



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ACTIVIDAD
ANTIHIPERTENSIVA EN QUESOS MADURADOS Y SUS EFECTOS
SOBRE LA SALUD DEL CONSUMIDOR**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ELIZABETH DUARTE CERDA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2021



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.

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Ruiz Terán

VOCAL: Profesor: Juan Carlos Ramírez Orejel

SECRETARIO: Profesora: Tania Gómez Sierra

1er. SUPLENTE: Profesora: Sofía Morán Ramos

2° SUPLENTE: Profesora: Adriana Berenice Pérez Jiménez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Juan Carlos Ramírez Orejel

SUSTENTANTE:

Elizabeth Duarte Cerda

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN... ..	II
OBJETIVO GENERAL	IV
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	IV
CAPÍTULO 1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE	1
1.1 PROTEÍNAS DE LA LECHE	1
1.1.1 Caseínas.....	1
1.1.2 Proteínas del suero	2
1.1.3. Composición proteica de la leche	2
1.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	3
1.4 GENERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	4
1.4.1 Hidrólisis enzimática (<i>in vitro</i>).....	4
1.4.2 Durante el procesamiento de alimentos.....	7
1.4.3 Digestión gastrointestinal	8
1.5 FUNCIONALIDAD DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	10
1.5.1 Sistema cardiovascular.....	12
1.5.2 Sistema inmunitario	14
1.5.3 Sistema nervioso	15
1.5.4 Sistema gastrointestinal.....	16
CAPÍTULO 2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN EL PROCESAMIENTO DE QUESOS.	17
2.1 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE QUESOS.	17
2.3 CLASIFICACIÓN DE QUESOS.....	19
2.3.1 Según su maduración (OMS/FAO, 2011 y Hernández, 2010).	20
2.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE QUESOS MADURADOS.	21
2.4.1 Selección de la leche	21
2.4.2 Estandarización de la leche	22
2.4.3 Pasteurización	22
2.4.4 Adición del cultivo iniciador	22
2.4.5 Adición de sales y aditivos.....	23

2.4.6 Coagulación de la leche.....	23
2.4.7 Deshidratación del coágulo, moldeado y prensado.....	23
2.4.8 Salazón	24
2.4.9 Maduración	24
2.5 ACTIVIDAD BIOACTIVA DE LOS QUESOS.....	24
2.5.1 Péptidos inhibidores de la ECA.....	25
CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO.....	28
3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MADURACIÓN DEL QUESO.....	28
3.2 GENERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS (PROTEÓLISIS)	29
3.2.1 Actividad de la plasmina.....	30
3.2.2 Enzimas coagulantes	32
3.2.3 Enzimas de bacterias ácido lácticas.....	33
3.2.4 Cultivos adjuntos.....	36
3.3 QUESOS CON PÉPTIDOS QUE PRESENTAN BIOACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA <i>IN VITRO</i>	37
3.3.1 Parmigiano Reggiano.....	40
3.3.2 Queso Grana Padano.....	41
3.3.3 Queso Manchego.	42
3.3.4 Queso Cheddar comercial	43
3.3.5 Queso Prato.....	44
3.3.6 Queso Crema de Chiapas	45
3.3.7 Queso Cotija mexicano.....	45
3.3.8 Queso de Cabra en salmuera blanca.....	46
3.3.9 Queso tipo Roquefort Brasileño.....	47
3.3.10 Queso tipo Camembert.....	47
CAPITULO 4. EFECTOS SOBRE LA SALUD CARDIOVASCULAR ASOCIADOS CON EL CONSUMO DE QUESO.....	49
4.1 HIPERTENSIÓN ARTERIAL	49
4.1.1 Prevalencia mundial de hipertensión arterial.....	49
4.1.2 Hipertensión arterial en México	51
4.1.3 Factores de riesgo para la hipertensión.....	52

4.1.4 Tratamiento de la hipertensión arterial.....	54
4.2 EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS.....	55
4.2.1 Mecanismo de acción de la actividad antihipertensiva	55
4.2.2 Características estructurales de los péptidos bioactivos	57
4.3 ESTUDIOS EN MODELOS ANIMALES Y ENSAYOS CLÍNICOS	57
4.3.1 Modelos animales	58
1.3.2 Ensayos clínicos	60
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación de las enzimas según su actividad catalítica (Torruco-Uco et al., 2008).	5
Figura 1.2. Procedimiento para el aislamiento e identificación de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de los alimentos (Vizcardo & Zavala, 2016).	6
Figura 1.3. Proceso de digestión gastrointestinal (Guerra et al., 2012).	9
Figura 1.4. Principales funciones de los péptidos bioactivos de las proteínas lácteas. Modificado de (Juárez Iglesias et al., 2015).	10
Figura 2.1. Consumo per cápita de derivados lácteos de los principales países consumidores en el año 2018 (FIRA, 2019).	17
Figura 2.2. Producción mundial y principales productores de derivados lácteos proyectados a Diciembre del 2018 (FIRA, 2019).	18
Figura 2.3. Producción de los distintos tipos de queso en México durante 2018 (CANILEC, 2019).	19

Figura 2.4. Clasificación de queso basada en el proceso de maduración (Khattab et al., 2019).	20
Figura 2.5. Protocolo general para la fabricación de queso madurado (Fox et al., 2017). 21	
Figura 3.1. Principales rutas metabólicas microbianas que conducen a la generación de sabor en quesos. Modificado de (McAuliffe et al., 2019).	28
Figura 3.2. Esquema de hidrólisis de proteínas y enzimas involucradas en la maduración del queso. Modificado de (Toldrá et al., 2018).	29
Figura 3.3. Actividad inhibidora de la ECA del extracto soluble en agua de queso Cheddar pasteurizado a 72°C (●), 75°C (■) y 78°C(◆) durante la maduración. (n = 4). abc indica, dentro del tratamiento térmico, las medias con superíndices diferentes son significativamente diferentes (P <0.05) entre sí .ABC indica que, dentro del período de maduración, las medias con superíndice diferente son significativamente diferentes (P <0,05) entre sí (Hossain et al., 2020).	31
Figura 3.4. Resumen del sistema proteolítico de <i>Lactococcus</i> . Los sistemas proteolíticos de otras bacterias del ácido láctico son generalmente similares (McSweeney, 2004).	34
Figura 3.5. Degradación de caseína extracelular y liberación de péptidos bioactivos a través del sistema proteolítico de LAB basado en <i>L. lactis</i> . Modificado de (Juillard et al., 2021).	35
Figura 4.1. Prevalencia de la hipertensión, normalizada por edades, en adultos de 25 años o más por región de la OMS y categoría de ingresos según el banco mundial; estimaciones comparables, 2008. Modificada de (OMS, 2013).	50
Figura 4.2. Porcentaje de la población de 20 años y más con diagnóstico médico previo de hipertensión, por sexo (ENSANUT, 2018).	52
Figura 4.3. Principales factores que contribuyen a la HTA y sus complicaciones (OMS, 2013).	53
Figura 4.4. Mecanismo de acción de la actividad antihipertensiva de péptidos bioactivos. Modificado de (Shivanna & Nataraj, 2020).	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición química (g/100mL) de la leche de diferentes especies (Ocampo et al., 2016).....	3
Tabla 1.2. Péptidos bioactivos liberados de las proteínas de la leche por diversos microorganismos (Mohanty et al., 2016).	8
Tabla 1.3. Algunas secuencias de péptidos bioactivos y sus funciones liberadas de caseínas y proteínas de suero (Lisak Jakopović et al., 2019).	11
Tabla 1.4. Secuencia de péptidos bioactivos derivados de proteínas de leche ovina y caprina (Park & Nam, 2015).....	13
Tabla 2.1. Péptidos identificados en extractos solubles en agua de algunas variedades de quesos con actividad antihipertensiva. Modificado de (López-Expósito et al., 2017).....	26
Tabla 2.2. Valores de IC50de péptidos inhibidores de la ECA (Stuknyte et al., 2015).....	26
Tabla 3.1. Hallazgos importantes en diferentes variedades de queso sobre la actividad Antihipertensiva.	38
Tabla 4.1. Composición nutrimental por 100g e ingesta diaria de los quesos de intervención.	62
Tabla 4.2. Composición química (g/100 g) de Grana Padano y placebo (Crippa et al., 2018).	64

RESUMEN

En los últimos años los péptidos bioactivos derivados de los alimentos, han sido tema de gran interés debido a los efectos positivos que proporcionan a la salud. Se ha demostrado que la leche y los productos lácteos son fuentes potenciales de péptidos que poseen actividades biológicas muy importantes como la actividad antihipertensiva, antioxidante, inmunomoduladora, antimicrobiana, opioide, etc. Sin embargo, la actividad antihipertensiva es una de las propiedades más reportadas, ya que existe una prevalencia mundial de enfermedades cardiovasculares. Se han identificado péptidos antihipertensivos en una gran variedad de quesos madurados, incluidos el Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Cheddar, Manchego, Roquefort, entre otros. Cabe mencionar que la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se ha atribuido como uno de los principales mecanismos antihipertensivos de los péptidos bioactivos derivados de los quesos y su actividad está estrechamente relacionada con su estructura química. Los péptidos bioactivos pueden liberarse en los quesos durante su procesamiento, especialmente en la maduración, durante la proteólisis. En la proteólisis del queso, se lleva a cabo la descomposición de las caseínas hasta la formación final de péptidos y aminoácidos libres. Algunos de los péptidos pueden ser bioactivos si se libera la secuencia de residuos adecuada. Es importante mencionar que los diferentes tipos de queso presentan bioactividad variable, debido a que durante el procesamiento el tipo y la cantidad de péptidos derivados de proteínas lácteas, se ve afectada por factores que influyen en la proteólisis como el tipo de cultivos iniciadores utilizados, tratamiento térmico de la leche, el tiempo y temperatura de maduración, etc. Diversas investigaciones se han centrado en la identificación de los péptidos Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) ya que han demostrado exhibir un efecto antihipertensivo *in vivo*. Como se sabe la hipertensión arterial es un problema importante de salud pública, lo que implica un gran desafío en la salud mundial. Existe una amplia gama de fármacos para el tratamiento de la hipertensión, los cuales pueden tener un efecto secundario en los consumidores a largo plazo, sin embargo, las intervenciones al estilo de vida como una dieta saludable, la realización ejercicio físico, así como evitar el consumo de alcohol y tabaco también se aplican ampliamente para reducir la presión arterial, constituyendo un tratamiento no farmacológico. Actualmente, existen estudios limitados sobre los efectos *in vivo* del queso madurado con relación a su efecto hipertensivo y algunos de ellos no son del todo concluyentes, a pesar esto, se ha demostrado que al incluir como parte de la dieta una porción de 30 g/día de queso Grana Padano, se obtiene una reducción de la presión arterial en personas con hipertensión de grado 1 (>140 y/o > 90mmHg). Además, diversos estudios indican que el consumo diario de quesos madurados, podría contribuir a la disminución de algunos factores de riesgo cardiovascular como la obesidad y diabetes mellitus tipo 2. La presente investigación proporciona una descripción de los principales hallazgos en relación a los péptidos antihipertensivos presentes en diversos quesos madurados y sus efectos sobre la salud del consumidor.

INTRODUCCIÓN

Los péptidos bioactivos se definen como fragmentos de proteínas específicas, de origen animal o vegetal que tienen una influencia positiva en las funciones fisiológicas y metabólicas del cuerpo humano y pueden ejercer beneficios a la salud (Park & Nam, 2015). Están encriptados e inactivos en su proteína nativa y pueden ser escindidos por hidrólisis enzimática, fermentación bacteriana, durante el procesamiento de alimentos o la digestión gastrointestinal (Vargas et al., 2019). La mayoría de los péptidos bioactivos comparten algunas propiedades comunes. Por ejemplo, contienen entre 2 y 15 aminoácidos, son ricos en aminoácidos hidrofóbicos, poseen masas moleculares de menos de 6000 Da y resistencia a la acción de peptidasas digestivas (Wang et al., 2018).

Actualmente, la leche y los productos lácteos son las fuentes principales de péptidos bioactivos derivados de los alimentos (Sánchez & Vázquez, 2017). Se ha demostrado que los péptidos bioactivos de la leche, poseen diversas actividades biológicas muy importantes, que incluyen actividad antihipertensiva, antioxidante, inmunomoduladora, antimicrobiana, opioide, entre otras. Sin embargo los péptidos antihipertensivos o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), han recibido especial atención debido a la alta prevalencia de hipertensión y enfermedades cardiovasculares a nivel mundial (Gómez-Ruiz et al., 2004).

La ECA es la enzima más importante en la regulación de la presión sanguínea, ya que cataliza la conversión de angiotensina-I, una hormona peptídica, en angiotensina-II, lo que produce una constricción vascular. Los péptidos inhibidores de la ECA inhiben la conversión dando como resultado la dilatación de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, controlando la hipersensibilidad (Bhandari et al., 2019).

La aparición de péptidos antihipertensivos ya se ha informado en productos lácteos fermentados como el yogur y leche fermentada y se ha demostrado que algunos de ellos confieren beneficios a la salud cardiovascular (Bhandari et al., 2019). Sin embargo, los quesos al constituir una fuente importante de proteína y al estar expuestos a procesos enzimáticos y fermentativos durante su procesamiento, también representan una fuente potencial de péptidos y otros componentes bioactivos.

Los péptidos bioactivos pueden liberarse en el procesamiento del queso especialmente en la maduración, durante la proteólisis, que es el principal evento bioquímico ocurrido en la maduración del queso (López-Expósito et al., 2017). Durante la proteólisis primaria, se lleva a cabo la descomposición de las caseínas a través de la acción de coagulantes, como el cuajo y proteinasas presentes en la leche, principalmente la plasmina. En la proteólisis secundaria participan proteasas y peptidasas de las bacterias iniciadoras (LAB, del inglés lactic acid bacteria) y no iniciadoras (NSLAB, del inglés non starter lactic acid bacteria) para formar péptidos y aminoácidos libres. Algunos de los péptidos liberados pueden ser bioactivos dependiendo de la longitud y secuencia de residuos que contengan (Toldrá et al., 2018 y Nongonierma & FitzGerald, 2011).

Debido a que el extracto soluble en agua (WSE, del inglés water soluble extract) de los quesos contiene la mayoría de los péptidos bioactivos, generalmente se evalúa la inhibición de la actividad de la ECA midiendo el valor de la concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) *in vitro* (Basiricò et al., 2015). Esto último representa la concentración de queso o un péptido individual capaz de inhibir la actividad de ECA en un 50% (Bütikofer et al., 2007). *In vivo* se representa por la disminución de la presión arterial en organismos vivos como pueden ser ratas en modelos de investigación o seres humanos (Barrón, 2012).

OBJETIVO GENERAL

Realizar una revisión de información actualizada acerca de quesos madurados que han reportado presencia de péptidos inhibidores de la ECA para conocer los principales factores del procesamiento que afectan su actividad así como los beneficios que se han reportado a la salud del consumidor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar los péptidos inhibidores de la ECA que se forman durante la maduración de diferentes quesos madurados y su mecanismo antihipertensivo.
- Analizar la relación que existe entre el tiempo de maduración de diferentes variedades de quesos y su actividad inhibidora de la ECA.
- Describir los factores del procesamiento de los quesos madurados que influyen en la generación y actividad de péptidos inhibidores de la ECA.
- Analizar si el consumo de queso tiene un efecto favorable sobre la presión arterial en humanos.

CAPÍTULO 1. PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA LECHE

1.1 PROTEÍNAS DE LA LECHE

Entre los macronutrientes presentes en los alimentos, los péptidos y las proteínas son de suma importancia, ya que proporcionan los aminoácidos necesarios para la biosíntesis de proteínas y además representan una fuente de energía (Sánchez & Vázquez, 2017). En particular, las proteínas lácteas incluyen todos los aminoácidos indispensables que son capaces de cubrir las necesidades nutricionales del hombre, ya que presentan elevada digestibilidad y valor biológico, por lo que se denominan proteínas de alta calidad. La leche forma parte de la dieta de más de 6 mil millones de personas en el mundo, constituyendo la leche bovina el 85% del total de la producción mundial, seguida de la leche de búfalo (11%), cabra (2,3%) y oveja (1,4%) (Vargas et al., 2019 y Ocampo G. et al., 2016).

Existen dos clases principales de proteínas en la leche, que se pueden separar en función de su solubilidad a un pH de 4.6 a 20 °C. Bajo estas condiciones, una alta proporción de las proteínas, llamadas caseínas, precipitan, mientras que las proteínas que permanecen solubles se conocen como proteínas séricas o proteínas de suero (Yada, 2018).

