, Phe-Ala, con menor velocidad a Ala-Phe, Tyr-Leu y Lys-Leu, otros dipéptidos como Ala-Ala o Leu-Gly no son afectados,

en cambio, microorganismos como *L. brevis* tiene una alta actividad dipeptidasa en Leu-Leu, Tyr-Leu, Ala-Ala, Leu-Gly, Ala-Phe, Lys-Leu y Phe-Ala, así como *L. casei* sp *casei* pero a una menor velocidad (Toldrá *et al.*, 2018).

2.3. Producción de péptidos bioactivos por proteólisis enzimática exógena

2.3.1. Enzimas utilizadas en la manufactura de productos lácteos

De manera general, las enzimas se pueden clasificar por su origen: endógenas o exógenas. Las enzimas endógenas están presentes o son secretadas naturalmente por el organismo, mientras que las exógenas son aisladas y purificadas a través de métodos biotecnológicos (Raveendran *et al.*, 2018; Gurumallesh *et al.*, 2019). Estas últimas son adicionadas, particularmente enzimas conocidas como proteasas; las cuales pueden ser clasificadas por su actividad endo o exo, es decir, endoproteasas y exoproteasas (actúan hidrolizando la secuencia de manera interna o desde los extremos carbonilos, respectivamente) (Collados *et al.*, 2020).

Algunas de estas enzimas son aisladas de diferentes órganos o secreciones animales, por ejemplo, la amilasa proviene de la saliva, la pepsina del estómago y proteasas, amilasas y lipasas de la secreción pancreática (Raveendran *et al.*, 2018). De manera similar, existen enzimas obtenidas a partir de frutas o vegetales como la bromelina que proviene de la piña, la papaína de la papaya, y la ficina del higo, las cuales son enzimas extensamente utilizadas en la industria alimentaria como ablandador de carnes, ayudante digestivo, coagulación de la leche, entre otros (Raveendran *et al.*, 2018, Gurumallesh *et al.*, 2019).

Sin embargo, las enzimas aisladas de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras son mayormente utilizadas en la industria alimentaria por ser más versátiles y estables que las de origen animal. Esto se debe a que son producidas por métodos fermentativos con requisitos de espacio y tiempos menores, y por su alta especificidad, sin mencionar que el proceso de modificación y optimización puede realizarse de manera sencilla (Raveendran *et al.*, 2018; Gurumallesh *et al.*, 2019; Collados *et al.*, 2020).

2.3.2. Proteasas y péptidos bioactivos

La manera de generar PB utilizando enzimas es a través de una combinación de proteasas (alcalasa, quimiotripsina, pepsina y termolisina) con la finalidad de liberar patrones de péptidos definidos, con un grado de hidrólisis bajo y una generación deficiente de aminoácidos. Permitiendo una diversificación en la bioactividad (Mohanty, *et al.*, 2016; Mora *et al.*, 2018).

No obstante, la reproducibilidad de la hidrólisis y estabilidad de la enzima no puede ser garantizada debido a que el sitio de unión es diferente para cada proteasa. De hecho, se ha observado una variabilidad de lote a lote, de una misma enzima, debido a variaciones en la actividad de ciertas enzimas (Toldrá *et al.*, 2018).

Por esta razón, se ha optado por elaborar un esquema de hidrólisis secuencial con proteasas. Considerando la capacidad de producir péptidos bioactivos de interés, controlando la hidrólisis, especie, variación y origen de las proteasas utilizadas, manteniendo la variabilidad al mínimo (Mora *et al.*, 2018; Toldrá *et al.*, 2018; Jimenez, *et al.*, 2020).

Capítulo 3. Propiedades terapéuticas de los péptidos bioactivos generados en productos lácteos

3.1. Actividad de los péptidos bioactivos

En todo caso, los péptidos bioactivos son aislados y obtenidos usando ensayos bio-dirigidos; proceso que realiza la selección de un grupo reducido de compuestos, con gran impacto biológico, de una gran lista de componentes presentes en una matriz biológica (Udenigwe, 2017). En la actualidad se han realizado diversos estudios, como los anteriormente dichos, los cuales desembocaron en la función, origen y secuencia de ciertos péptidos presentes en productos lácteos (Figura 3.1) (Egger *et al.*, 2017).

Así mismo, y con base en los resultados observados en dichos ensayos. Se determino que las actividades biológicas que poseen los PB son determinadas con base a la secuencia y composición de los aminoácidos que estén presentes en su estructura (Egger *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019). Demostrando el amplio rango de propiedades farmacológicas que pueden regular los PB en el organismo (Mohanty *et al.*, 2016).

Proteína	Proceso	Secuencia peptídica	Función	Alimento/Fuente	
Proteína láctea	caseínas	α -caseína	AYFYPEL (143 - 149)	Opioide	Hidrolizado de caseína (Fernández-Tomé <i>et al.</i> , 2016)
			YFYPEL (144 - 149)	Opioide	Hidrolizado de caseína (Fernández-Tomé <i>et al.</i> , 2016)
			CPP (2 - 21, 55 - 75, 126 - 136)	Unión a minerales	Leche (Nongonierna <i>et al.</i> , 2016), Queso parmesano (Egger <i>et al.</i> , 2017)
		β -caseína	VPP (84 - 86)	Reducción en presión arterial	Yogurt (Beltrán-Barrientos <i>et al.</i> , 2016); Calpis (Cicero <i>et al.</i> , 2016)
			IPP (74 - 76)	Reducción en presión arterial	Yogurt (Beltrán-Barrientos <i>et al.</i> , 2016); Calpis (Cicero <i>et al.</i> , 2016)
			HLPLP (134 - 138)	Reducción en presión arterial	Yogurt (Egger <i>et al.</i> , 2016); Calpis (Cicero <i>et al.</i> , 2016)
			LPVPQ (171 - 175)	Inhibidor de la DPP-IV	Hidrolizado de proteína (Karami <i>et al.</i> , 2019)
			PGPIPQ (63 - 68)	Antitumoral	Hidrolizado de proteína (Karami <i>et al.</i> , 2019)
			CPP (1 - 25, 1 - 28)	Unión a minerales	Leche (Nongonierna <i>et al.</i> , 2016), Queso parmesano (Egger <i>et al.</i> , 2017)
	κ -caseína	β -casofensina (94 - 123)	Reducción de estrés intestinal	Yogurt (Fernández-Tomé <i>et al.</i> , 2016)	
		IPP (108 - 110)	Reducción en presión arterial	Yogurt (Nongonierna <i>et al.</i> , 2016)	
		Glicomacro péptido (106 - 169)	Antiinflamatorio	Queso (Egger <i>et al.</i> , 2016), Kefir (Izquierdo-González <i>et al.</i> , 2019)	
	proteínas de suero	α -lactoalbúmina	DQWL (116 - 119)	Antiinflamatorio	Yogurt griego (Egger <i>et al.</i> , 2016)
			α -lactofina (102 - 105)	Opioide	Kumis (García <i>et al.</i> , 2019)
		β -lactoglobulina	β -lactostatina (IIAEK, 71 - 75)	Hipolipemiante, hipocolesterolémico	Hidrolizado de proteína con tripsina (Karami <i>et al.</i> , 2019)
			β -lactotensina (HIRL, 146 - 149)	Ansiolítico	Hidrolizado de proteína con quimiotripsina y tripsina (Karami <i>et al.</i> , 2019)
			DYKKY (98 - 102)	Antiinflamatorio	Proteínas de suero (Nongonierna <i>et al.</i> , 2016), Yogurt griego (Egger <i>et al.</i> , 2016)
		lactoferrina	lactoferrina-b, LFC-b (17 - 41)	Antitumoral, antimicrobiano, inmunomodulador	Calostro humano y leche materna (Egger <i>et al.</i> , 2017)
lactoferrina-b, LF-b (1 - 11)			Antimicrobiano	Calostro humano y leche materna (Egger <i>et al.</i> , 2017)	
lactoferrina-b, LFA-b (268 - 284)			Antimicrobiano	Kumis & Kefir (García <i>et al.</i> , 2019)	

Figura 3.1. Origen, secuencia y función de los péptidos bioactivos en productos lácteos. Adaptado de Egger *et al.*, 2017.