Las caseínas, representan alrededor del 78% del contenido total de las proteínas en la leche bovina, las proteínas del suero aproximadamente 18%, sin embargo hay otras proteínas minoritarias, las de la membrana del glóbulo graso, que representan menos del 4%. (Vargas et al., 2019).

1.1.1 Caseínas

Las caseínas (-CN) son proteínas globulares de bajo peso molecular, que se autoensamblan en estructuras coloidales denominadas micelas de caseína en presencia de fosfato de calcio. Se pueden subdividir en cinco tipos: α 1-, α 2-, β - y κ -CN. Todas ellas excepto la γ -CN se sintetizan en la glándula mamaria, esta última se origina debido a la proteólisis de la caseína β , por acción de proteasas nativas de la leche especialmente la plasmina o de la actividad proteolítica de las bacterias (Fox et al., 2017 y Yada, Y, 2018).

Algunas de las características más importantes de las caseínas son que todas están fosforiladas, sin embargo α 1- y α 2- caseínas lo están en mayor proporción; otra

característica importante, es que no son sensibles a los agentes desnaturalizantes como la temperatura ya que carecen de estructuras secundarias y terciarias estables, sin embargo son sensibles a altas concentraciones de calcio y a los cambios de pH (Fox et al., 2017).

1.1.2 Proteínas del suero

La fracción proteica de suero de leche de las especies bovina, ovina, caprina y de búfalo contiene cuatro proteínas principales: β -lactoglobulina (β -lg, 50%), α -lactoalbúmina (α -la, 20%), albúmina de suero sanguíneo (BSA, 10%) e inmunoglobulinas (Ig, 10%; principalmente IgG1 con cantidades menores de IgG2, IgA e IgM)(Fox et al., 2017).

A diferencia de las caseínas, las proteínas del suero poseen altos niveles de estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. Son proteínas globulares típicas y se desnaturalizan al calentarlas, por ejemplo, completamente a 90 °C por 10 min. No están fosforiladas y son insensibles al Ca^{2+} . Todas las proteínas del suero contienen enlaces disulfuro intramoleculares que estabilizan la estructura de las proteínas (Fox et al., 2017).

1.1.3. Composición proteica de la leche

Desde el punto de vista tecnológico, la composición de la leche determina su calidad nutritiva, siendo el contenido proteico un factor de gran importancia dentro de la industrialización láctea, ya que influye de manera directa sobre el rendimiento en la elaboración de productos lácteos y la aptitud tecnológica de la leche (Ocampo G. et al., 2016 y Bidot, 2017).

La leche de diferentes especies tiene composición semejante, sin embargo puede variar en su composición porcentual ocasionando propiedades diferentes entre ellas como una mayor o menor digestibilidad (Ocampo et al., 2016). Dentro de las especies las diferencias en la composición pueden estar influenciadas por varios factores tales como la raza, genética, alimentación y el medio ambiente que se le brinde al animal (Bidot, 2017).

En un estudio realizado por Ocampo et al., (2016) se comparó la composición proteica entre algunas especies productoras como se muestra en la Tabla 1.1, resultando la leche de búfalo la de mayor contenido proteico 4.08 g/100mL que la leche de vaca y cabra 3.02

g/100 mL y 3.01 g/100 mL respectivamente. Sin embargo, en otro estudio realizado por Mohapatra et al., (2019), la leche de oveja, resultó con el mayor contenido proteico con un valor de 4.50-6.60 g/100 mL con respecto a las especies ya mencionadas. A pesar de su gran contenido proteico, la leche de oveja, no es rentable para su consumo y elaboración productos lácteos, ya que la contribución a la producción mundial de este tipo de leche es insignificante, además de que su cría va más dirigida hacia la producción de carne y de lana (Mohapatra et al., 2019).

Tabla 1.1. Composición química (g/100 mL) de la leche de diferentes especies (Ocampo et al., 2016)

Especie	Lactosa	Lípidos	Proteínas	ST	SNG	NUL(mg/dL)
Vaca	4.50 ± 0.01	3.60 ± 0.25	3.02 ± 0.1	11.93 ± 0.31	0.30 ± 0.11	18.10 ± 0.99
Cabra	4.20 ± 0.01	4.44 ± 0.30	3.01 ± 0.29	12.59 ± 0.10	7.99 ± 0.30	28.35 ± 5.73
Búfalo	5.06 ± 0.01	7.24 ± 0.36	4.08 ± 0.21	16.82 ± 0.52	9.92 ± 0.22	19 ± 2.97

ST: Solidos Totales; **SNG:** Solidos No Grasos; **NUL:** Nitrógeno Ureico en Leche

Con base a lo anterior, la leche búfalo y caprino puede representar una mayor rentabilidad a los productores debido a sus características composicionales y nutricionales específicas, que las hacen aptas para la manufacturación de productos elaborados de muy alta calidad como los quesos y yogures gourmet (Ocampo et al., 2016).

1.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas de los alimentos cada vez son más reconocidas debido a las propiedades multifuncionales que ejercen a través de sus péptidos con actividad biológica. Estos péptidos, se pueden obtener de proteínas animales y vegetales, sin embargo, la leche y los productos lácteos bovinos son las mayores fuentes de proteínas y péptidos bioactivos. Esta puede ser una de las principales razones por las que se requiere la leche más allá de la nutrición en los primeros meses de vida (Sánchez & Vázquez, 2017).

De acuerdo con Park & Nam., (2015) los péptidos bioactivos se definen como fragmentos de proteínas específicas, de origen animal o vegetal, que tienen una influencia positiva en las

funciones o condiciones fisiológicas y metabólicas del cuerpo y pueden tener efectos beneficiosos en la salud humana.

Según Mohanty et al., (2016) los péptidos biológicamente activos en la secuencia de proteínas se definen como fragmentos que permanecen inactivos en las secuencias de proteínas precursoras, pero cuando se liberan por la acción de enzimas proteolíticas, pueden interactuar con receptores seleccionados y regular las funciones fisiológicas del cuerpo.

Cabe mencionar, que la mayoría de los péptidos bioactivos comparten algunas propiedades comunes. Por ejemplo, contienen entre 2 y 15 aminoácidos, son ricos en aminoácidos hidrofóbicos, poseen masas moleculares de menos de 6000 Da y resistencia a la acción de peptidasas digestivas (Wang et al., 2018). Además, están encriptados e inactivos en su proteína parental y deben ser escindidos por proteasas presentes en la leche, durante el procesamiento de alimentos, la fermentación bacteriana o la digestión gastrointestinal (Vargas et al., 2019).

1.4 GENERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

1.4.1 Hidrólisis enzimática (in vitro)

Los hidrolizados enzimáticos han sido utilizados para muchos propósitos, tales como mejorar y/o modificar las propiedades funcionales de productos alimenticios así como el desarrollo de productos farmacéuticos y nutracéuticos (Torruco-Uco et al., 2008). Para obtener los efectos fisiológicos, los péptidos bioactivos (hidrolizados de proteínas) se pueden consumir en forma de alimentos y bebidas, así como en forma de tabletas, cápsulas, polvos y líquidos (Chalamaiah et al., 2019).

De manera general, las proteínas alimentarias a partir de las cuáles se obtienen los péptidos bioactivos se seleccionan con base a dos criterios principales: (1) Empleo de alimentos ricos en proteínas subutilizadas o de subproductos ricos en proteínas de la industria de alimentos y (2) la utilización de proteínas que contienen secuencias de péptidos específicos o residuos de aminoácidos de especial interés farmacológico (Vizcardo & Zavala, 2016).

constituyentes (Fig. 1.2). Posteriormente se identifican los péptidos y se evalúa la actividad biológica de todo el hidrolizado con el fin de obtener péptidos individuales con la secuencia más potente (Wang et al., 2018).

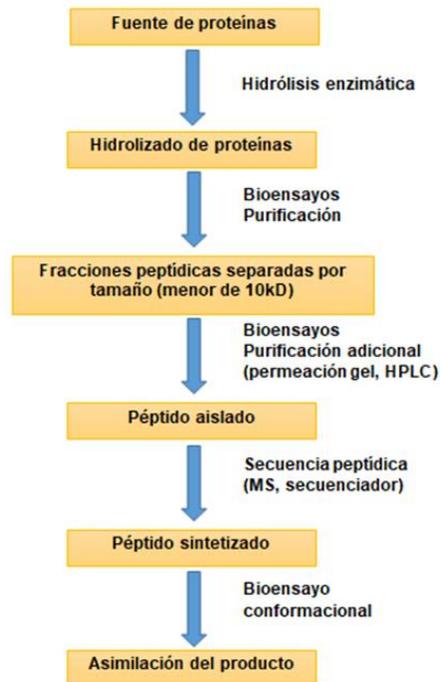


Figura 1.2. Procedimiento para el aislamiento e identificación de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de los alimentos (Vizcardo & Zavala, 2016).

La bioactividad de los péptidos depende principalmente de las enzimas utilizadas para la hidrólisis, las condiciones de procesamiento y el tamaño de los péptidos aislados (Bhandari et al., 2019). Esta puede probarse mediante ensayos bioquímicos *in vitro*, cultivo celular, estudios *in vivo* a través de modelos animales y ensayos clínicos en humanos (Chakrabarti et al., 2018).

La forma más común de producir péptidos bioactivos a partir de la leche es a través de la hidrólisis enzimática de las moléculas proteicas completas, ya que este método es fácil de escalar y generalmente tiene un tiempo de reacción más corto que la fermentación microbiana (Chakrabarti et al., 2018 y Mohanty et al., 2016).

1.4.2 Durante el procesamiento de alimentos

Diversas cantidades de péptidos bioactivos se generan de manera natural en los alimentos debido a la proteólisis ocurrida durante su procesamiento como en la fermentación de la leche o la maduración de los quesos. Por lo tanto, dicha proteólisis puede llevarse a cabo por enzimas endógenas en alimentos madurados o por la acción combinada de enzimas endógenas y microbianas cuando se fermentan. En general, las principales causas de alteración de las proteínas durante el procesamiento son los cambios de pH como la acidificación, los tratamientos térmicos y la fermentación. Estos cambios pueden ser responsables de aspectos positivos como la mejora en las características sensoriales del producto final como la textura y sabor, una mejor estabilidad del producto y la generación de péptidos con actividad biológica (Toldrá et al., 2018 y Li & Zhao, 2019).

La fermentación de la leche, se ha descrito como un mecanismo para la obtención de péptidos bioactivos y se considera un enfoque atractivo para generar alimentos funcionales enriquecidos de bajo costo y con una imagen nutricional positiva asociada con los productos lácteos fermentados (Sánchez & Vázquez, 2017). Tradicionalmente para la fermentación de la leche se utilizan LAB, que tienen la capacidad de hidrolizar las proteínas de la leche (principalmente caseínas) mediante su sistema proteolítico (González, 2014).

Algunas de las LAB más estudiadas para la fermentación de la leche son *Lactococcus spp.* y *Lactobacillus spp.*, ya que sintetizan enzimas proteolíticas intracelulares como proteasas y peptidasas capaces de liberar biopéptidos (Rodríguez Hernández et al., 2014). También se ha reportado que *Lactobacillus helveticus* y enzimas proteolíticas derivadas de otros microorganismos como levaduras han liberado péptidos con actividad bioactiva como se presenta en la Tabla 1.2 (Mohanty et al., 2016).

Tabla 1.2. Péptidos bioactivos liberados de las proteínas de la leche por diversos microorganismos (Mohanty et al., 2016).

Microorganismo	Proteína precursora	Secuencia peptídica	Bioactividad
<i>L. rhamnosus</i> + digestión con pepsina	β -cn	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu	IECA inhibitoria
<i>Lactobacillus helveticus</i>	β -cn, κ -cn	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	I ECA inhibitoria, antihipertensiva
Lactobacillus GG enzimas + pepsina y tripsina	β -cn, as1-cn	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	Opioide, inhibidor de la ECA, inmunoestimulante
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp., <i>Bulgarius</i> IFO13953	κ -cn	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-Phe-met	Antioxidante
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var.	β -lg	Tyr-Leu-Leu-Phe	Inhibidor de la ECA
<i>Lactobacillus helveticus</i> CP90 proteinasa	β -cn	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-(Glu)	Inhibidor de la ECA

Es importante mencionar que la funcionalidad de los péptidos hidrolizados depende de la cepa utilizada para la hidrólisis ya que cada microorganismo tiene un sistema proteolítico único (Chakrabarti et al., 2018 y Bhandari et al., 2019). Además se debe considerar el tiempo de fermentación, el cual determina el grado de hidrólisis, así como el pH y la temperatura de almacenamiento los cuales pueden afectar el perfil de péptidos de una leche fermentada (González, 2014).

1.4.3 Digestión gastrointestinal

Finalmente, la digestión gastrointestinal constituye el paso final de hidrólisis en la generación de péptidos bioactivos ya que muchos tipos de bacterias aplicadas en la producción de alimenticios fermentados y que se producen naturalmente en el tracto gastrointestinal son capaces de producir péptidos biológicamente activos (Toldrá et al.,

2018). Los péptidos bioactivos pueden liberarse *in vivo* cuando las proteínas de los alimentos una vez ingeridas llegan al estómago, y la digestión es promovida por el ambiente ácido del jugo y enzimas gástricas. El HCl es el responsable de activar el pepsinógeno y lo convierte a su forma activa, la pepsina, la cual actúa sobre proteínas dando lugar a la formación de polipéptidos, oligopéptidos y algunos aminoácidos (Segura Campos et al., 2010 y Mohanty et al., 2016).

En el caso de las proteínas de la leche, las caseínas se hidrolizan por la pepsina en el proceso de digestión gástrica, sin embargo la estructura globular de las proteínas del suero hace que sean más resistentes a la hidrólisis gastrointestinal. Posteriormente la digestión continúa en el intestino delgado y las enzimas como la tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa y la aminopeptidasa contribuyen a la hidrólisis intestinal de las proteínas, siendo las células intestinales el primer tejido objetivo de nutrientes lácteos. Los dipéptidos, tripéptidos y aminoácidos pueden ser absorbidos por las células epiteliales del intestino e ingresar directamente al torrente sanguíneo para ser distribuidos por todo el cuerpo, donde obtienen funciones únicas. Finalmente, los polipéptidos no absorbidos llegan al intestino grueso (ciego, colon y recto) donde se produce la fermentación y la reabsorción de agua con un tiempo de tránsito de más de 12 h en adultos como se muestra en Figura 1.3 (Giromini et al., 2019).

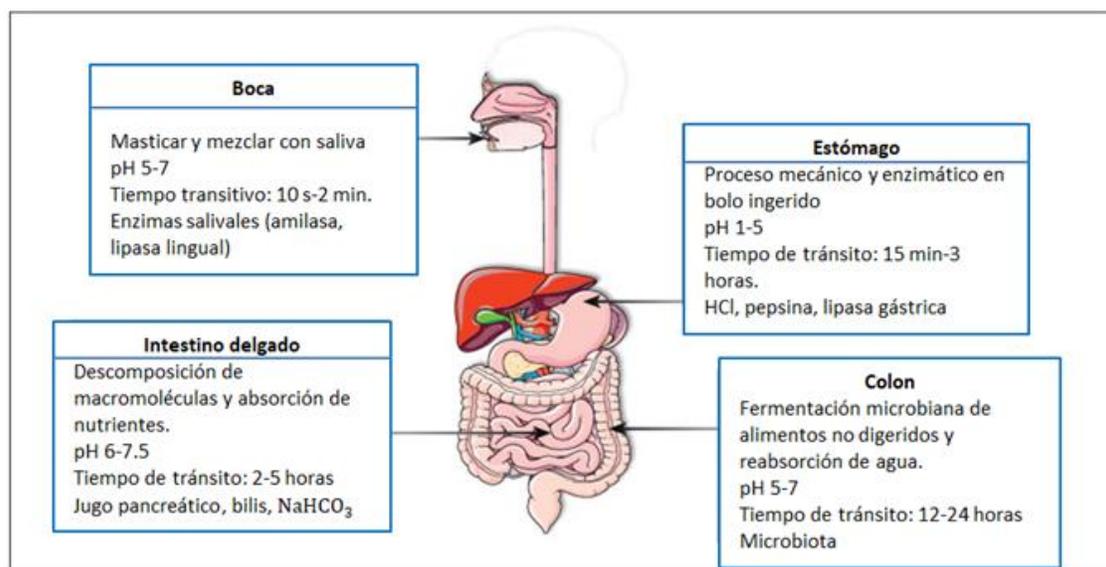


Figura 1.3. Proceso de digestión gastrointestinal (Guerra et al., 2012).

Según Mohanty et al., (2016), varios péptidos bioactivos con actividad antibacteriana, inmunomoduladora, antihipertensivos y opioides se han liberado de la caseína y proteínas del suero por digestión gastrointestinal.

En un estudio realizado en efluentes yeyunales humanos después de la ingestión de proteínas de la leche, se identificaron fragmentos de proteínas resistentes a la digestión gastrointestinal que podrían ejercer una función fisiológica al interactuar directamente con el epitelio intestinal o al ser absorbidos por el torrente sanguíneo, como es el caso de la β -LG la cual es resistente al ataque de la pepsina debido a que interacciona con la fosfatidilcolina de la mucosa gástrica. Sin embargo, la lactoferrina, aunque es relativamente resistente a la digestión por proteasas del tracto gastrointestinal, puede hidrolizarse activamente durante la digestión gástrica en el péptido bioactivo más potente, lactoferricina (Giromini et al., 2019).

1.5 FUNCIONALIDAD DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

En las últimas dos décadas, la leche de diferentes especies lácteas, se ha analizado e investigado en términos de péptidos bioactivos y han demostrado tener un gran espectro de bioactividades (Park & Nam, 2015). Los péptidos bioactivos de la leche poseen diversas actividades y funcionalidades biológicas muy importantes, que incluyen efectos sobre el sistema cardiovascular, gastrointestinal, inmunitario y nervioso como se muestra en la Figura 1.4.

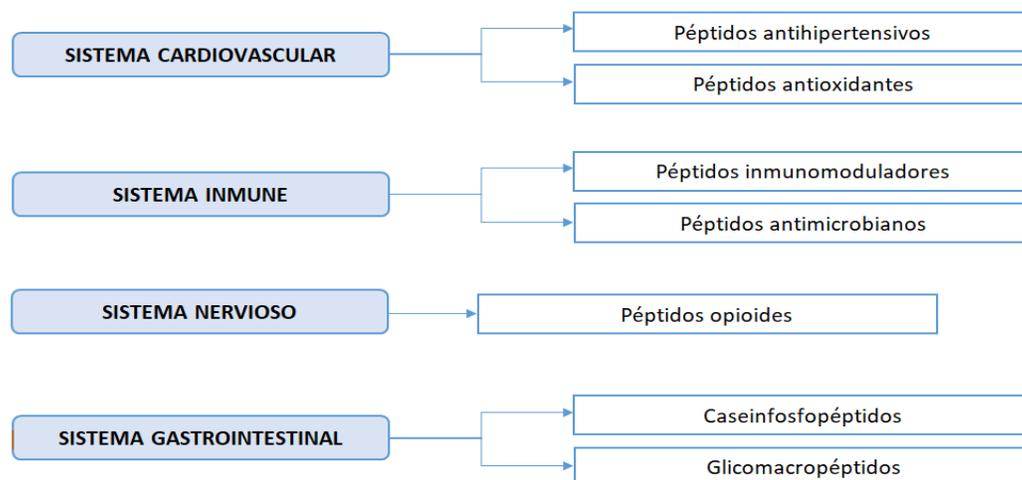


Figura 1.4. Principales funciones de los péptidos bioactivos de las proteínas lácteas. Modificado de (Juárez Iglesias et al., 2015).

Se han identificado péptidos bioactivos de especies diferentes, predominando con el 76% la leche de vaca, 11% humano, 7% cabra, 5% oveja y 1% en leche de búfalo, burro, cerdo, camello, conejo y yak (Nielsen et al., 2017).

De acuerdo a Nielsen et al, (2017) el predominio de los péptidos bioactivos derivados de la leche de vaca no se deriva de una realidad biológica, sino más bien se debe a que la leche de vaca se estudia a mayor profundidad, pero debido a que existe una alta homología de secuencia dentro de las proteínas de la leche entre especies, los estudios extensivos sobre la leche de vaca pueden permitir la traducción de los hallazgos de péptidos bioactivos a otras especies. Sin embargo, Tagliacucchi et al., (2018) menciona que la diferencia en la estructura primaria de las proteínas de la leche entre especies puede tener un impacto en las bioactividades potenciales de los péptidos liberados, pudiendo ser los péptidos derivados de leche de vaca los de mayor actividad antioxidante y los de oveja con mayor capacidad de inhibir la ECA.

Cabe mencionar que los péptidos con acciones inhibitoras de la ECA de la leche de vaca son los más abundantes en la literatura, sin embargo, también se han reportado péptidos, antioxidantes, antimicrobianos, opioides, antiinflamatorios, inmunomoduladores, entre otros (Nielsen et al., 2017). En la Tabla 1.3 se muestran algunos péptidos bioactivos derivados de la leche de bovino.

Tabla 1.3. Algunas secuencias de péptidos bioactivos y sus funciones liberadas de caseínas y proteínas de suero (Lisak Jakopović et al., 2019).

Secuencia	Nombre	Fragmento	Efecto
VPP/IPP	Lactotripéptidos	β - y κ -caseína	Inhibidor de la ECA
FFVAP	α_{s1} -Casokinina-5	α_{s1} -caseína f(23-27)	Antihipertensivo Inhibidor de la ECA
AVPYPQR	β -casokinina-7	β -caseína f(177-183)	Inhibidor de la ECA
WLAHK	Lactokinina	α -lactalbúmina f(104-108)	Inhibidor de la ECA
IPA	Lactokinina	β -lactoglobulina f(78-80)	Inhibidor de la ECA
TTMPLW	α_{s1} -Inmunocasokinina	α_{s1} -caseína f (194-199)	Inmunomodulador Antihipertensivo

YPPFGPI	β -casomorfina-7	β -caseína f(60-66)	Opioide Inmunomodulador
IIAEK	Lactostatina	β -lactoglobulina f(71-75)	Hipocolesterolémico
FKCRRWQ WRMKKLG APSITCVRR AF	Lactoferricina	Lactoferrina f(17-41)	Antimicrobiano Inmunomodulador

1.5.1 Sistema cardiovascular

❖ Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva es una de las propiedades más ampliamente reportadas de los péptidos bioactivos de la leche debido a que existe una prevalencia mundial de enfermedades cardiovasculares. Específicamente, muchos de estos péptidos pueden reducir la presión arterial al inhibir la ECA. Ésta enzima es la más importante en la regulación de la presión sanguínea, ya que cataliza la conversión de angiotensina-I, una hormona peptídica, en angiotensina-II, lo que produce una constricción vascular. Los péptidos inhibidores de la ECA inhiben la conversión dando como resultado la dilatación de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, controlando la hipersensibilidad (Bhandari et al., 2019). Es importante mencionar, que los péptidos con mayor actividad inhibidora de la ECA suelen tener aminoácidos *N*-terminales aromáticos o básicos, mayor cantidad de aminoácidos hidrófobos y cargados positivamente en *C*-terminales (Sánchez & Vázquez, 2017).

Se han identificado varios péptidos inhibidores de la ECA por digestión enzimática *in vitro* de proteínas de la leche o síntesis química de análogos de péptidos. Como se observa en la tabla 1.3, los inhibidores de la ECA derivados de las proteínas de la leche se atribuyen a diferentes fragmentos de caseína, llamados casokininas o proteínas de suero, llamadas lactokininas (Park & Nam, 2015).

Los péptidos inhibidores de la ECA de las proteínas de la leche de vaca representan el grupo más grande de péptidos, sin embargo también se han hallado en leche de cabra y oveja como se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Secuencia de péptidos bioactivos derivados de proteínas de leche ovina y caprina (Park & Nam, 2015).

Fragmento de péptido	Secuencia	Actividad biológica
Ovinos α_{s1} -CN f(86-92)	VPSELYL	Inhibidor de la ECA
Ovinos α_{s1} -CN f(102-109)	KKYNVPQL	Inhibidor de la ECA
Caprinos α_{s1} -CN f(143-146)	AYFY	Inhibidor de la ECA
Ovinos α_{s2} -CN f (165-170)	LKKISQ	Antibacteriano
Ovinos α_{s2} -CN f(165-181)	LKKISQYYQKFAWPQYL	Antibacteriano
Caprinos α_{s2} -CN f(174-179)	KFAWPQ	Inhibidor de la ECA
Ovinos α_{s2} -CN f(184-208)	VDQHQAMKPWTQPKT- KAIPYVRYL	Antibacteriano
Ovinos α_{s2} -CN f(202-204)	IPY	Inhibidor de la ECA Antibacteriano
Ovinos y caprinos α_{s2} -CN f(203-208)	PYVRYL	Inhibidor de la ECA Antihipertensivo
Ovinos α_{s2} -CN f(205-208)	VRYL	Inhibidor de la ECA
Ovinos y caprinos β -CN f(47-51)	DKIHP	Inhibidor de la ECA
Ovinos β -CN f(58-68)	LVYPFTGPIPN	Inhibidor de la ECA
Caprinos κ -CN f(59-61)	PYY	Inhibidor de la ECA
Ovinos y caprinos κ -CN f(106-111)	MAIPPK	Inhibidor de la ECA
Ovinos y caprinos κ -CN f(106-112)	MAIPPKK	Inhibidor de la ECA
Ovinos κ -CN f(112-116)	KDQDK	Antitrombótico
Caprinos β -Lg f(46-53)	LKPTPEGD	Inhibidor de la ECA
Caprinos β -Lg f(58-61)	LQKW	Inhibidor de la ECA
Caprinos β -Lg f(103-105)	LLF	Inhibidor de la ECA
Caprinos β -Lg f(122-125)	LVRT	Inhibidor de la ECA
Ovinos y caprinos LF f(17-41)	ATKCFQWQRNMRKVR GP- PVSCIIRD	Antibacteriano
Ovinos y caprinos LF f(14-42)	QPEATKCFQWQRNMR KVRGP- PVSCIIRDS	Antibacteriano

❖ **Actividad antioxidante**

La mayoría de los péptidos derivados de alimentos con actividad antioxidante, muestran características estructurales como altas cantidades de histidina y aminoácidos hidrofóbicos que pueden aumentar la interacción entre los péptidos y los radicales de ácidos grasos. En la leche la mayor parte de los péptidos antioxidantes reportados provienen de caseínas, especialmente β -caseína y α 1-caseína. Los péptidos antioxidantes de productos lácteos fermentados pueden prevenir la formación de radicales libres o eliminar los radicales libres existentes o los peróxidos implicados en la oxidación de lípidos de membrana, proteínas celulares, ADN y enzimas (Nielsen et al., 2017; Wang et al., 2018 y Park & Nam, 2015).

La secuencia de aminoácidos WYSLAMAASDI proveniente de la La β -lactoglobulina f (19–29) es un péptido antioxidante que se ha destacado por su gran actividad, incluso mayor que antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado, y por lo tanto podría ser una alternativa para su uso en el industria de alimentos (Nielsen et al., 2017).

1.5.2 Sistema inmunitario

❖ **Actividad inmunomoduladora**

La actividad inmunomoduladora se ha relacionado con la mejora de la proliferación de linfocitos y la síntesis de anticuerpos. Las características fisicoquímicas como la carga positiva, la hidrofobicidad y la longitud de la cadena peptídica influyen en las propiedades inmunomoduladoras de los péptidos (Nielsen et al., 2017).

Se ha demostrado que los péptidos bioactivos de la leche de vaca (Tabla 1.4) tales como β -casokininas, β -casomorfina y lactoferricina estimulan la respuesta inmunitaria así como derivados de la β -caseína humana. Específicamente, los péptidos derivados de caseína estimulan la proliferación de linfocitos humanos y la actividad fagocítica de los macrófagos. Además, estos péptidos bioactivos contribuyen a la protección contra las infecciones causadas por bacterias, virus y parásitos, regulan a la baja los procesos inflamatorios autoinmunes y evitan el rechazo de los trasplantes (Vargas et al., 2019 y Nielsen et al., 2017).

❖ **Actividad antimicrobiana**

De forma general, los péptidos antimicrobianos (PAM) ejercen su efecto al alterar la integridad celular principalmente en las membranas celulares bacterianas con un aumento resultante en la permeabilidad de la membrana. La pared celular microbiana está compuesta de lipoproteínas que son el objetivo principal de la desintegración para tomar en cuenta la actividad antimicrobiana de los péptidos. Los péptidos antimicrobianos son generalmente péptidos catiónicos, anfipáticos. La parte catiónica de los péptidos es responsable de la interacción electrostática con fosfolípidos aniónicos que conducen a la formación de poros en la membrana citoplasmática. Debido a la formación de poros, los PAM se ensamblan sobre la superficie de la membrana celular y se incorporan a ella (Bhandari et al., 2019; Wang et al., 2018 y Nielsen et al., 2017).

Los péptidos antimicrobianos se han aislado y caracterizado a partir de una variedad de proteínas alimentarias, especialmente de la leche como las lactoferrinas derivadas de la lactoferrina bovina (Tabla 1.4) y humana o los péptidos derivados de la caseína. Sin embargo también se ha identificado péptidos antimicrobianos en leche de cabra y oveja (Tabla 1.5). Se ha demostrado que las lactoferrinas tienen actividad antimicrobiana contra diversas bacterias, levaduras y hongos filamentosos principalmente gram-positivos y negativos. Sin embargo los péptidos antimicrobianos también se han aislado de huevos, cebada, queso y arroz (Nielsen et al., 2017; Lisak Jakopović et al., 2019 y Park & Nam, 2015).

1.5.3 Sistema nervioso

❖ **Actividad Opioide**

Otra propiedad que ejercen los péptidos bioactivos es la actividad opioide. Los péptidos opioides son aquellos péptidos que poseen similitudes farmacológicas con el opio, a fin de aliviar el dolor. Las características de secuencia comunes para estos péptidos son tirosina en el N-terminal y fenilalanina o tirosina en la segunda, tercera o cuarta posición. Estos elementos estructurales permiten que los péptidos se ajusten mejor al sitio de unión del receptor de opioide (Nielsen et al., 2017 y Lisak Jakopović et al., 2019).

Los péptidos opioides se han encontrado tanto en caseínas como en proteínas del suero, sin embargo, los péptidos bioactivos opioides más reconocidos son las β -casomorfina derivadas de caseína, ya que fueron los primeros péptidos que mostraron actividad agonista en los receptores opioides exógenos. Se ha descrito una actividad similar para α -lactorfina y β -lactorfina, derivadas de α -lactalbúmina y β -LG, respectivamente. También todos los fragmentos de caseína κ , conocidos como casoxinas, se comportan como antagonistas opioides estos se han encontrado principalmente en la leche de vaca (Egger & Ménard, 2017).

1.5.4 Sistema gastrointestinal

Las proteínas y péptidos derivados de la leche influyen la regulación de enzimas digestivas y la absorción de nutrimentos en el tracto intestinal. Los fosfopéptidos de la leche se derivan principalmente de las proteínas de la caseína y se liberan tras la digestión enzimática. Los residuos de serina fosforilados pueden unirse y solubilizar iones de calcio y facilitar su biodisponibilidad y absorción intestinal (Nielsen et al., 2017 y Rodríguez Hernández et al., 2014).

Por otro lado el GMP, ha sido reconocido como un péptido bioactivo derivado de la digestión de la κ -caseína. Recientemente se ha demostrado que previene la adhesión bacteriana y viral a las células intestinales, actúa como enlazador o secuestrante de enterotoxinas de cólera y *E. coli*, promotor del crecimiento de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal, tales como bifidobacterias y supresor de secreciones gastrointestinales (Carrasco Alvarado & Guerra, 2010).

CAPÍTULO 2. PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN EL PROCESAMIENTO DE QUESOS.

2.1 PRODUCCIÓN Y CONSUMO DE QUESOS.

El queso se ha convertido en un producto muy importante en la industria láctea, ya que es uno de los derivados de la leche más consumidos a nivel mundial debido a sus propiedades sensoriales y nutricionales, por lo que desempeña un papel importante en las dietas de todos los grupos de población, y su consumo diario es recomendado por las organizaciones de salud y las autoridades mundiales (Santiago-López et al., 2018 y Rolim et al., 2020). En el año 2018 la Unión Europea se destacó como el principal consumidor de queso, con una demanda del 47.7% del total mundial, además se destacaron países desarrollados como Estados Unidos (28.6%) Rusia y Canadá. Sin embargo países en vías de desarrollo como Brasil también constituyen una importante demanda tal como se muestra en la Figura 2.1 (FIRA, 2019).