La actividad fue determinada por modelos *in vitro* e *in vivo*, antes y después de la digestión gastrointestinal, encontrando propiedades farmacológicas como reductoras de la presión arterial, hipolipemiantes, antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, hipoglucemiantes, anticancerígenas, insulino-trópicas y supresoras del apetito (Egger *et al.*, 2017; Mora *et al.*, 2018). Lo que representa una gran ventaja, ya que abre una amplia posibilidad de crear alimentos funcionales y/o nutracéuticos sustituyendo fármacos sintéticos, los cuales presentan efectos secundarios, ausentes (en la actualidad) en péptidos bioactivos, y/o aumentar los tratamientos ya existentes (Mohanty *et al.*, 2016; Karami *et al.*, 2018).

3.2. Impacto de los péptidos bioactivos reductores de presión arterial

Dentro de las actividades encontradas la reducción de la presión arterial destaca por su importancia en el tratamiento contra enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte a nivel mundial (Roth *et al.*, 2017). Dentro de las cuales se encuentra la hipertensión arterial; trastorno multifactorial que se caracteriza por mantener los niveles de presión arterial persistentemente altos [$\geq 140 / 90$ milímetros de mercurio (mm Hg)], afectando vasos sanguíneos, corazón, hígado y cerebro (Katigbak & Fontenot., 2018; Oparil *et al.*, 2018).

Dentro de los fármacos más utilizados para tratar la hipertensión se encuentra el losartán, amlodipino, indapamina, atenolol, doxazina, α -metildopa, entre otros. Dichos fármacos tienen como mecanismo de acción la inhibición o activación de distintos receptores biológicos, en sistemas como el sistema renina angiotensina aldosterona, el endotelio y el sistema nervioso central (Waller *et al.*, 2018; Oparil *et al.*, 2018).

Sin embargo, estos fármacos presentan una diversidad de efectos secundarios; que van desde tos aguda e insomnio hasta taquicardia, broncoespasmos, hipotensión, etc. (Taylor, 2014; Baghani *et al.*, 2018). Y, por si fuera poco, en la mayoría de las personas que sufren de este padecimiento es necesario administrar dos o más de estos fármacos para mantener la presión arterial en niveles óptimos (120 / 80 mm Hg), lo que a largo plazo termina agravando el cuadro clínico (Taylor, 2014; Baghani *et al.*, 2018).

Por otro lado, ensayos realizados en ratas hipertensas administradas oralmente con Histidina-Leucina-Prolina-Leucina-Prolina (HLPLP), péptido bioactivo con actividad reductora en presión arterial, revelaron un descenso máximo de 15 – 21 mm Hg al transcurrir dos horas. Sugiriendo que una ingesta de 40 mg/kg de peso corporal es suficiente para reducir la presión arterial significativamente y sin efectos secundarios observables (Sánchez-Rivera *et al.*, 2016).

Además, pruebas clínicas realizadas por Cicero *et al.*, (2016) en pacientes con síndrome metabólico, confirmaron que una pequeña dosis (10.2 mg/día) diaria, durante 4 semanas, de lactotripéptidos [Isoleucina-Prolina-Prolina (IPP) / Valina-Prolina-Prolina (VPP)] es suficiente para reducir 3.4 - 3.2 mm Hg en la presión arterial y conservarla durante 24 horas. Demostrando el potencial de los péptidos bioactivos, involucrados en la reducción de la presión arterial, como un posible tratamiento en la hipertensión o problemas relacionados con la vasodilatación.

3.2.1. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

El mecanismo de acción propuesto para los péptidos bioactivos utilizados (HLPLP, IPP, VPP) involucra la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (I-ECA I). Parte importante del sistema renina angiotensina aldosterona y crucial en la regulación de la presión vascular debido a que cataliza la transformación de la angiotensina I a angiotensina II, e hidroliza la bradicinina (vasodilatador) (Cicero *et al.*, 2016; Sánchez-Rivera *et al.*, 2016).

Por su parte, la angiotensina II induce la síntesis y liberación de aldosterona, mejorando la reabsorción de sodio en el túbulo proximal, incrementando su concentración, promoviendo así la retención de fluidos lo que a su vez aumenta el volumen sanguíneo, y por ende la presión arterial (Figura 3.2) (Mohanty *et al.*, 2016; Oparil *et al.*, 2018). Por esta razón al inhibir la ECA I se obtiene un efecto que disminuye la presión arterial, estrategia para tratar la hipertensión.

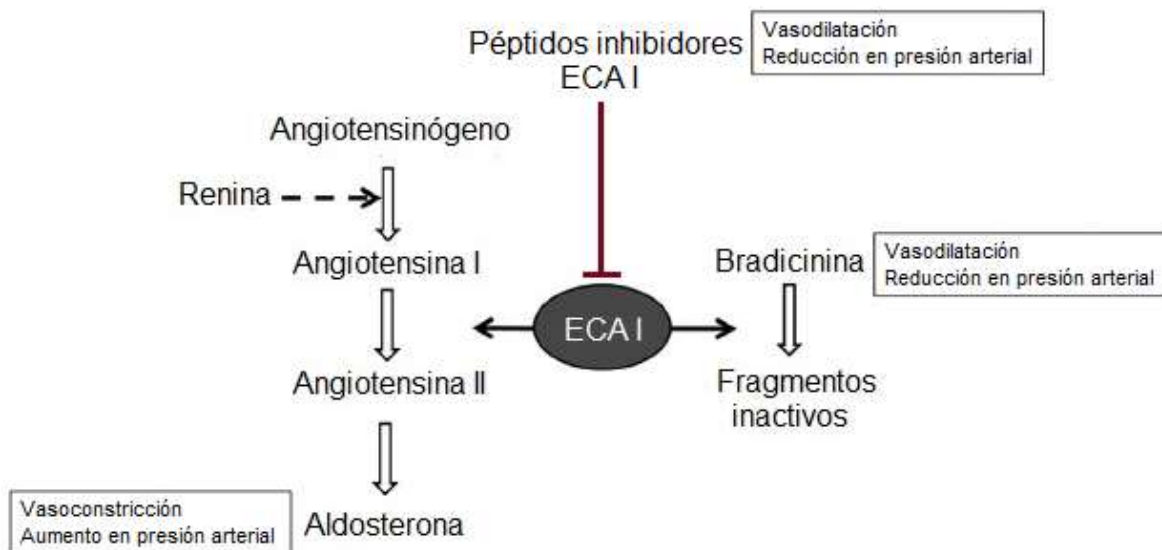


Figura 3.2. Mecanismo de acción de los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (Toldrá *et al.*, 2018).