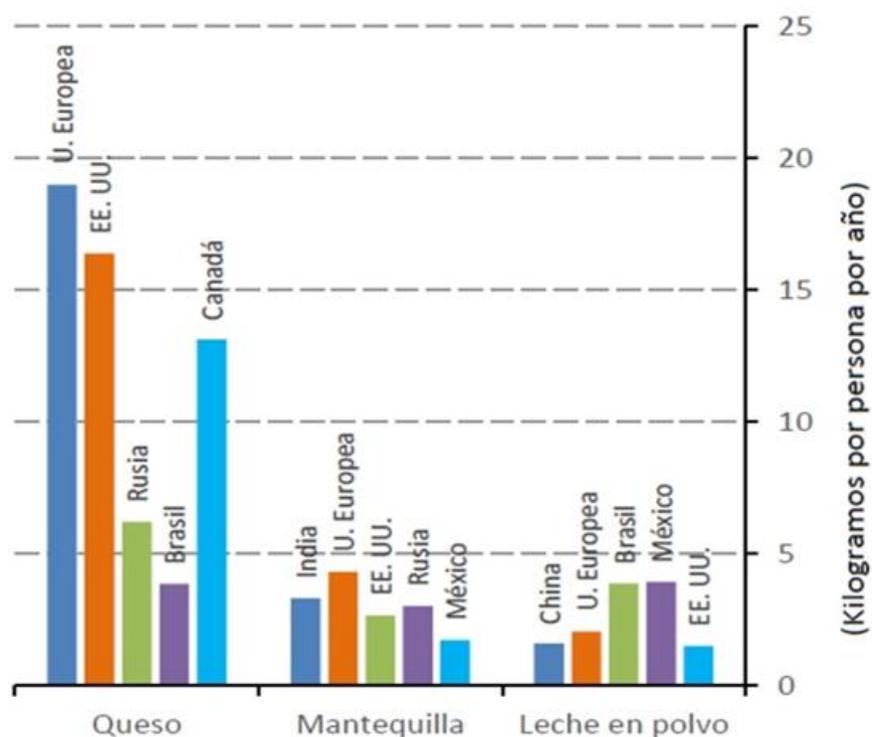


Figura 2.1. Consumo per cápita de derivados lácteos de los principales países consumidores en el año 2018 (FIRA, 2019).

Es importante mencionar que Grecia es el mayor consumidor mundial (per cápita) de queso, con 27.3 kg (el Feta representa $\frac{3}{4}$ de este consumo). Francia es el segundo mayor consumidor de queso con 24 kg per cápita, siendo el Emmental y Camembert los quesos más comunes en Francia. El número tres corresponde a Italia con 23 kg per cápita, los quesos más populares son Mozzarella, el Parmigiano Reggiano y el Pecorino. En los Estados Unidos el consumo de queso también está aumentando rápidamente. Mozzarella es el queso favorito de Estados Unidos ya que es uno de los principales ingredientes de la pizza (Mikkelsen, 2014 y Pérez, 2013).

Por otro lado, entre los productos lácteos, los quesos también han ocupado en los últimos años los primeros lugares de producción a nivel mundial (67.5% del volumen total) por arriba de otros derivados de la leche como la mantequilla y la leche en polvo como se observa en la Figura 2.2. Además su producción se concentra en países de primer mundo como la ya mencionada Unión Europea, que así como en su demanda también sostiene el primer lugar en la producción de queso, contribuyendo en 2018 con el 37.1% del total mundial (FIRA, 2019).

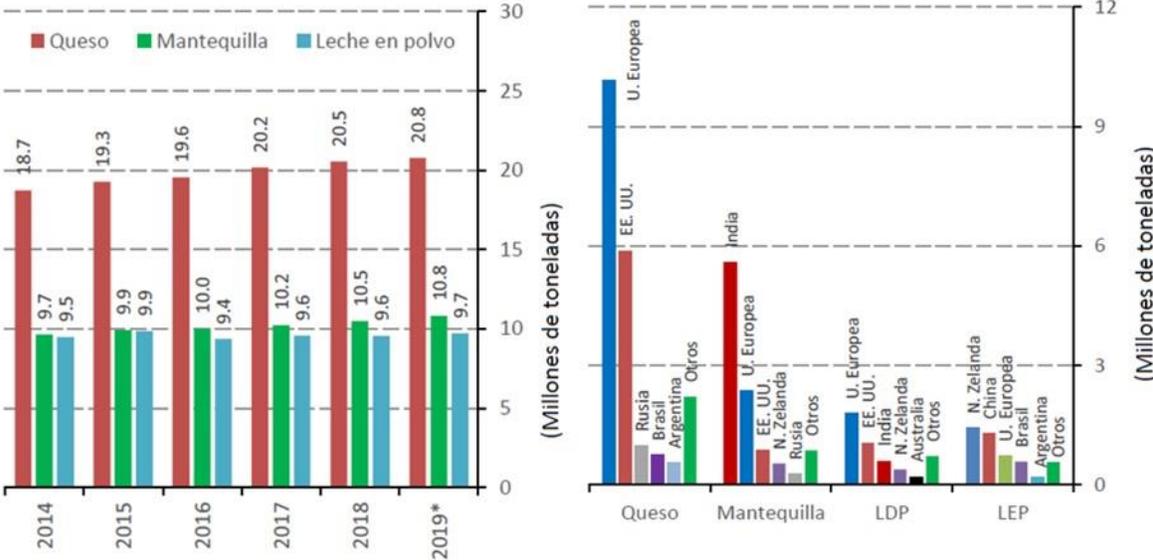


Figura 2.2. Producción mundial y principales productores de derivados lácteos proyectados a Diciembre del 2018 (FIRA, 2019).

A nivel nacional, el queso ocupa el cuarto lugar en producción de leche y derivados lácteos, constituyendo el 8% de la producción nacional. Se encuentra por debajo del yogur y por encima de productos como la crema, la leche en polvo y la mantequilla. Como

se puede observar en la Figura 2.3, los quesos sin madurar predominan la mayor parte de la producción en México, siendo el queso fresco el más producido en el año 2018, también se destacan los quesos doble crema, panela y amarillo. Cabe mencionar que los quesos mexicanos tienen beneficios potenciales debido a su microbiota nativa, el tipo de leche utilizada y las técnicas artesanales aplicadas durante su producción (CANILEC, 2019 y Santiago-López et al., 2018).

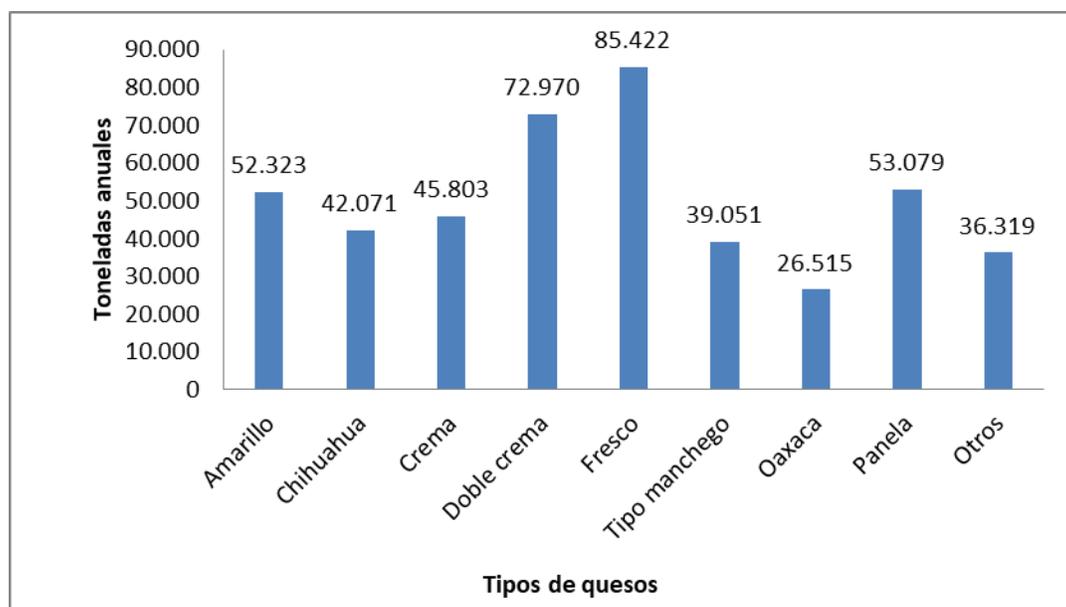


Figura 2.3. Producción de los distintos tipos de queso en México durante 2018 (CANILEC, 2019).

Con respecto al consumo, el Panela es el queso más consumido en México con el 52.3%, seguido por el Oaxaca (17.4%), lo cual indica la clara tendencia de los mexicanos al consumo de queso fresco, los quesos semi-madurados como lo son el Chihuahua (11.5%) y el Manchego (7.3%), aún son de consumo selectivo (Galván, 2005).

2.3 CLASIFICACIÓN DE QUESOS

El queso puede variar ampliamente en sus características, incluido el color, el aroma, la textura, el sabor y la firmeza, que generalmente se puede atribuir a la tecnología de producción, la fuente de la leche, el contenido de humedad y la duración del tiempo de maduración, además de la presencia de hongos, levaduras y bacterias. Debido a esto

existe una gran diversidad de quesos y cada país productor tiene su propio sistema o utiliza términos técnicos para nombrar sus productos, por lo tanto, no hay una sola clasificación que incluya todas las variedades de queso en el mercado (Santiago-López et al., 2018 y Harbutt, 2015). A continuación se muestra la clasificación de los quesos madurados:

2.3.1 Según su maduración (OMS/FAO, 2011 y Hernández, 2010).

- ❖ **Queso fresco:** es el que está listo para su consumo al finalizar su proceso de fabricación.
- ❖ **Queso madurado:** es el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión. En la Figura 2.4 pueden observarse algunas de las variedades de quesos madurados y su clasificación.
- ❖ **Queso madurado con mohos:** es un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.
- ❖ **Queso en salmuera:** son los quesos madurados semilleros a blandos que se conservan en salmuera hasta su entrega al consumidor o su prensado para la distribución.

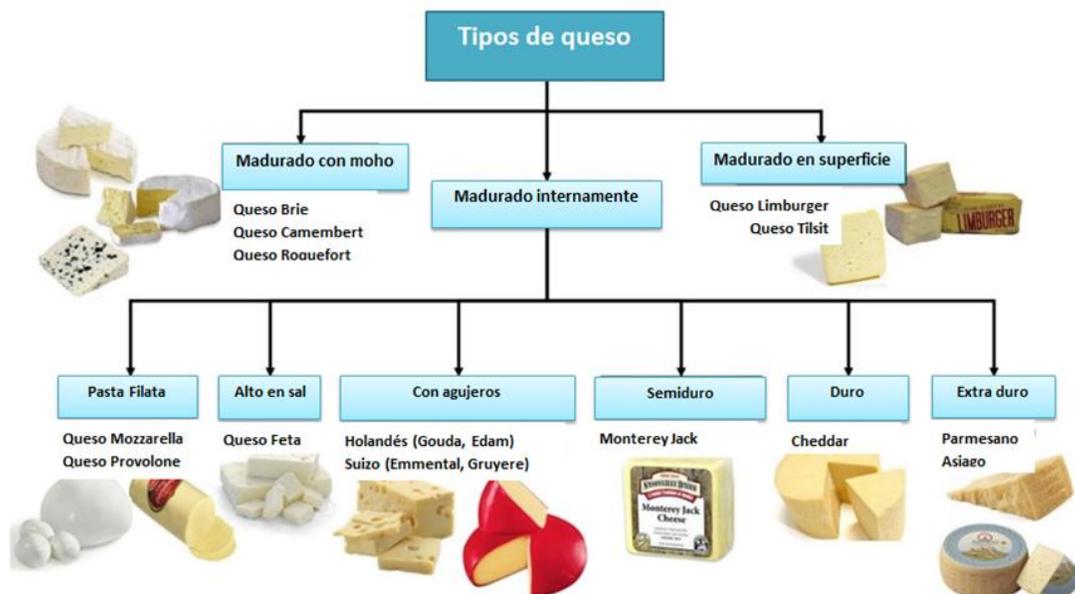


Figura 2.4. Clasificación de queso basada en el proceso de maduración (Khattab et al., 2019).

2.4 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE QUESOS MADURADOS.

Tradicionalmente, el queso se fabrica convirtiendo la leche líquida en una masa semisólida mediante el uso de un agente coagulante, como el cuajo, ácido, temperatura o una combinación de los mismos (Santiago-López et al., 2018). De manera general los principales pasos para la fabricación de queso se muestran en la Figura 2.5:

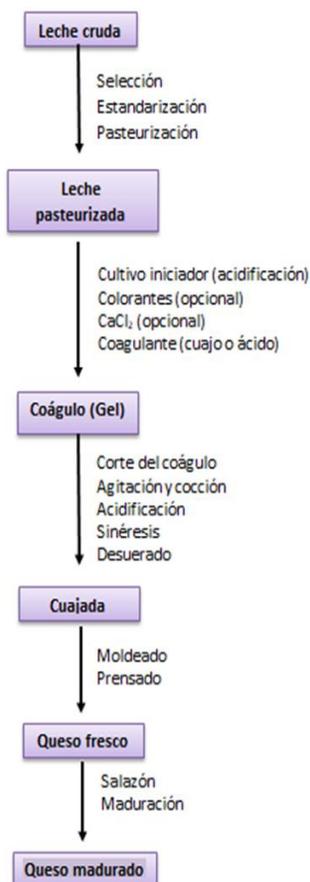


Figura 2.5. Protocolo general para la fabricación de queso madurado (Fox et al., 2017).

2.4.1 Selección de la leche

La composición del queso está fuertemente influenciada por la composición de la leche, especialmente el contenido de grasas, proteínas, calcio y pH. Para la elaboración del queso, la leche deber ser higiénicamente obtenida de vacas sanas. Debido a las principales diferencias de la composición, la leche de las vacas en las etapas muy tempranas o tardías de la lactancia y aquellas que sufren de mastitis deben ser excluidas.

También, la leche debe ser de buena calidad microbiológica, ya que las bacterias contaminantes se concentrarán en la cuajada de queso y pueden causar defectos o problemas de salud pública (Fox et al., 2017).

2.4.2 Estandarización de la leche

La estandarización del contenido graso de la leche se realiza con el objetivo de tener un contenido característico de grasa en materia seca y por ende una cierta proporción de grasa-proteína (caseína). Esto se debe a que diferentes variedades de quesos poseen un contenido característico de grasa que les confiere un estándar de identidad. Dependiendo de la proporción requerida, puede modificarse a través de la eliminación de grasa mediante centrifugación, adición de leche descremada o crema, y agregando leche en polvo. Estas adiciones también aumentan el contenido total de sólidos de la leche y, por lo tanto, el rendimiento del queso (Fox et al., 2017).

2.4.3 Pasteurización

La leche se pasteuriza para eliminar los microorganismos patógenos y mantener sus propiedades nutricionales. La pasteurización se desarrolló principalmente para eliminar al patógeno *M. tuberculosis*, el cual es resistente a la temperatura. Cabe mencionar que la pasteurización por lotes a baja temperatura y tiempo prolongado (LTLT, del inglés Low Temperature Low Time; 63–65 °C × 30 min) se usó inicialmente, pero se reemplazó por pasteurización continua (HTST, del inglés High Temperature Short Time; 72 °C × 15 s), siendo este tratamiento térmico al que se somete la mayoría de la leche para la fabricación de queso (Fox et al., 2017).

2.4.4 Adición del cultivo iniciador

El principal objetivo del cultivo iniciador es desarrollar ácido en la cuajada, generalmente se logra mediante la producción de ácido láctico a través de la fermentación de la lactosa, por LAB, las cuales también contribuyen al desarrollo de la textura y el sabor del producto final. Además, inhiben el crecimiento microbiano sobreviviente de la pasteurización, produce CO₂ y compuestos aromáticos. Por lo tanto, las LAB tienen un papel crítico durante el proceso de elaboración del queso (Santiago-López et al., 2018).

2.4.5 Adición de sales y aditivos

El calcio juega un papel importante en la coagulación de la leche por el cuajo y el posterior procesamiento del coágulo y, por lo tanto, es una práctica común agregar CaCl_2 en la leche de queso. Una baja concentración de iones calcio en la leche de queso causa un coágulo blando. Esto produce pérdidas de caseína y grasa, así como una sinéresis deficiente durante la fabricación del queso. En esta etapa, también pueden adicionarse colorantes por las demandas del mercado sobre algunos quesos como es el caso del Cheddar (Fox et al., 2017 y Gösta Bylund et al., 2015).

2.4.6 Coagulación de la leche

La coagulación de la leche ya sea por proteólisis o acidificación, es la operación clave en la fabricación de queso. Sin embargo la mayoría de los quesos se producen mediante coagulación enzimática. En esta etapa la quimosina provoca la desestabilización de las micelas de caseína y forman un gel que se conoce como cuajada (Hernández, 2010 y Fox et al., 2017).

Desde el punto de vista fisicoquímico la coagulación enzimática puede dividirse en dos fases, una primaria (hidrólisis enzimática) y otra secundaria (agregación). La fase primaria implica la modificación enzimática de las micelas de caseína mediante la hidrólisis de las proteínas inducida por el cuajo. La característica más importante de esta enzima (quimosina) en quesería, es que cataliza la hidrólisis específica del enlace $\text{Phe}_{105} - \text{Met}_{106}$ de la κ -caseína. Las dos partes resultantes de la escisión de la κ -caseína son una paracaseína insoluble (fragmento 1 a 105 residuos de aminoácidos) que continúa permaneciendo en la micela de caseína y el glicomacropéptido C-terminal soluble (fragmento 106 a 148 residuos de aminoácidos). Finalmente, como resultado de esta acción se produce la reducción de la carga negativa neta y de la repulsión estérica. De esa manera, las micelas modificadas comienzan a ser susceptibles de agregarse (Scott et al., 2003).

2.4.7 Deshidratación del coágulo, moldeado y prensado.

La sinéresis es un paso importante en la fabricación de queso donde el suero es expulsado de las partículas de cuajada durante el corte del coágulo. Este proceso

concentra la grasa y la caseína de la leche. Cuando se alcanza el grado deseado de sinéresis y, en algunos casos el pH deseado, las cuajadas se separan del suero, se transfiere en moldes y se somete a presión para obtener la forma deseada mediante un método específico de la variedad (Panikuttira et al., 2018).

2.4.8 Salazón

La mayoría de los quesos son salados al final del proceso de fabricación por mezcla de sal seca, inmersión en salmuera o frotando sal seca en la superficie del queso. La sal, que varía de aproximadamente 2 a 10% en la fase de humedad, tiene una gran influencia en varios aspectos de la maduración, calidad y seguridad del queso (Gösta Bylund et al., 2015).

2.4.9 Maduración

Los quesos se maduran durante un período que varía de aproximadamente 3 semanas a más de 2 años, la duración de la maduración está inversamente relacionada con el contenido de humedad del queso. Las características únicas de cada variedad se desarrollan durante la maduración como resultado de un complejo conjunto de reacciones bioquímicas. Los cambios que ocurren durante la maduración son responsables del sabor, el aroma y la textura del queso (Fox et al., 2017).

2.5 ACTIVIDAD BIOACTIVA DE LOS QUESOS.

Las proteínas además de ser las responsables de los aspectos nutricionales, fisicoquímicos, y sensoriales del queso, son las principales precursoras de péptidos bioactivos, principalmente las caseínas. El contenido de proteína en el queso depende de la variedad, que va desde el 4% (queso crema) al 40% (queso parmesano).

Los péptidos bioactivos pueden liberarse en los quesos durante su procesamiento especialmente en la maduración durante la proteólisis. De manera general los péptidos generados en quesos son pequeños entre 2-20 residuos de aminoácidos y principalmente se originan de α 1-CN, seguidos por β -CN y α 2-CN, mientras que κ -CN es menor fuente de estos péptidos bioactivos. (López-Expósito et al., 2017 y Barac et al., 2017).

Las diferentes variedades de quesos presentan bioactividad variable debido a que durante el procesamiento, el tipo y la cantidad de péptidos derivados de proteínas lácteas, se ve afectada por factores que influyen en la proteólisis, como el pH, el tipo de enzimas, la relación sal/humedad, el tiempo y temperatura de almacenamiento. Dicha bioactividad está relacionada con efectos antihipertensivos, antioxidantes, opioides, antimicrobianos, entre otros. Cabe mencionar que los principales péptidos bioactivos estudiados son inhibidores de la ECA, los cuales que tienen un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, sin embargo los péptidos antioxidantes derivados de la leche ganaron interés recientemente y han exhibido su efecto preventivo sobre la reducción del estrés oxidante (López-Expósito et al., 2017; Barać et al., 2017.y Kocak et al., 2020).

2.5.1 Péptidos inhibidores de la ECA

La hipertensión arterial es una enfermedad cardiovascular con gran presencia a nivel mundial. La mayoría de los pacientes hipertensos son tratados con medicamentos inhibidores de la ECA. Sin embargo, se ha demostrado que se pueden obtener pequeñas reducciones en la presión arterial promedio mediante hábitos nutricionales, como la reducción de la ingesta de sodio y el aumento del consumo diario de péptidos antihipertensivos derivados de los alimentos. Diferentes estudios han mostrado la actividad inhibitoria de la ECA en variedades de quesos con distintos péptidos bioactivos que son responsables de tal efecto como se presenta en la Tabla 2.1. Cabe mencionar que este efecto es el mejor estudiado y confirmado en estudios *in vivo* (López-Expósito et al., 2017 y Skwarek et al., 2018).

Las casokininas, son péptidos inhibidores de la ECA provenientes de las caseínas y se han identificado en extractos solubles en agua de los quesos Gouda, Cheddar, Gamalost, Gorgonzola, Grana Padano, Queso Gruyere, Manchego, entre otros. Entre estos diferentes péptidos inhibidores de la ECA, los tripéptidos VPP e IPP pertenecen al grupo más potente inhibidor de la ECA y están encriptados en la β -caseína de la leche. También se sabe que son fácilmente absorbidos por el intestino y se ha demostrado que los péptidos que contienen Pro-Pro en el C-terminal son bastante resistentes a una mayor degradación por las proteasas y peptidasas digestivas. De manera similar, los péptidos antihipertensivos derivados de α 1-caseína AYFYPEL y RYLGY se encontraron en varias

variedades de queso, como Brie, Caprino, Cheddar, Gorgonzola y Maasdam (López-Expósito et al., 2017; Skwarek et al., 2018 y Barać et al., 2017).

Tabla 2.1. Péptidos identificados en extractos solubles en agua de algunas variedades de quesos con actividad antihipertensiva. Modificado de (López-Expósito et al., 2017).

Tipo de queso	Péptidos identificados
Grana Padano	VPP; IPP; RYLG; HLPLP; LHLPLP
Caprino	VPP; IPP; RYLG; RYLGY; AYFYPEL; LHLPLP
Cheddar	VPP; IPP; RYLG; RYLGY; HLPLP; AYFYPEL; LHLPLP
Emental	VPP;IPP
Fontina	VPP; IPP; HLPLP
Maasdam	VPP; IPP; HLPLP; AYFYPEL; LHLPLP
Provolone	VPP; IPP; RYLG; LHLPLP
Gouda	VPP; IPP
Gorgonzola	VPP; IPP; AYFYPE; HLPLP; AYFYPEL; LHLPLP

Es importante mencionar que se ha puesto especial atención en la identificación de los péptidos derivados de la caseína bovina VPP, IPP, RYLG, RYLG, AYFYPEL, AYFYPE, LHLPLP y HLPLP (Tabla 2.2) debido a que se ha informado que poseen actividad ACE-I (inhibidora de la ECA) *en estudios in vitro e in vivo* (Stuknyte et al., 2015).

Tabla 2.2. Valores de IC₅₀ de péptidos inhibidores de la ECA (Stuknyte et al., 2015).

Secuencia	Fuente caseína bovina	IC ₅₀ (μM)
VPP	β- CN f (84-86)	9
IPP	β- CN f (74-76)	5
RYLG	α _{s1} -CN f (90-93)	225
RYLG	α _{s1} -CN f (90-94)	0.71
AYFYPE	α _{s1} -CN f (143-148)	261
AYFYPEL	α _{s1} -CN f (143-149)	6.58
HLPLP	β- CN f (134-138)	21
LHLPLP	β- CN f (133-138)	5.5/3.7

Aunque la mayoría de los péptidos identificados en quesos son inhibidores de la ECA, también se ha demostrado la capacidad antioxidante de diversos quesos madurados, mediante los métodos radical libre DPPH* (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y ABTS*+ (Ácido

2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Algunos de estos quesos incluyen el Camembert, Gouda, Parmesano, Coalho, Fresco y Cheddar (Skwarek et al., 2018 y Baracé et al., 2017). Con respecto a los péptidos antimicrobianos hasta, ahora no existe suficiente información sobre el potencial del queso como fuente de estos péptidos (Lopes Fialho et al., 2018).

De manera general los estudios que han demostrado la capacidad de los quesos para producir péptidos bioactivos con actividad antihipertensiva, se han relacionado con el tiempo de maduración o la actividad de los cultivos iniciadores y se sabe poco sobre su producción en quesos frescos. Dado que este tipo de quesos representa un alto mercado en países Latinoamericanos, identificar péptidos bioactivos podría proporcionar un valor adicional a sus consumidores. Los hallazgos en México sobre péptidos bioactivos derivados del queso también son limitados, sin embargo se ha reportado actividad antioxidante y antihipertensiva de los extractos solubles en agua obtenidos de diferentes tipos de queso artesanal como Crema de Chiapas, Cocido y Fresco de Sonora (Santiago-López et al., 2018 y Hernández-Galán et al., 2017).

CAPÍTULO 3. PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DURANTE LA MADURACIÓN DEL QUESO

3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MADURACIÓN DEL QUESO

El proceso de maduración en el queso implica cambios microbiológicos y bioquímicos en la cuajada, que resultan en el sabor y textura característicos de la variedad particular. Este proceso puede durar desde dos semanas (queso mozzarella) o hasta dos años (Parmigiano Reggiano o Cheddar madurado) según la variedad de queso. (Santiago-López et al., 2018).

Durante la maduración, la textura se suaviza como consecuencia de hidrólisis de las micelas de caseína por proteólisis, ocurren cambios en la capacidad de retención de agua de la cuajada y en el pH. También se desarrolla el sabor del queso debido a los compuestos generados a través de la actividad enzimática y metabólica de los microorganismos de la leche, los cultivos iniciadores y adjuntos (McAuliffe et al., 2019 y Khattab et al., 2019). Como se puede observar en la Figura 3.1, los principales eventos bioquímicos que participan en el proceso de maduración de queso e impulsan la generación de compuestos de sabor son: el metabolismo del azúcar (glucólisis), la degradación de proteínas (proteólisis) y la descomposición de grasas (lipólisis) (Nongonierma & FitzGerald, 2011).



Figura 3.1. Principales rutas metabólicas microbianas que participan en la generación de sabor de los quesos. Modificado de (McAuliffe et al., 2019).

3.2 GENERACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS (PROTEÓLISIS)

En los quesos, los péptidos bioactivos se generan a través de la hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche en los procesos de fermentación y maduración (Parra Baptista et al., 2018). Esta última etapa se conoce como la más importante de la fabricación de quesos, ya que no solamente es la responsable de la generación de las características sensoriales de los quesos como cambios en la textura del queso y liberación de compuestos de sabor y olor como se observa en la Figura 3.2; sino también de la generación de péptidos bioactivos (Pihlanto & Korhonen, 2014; Upadhyay et al., 2004 y Santiago-López et al., 2018).

Durante la proteólisis primaria las proteasas y peptidasas presentes en la leche junto con el coagulante retenido en la cuajada actúan directamente sobre las caseínas para formar principalmente péptidos grandes y de tamaño intermedio; posteriormente, en la proteólisis secundaria estos péptidos se hidrolizan aún más, por las enzimas de LAB y NSLAB para producir péptidos más cortos que luego son degradados por una amplia gama de peptidasas para formar aminoácidos libres (Toldrá et al., 2018 y Nongonierma & FitzGerald, 2011).

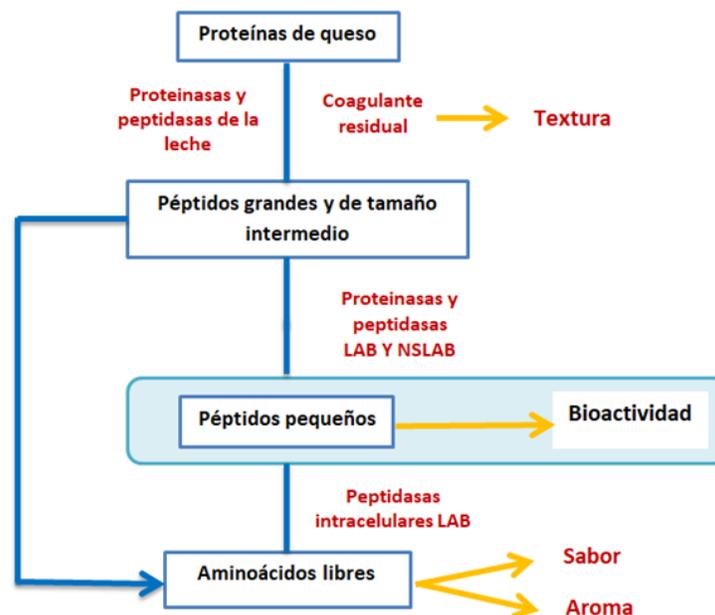


Figura 3.2. Esquema de hidrólisis de proteínas y enzimas involucradas en la maduración del queso. Modificado de (Toldrá et al., 2018).

Por lo tanto, el resultado de la acción combinada de endo y exopeptidasas es una acumulación de péptidos pequeños y aminoácidos libres en el queso. Algunos de los péptidos liberados pueden ser bioactivos si presentan la longitud y secuencia de residuos adecuada (Toldrá et al., 2018).

Baptista et al., (2018) mencionan que los principios generales de la proteólisis, permiten establecer los parámetros que afectan la liberación de péptidos bioactivos. Las enzimas que median la proteólisis se originan de diferentes fuentes: la leche, el coagulante, LAB, cultivos adjuntos y NSLAB que conducen a la liberación de péptidos, incluidos los bioactivos.

3.2.1 Actividad de la plasmina

La plasmina es la enzima nativa de la leche más importante con respecto a la maduración del queso, con un pH y temperatura óptimos de ~7.5 y 37 °C respectivamente. La degradación inicial de α_{S2} -caseína y β -caseína en el queso se ve afectada principalmente por la plasmina, mientras que el cuajo es responsable de la degradación inicial de α_{S1} -caseína durante la maduración del queso (Upadhyay et al., 2004).

Cabe mencionar, que a plasmina es una enzima termoestable y su actividad aumenta después del tratamiento térmico, ya sea por la inactivación de los inhibidores naturales de la plasmina o por la activación del plasminógeno (Santiago-López et al., 2018). Por lo tanto, la acción de esta enzima, es de particular importancia, en los quesos de pasta hilada y de alta cocción, así como en los quesos cuyo pH aumenta durante la maduración como el tipo Camembert (Hill & Kethireddipalli, 2012).

Según Santiago-López et al., (2018) la formación de los péptidos inhibidores de la ECA en el queso Cheddar, se ve significativamente afectada por la naturaleza de la proteólisis, en especial, por la actividad enzimática de la plasmina. Aunado a esto Hossain et al., (2020) estudiaron la relación del tratamiento térmico sobre la actividad de la plasmina y la bioactividad inhibidora de la ECA del queso Cheddar tratado con tres temperaturas diferentes de pasteurización (72 , 75 y 78 °C durante 15 s). En el estudio se concluyó, que la actividad de la plasmina del queso Cheddar no se vio afectada significativamente ($P > 0.05$) al aumentar el tratamiento térmico durante el período de maduración. Sin embargo la bioactividad disminuyó al aumentar la temperatura de pasteurización y el tiempo de

maduración. Es decir, el queso que tuvo el tratamiento térmico a 72°C mostró mayor actividad inhibidora de la ECA, durante todo el periodo de maduración como se muestra en la Figura 3.3. Esto puede atribuirse a una menor destrucción de las enzimas proteolíticas durante el calentamiento (Hossain et al., 2020).

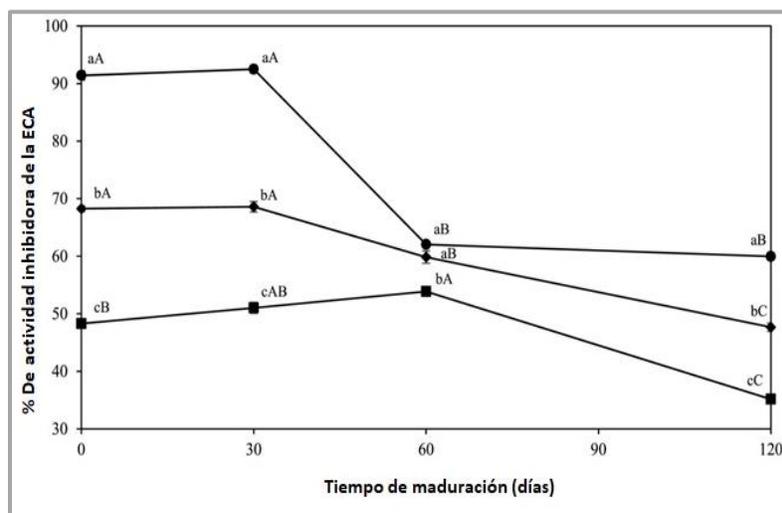


Figura 3.3. Actividad inhibidora de la ECA del extracto soluble en agua de queso Cheddar pasteurizado a 72°C (●), 75°C (■) y 78°C(◆) durante la maduración. (n = 4). abc indica, dentro del tratamiento térmico, las medias con superíndices diferentes son significativamente diferentes (P <0.05) entre sí .ABC indica que, dentro del período de maduración, las medias con superíndice diferente son significativamente diferentes (P <0,05) entre sí (Hossain et al., 2020).