Se ha observado que los péptidos bioactivos con actividad I-ECA poseen una estructura de aminoácidos corta, con longitud de dos a nueve aminoácidos. Esto presenta una ventaja debido a que aumenta la probabilidad de absorción intestinal e internalización a las células cuando se compara con péptidos de mayor tamaño y aminoácidos (Egger *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019).

Otro de los factores que aumentan la probabilidad de absorción es la resistencia a la hidrólisis por enzimas digestivas, dicha resistencia puede incrementar al presentar residuos de prolina en la secuencia; por lo que péptidos que presenten un alto número de prolina resistirán más tiempo en el sistema digestivo, facilitando su absorción y aumentando la probabilidad de ejercer su actividad en modelos *in vivo* (Nielsen *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019).

3.2.2. Estructura de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I

Estudios cuantitativos de relación estructura-actividad indicaron que la longitud de la cadena influye sobre la actividad inhibidora de la ECA, debido a que la influencia de los aminoácidos presentes en el carbonilo terminal se ve reducida. Este efecto se observa en péptidos mayores a seis residuos de aminoácidos (Nielsen *et al.*, 2017).

Cabe destacar, que la secuencia del carboxilo terminal dictamina la capacidad de unión con la enzima convertidora de angiotensina y, por lo tanto, su fuerza inhibitoria por medio de los residuos de aminoácidos presentes en la cadena (Nielsen *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019); por ejemplo, los residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano) y de prolina mejoran la unión, mientras que residuos dicarboxílicos (ácido glutámico, ácido aspártico) la disminuyen. Por su parte, se ha observado que residuos hidrofóbicos o ramificados (valina, leucina e isoleucina) en la fracción amino terminal mejoran la unión con la ECA (Nielsen *et al.*, 2017).

De hecho, existen experimentos realizados en ratas hipertensa donde se observa que dipéptidos con residuos de tirosina en C-terminal causaron una disminución lenta y prolongada en la presión arterial. En contraste, dipéptidos con fenilalanina en C-terminal produjeron una reducción más rápida, pero, con una duración de acción más corta (Karami *et al.*, 2019).

Entonces, se puede deducir que grupos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y estructuras cíclicas no polares, como la prolina, aumentan la probabilidad de unión con ECA para producir un efecto inhibitorio. Aumentando el efecto mientras estén presentes en la parte carboxilo terminal, y la resistencia a enzimas digestivas.

3.3. Péptidos bioactivos antioxidantes

3.3.1. Estrés oxidante

Otra de las propiedades de las que más información se tiene en la actualidad es la propiedad antioxidante; la cual tiene un rol regulatorio en el metabolismo oxidativo, por la capacidad de neutralizar especies reactivas de oxígeno (Mohanty *et al.*, 2016; Aguilar-Toalá *et al.*, 2017). Al contrarrestar los cambios oxidativos provocados por el proceso denominado como estrés oxidativo se promueve la supervivencia de las células (Mohanty *et al.*, 2016).

El estrés oxidativo es un proceso definido como el desequilibrio entre la formación de especies reactivas de oxígeno y agentes antioxidantes celulares, en favor de las especies oxidantes (Priya-Dharshini *et al.*, 2020; Battino *et al.*, 2020). Las especies reactivas de oxígeno son moléculas generadas naturalmente en mitocondrias, peroxisomas, lisosomas y el retículo endoplásmico, por la reducción parcial de oxígeno (Reyes-Fermin *et al.*, 2020), por ejemplo, la producción de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina y oxígeno molecular (O₂), por medio de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), donde se genera NO[•] y O^{•-} (Battino *et al.*, 2020).

3.3.1.1. Consecuencias del estrés oxidante

La producción basal de especies reactivas de oxígeno es necesaria para regular funciones celulares, especialmente en mitocondria y retículo endoplásmico donde los grupos tiol (-SH) de las cisteínas actúan como sensores químicos los cuales son sometidos a modificaciones post-traduccionales dependientes del microambiente redox (Reyes-Fermin *et al.*, 2020). Sin embargo, un incremento excesivo en la producción de especies reactivas de oxígeno produce niveles altos de daño oxidativo (Reyes-Fermin *et al.*, 2020; Priya-Dharshini *et al.*, 2020), afectando proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y factores de transcripción (Battino *et al.*, 2020).

Algunas de estas proteínas están involucradas en procesos antioxidantes como; las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa-1 (GPx-1) (Priya-Dharshini *et al.*, 2020), y en procesos de plegamiento de proteínas, por lo que un daño en alguna de ellas puede ocasionar una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, ya sea por la falta de desintoxicación o por el incorrecto plegado de proteínas. Cabe destacar, que la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas puede aumentar la producción de ROS; dando lugar a un círculo vicioso (Reyes-Fermin *et al.*, 2020) ocasionando patologías como disfunción endotelial, cáncer, diabetes, aterosclerosis, isquemia, diabetes y enfermedades neurológicas (Fernández-Rojas *et al.*, 2020; Priya-Dharshini *et al.*, 2020).

3.3.2. Origen de los péptidos bioactivos

Por otra parte, se ha determinado que el 95% de los péptidos antioxidantes encontrados en productos lácteos provienen de caseínas; principalmente de β -caseína (45%) y α -S₁ caseína (40%) (Nielsen *et al.*, 2017). Presentando una estructura con longitud de 2 a 14 aminoácidos, estando presentes (en su mayoría) residuos hidrofóbicos en la parte amino y/o carboxilo terminal, así como residuos de prolina, histidina o tirosina dentro de su secuencia (Mohanty *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 2017).

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los péptidos antioxidantes pueden contrarrestar y/o prevenir la formación de radicales libres involucrados en la oxidación de la membrana lipídica, proteínas celulares, ADN y enzimas. Más aún, tecnológicamente pueden ser utilizados en productos cárnicos; previniendo la oxidación de lípidos y generación de sabores desagradables que pueden ocurrir durante su almacenamiento (Nielsen *et al.*, 2017).

Uno de los productos lácteos donde se han encontrado estas estructuras es en el yogur, específicamente en extractos acuosos, donde se determinó la actividad antioxidante por medio del ensayo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Los valores medios reportados fueron de 7.697 mmol de Trolox/g en yogures comerciales y 10.115 mmol de Trolox/g yogures artesanales (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017), llegando a ser valores hasta 50% más altos que los presentes en el limón (6.7 mmol de Trolox/g) con respecto al yogur artesanal (Zavala *et al.*, 2007).

3.3.3. Estructura y actividad de los péptidos antioxidantes

De acuerdo con un análisis estructura-actividad de los péptidos antioxidantes se observaron aminoácidos con la capacidad de aumentar o disminuir la actividad antioxidante. Por ejemplo, la substitución de L-Histidina por D-Histidina en un péptido puede reducir la actividad antioxidante debido a que la posición del grupo imidazol influencia la actividad antioxidante (Nielsen *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019).

De esta manera, se confirmó que la actividad antioxidante de un péptido depende no solo de la secuencia de aminoácidos, sino que también de la posición y orientación que presentan. Ocasionando que cualquier modificación en la secuencia de aminoácidos resulte en cambios de la actividad antioxidante (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019).

Tomando en cuenta dichos estudios, se logró determinar la capacidad antioxidante de algunos residuos. Por ejemplo, la histidina posee propiedades que le permiten

actuar por reducción directa vía transferencia de electrones o por quelación de radicales por transferencia de hidrógenos resultando en especies más estables debido al grupo imidazol (Aguilar-Toalá *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2017; Karami *et al.*, 2019).