Es importante mencionar que la actividad inhibidora de la ECA incrementó hasta un mes de maduración, y después comenzó a disminuir. Por lo tanto este estudio resalta que puede existir un efecto del tiempo de maduración y temperatura de pasteurización sobre la bioactividad de los quesos madurados, pudiendo afectar la cantidad y secuencia específica de los péptidos bioactivos (Santiago-López et al., 2018).

En relación a lo anterior, Pisanu et al., (2015) evaluaron el efecto de la pasteurización de la leche sobre la bioactividad de quesos elaborados con leche de oveja. Sus resultados mostraron que hubo una abundancia significativamente mayor (prueba *t*, $P \leq 0.05$) de péptidos inhibidores de la ECA potentes en queso con leche cruda. Por lo tanto, el autor menciona que el sustrato de la proteína de la leche se vuelve menos susceptible a la

proteólisis en los quesos pasteurizados debido a los cambios que ocurren en las proteínas cuando se someten a tratamiento térmico como desnaturalización, formación de complejos de caseína-proteínas de suero, modificación de residuos de aminoácidos, así como otros cambios químicos.

3.2.2 Enzimas coagulantes

El cuajo tradicional utilizado para la fabricación de queso es el de origen gástrico, secretado por rumiantes jóvenes, que contiene quimosina y pepsina como proteinasas principales (Timón et al., 2014). La mayor parte del cuajo agregado a la leche de queso se elimina en el suero, pero la parte retenida en la cuajada desempeña un papel importante en la proteólisis inicial de las caseínas en la mayoría de los quesos. Sin embargo, el cuajo se desnaturaliza de manera extensa o completa en variedades donde las temperaturas de cocción de la cuajada exceden los 55 °C, como en los quesos Emmental, Parmigiano-Reggiano y Mozzarella. Por lo tanto su retención y actividad en el queso, y la consiguiente hidrólisis de la caseína α_1 , depende de factores tecnológicos como el pH en el drenaje, la temperatura de cocción o la humedad del queso (Upadhyay et al., 2004; Vélez et al., 2015 y Hill & Kethireddipalli, 2012).

Debido a la expansión en la producción de quesos se han buscado alternativas al cuajo tales como la quimosina recombinante, sin embargo está prohibida en algunos países por asuntos religiosos o relacionados con la dieta, por lo que diversos investigadores se han dado la tarea de encontrar nuevos coagulantes de la leche (Alavi & Momen, 2020). Además de la quimosina recombinante, existen otras opciones al cuajo que se han utilizado ampliamente en la práctica comercial como las pepsinas bovina y las proteasas microbianas producidas por *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *Cryphonectria parasítica* (Timón et al., 2014).

En los últimos años los coagulantes de origen vegetal han recibido un mayor interés, en especial las proteasas aspárticas (PA) de las flores de las plantas de cardo, particularmente el género *Cynara L.* Su importancia, con respecto al tema de estudio se debe, a que la actividad proteolítica de las PA de cardo es mayor que la de la quimosina, por lo que los coagulantes de cardo son más capaces de hidrolizar caseínas y liberar péptidos bioactivos encriptados dentro de las moléculas de caseína intactas. Sin embargo

una alta proteólisis puede causar una maduración excesiva y la generación de péptidos amargos. Se ha informado que algunos quesos elaborados con leche bovina presentan sabor amargo, por lo que este tipo de coagulante podría ser una opción más adecuada para quesos de leche ovina y caprina los cuales no se mostró un sabor amargo notable (Alavi & Momen, 2020).

Con respecto a la producción de péptidos bioactivos, se han realizado estudios que comparan la actividad antioxidante de quesos elaborados con cuajo vegetal y animal. Timón et al., (2014) demostraron una mayor capacidad antioxidante en quesos tipo burgos coagulados con proteinasas de flores de cardo (*Cynara cardunculus*) que los producidos con cuajo de origen animal, siendo más eficientes en la inhibición de radicales (DPPH) y la quelación de metales. También se ha informado que los quesos preparados a partir de mezclas de quimosina y un coagulante de cardo de flores de *Silybum marianum* (75% de quimosina / 25% de extracto de enzima *S. marianum*) tienen una mayor actividad antioxidante que los quesos coagulados con 100% de quimosina (Timón et al., 2014 y Alavi & Momen, 2020).

3.2.3 Enzimas de bacterias ácido lácticas.

Además de la importancia de las enzimas proteolíticas de LAB en las propiedades organolépticas del producto final, se ha demostrado que estas bacterias poseen amplios sistemas proteolíticos capaces de liberar péptidos bioactivos (Rodríguez Hernández & Chávez Matínez, 2018). La mayor parte del conocimiento se ha adquirido en *Lactococcus lactis* considerado como el modelo de la familia LAB que agrupa los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Juillard et al., 2021).

El sistema proteolítico de LAB, está compuesto por una proteinasa asociada a la envoltura celular (PrtP o lactocepina), 3-4 proteinasas intracelulares, oligoendopeptidasas intracelulares (PepO, PepF) que hidrolizan péptidos grandes, hasta al menos 30 residuos de aminoácidos, varias aminopeptidasas (PepN, PepC, PepG, PepA, PepL), una pirrolidona carboxil peptidasa (PCP), una dipeptidil aminopeptidasa (PepX), una prolina iminopeptidasa (PepI), una aminopeptidasa P (PepP), una prolina (PepR), una prolidasa (PepQ), dipeptidasas generales (PepV, PepD, PepDA) y una tripeptidasa

general (PepT). También poseen sistemas de transporte de oligopéptidos , di / tripéptidos y aminoácidos como se muestra en la Figura 3.4 (McSweeney, 2004).

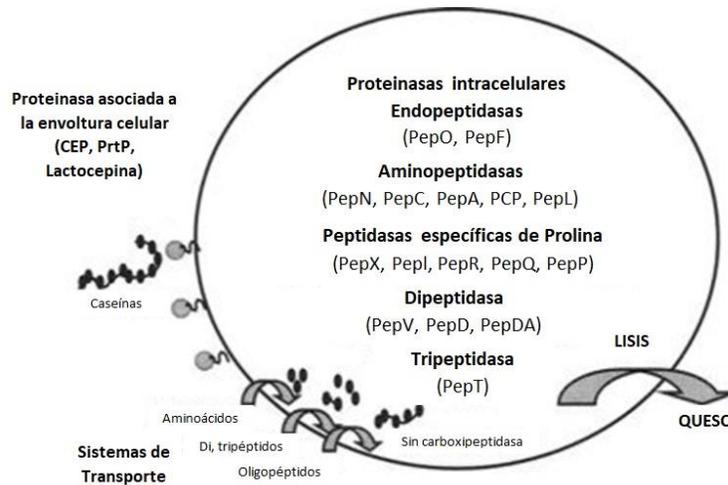


Figura 3.4. Resumen del sistema proteolítico de *Lactococcus*. Los sistemas proteolíticos de otras bacterias del ácido láctico son generalmente similares (McSweeney, 2004).

De manera general, la degradación de la caseína se logra en un proceso de tres pasos: En primer lugar, las proteinasas de LAB después de la lisis de la célula, se asocian a la envoltura celular para degradar la caseína en oligopéptidos (Venegas-Ortega et al., 2019). Las proteasas con especificidad PI hidrolizan principalmente la β caseína, y la parte N-terminal del péptido 1–23 de α_1 -caseína; las proteasas con especificidad PIII hidrolizan las tres caseínas principales (α_1 , β , κ), y la parte C-terminal del péptido 1–23 de α_1 -caseína (Juillard et al., 2021).

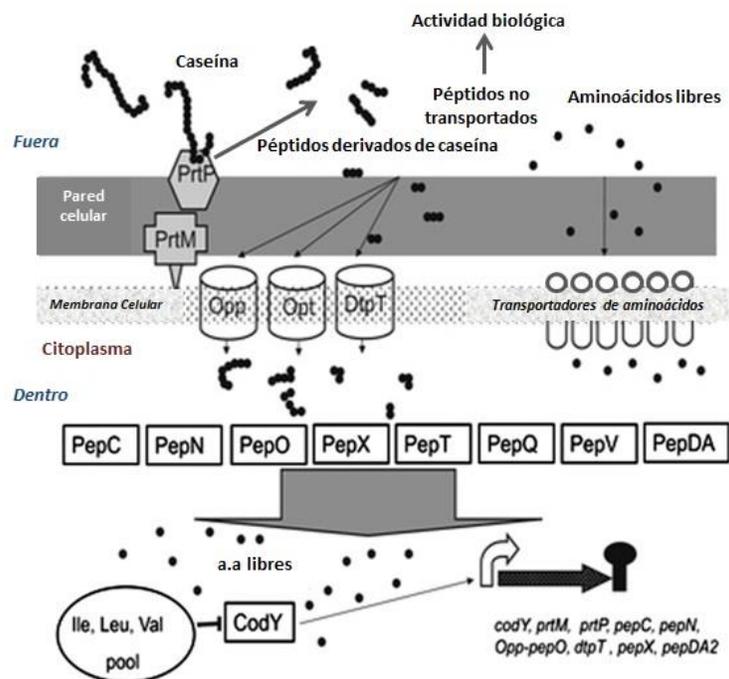


Figura 3.5. Degradación de caseína extracelular y liberación de péptidos bioactivos a través del sistema proteolítico de LAB basado en *L. lactis*. Modificado de (Juillard et al., 2021).

En segundo lugar, como se observa en la Figura 3.5, un sistema de transportadores activos (Opp, Dpp y DtpT) participan en la captación de péptidos en el citoplasma; en este punto, los péptidos que no fueron transportados son los que participan como promotores de salud, dependiendo de la secuencia de sus aminoácidos (Venegas-Ortega et al., 2019). Dentro de los sistemas transportadores, Opp de *L. lactis*, es capaz de transportar péptidos de hasta 18 residuos. DtpT transporta dipéptidos y tripéptidos (especialmente hidrofílicos y con carga) mediante fuerza motriz de protones. Por su parte Dpp transporta dipéptidos, tripéptidos y tetrapéptidos (especialmente hidrofóbicos de cadena ramificada) usando moléculas de ATP (Monzón, 2012).

Como punto final en el proceso de proteólisis, las endopeptidasas intracelulares, participan en la generación de aminoácidos libres que se utilizan en el proceso de síntesis de proteínas para las necesidades de LAB (Venegas-Ortega et al., 2019). Las peptidasas que se han identificado dentro de LAB exhiben diferentes preferencias de sustrato (oligopéptidos, dipéptidos o tripéptidos) y especificidades de escisión (generales o específicas para algunos aminoácidos). Sin embargo, como las caseínas son ricas en

prolina, los LAB tienen numerosas prolina peptidasas para degradar péptidos ricos en prolina (Juillard et al., 2021).

Por lo tanto durante el proceso de maduración del queso, PrtP, está involucrada en la fase inicial de hidrólisis de la proteína de la leche en la producción de péptidos bioactivos, ya que hidroliza oligopéptidos que fueron producidos a partir de α_{s1} -caseína por quimosina o de β -caseína por plasmina, a péptidos más pequeños (Shivanna & Nataraj, 2020). Lo que sugiere que la proteólisis de la caseína por la proteinasa extracelular es el parámetro más importante en la producción de componentes bioactivos a partir de la leche (Pihlanto & Korhonen, 2014). Sin embargo, la actividad de PrtP ha mostrado especificidad de especie y/o cepa para producir péptidos bioactivos de diferente masa molecular y actividad (Shivanna & Nataraj, 2020).

3.2.4 Cultivos adjuntos

Los cultivos adjuntos se utilizan en la fabricación de queso con el objetivo de mejorar el desarrollo del sabor de algunos quesos madurados. Además, diferentes cultivos adjuntos han sido reconocidos por su capacidad de producir enzimas con especificidad para hidrolizar caseínas, lo que conduce a la liberación de péptidos bioactivos. La elección del cultivo adjunto que se utilizará en la fabricación de queso debe tener en cuenta el proceso de fabricación de cada variedad de queso y las características deseables del producto final (Parra Baptista et al., 2018). Cepas de *Lactobacillus spp.* (por ejemplo, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii*) se usan ampliamente como cultivos adjuntos para el desarrollo del sabor (Blaya et al., 2018).

Lactobacillus helveticus es uno de los microorganismos capaces de liberar péptidos bioactivos a partir de la leche y productos lácteos, como la leche fermentada y algunos quesos madurados. Además favorece las características sensoriales de los quesos como reducir el amargor y dar un sabor característico al queso (Griffiths & Tellez, 2013). En un estudio realizado por Baptista et al., (2018) se evaluó el efecto de la adición del cultivo adjunto *Lactobacillus helveticus* LH-B02 sobre la proteólisis y el perfil peptídico del queso Prato durante la maduración. Este estudio demostró que la adición del cultivo favoreció la liberación de péptidos de la β -caseína y, en particular, el péptido inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina β -CN (f194–209) después de 60 días de maduración. El

sistema de *L. helveticus* también ha sido bien caracterizado, por lo que aprovecharlo de una manera eficiente abre oportunidades a futuro para buscar nuevos compuestos derivados de alimentos con potenciales propiedades promotoras de la salud (Griffiths & Tellez, 2013).

3.3 QUESOS CON PÉPTIDOS QUE PRESENTAN BIOACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA *IN VITRO*

Los péptidos antihipertensivos se han estudiado ampliamente debido a la alta incidencia de hipertensión, que actualmente se considera una de las enfermedades crónicas no transmisibles más graves a nivel mundial (Gómez-Ruiz et al., 2004). Se han identificado péptidos bioactivos producidos por varios quesos durante la maduración, principalmente los que inhiben la ECA producida en el cuerpo humano. La consiguiente inhibición de la ECA disminuye el nivel de péptidos responsables de la vasoconstricción y, por lo tanto, puede provocar un efecto antihipertensivo (Munir et al., 2020).

Debido a que el WSE de los quesos contiene la mayoría de los péptidos, generalmente se evalúa la inhibición de la actividad de la ECA midiendo el valor de la concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) *in vitro* (Basiricò et al., 2015). Esto último representa la concentración de queso o un péptido individual capaz de inhibir la actividad de ECA en un 50% (Bütikofer et al., 2007). *In vivo* se representa por la disminución de la presión arterial en organismos vivos como pueden ser ratas en modelos de investigación o seres humanos (Barrón, 2012).

El reconocimiento del potencial de liberación de péptidos bioactivos durante la maduración del queso ha llevado a los investigadores a identificar cepas específicas de bacterias ácido lácticas capaces de promover la liberación de péptidos bioactivos de la caseína (Domingues Galli et al., 2019). También se ha estudiado la influencia de la adición de ciertas cepas probióticas o la digestión gastrointestinal simulada sobre la actividad inhibidora de la ECA de diferentes tipos de quesos (López-Expósito et al., 2017).

Los estudios sobre la bioactividad de los quesos han revelado el potencial inhibidor de la ECA de diferentes variedades de queso (Munir et al., 2020). En la Tabla 3.1 se muestran algunos péptidos identificados en extractos solubles en agua de diversos quesos con

diferente tiempo de maduración así como los microorganismos involucrados. Es importante mencionar que el tiempo de maduración mostrado se refiere al tiempo en el cual se encontró la mayor actividad inhibitoria de la ECA o mayor concentración de péptidos inhibidores.

Tabla 3.1. Hallazgos importantes en diferentes variedades de queso sobre la actividad Antihipertensiva.