Por su parte, la cisteína proporciona la capacidad antioxidante debido a la interacción directa entre radicales libres y el grupo tiol (-SH). De igual forma los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) reducen la formación de radicales libres, por su capacidad de donar protones a las especies deficientes de electrones, la tirosina posee grupos fenólicos que pueden funcionar como donadores de hidrógenos (Silvia *et al.*, 2012; Karami *et al.*, 2019).

En cuanto a los aminoácidos hidrofóbicos (valina, leucina e isoleucina) encontrados se ha reportado que promueven la actividad antioxidante facilitando la interacción entre el péptido y los ácidos grasos, inhibiendo el proceso de peroxidación de lípidos, concluyendo en la protección contra la oxidación (Karami *et al.*, 2019).

Capítulo 4. Los péptidos bioactivos como alimento funcional

4.1. Alimentos funcionales y nutraceuticos

El concepto alimento funcional nació en Japón como resultado de la búsqueda para definir a los alimentos que fueron desarrollados para mejorar la salud y reducir el riesgo de contraer enfermedades (Valenzuela *et al.*, 2014). Sin embargo, al pasar los años las definiciones han evolucionado, adaptándose a nuevos conceptos (Chaves-López *et al.*, 2014).

En la actualidad, la mayoría de los investigadores define un alimento funcional como “un alimento consumido como parte de una dieta habitual, que ha demostrado tener beneficios fisiológicos y/o reducir el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones nutricionales básicas” (Ghaffari & Roshanravan, 2020). La definición de alimento funcional se modificó debido a la introducción del término nutraceutico.

Acuñado en 1989 por Stephen DeFelice, el término nutraceutico, surgió de las palabras “nutrición” y “farmaceutico”, definiéndose actualmente como “un alimento o parte de un alimento que provee beneficios en la salud, incluida la prevención y tratamiento de enfermedades más allá de las funciones nutricionales básicas” (Santana-Gálvez *et al.*, 2019; Ghaffari & Roshanravan, 2020). Con base en esta definición los alimentos nutraceuticos pueden estar presentes en medicamentos botánicos, suplementos dietéticos o compuestos aislados, si algunos de los ingredientes provienen de fuentes alimentarias (Santana-Gálvez *et al.*, 2019).

4.1.1. Alimentos nutraceuticos; una nueva oportunidad como tratamiento de enfermedades.

Algunos investigadores han llegado a recomendar dichos alimentos como tratamientos complementarios o alternativos contra diversas enfermedades debido a las propiedades preventivas y terapéuticas que poseen (Santana-Gálvez *et al.*, 2019). Destacando los alimentos nutraceuticos sobre los funcionales ya que la actividad biológica se encuentra en una parte del alimento, siendo relativamente sencillo aislar y concentrar el compuesto para después desarrollar una base que funcione como tratamiento de un padecimiento específico (Santana-Gálvez *et al.*, 2019; Ghaffari & Roshanravan, 2020).

En comparación, un alimento funcional al ser una matriz compleja puede causar diversas actividades, llegando a ser contraproducente en ciertas enfermedades al no saber en ciencia cierta los efectos producidos por todos sus componentes (Santana-Gálvez *et al.*, 2019; Ghaffari & Roshanravan, 2020). Además, los alimentos nutraceuticos presentan ciertas ventajas cuando se comparan con fármacos, al no requerir extensas pruebas de toxicidad y rigurosas pruebas en

humanos se reduce significativamente el tiempo de liberación en el mercado (Santana-Gálvez *et al.*, 2019; Ruano-Ordás *et al.*, 2019).

Sin mencionar, que su desarrollo es menos costoso, poseen pocos o ningún efecto adverso (que han sido asociados a medicamentos después de una administración a largo plazo) y pueden ser administrados fácilmente por vía oral. Ruta preferida entre consumidores ya que no es invasiva, no implica técnicas especiales o instrucciones complejas, y sigue el mismo proceso de consumo que los alimentos y nutrimentos en el cuerpo (Santana-Gálvez *et al.*, 2019).

4.2. Péptidos bioactivos como alimentos nutraceuticos

De acuerdo con la creciente percepción sobre la relación entre dieta y salud, los consumidores están interesados en prevenir enfermedades y mejorar su propio bienestar mediante el uso de alimentos nutraceuticos (Hafeez *et al.*, 2014). Por esta razón, la industria nutraceutica ha desarrollado un particular interés en el estudio, descubrimiento y desarrollo de péptidos bioactivos provenientes de productos lácteos para la producción de alimentos nutraceuticos que promuevan la salud y aumenten la calidad de vida de la población (Giromini *et al.*, 2018).

Ya que los péptidos bioactivos presentan efectos biológicos que incluyen actividades antimicrobianas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (antigluceante), agonistas y antagonistas a receptores opioides (analgésicos), inmunomoduladores, funciones antioxidantes, entre otras, tienen el potencial necesario para desarrollar un alimento nutraceutico (Saavedra *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2017; Egger *et al.*, 2017). Además, de que son sustancias derivadas de los alimentos que pueden ser almacenadas en formas medicinales como píldoras, capsulas, pociones y líquidos (Ghaffari & Roshanravan, 2020).

De hecho, este enfoque ya está siendo implementado en países como Japón y Finlandia, en los que existen algunos productos lácteos que poseen péptidos bioactivos; los cuales fueron agregados y/o generados durante el proceso de fermentación. Dichos productos son leches fermentadas que poseen efectos antihipertensivos y han sido distribuidos bajo el nombre de “Calpis” o “Ameal S” (Calpis Co, Japón) y “Evolus” (Valio Oy, Finlandia), los péptidos que poseen son lactotripéptidos que provienen de β y κ - caseína (IPP y VPP) (Hafezz *et al.*, 2014; Ghaffari & Roshanravan, 2020). Estudios *in vivo* realizados en humanos lograron evaluar y determinar, de manera exitosa, que 95 mL/d y 150 mL/d son suficientes para reducir la presión arterial en 14.1 mm Hg y 10.8 mm Hg respectivamente, dichos efectos se observaron a lo largo de ocho semanas (Domínguez-González *et al.*, 2014).

Capítulo 5. Discusión

En México, existen una gran diversidad de productos tradicionales y comerciales que utilizan leche como materia prima; los productos líquidos fermentados (yogur bebible, leche búlgara o kéfir, jocoque y leches fermentadas), y productos sólidos fermentados como quesos (chihuahua, manchego, “de bola”, Cotija, etc.), sin mencionar, los productos lácteos frescos. Sin embargo, en la actualidad, no existen productos lácteos nutracéuticos o derivados de la leche que utilicen péptidos bioactivos como principio activo; por lo que se vuelve una gran oportunidad de desarrollo económico y tecnológico, mediante la extracción, adición y estandarización de un PB específico en un alimento o producto terminado.

Aunque, antes de poder pensar en generar un producto innovador, eficaz y costeable que pueda ser distribuido a una cantidad significativa de la población hace falta desarrollo e investigación, tanto científica, como de mercado, que determine su viabilidad. Por esta razón, es necesario generar información de cómo se generan los péptidos bioactivos, la composición, secuencia y patrón de fragmentación de proteínas lácteas en diferentes productos lácteos de acuerdo con las cepas utilizadas en el proceso de fermentación, maduración y digestión.

Cabe destacar que en otros países se comercializan alimentos nutracéuticos (Calpis, Ameal S y Evolus) los cuales ya fueron sometidos a pruebas *in vitro* e *in vivo*, comprobando su efectividad en humanos; con una ingesta mínima diaria que va desde los 95 mL hasta los 150 mL, funcionando como productos base que impulsen el desarrollo de productos lácteos similares y/o derivados. Las evaluaciones realizadas en estos productos son particularmente interesantes, debido a que, con una pequeña porción consumida de este producto, no mayor al 5% del consumo recomendable promedio de agua diaria (2 L) es factible disminuir de 10 hasta 14 puntos la presión arterial (Cicero *et al.*, 2016).

Este hecho, hace factible proponer dichos alimentos nutracéuticos, y en particular a los péptidos bioactivos presentes en ellos (IPP y VPP), como tratamiento para la presión elevada que de acuerdo con la nueva guía para la prevención, detección, evaluación y manejo de la hipertensión promovida por el Colegio Americano de Cardiología y Asociación Americana del Corazón, en el 2018, se diagnostica con niveles repetidos de presión arterial 120-129/<80 mm Hg, y como un agente complementario en el tratamiento contra la hipertensión de primera y segunda fase (130-139/80-89 mm Hg y $\geq 140/\geq 90$ mm Hg respectivamente). Siendo una estrategia para disminuir el uso de fármacos aprobados como atenolol, captopril, verapamilo, losartán, entre otros, así como de los efectos secundarios atribuidos, que van desde tos, diarrea, estreñimiento, vértigo hasta vómito, hipotensión e insomnio;

desventajas que incrementan el riesgo y aumentan las molestias en el tratamiento contra la hipertensión.

Teniendo en cuenta dichos antecedentes, las posibilidades de promover a los péptidos bioactivos como un tratamiento alternativo y/o complementario contra enfermedades (hipertensión, diabetes, cáncer, entre otras) por medio de un alimento nutracéutico incrementan. Aunque, el desarrollo de una presentación comestible o bebible como un yogur, queso o leche fermentada no sea viable por alguna situación en concreto, existen otras posibilidades que pueden ser explotadas como la micro o nano-encapsulación, emulsión, extractos o aislados de dichos PB, las cuales al ser una presentación concentrada tienen la capacidad de ser más potentes, requiriendo una menor cantidad para ejercer su efecto farmacológico, sin perder su clasificación de alimento nutracéutico al provenir de una parte esencial de los alimentos (lacteos).

En cuanto a los procesos para obtener péptidos bioactivos, si bien es cierto que los consorcios de bacterias aumentan la producción de péptidos bioactivos también lo es la inespecificidad que puede surgir del mismo. Además, las LABs generalmente poseen actividad aminopeptidasa, siendo capaces de liberar aminoácidos como alanina, lisina, prolina, arginina, metionina, leucina e isoleucina (Toldrá *et al.*, 2018); por lo que en un proceso de maduración o fermentación extendido puede disminuir la capacidad de generar péptidos bioactivos por la hidrólisis de los péptidos bioactivos en aminoácidos libres, dependiendo el consorcio de bacterias utilizado en el proceso (García *et al.*, 2019).

Sin embargo, es factible diseñar un proceso tecnológico que permita generar de manera específica, en cierto grado, un péptido bioactivo. Sin embargo, existen diversas estrategias las como la inoculación secuencial o la inhibición o mejora de ciertos LAB's que funcionen como antimicrobianos para reducir ciertas bacterias que producen uno u otro péptido.

Para ello hacen falta más ensayos que determinen el sitio de unión y comportamiento de los microorganismos en la fermentación y maduración, siendo el género *Lactobacillus* los principales LAB's en ser explorados por su alta versatilidad, a partir de proteínas lácteas; que permitan definir los parámetros y condiciones tecnológicas necesarias para desarrollar el péptido bioactivo, o varios, de interés, minimizando la hidrólisis en aminoácidos y estandarizando el proceso de un producto lácteo. Para de esta forma garantizar la concentración de un PB en específico, y, por lo tanto, el efecto farmacológico que se producirá al ser consumido.

El queso, es uno de los productos lácteos que podría implementar un programa de hidrólisis secuencial con enzimas exógenas, ya que, la producción de queso se puede dividir en dos secciones, obtención de la cuajada (queso) y maduración del queso (sección que puede ser controlada por la adición de enzimas exógenas): La primera sección empieza cuando se agrega cuajo de ternera (coagulante) en leche fresca, desestabilizando micelas de caseínas debido a que la fracción de κ -caseína, localizada en la periferia de las micelas se hidroliza; causando la floculación y agregación de las caseínas. Se ha observado que los componentes que están presentes en el cuajo actúan sobre residuos de fenilalanina, leucina o ácido glutámico desarrollando péptidos bioactivos (Toldrá *et al.*, 2018) Dichos componentes son la quimosina (80-90 % de la actividad enzimática) y la pepsina (Raveendran *et al.*, 2018; Collados *et al.*, 2020) pudiendo obtener los péptidos derivados de pepsina.

En la etapa de maduración, son utilizadas las proteasas para hidrolizar caseínas, donde su principal función es generar sabor y olor (Gurumallesh *et al.*, 2019); es en este punto donde la aplicación de proteasas exógenas específicas tiene la capacidad de generar un péptido bioactivo específico. Para diseñar este programa, se requiere conocer los diferentes puntos de unión enzima-péptido o enzima-proteína, con la finalidad de evitar reacciones indeseadas y que el producto de una primera enzima no se vea afectado por la adición de una segunda. De esta manera se establecen los puntos de escisión, tanto de la primera como de la segunda enzima empleada, y evitan interferencias entre ellas e hidrólisis de los productos.

De igual forma, dicha información y proceso puede ser empleada en una ruta alterna utilizando aislados de proteínas lácteas como materia prima, los cuales al tener una pureza elevada se podrá utilizar un programa como el anteriormente mencionado, pero sin interferencias de algún otro componente del alimento siendo más específica la producción. La ausencia de otros microorganismos, como los del consorcio bacteriano, disminuyen las interferencias, y el sitio de acción será específicamente el de la enzima empleada. Siendo posible implementar una fermentación o maduración controlada para favorecer la generación de un péptido u otro. Sin embargo, emplear este método hace necesario un proceso de extracción que permita separar el compuesto de interés de los residuos proteínicos, para posteriormente adicionarlos a una forma farmacéutica. De esta forma se facilita el proceso de estandarización de la concentración y potencia de los PB en los productos.

Aunque el diseño de un programa similar suene ambicioso y complejo, existen herramientas en la actualidad que pueden emplearse para su diseño; un análisis por computadora puede simular el proceso desde el inicio, utilizando la secuencia de la proteína madre (proteína láctea) y el sitio de corte de las enzimas, definiendo

el producto o los fragmentos generados, llegando hasta una proyección viable de los péptidos obtenidos al final del proceso. Cabe mencionar que en dicho análisis se obtendrían los posibles fragmentos provenientes de la proteína láctea, más no, las posibles interacciones que podrían estar ocurriendo con alguna otra macromolécula.

De acuerdo con Udenigwe & Fogliano (2017)., podrían generarse reacciones como productos de amadori, quinonas y/o polimerización por la formación de puentes disulfuro de los grupos tiol, deshidratación de alcoholes, glicosilación de aminas y oxidación de anillos aromáticos. Por lo que también se tendrán que considerar al momento de diseñar el programa de maduración o fermentación; con la finalidad de evitar productos indeseados en el proceso y/o en el almacenamiento.