Tipo de queso	Tiempo de maduración	Péptidos detectados	Microorganismos Involucrados	Hallazgos importantes	Referencias
Parmigiano Reggiano (Comercial) 	18 meses	VPP IPP YPFPGPI LHLPLP HLPLP	Cultivo iniciador <i>Lactobacillus helveticus</i>	La mayoría de los péptidos inhibidores de la ECA aumentaron después de la digestión in vitro en función del tiempo de maduración.	(Martini et al., 2020) (Basiricò et al., 2015)
Grana Padano 	11 meses	VPP IPP RYLGY LHLPLP HLPLP	Cultivo iniciador <i>Lactobacillus helveticus</i>	Durante la digestión gastrointestinal in vitro se lleva a cabo la formación y degradación de péptidos inhibidores de la ECA.	(Stuknyte et al., 2015)
Manchego 	8 meses	DKIHPF VRYL LPQNILP VPSERYL KKYNVPQL	Cultivos iniciadores <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	La concentración de los péptidos inhibidores de la ECA varió con el proceso de producción y el tiempo de maduración.	(Gómez-Ruiz et al., 2004)

<p>Cheddar (comercial)</p> 	<p>12 meses</p>	<p>IPP VPP VRYL FFVAP EKDERF YFPFGPIPN</p>	<p>Cultivos iniciadores (no mencionados)</p>	<p>Las concentraciones de los péptidos inhibidores de la ECA aumentaron hasta una cierta etapa de maduración.</p>	<p>(Lu et al., 2016)</p>
<p>Queso Prato</p> 	<p>4 meses</p>	<p>YQEPVLGP V-RGPFPIIV</p>	<p>Cultivos Iniciadores <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>lactis</i> y <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>cremoris</i></p> <p>Cultivo adjunto <i>Lactobacillus helveticus</i> LH-B02</p>	<p>El cultivo adjunto condujo a una mayor actividad inhibitoria de la ECA durante la maduración del queso Prato.</p>	<p>(Baptista et al., 2020)</p>
<p>Queso crema de Chiapas (comercial)</p> 	<p>Semi Madurado (3 meses)</p>	<p>No se identificaron las secuencias</p>	<p>Microbiota nativa</p>	<p>El queso crema de Chiapas contiene cepas altamente proteolíticas capaces de liberar compuestos bioactivos</p>	<p>(Gonzalez et al., 2019)</p>
<p>Queso Cotija mexicano (comercial)</p> 	<p>3 meses y 1 semana</p>	<p>No se identificaron las secuencias</p>	<p>Microbiota nativa</p>	<p>El producto comercializado posee un contenido significativo de péptidos inhibidores de la ECA.</p>	<p>(Hernández-Galán et al., 2016)</p>

<p>Queso de cabra con salmuera blanca</p> 	<p>2 meses</p>	<p>No se identificaron las secuencias</p>	<p>Cultivo iniciador <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i></p> <p>Cultivo adjunto <i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 393)</p>	<p>El uso de cultivos adjuntos contribuye a aumentar la actividad inhibidora de la ECA.</p>	<p>(Kocak et al., 2020)</p>
<p>Queso Roquefort Brasileño (comercial)</p> 	<p>3 meses</p>	<p>KEMPFKY-PVE LGPVRGPFPI</p>	<p>No menciona</p>	<p>Los quesos elaborados con leche cruda presentaron una mayor actividad inhibidora de la ECA que los de leche pasteurizada.</p>	<p>(Meister et al., 2012)</p>
<p>Queso tipo Camembert</p> 	<p>4 meses y 1 semana</p>	<p>Fragmento β-CN (f193–209)</p>	<p>Cultivo iniciador <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i></p> <p>Cultivo secundario <i>Penicillium candidum</i></p> <p>Cultivo adjunto <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG</p>	<p>Los péptidos bioactivos importantes se encontraron en el queso durante todo el tiempo de maduración.</p>	<p>(Domingues Galli et al., 2019)</p>

3.3.1 Parmigiano Reggiano

Parmigiano Reggiano (PR) es uno de los quesos italianos más conocidos y exportados en todo el mundo, además se considera un alimento funcional debido a la presencia de diferentes compuestos con actividades biológicas particulares. Es un queso extraduro y de maduración larga producido a partir de leche cruda de vaca. Este queso contiene aproximadamente un 33% de proteína y está registrado como queso de Denominación de Origen Protegida (Basiricò et al., 2015).

Recientemente Martini et al., (2020) identificaron péptidos antihipertensivos (Tabla 3.1) en WSE de queso PR. En el estudio se evaluó el efecto del tiempo de maduración (12, 18 y 24 meses) y su digestión *in vitro* sobre la evolución de los péptidos bioactivos. La mayoría

de los péptidos inhibidores de la ECA potentes, mostraron una tendencia creciente después de la digestión, en función del tiempo de maduración. Cabe mencionar que los péptidos VPP e IPP se encontraron en las muestras no digeridas y digeridas de los extractos solubles en agua en todos los tiempos de maduración, sin embargo el péptido YPFPGPI no se detectó en las muestras no digeridas. La cantidad de VPP e IPP encontrada en PR madurado a los 12 meses fue de 6.87 ± 0.68 y 1.63 ± 0.82 mg/ kg, respectivamente. A los 18 meses se alcanzó la concentración máxima (11.34 ± 0.21 y 4.24 ± 2.85 mg/kg, respectivamente) y se observó una disminución a los 24 meses de maduración (4.52 ± 0.28 y 0.66 ± 0.05 mg/kg, respectivamente). Con respecto a los extractos digeridos se obtuvo un aumento en la concentración a los 12 y 18 meses principalmente en IPP, sin embargo se observó una disminución significativa de VPP a los 24 meses de maduración. De igual manera Basiricò et al., (2015) identificaron en WSE de PR de 12 meses de maduración los péptidos VPP e IPP, además de los péptidos LHLPLP y HLPLP antes y después de la digestión gastrointestinal. Se determinó una actividad inhibitoria de la ECA mayor en las muestras digeridas de queso, mostrando valores menores de IC_{50} (3.20 ± 1.69 g de péptidos/mL) en comparación con las no digeridas *in vitro* (7.92 ± 2.08 g de péptidos/mL).

3.3.2 Queso Grana Padano

El queso Grana Padano, es otro queso Italiano que se ha caracterizado por sus cualidades nutricionales positivas. Es un queso de larga maduración (1 a 2 años) elaborado con leche de vaca, es semigraso de pasta dura cocida y posee denominación de origen protegida (Summer et al., 2017 y Crippa et al., 2018).

En un estudio realizado por Stuknyte et al., (2015) se investigó la presencia de ocho péptidos inhibidores de la ECA (VPP, IPP, RYLG, RYLG, AYFYPEL, AYFYPE, LHLPLP y HLPLP) en muestras de Grana Padano no digeridas y digeridas *in vitro* (en estómago e intestino). Se encontraron los siguientes péptidos en las muestras de Grana Padano no digeridas (mg/kg): VPP 2.76, IPP 2.49, RYLG 0.07, HLPLP 0.23, LHLPLP 0.38, en la fracción de masa total de péptidos inhibidores de la ECA de 5.93 mg/kg. Después de la digestión gástrica, se encontraron los siguientes péptidos (en mg/kg): VPP 2.85, IPP 1.22, RYLG 1.72, HLPLP 0.71, en la fracción de masa total de péptidos inhibidores de la ECA de 6.50 mg/kg. Después de la digestión intestinal se encontraron los siguientes péptidos

(en mg/kg): HLPLP 4.64 y LHLPLP 306, en una fracción de masa total de péptidos inhibidores de la ECA de 311 mg/kg. Por lo tanto, los resultados apoyan que durante la digestión gastrointestinal *in vitro* puede existir tanto la formación como la degradación de ciertos péptidos, por lo que el potencial inhibidor de la ECA del queso, no se puede inferir del perfil de péptidos inhibidores de la ECA del queso no digerido. Además mencionan que en el queso Grana Padano, *Lactobacillus helveticus* junto con plasmina, proteinasas y peptidasas de *Lactobacillus* spp son los principales responsables de la liberación de péptidos que tienen una actividad inhibidora sostenida de la ECA.

3.3.3 Queso Manchego.

El queso manchego se produce en la región de La Mancha de España, es elaborado con leche de oveja cruda o de leche pasteurizada en la forma industrial. Su periodo de maduración va desde los 3 meses hasta un año (Kongo & Malcata, 2015). En el queso manchego también se han identificado péptidos bioactivos.

Gómez-Ruiz et al.,(2004) investigaron la producción de péptidos inhibidores de la ECA a lo largo del tiempo de maduración (2, 4, 8 y 12 meses). En el estudio se evaluó un queso control (leche cruda de ovino y sin cultivos iniciadores) y quesos experimentales (leche ovina pasteurizada y con cultivos iniciadores seleccionados). Como resultado se identificaron péptidos inhibidores de la ECA (DKIHPPF, VRYL, LPQNILP, VPSERYL, KKYNVPQL) a lo largo del tiempo de maduración y se alcanzó un máximo a los 8 meses. Sin embargo, la concentración del péptido más activo, decir, VRYL (IC_{50} 24.1 μ M) fue más alta en el queso experimental en el cual se utilizaron los cultivos iniciadores mencionados en la Tabla 3.1. A grandes rasgos, aunque no se observó una tendencia general para los demás péptidos, ya que su concentración varió fuertemente con el tipo de queso y el tiempo de maduración, la mayoría de ellos alcanzaron concentraciones máximas en el queso Manchego de leche cruda seguido por el queso Manchego experimental ya mencionado. Cabe mencionar que las cepas incluidas en este queso (Tabla 3.1) ya se han reportado en quesos Manchegos de buena calidad y han demostrado exhibir una alta actividad inhibidora de la ECA *in vitro*. Además, en otro estudio realizado por el mismo autor encontró, que la actividad antihipertensiva en el queso Manchego disminuía en los primeros 4 meses, era máxima a los 8 meses de maduración y disminuía nuevamente a los 12 meses.

3.3.4 Queso Cheddar comercial

El queso Cheddar es un queso madurado producido por acidificación y concentración de leche bovina después de la formación de gel con cuajo. El período de maduración puede variar según el tipo de queso: 3 meses para un queso suave, 6 meses para maduros medios, 9 meses para maduros, 12-18 meses para maduros extra y 18-24 meses o más para Cheddar añejo (Banks, 2011).

En un estudio realizado por Lu et al.,(2016) se determinó la concentración de seis péptidos con alta actividad inhibitoria de la ECA (IPP, VPP, VRYL, FFVAP, EKDERF, YPFPGPIP) en quesos Cheddar comerciales. Estos quesos se produjeron por dos fabricantes diferentes (A y B) y también se evaluó la influencia del tiempo de maduración del queso en la actividad inhibitoria de ECA. Todo esto se realizó durante un periodo de tiempo de dos años. De manera general se obtuvo que las concentraciones de estos 6 péptidos aumentaron hasta una cierta etapa de maduración. La mayor actividad inhibitoria de la ECA se observó en el queso Cheddar de marca A madurado por 1 año ($IC_{50} = 7.6$ mg/mL) que también tenía las concentraciones más altas de IPP (2.8 mg/100 g de queso) y VPP (7.4 mg / 100 g de queso). Sin embargo las concentraciones de estos péptidos de la misma marca y su actividad inhibitoria de la ECA ($IC_{50} = 10.4$ mg/mL) fueron las más bajas a los 2 años de maduración en comparación con los quesos de 2, 6, 9 y 12 meses.

El queso de la marca B de 1 año de edad también mostró una alta actividad de ECA ($IC_{50} = 8.3$ mg/mL), debido a altas concentraciones de EKDERF (5.3 mg/100 g de queso), VRYL (5.0 mg/100 g de queso) e YPFPGPIP (1.4 mg/100 g de queso). Cabe mencionar que la concentración del péptido EKDERF para el queso de la marca A, aumentó con el tiempo de maduración hasta 6 meses, pero disminuyó con tiempos de maduración más largos, como 9 meses a 2 años. Sin embargo para los quesos de la marca B, se observó una tendencia creciente en la concentración de EKDERF y no se detectó diferencia significativa en la actividad inhibitoria en quesos durante el tiempo de maduración de 2 meses a 2 años con el tiempo de maduración.

Por otra parte el contenido máximo de VRYL fue de 7,5 mg/100 g de queso y se obtuvo en el queso Cheddar de marca B de 2 años. El contenido máximo de YPFPGPIP fue de 6,8 mg/100 g de queso y se detectó en el queso Cheddar de marca A de 6 meses de

edad. Con respecto, al péptido FFVAP se encontró en una concentración muy pequeña en el queso Cheddar de la marca B pero no se detectó en las muestras de queso de la marca A. Por lo tanto se infiere que las prácticas de fabricación específicas, así como el tipo de cultivos iniciadores y la microbiota NSLAB pudieron influir en las diferencias de las concentraciones de los péptidos y su actividad inhibitoria de la ECA.

Es importante mencionar que el autor sugiere que es necesario validar los efectos antihipertensivos en estudios *in vivo* de estos péptidos obtenidos en el queso Cheddar, los tripéptidos IPP y VPP tendrían efectos antihipertensivos y su efecto se podría obtener al consumir 100 g de queso Cheddar de la marca A durante un año .

3.3.5 Queso Prato

El queso Prato, es el queso madurado más producido en Brasil y en los últimos años los estudios realizados para mejorar sus características funcionales han tenido interés económico y de salud pública. Como se mencionó anteriormente por Baptista et al., (2018) la adición del cultivo adjunto *Lactobacillus helveticus* favorece la liberación de péptidos inhibidores de la ECA después de 60 días de maduración en el queso Prato. Cabe mencionar que el mismo grupo de investigadores, con el fin de satisfacer la demanda de la sociedad de alimentos saludables, evaluaron el efecto combinado de la reducción de sal, la adición del cultivo adjunto *Lactobacillus helveticus* LH-B02 y el tiempo sobre el potencial antihipertensivo del queso Prato.

En general se observó, que la adición del cultivo adjunto como la reducción de la sal favoreció la abundancia del péptido bioactivo YQEPVLGPVRGPFPIIV. El autor menciona que esta secuencia peptídica tiene tres aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia de tripéptido C-terminal, que es un factor determinante para la unión a la ECA y la consiguiente actividad inhibitoria. También hubo un incremento de la actividad inhibitoria de la ECA con la adición de LH B02, que varió de 75.48% en queso control a 79.67% en queso hecho con la adición de cultivo adjunto, independientemente del contenido de sal. La actividad inhibitoria aumentó conforme avanzaba la maduración y se observó la mayor actividad inhibitoria (90.22%) a los 120 días de maduración.

3.3.6 Queso Crema de Chiapas

El queso crema de Chiapas (CCH) es un queso tradicional semi-madurado fabricado en el sur tropical de México con leche cruda de vaca. Se caracteriza por su sabor ácido y sus propiedades sensoriales cremosas. González et al., (2019) probaron la hipótesis de que estos quesos contienen cepas altamente proteolíticas capaces de liberar compuestos bioactivos mediante la hidrólisis de proteínas de la leche. En el estudio se evaluó la actividad inhibitoria de la ECA en fracciones solubles en agua de quesos fabricados en dos regiones diferentes. Se obtuvieron valores IC_{50} (mg/mL) de 2.75 ± 0.50 y 1.75 ± 0.49 para las muestras de Veracruz y Tabasco respectivamente. Cabe mencionar que el queso de Veracruz presentó mayor actividad proteolítica lo cual se confirmó al presentar una concentración más alta de aminoácidos libres en comparación con el fabricado en Tabasco. Esto también podría explicar que el queso producido en Veracruz con mayor actividad proteolítica mostró menor potencia de actividad inhibitoria de la ECA que las muestras de Tabasco. Además, se evaluaron las capacidades proteolíticas de la microbiota aislada del CCH y su actividad proteolítica fue similar a la cepa comercial de referencia (*Lb. helveticus* DSM13137) y dos de las cepas aisladas mostraron una actividad inhibidora de la ECA similar a *Lb. helveticus* DSM13137. Estos aislados de queso podrían conducir a la producción de alimentos funcionales con una gama de funcionalidades biológicas.

3.3.7 Queso Cotija mexicano

El queso Cotija es un queso mexicano artesanal producido con leche cruda de vaca y requiere un mínimo de tres meses de maduración. Su corteza es dura, alto contenido de sal, textura firme con aroma fuerte o picante. Hernández-Galán et al., (2016) midieron la actividad inhibidora de la ECA de los péptidos liberados durante un periodo de maduración de 6 meses. La actividad inhibidora de la ECA de los péptidos se midió en las fracciones con los péptidos de menor peso molecular solubles e insolubles en etanol (EtOH-SN y EtOH-NSN) ya que los péptidos pequeños son los principales en los que se ha detectado esta actividad biológica. En EtOH-SN, la actividad inhibidora de la ECA aumentó abruptamente durante las primeras 5 semanas de maduración y en la semana 6 alcanzó el 100%. Mientras que, en EtOH-NSN, la actividad inhibidora de la ECA aumentó continuamente después de la semana 6, alcanzando un estado estable después de la

semana 9. Después de 17 semanas, la actividad inhibitoria de la ECA en ambas fracciones fue similar, presumiblemente porque en este punto la mayoría de los péptidos en EtOH-SN y EtOH-NSN son de cadena corta con actividad similar. En resumen la actividad inhibitoria de la ECA ejerce sus niveles máximos después de 13 semanas de maduración. Por lo tanto, se concluyó que considerando que el queso Cotija madura al menos durante 3 meses (12 semanas), el producto comercializado posee un contenido significativo de péptidos bioactivos con un posible efecto sobre la salud que hace que Cotija sea un queso funcional.