Se debe hacer mención que existen maneras distintas de generar péptidos bioactivos, siendo la síntesis química y enzimática las dos más factibles. Sin embargo, para llevar a cabo dichas propuestas se requieren mayores estudios para definir las diferentes condiciones como el medio de reacción, la solubilidad, el rendimiento, la regio-selectividad, costos, entre otros, siendo un proceso de investigación a largo plazo, ya que cada sistema se debe estudiar de forma particular para cada enzima, substrato y PB deseado. Por esta razón, el diseño de un programa hidrolítico, a partir de proteínas mayormente estudiadas (proteínas lácteas) se visualiza en un periodo de tiempo más corto y menos costoso, sin mencionar la ventaja de que al ser utilizado en el proceso

Por otra parte, la ingesta de productos lácteos ha sido relacionada con un aumento en péptidos bioactivos en plasma sanguíneo debido a que más allá de sus propiedades nutricionales, las caseínas y proteínas de lactosuero presentan resistencia a la desnaturalización e hidrólisis, respectivamente. Por lo que, al consumir productos lácteos, pequeños fragmentos pueden estar presentes después de la digestión, y de acuerdo con Wada & Lönnerdal (2014)., la resistencia a condiciones ácidas y enzimas pancreáticas aumentan la probabilidad de que la secuencia de aminoácidos ejerza una función en el organismo, debido a que aumentan las probabilidades de absorción y, por lo tanto, la interacción con su receptor.

La estrategia que demostró la presencia y actividad de dichas secuencias fue la mencionada por Egger & Ménard en el 2017; la cual determinó las secuencias de aminoácidos y los efectos producidos después de la ingesta y digestión de 100 g de queso parmesano al día, por medio del perfil y concentración de los péptidos presentes en el plasma sanguíneo. Asegurando la presencia de secuencias resistentes a la digestión con efectos farmacológicos en el organismo.

Sin embargo, ciertos parámetros toxicológicos (dosis letal media, concentración efectiva media, teratogenicidad, entre otras) tendrían que ser evaluados previamente en caso de querer replicar la estrategia con otro producto. Debido a la posibilidad que menciona Santana-Gálvez *at al.*, (2019); el consumo excesivo puede causar efectos adversos y/o potenciar una enfermedad precedente en el individuo como la diabetes o hipertensión, además, de ser un requisito regulatorio para la venta y distribución de un producto alimentario en cualquier país.

Para su estudio, se requiere analizar el grado y mecanismo de absorción que siguen los péptidos bioactivos tras la liberación por enzimas pancreáticas. Sin embargo, solamente ha sido reportado de manera general debido al grado de absorción y alto metabolismo, sin mencionar, la diferencia que existe entre evaluaciones *in vitro* e *in vivo* (Wada & Lönnerdal, 2014; Giromini *et al.*, 2018) por la cantidad que se requiere e interacción que puede haber con otras enzimas y moléculas.

Cabe notar que el mecanismo de transporte depende directamente de la secuencia de aminoácidos, y el sitio de acción es único para cada actividad farmacológica, volviendo necesario el estudio individual de cada péptido para determinar su mecanismo de acción, aumentando la dificultad y costos (estudios similares se aplican a los nuevos fármacos). Sin embargo, los péptidos bioactivos llegan a presentar secuencias específicas y conservadas agrupadas de acuerdo con la propiedad bioactiva que exhiban, permitiendo encontrar secuencias similares, en diferentes fuentes naturales, las cuales podrían tener alto potencial farmacológico para desarrollar un alimento nutracéutico o fármaco.

Un estudio detallado entre las similitudes estructurales, el sitio de unión y las interacciones involucradas con los residuos del péptido, definiendo el tipo de enlaces que permiten la activación de dicha diana molecular, ya sea un efecto agonista o antagonista, es de gran relevancia debido a que se puede aprovechar esta información para modificar su estructura con el objetivo de aumentar o disminuir algún aspecto deseable o indeseable como: la potencia, eficacia o toxicidad del efecto biológico mediante la optimización de la molécula o síntesis.

De acuerdo con la idea anterior, se llevaron a cabo diversos estudios que revelaron la composición y longitud de algunos péptidos bioactivos. Determinando la influencia o función de ciertos aminoácidos, que se repetían en varias secuencias con la misma actividad, los cuales eran fundamentales para la unión con la diana molecular específica, por lo que podrían funcionar como reguladores, aumentando o disminuyendo la actividad que presenta el péptido bioactivo.

Por ejemplo, secuencias de aminoácidos con altos contenidos de prolina (IPP, VPP, HLPLP) localizados en el extremo carboxilo terminal, presentaron interacciones

favorables con la enzima convertidora de angiotensina I debido a la unión de los sitios S_1 , S'_1 y S'_2 de la ECA con los carbonos saturados del anillos de prolina, siendo interacciones hidrofóbicas las principales involucradas, aunque es probable que la formación de puentes de hidrógeno y enlaces iónicos incrementen su afinidad (Figura 5.1), finalizando en una inhibición competitiva, disminuyendo la presión arterial. De la misma forma, altos contenidos de histidina, cisteína y tirosina favorecen la capacidad antioxidante de un péptido, por lo tanto, su unión a radicales libres y agentes oxidantes debido a las interacciones explicadas en la sección 3.3.3.

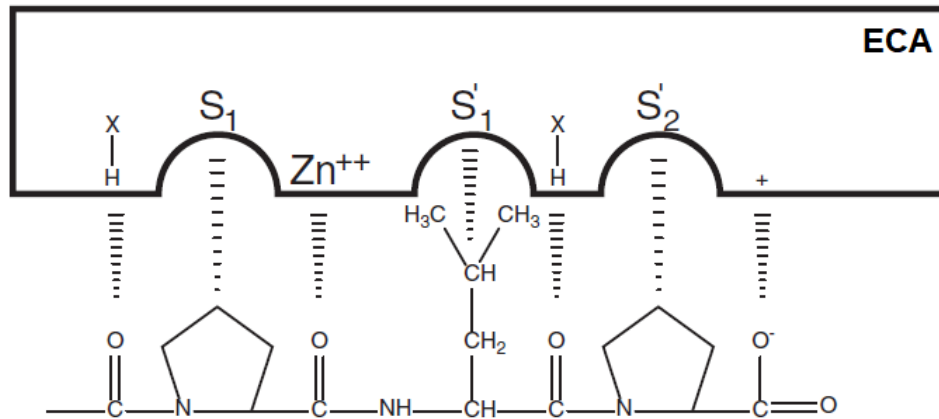


Figura 5.1. Sitio de unión ECA con los residuos C-terminal de HLPLP (Wada & Lönnerdal, 2014). Mostrando un esquema de las interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos y el sitio de unión de ECA. Así como los puentes de hidrógenos y enlaces iónicos que se podrían formar.

Por otra parte, en los aminoácidos que funcionan como reguladores, se han observado características interesantes: como las que presenta Nielsen *et al.*, 2017. Donde se menciona la influencia que presenta la orientación de los aminoácidos, confirmando que el intercambio de una L-histidina por una D-histidina disminuye su capacidad antioxidante por la modificación del efecto estérico que proporciona la posición del grupo imidazol.

De manera similar, los residuos ácidos (ácido glutámico y aspártico) presentan un aspecto negativo en la unión con ECA, pudiendo ser la capacidad de donar puentes de hidrógeno el aspecto decisivo, ya que en la estructura de los lactotripéptidos solo existen aceptores de puentes de hidrógeno, debido a que el sitio de unión de la ECA es el principal donador de dichos enlaces. En cambio, los residuos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) influyen de manera positiva, mejorando la actividad antioxidante y reductora de la presión arterial, e inclusive regulan la manera en que es metabolizado el péptido, ya que, se han observado que al estar unida la tirosina en C-terminal se provoca una disminución lenta y prolongada, al

contrario que, la fenilalanina la cual produce una reducción rápida, pero con duración más corta, en presión arterial.

Los residuos hidrofóbicos (valina, leucina e isoleucina) unidos a la parte amino terminal facilitan la interacción entre la secuencia peptídica y ácidos grasos, lo que aumenta el poder antioxidante por la inhibición del proceso de peroxidación de lípidos. De hecho, sería factible establecer que los residuos hidrofóbicos presentan un comportamiento conservado, ya que (aunque no se menciona por su bajo perfil de estudio) los péptidos antimicrobianos presentan un mecanismo de acción similar, debido a que su estructura posee una superficie hidrofóbica que contribuye en la unión con la membrana externa de las bacterias, siendo más eficaz en bacterias Gram positivo por la ausencia de la doble membrana característica de las Gram negativas. Llegando a ser un aspecto útil tanto farmacológicamente como tecnológicamente (por ejemplo, en la industria cárnica).

Conclusiones

Los péptidos bioactivos son fragmentos específicos de las proteínas con actividad biológica, los cuales presentan propiedades conservadas como el tamaño, baja toxicidad y acumulación en tejidos. Siendo los péptidos antihipertensivos y antioxidantes de los productos lácteos fermentados secuencias con altos contenidos de prolina e histidina, cisteína y tirosina, en las cuales las interacciones hidrofóbicas provocan una interacción lenta y prolongada, así como aumentar el poder antioxidante, respectivamente.

El método a corto plazo para generar péptidos bioactivos en la manufactura de productos lácteos fermentados es diseñar e implementar un programa hidrolítico tecnológico controlado donde se favorezca la producción de un péptido bioactivo mediante el uso de bacterias ácido lácticas y enzimas exógenas conocidas. O, de manera alterna, utilizar un aislado proteínico el cual será sometido a condiciones fermentativas con enzimas exógenas o una (o varias) bacterias ácido lácticas para producir con una mayor facilidad el péptido bioactivo de interés, para posteriormente aislarlo y adicionarlo al alimento o desarrollar una forma farmacéutica.

De esta manera, los productos lácteos fermentados ofrecen una gran oportunidad de producir alimentos nutraceuticos como estrategia para tratar diversas enfermedades, dentro de los cuales destacan la hipertensión y el estrés oxidante, siendo una alternativa en sus tratamientos con fármacos convencionales; los cuales presentan efectos secundarios a corto y largo plazo, mayor costo de venta, baja eficiencia y, en ciertos casos, se adquiere tolerancia requiriendo dosis mayores; agravando el cuadro clínico por los efectos secundarios asociados.

De acuerdo con lo anteriormente mencionado es factible proponer el desarrollo de un alimento nutraceutico, ya que la producción de péptidos bioactivos puede ser escalada a nivel industrial al establecer un programa hidrolítico controlado o partiendo de proteínas aisladas (para un mayor control). Y al estar contenidos en un alimento se facilita su distribución, adquisición y aumenta el valor nutricional del alimento, generando en el consumidor un doble beneficio (nutricional y terapéutico), manteniendo un efecto terapéutico estable y específico por medio de la dieta.

Bibliografía

1. Aguilar-Toalá, J. E., Santiago-López, L., Peres, C. M., Peres, C., Garcia, H. S., Vallejo-Cordoba, B., ... Hernández-Mendoza, A. (2017). Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, *100*(1), 65–75.
2. Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, *98*, 244–256.
3. Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, *33*(10), 692-699.
4. Bamforth, C. W., (2005). The Science Underpinnig Food Fermentations **En:** *Food, Fermentation and Micro-organisms*. Ltd, Kundli: Blackwell Science, capítulo 1.
5. Beltrán-Barrientos, L. M., Hernández-Mendoza, A., Torres-Llanez, M. J., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Córdova, B. (2016). Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of Dairy Science*, *99*(6), 4099–4110.
6. Battino, M., Giampieri, F., Cianciosi, D., Ansary, J., Chen, X., Zhang, D., ... Forbes-Hernández, T. (2020). The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation. *Phytomedicine*, (December 2019), 153170.
7. Bhagani, S., Kapil, V., D-Lobo, M. (2018). Hypertension. *Medicine*, *46* (9), 509-515.
8. Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC). 2018. *Estadísticas del Sector Lácteo 2010 – 2017*. [En línea]. (Actualizado en marzo de 2018). Disponible en: <http://www.canilec.org.mx/estadisticas-lacteos-2010-2017.pdf> [Última acceso el 10 de febrero del 2018).
9. Castellano, P., Mora, L., Escudero, E., Vignolo, G., Aznar, R., & Toldrá, F. (2016). Antilisterial peptides from Spanish dry-cured hams: Purification and identification. *Food Microbiology*, *59*, 133–141.
10. Chalupa-Krebzdak, S., Long, C. J., & Bohrer, B. M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, *87*, 84–92.
11. Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2014). Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology*, *42*, 117–121.
12. Cicero, A. F. G., Colletti, A., Rosticci, M., Cagnati, M., Urso, R., Giovannini, M., D'Addato, S. (2016). Effect of Lactotriptides (Isoleucine-Proline-Proline/Valine-Proline-Proline) on Blood Pressure and Arterial Stiffness Changes in Subjects with Suboptimal Blood Pressure Control and Metabolic

- Syndrome: A Double-Blind, Randomized, Crossover Clinical Trial. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 14(3), 161–166.
13. Codex Alimentarius. 2011. *CODEX STAN 206-1999*. [En línea]. (Actualización en septiembre del 2017). Disponible en: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/codex-alimentarius/es/> [Último acceso 15 de febrero del 2019].
 14. Collados, A., Conversa, V., Fombellida, M., Rozas, S., Kim, J.H., Arboleya, J.C., Román, M., Perezábad, L., (2020). Applying food enzymes in the kitchen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 21, 100212.
 15. Diario Oficial de la Federación (DOF). (2012). *Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2012, Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. [En línea]. (15 de marzo del 2012). Disponible en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4692/seeco/seeco.htm> [Último acceso el 17 de enero del 2019].
 16. Domínguez González, K. N., Cruz Guerrero, A. E., Márquez, H. G., Gómez Ruiz, L. C., García-Garibay, M., & Rodríguez Serrano, G. M. (2014). El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 58–65.
 17. Dupont, D. (2017). Peptidomic as a tool for assessing protein digestion. *Current Opinion in Food Science*, 16, 53–58.
 18. Egger, L., & Ménard, O. (2017). Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Current Opinion in Food Science*, 14, 116–121.
 19. Farnworth, E. R., (2008). The History of Fermented Foods; J. B. Prajapati., B. M., Nair. Eds. *Handbook of Fermented Functional Foods*. Boca Raton, FL: CRC Press. Capítulo 1.
 20. Fernández-Rojas, B., Vázquez-Cervantes, G. I., Pedraza-Chaverri, J., & Gutiérrez-Venegas, G. (2020). Lipoteichoic acid reduces antioxidant enzymes in H9c2 cells. *Toxicology Reports*, 7(may 2018), 101–108.
 21. Fernández-Tomé, S., Martínez-Maqueda, D., Girón, R., Goicoechea, C., Miralles, B., & Recio, I. (2016). Novel peptides derived from α s1-casein with opioid activity and mucin stimulatory effect on HT29-MTX cells. *Journal of Functional Foods*, 25, 466–476.
 22. Fitzgerald, R. J., Cermeño, M., Khalesi, M., Kleekayai, T., & Amigo-benavent, M. (2020). Application of in silico approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides. *Journal of Functional Foods*, 64(July 2019), 103636.
 23. García, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2019). Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. *Food Research International*, 119 (october 2018), 207–220.
 24. Ghaffari, S., & Roshanravan, N. (2020). The role of nutraceuticals in prevention and treatment of hypertension: An updated review of the literature. *Food Research International*, 128(october 2019).

25. Giacometti, J., & Buretić-Tomljanović, A. (2017). Peptidomics as a tool for characterizing bioactive milk peptides. *Food Chemistry*, 230, 91–98.
26. Giromini, C., Cheli, F., Rebucci, R., & Baldi, A. (2018). Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 929–942.
27. Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 254–267.
28. Hafeez, Z., Cakir-kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., & Dary-mourot, A. (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *FRIN*, 63, 71–80.
29. Hansen, E. B. (2018). Redox reactions in food fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 19, 98–103.
30. Hodgkinson, A. J., Wallace, O. A. M., Boggs, I., Broadhurst, M., & Prosser, C. G. (2018). Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. *Food Chemistry*, 245(June 2017), 275–281.
31. Jimenez, J., Charnier, C., Kouas, M., Latrille, E., Torrijos, M., Harmand, J., Steyer, J. P. (2020). Modelling hydrolysis: Simultaneous versus sequential biodegradation of the hydrolysable fractions. *Waste Management*, 101, 150–160.
32. Johansen, A.-G., Hoffmann, T. K., Rukke, E.-O., Skeie, S. B., Abrahamsen, R. K., & Jørgensen, C. E. (2018). Processing of high-protein yoghurt – A review. *International Dairy Journal*, 88, 42–59.
33. Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535–547.
34. Katigbak, C., & Fontenot, H. B. (2018). A Primer on the New Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of Hypertension. *Nursing for Women's Health*, 22(4), 346–354.
35. Kocak, A., Sanli, T., Anli, E. A., & Hayaloglu, A. A. (2020). Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 123(January), 109127.
36. Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187.
37. Lupiañez-Barbero, A., González Blanco, C., & de Leiva Hidalgo, A. (2018). Spanish food composition tables and databases: need for a gold standard for healthcare professionals. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 65(6), 361–373.
38. Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577–583.
39. Mora, L., Toldra, F., Cientí, I. (2018). Bioactive Peptides, Encyclopedia of Food Chemistry. 381-389

40. Nielsen, S. D., Beverly, R. L., Qu, Y., & Dallas, D. C. (2017). Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chemistry*, 232, 673–682.
41. Nongonierma, A. B., & Fitzgerald, R. J. (2015). The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review. *Journal of Functional Foods*, 17, 640–656.
42. Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 26–43.
43. Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifkova, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A. Whelton, P. K. (2018). Hypertension. *Nature*, 4(18014), 1 – 21.
44. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO). 2019. Portal lácteo-Productos (tipos y características). [En línea]. (Actualizado en el año 2019). Disponible en: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/tipos-y-caracteristicas/es/> [Ultimo acceso 16 de octubre del 2019).
45. Priya Dharshini, L. C., Vishnupriya, S., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2020). Oxidative stress responsive transcription factors in cellular signalling transduction mechanisms. *Cellular Signalling*, 72(May), 109670.
46. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., ... Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30.
47. Reyes Sanamé, F., María Luisa Pérez Álvarez, D., Alfonso Figueredo, E., Céspedes Cuenca, Y., Ardevol Proenza Hospital General Docente, E., & Luis Fernández Hernández Baquero, G. (2016). Las incretinas como nueva opción terapéutica en la diabetes mellitus tipo 2 Incretins as a new therapeutic option in the diabetes mellitus type 2. *Revista Cubana de Medicina*, 5454 (22), 151–166.
48. Reyes-Fermín, L. M., Aparicio-Trejo, O. E., Avila-Rojas, S. H., Gómez-Sierra, T., Martínez-Klimova, E., & Pedraza-Chaverri, J. (2020). Natural antioxidants' effects on endoplasmic reticulum stress-related diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 138 (February), 111229.
49. Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., ... Murray, C. (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(1), 1–25.
50. Ruano-Ordás, D., Yevseyeva, I., Fernandes, V. B., Méndez, J. R., Emmerich, M. T. M. (2019). Improving the drug discovery process by using multiple classifier systems. *Expert Systems with Applications*, 121, 292–303.

51. Saavedra, L., Hebert, E. M., Minahk, C., & Ferranti, P. (2013). An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies. *Food Research International*, 54(1), 925–934.
52. Sánchez-Rivera, L., Santos, P. F., Miralles, B., Carrón, R., José Montero, M., & Recio, I. (2016). Peptide fragments from β -casein f(134–138), HLPLP, generated by the action of rat blood plasma peptidases show potent antihypertensive activity. *Food Research International*, 88, 348–353.
53. Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). A practical guide for designing effective nutraceutical combinations in the form of foods, beverages, and dietary supplements against chronic degenerative diseases. *Trends in Food Science and Technology*, 88(december 2018), 179–193.
54. Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394–406.
55. Sierra, R. T., Trabazo, R. L., & Velázquez, J. B. (2006). Productos lácteos fermentados, *Anales de pediatría*, 4(1), 54–66.
56. Silvia, V., Baldisserotto, A., Scalambra, E., Malisardi, G., Durini, E., & Manfredini, S. (2012). Novel molecular combination deriving from natural aminoacids and polyphenols: Design, synthesis and free-radical scavenging activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 383–392.
57. Taylor, A. A. (2014). Basic Science Pharmacology of antihypertensive drugs. *Journal of the American Society of Hypertension*, 8(10), 765–767.
58. Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267, 395–404.
59. Udenigwe, C. C., & Fogliano, V. (2017). Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods*, 35, 9–12.
60. Valenzuela B., A., Sanhueza, J., Valenzuela, R., & Morales I., G. (2014). Alimentos funcionales, Nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista Chilena de Nutricion*, 41(2), 198–204.
61. Velazquez-Bautista, M., López-Sandoval, J. J., González-Hita, M., Vázquez-Valls, E., Cabrera-Valencia, I. Z., & Torres-Mendoza, B. M. (2017). Association of metabolic syndrome with low birth weight, intake of high-calorie diets and acanthosis nigricans in children and adolescents with overweight and obesity. *Endocrinología, Diabetes y Nutricion*, 64(1), 11–17.
62. Wada, Y., & Lönnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins - mechanisms of action. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(5), 503–514.
63. Waller, J. R., Waller, D. G. (2018). Drugs for systemic hypertension and angina. *Medicine (United Kingdom)*, 46(9), 566–572.
64. Zavala, Á. G., Rivero, L. L., García García, I., & Castillejos, O. G. (2007). Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 33(1).