3.3.8 Queso de Cabra en salmuera blanca

El queso de salmuera blanca es el tipo de queso producido y consumido más comúnmente en Turquía y similar al queso Feta. Se fabrica a partir de leche de vaca, ovino y caprino o de mezclas de estas leches. En el método industrial, se aplica tratamiento térmico a la leche y se agrega cultivo iniciador. Este queso es específico en su período de maduración de 2 a 3 meses en salmuera (Kocak et al., 2020).

Kocak et al.,(2020) evaluaron los efectos de diferentes cultivos adjuntos sobre la actividad inhibitoria de la ECA de un queso de cabra en salmuera blanca durante un periodo de maduración de 3 meses. De manera general se obtuvo que la actividad inhibidora de la ECA de las muestras de queso que contenían cultivos adjuntos (*Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* ATCC 11842) fue mayor que la de la muestra de control después de 30 días de maduración. La actividad inhibidora de la ECA más alta (51.95%) se determinó después de 60 días de maduración, en la muestra que queso que contenía el cultivo adjunto *Lactobacillus casei* que también fue la cepa más proteolítica. Además encontró que la actividad inhibidora de la ECA de todos los quesos estaba de acuerdo con el nivel de proteólisis, siendo máxima en 60 días de maduración y disminuyó ligeramente al final del período de maduración. Por lo tanto el uso de cultivos adjuntos en la fabricación de queso de cabra con salmuera blanca contribuye a aumentar la actividad inhibidora de la ECA.

3.3.9 Queso tipo Roquefort Brasileño

El queso Roquefort es un queso Francés hecho de leche de oveja, con un periodo de maduración de 3 a 5 meses. Tiene textura cremosa con un sabor fuerte, picante y salado. Pertenece al grupo de los quesos azules debido a las venas de color azul que se desarrolla a partir del crecimiento de *Penicillium roqueforti* (Kongo & Malcata, 2015). Este tipo de queso también se caracteriza por una intensa proteólisis durante su periodo de maduración. Algunos péptidos derivados del queso han demostrado tener actividad antihipertensiva como es el caso de los quesos de leche ovina.

Meira et al., (2012) determinaron la actividad inhibitoria de la ECA de quesos Brasileños tipo Feta (fresco y madurado) y Roquefort. De manera general el queso tipo Feta sin madurar tuvo una actividad inhibitoria menor del 46.45%, sin embargo el madurado por 2 meses aumento hasta un 75% y el queso Roquefort tuvo el valor más alto de 80%. Los quesos elaborados con leche cruda presentaron una mayor actividad inhibidora de la ECA que los elaborados con leche pasteurizada, lo que podría atribuirse a una mayor presencia de enzimas proteolíticas de la microbiota láctea (NSLAB). Cabe mencionar que el queso Roquefort mostró el valor máximo de IC_{50} , correspondiente a 0.34 mg / mL. La investigación se centró principalmente en el queso tipo Roquefort ya que mostró las más altas propiedades tanto antioxidantes como antihipertensivas. Específicamente, el péptido HKEMPFKYPVQPF, posee una alta homología con el péptido de β -CN (122-132) en WSE tipo Roquefort el cual se describió tener ambas bioactividades y el péptido LGPVRGPFPI incluye el péptido inhibidor de la ECA VRGPFPI que se encuentra en el queso Manchego. Todos los péptidos identificados en el queso Roquefort mostraron al menos un residuo de prolina, lo que puede contribuir a la afinidad de unión del péptido al sitio activo de la enzima ACE.

3.3.10 Queso tipo Camembert

El Camembert es un queso suave y de alta humedad que está cubierto con una capa blanca aterciopelada originada por el crecimiento del moho *Penicillium candidum*. Durante su maduración ocurre una alta actividad proteolítica debido a las enzimas involucradas en el proceso de fabricación, lo que podría favorecer la liberación de péptidos bioactivos. Galli et al.,(2019) evaluaron el efecto de la temperatura de pasteurización y la adición del

cultivo adjunto *Lactobacillus rhamnosus* GG en el desarrollo del perfil peptídico del queso Camembert durante la maduración. Con respecto a la formación de péptidos, los que tenían potencial bioactivo se encontraron en todos los quesos en algún momento de la maduración independientemente del tratamiento realizado. El péptido β -CN (f193–209) estuvo presente con la mayor intensidad en todos los quesos durante los 50 días de maduración. Cabe destacar que este péptido es reconocido por su potencial bioactivo, tanto como inhibidor de la ECA como antimicrobiano. Su mayor intensidad revela que era resistente a la degradación enzimática frente a los diferentes tratamientos evaluados en el estudio, que es el tratamiento térmico de la leche, el uso del cultivo adjunto y el tiempo de maduración. Es importante mencionar que los quesos elaborados con leche cruda, que tienen una mayor diversidad de proteasas, mostraron una diferenciación mejor definida del perfil peptídico durante la maduración en comparación con los quesos obtenidos de la leche pasteurizada. Sin embargo, el autor menciona que no es posible afirmar que el tratamiento térmico de la leche y la adición del cultivo adjunto de *Lactobacillus rhamnosus* GG favorecieran la liberación de péptidos exclusivos en ninguno de los tratamientos analizados.

CAPITULO 4.EFECTOS SOBRE LA SALUD CARDIOVASCULAR ASOCIADOS CON EL CONSUMO DE QUESO

4.1 HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión arterial (HTA) es un problema importante de salud pública, ya que es el principal factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen la primera causa de muerte en todo el mundo. Esta enfermedad puede provocar infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares (Wyss et al., 2020 y OMS, 2013). En la gran mayoría de los casos la HTA es esencial y se relaciona con un origen multifactorial, incluyendo la edad, factores genéticos y hábitos de vida. En un porcentaje menor de casos la HTA es secundaria o de causa identificable y puede tener un tratamiento específico (Santamaría et al., 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la presión arterial (PA) se define como la fuerza que ejerce la sangre circulante contra las paredes de las arterias, que son grandes vasos por los que circula la sangre en el organismo. Cuando esta es demasiado elevada, se considera hipertensión. La tensión arterial se expresa mediante la tensión sistólica y diastólica; la primera representa la presión que ejerce la sangre sobre los vasos cuando el corazón se contrae o late, mientras que la segunda representa la presión ejercida sobre los vasos cuando el corazón se relaja (OMS, 2013)

La tensión arterial normal en un adulto se define como una tensión sistólica de 120 mm Hg y una tensión diastólica de 80 mmHg (OMS, 2013). Para establecer el diagnóstico de HTA, el punto de corte arbitrario actualmente se ha establecido en un nivel de PA de $\geq 140/90$ mmHg. Es decir la presión sistólica ha de ser superior o igual a 140 mmHg y la diastólica superior o igual a 90 mmHg (Wyss et al., 2020).

4.1.1 Prevalencia mundial de hipertensión arterial

La HTA es un importante desafío para la salud mundial, diversos investigadores calculan que la hipertensión es la causa por la que mueren anualmente nueve millones de personas y contribuye al 12.8% de la mortalidad por todas las causas (Iglesias et al., 2015 y OMS, 2013). Normalmente se creía que la HTA era más importante para los países de altos ingresos, sin embargo información reciente (2017-2020) reportada por la Sociedad

Interamericana de Cardiología, indica que la prevalencia de la HTA está aumentando en los países de ingresos bajos y medios, lo cual se resume de la siguiente manera (Wyss et al., 2020 y Syme, 2020).

1. A nivel mundial, el 31.1% de la población adulta (1.390 millones de personas) tiene HTA.
2. La prevalencia de HTA es mayor en los países de ingresos bajos y medianos (31.5%) que en los países de ingresos altos (28.5%).
3. Aproximadamente el 75% de las personas con HTA (1.04 mil millones) viven en países de bajos y medianos ingresos.
4. La conciencia, el tratamiento y el control de la HTA son mucho más bajos en los países de ingresos bajos y medios que en los países de ingresos altos.

Además, existen diferencias geográficas con respecto a la prevalencia de la HTA en todo el mundo. En el año 2008 la OMS reportó la máxima prevalencia de hipertensión en la Región de África, con un 46% de los adultos mayores de 25 años, mientras que la más baja se observa en la Región de las Américas, con un 35%. En general, la prevalencia de la hipertensión es menor en los países de ingresos elevados (35%) que en los países de otros grupos de ingresos, en los que es del 40% como se observa en la Figura 4.1 (OMS, 2013).

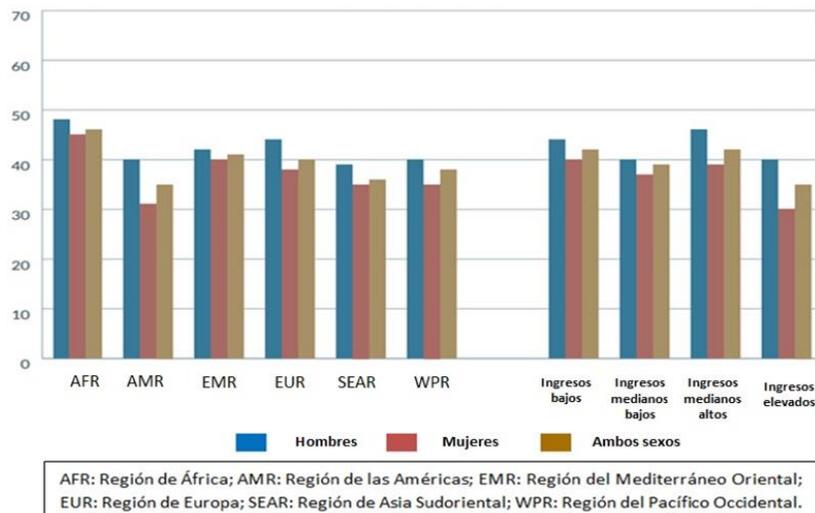


Figura 4.1. Prevalencia de la hipertensión, normalizada por edades, en adultos de 25 años o más por región de la OMS y categoría de ingresos según el banco mundial; estimaciones comparables, 2008. Modificada de (OMS, 2013).

Para el año el año 2015 la prevalencia más elevada seguía correspondiendo a la Región de África de la OMS (27%) y la más baja a la Región de las Américas (18%)(OMS, 2019).

En Europa, la prevalencia global de HTA oscila entre el 30% y 45% de la población general, con un marcado incremento con la edad. Se ha informado una estrecha relación entre la prevalencia de HTA y la mortalidad por enfermedad vascular cerebral (EVC). Los países de Europa del oeste muestran una tendencia en disminución de la tasas de mortalidad por EVC, en contraste con tasas crecientes en los países de Europa del este (Mancia et al., 2013).

Es importante mencionar que la prevalencia de hipertensión en países de bajos ingresos se debe a la desinformación, sistemas de salud deficientes, malos hábitos de alimentación, etc. Sin embargo los países de ingresos elevados han comenzado a reducir la HTA en sus poblaciones mediante políticas enérgicas de salud pública, como la reducción de sal en los alimentos procesados y la amplia disponibilidad de servicios de diagnóstico y tratamiento de la hipertensión y otros factores de riesgo (OMS, 2013).

4.1.2 Hipertensión arterial en México

En México se registró la prevalencia más alta de HTA en todo el mundo, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Esto se debió a la falta del diagnóstico oportuno y de información acerca de los factores de riesgo que pueden desencadenar que se eleve la PA (Baglietto-Hernández et al., 2020). Sin embargo para el año 2018 incrementó el número de personas con diagnóstico previo de hipertensión que fue de 15.2 millones de personas en comparación con los 9.3 millones en 2012 como se muestra en la Figura 4.2 (ENSANUT, 2018).

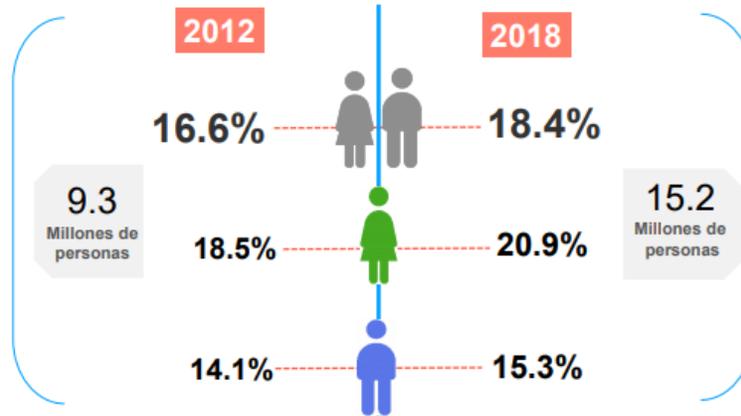


Figura 4.2. Porcentaje de la población de 20 años y más con diagnóstico médico previo de hipertensión, por sexo (ENSANUT, 2018).

De manera general los datos indicaron que conforme se incrementa la edad, crece el porcentaje de población con diagnóstico previo de HTA, principalmente a partir de los 50 años. Cabe mencionar que las entidades con los porcentajes más altos de hipertensión en 2018 fueron: Campeche, Sonora, Veracruz, Chihuahua y Coahuila(ENSANUT, 2018).

También, se ha informado que en el país la prevalencia de HTA se ha asociado al nivel socioeconómico. En México durante el año 2016 la prevalencia fue de 30.2%. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 24.6% de los mexicanos con nivel socioeconómico bajo tenía HTA y sólo 47.1% de ellos habían sido diagnosticados. En algunas poblaciones con vulnerabilidad socioeconómica la prevalencia de HTA es más alta y la proporción de personas con tratamiento y control es más baja. Además, es importante mencionar que el costo de los fármacos se ha considerado un obstáculo para que los adultos con HTA no sigan su tratamiento farmacológico principalmente en las zonas rurales (Campos-Nonato et al., 2019).

4.1.3 Factores de riesgo para la hipertensión

Hay una serie de factores importantes que conducen a una alta incidencia de hipertensión. Estos incluyen sociales, conductuales y metabólicos como se observa en la Figura 4.3.

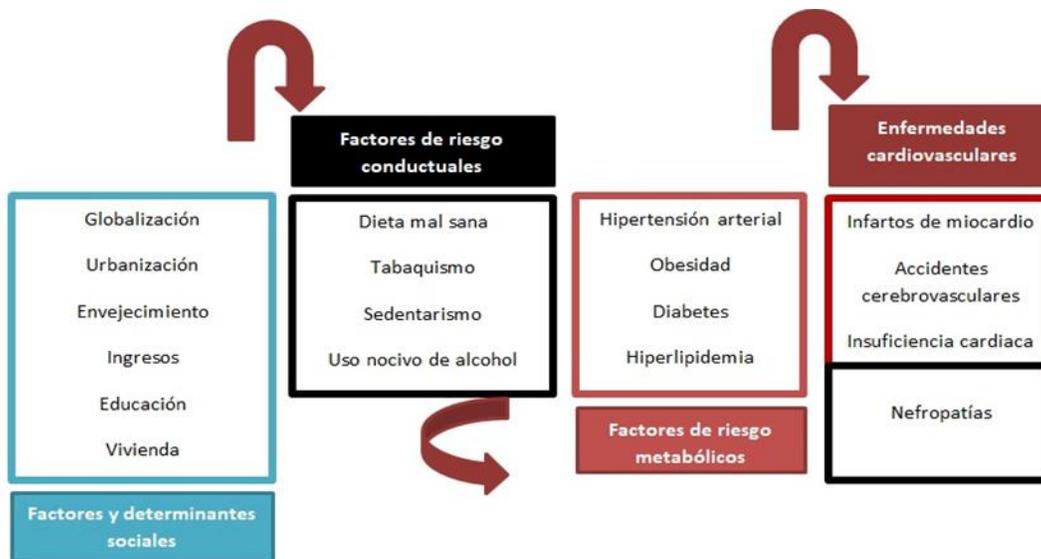


Figura 4.3. Principales factores que contribuyen a la HTA y sus complicaciones (OMS, 2013).

Los factores de riesgo prevenibles son aquellos relacionados con el comportamiento, como el consumo de alimentos que contienen alta cantidad de sal y grasa, el uso nocivo del alcohol, tabaco y la inactividad física. Los riesgos metabólicos como la diabetes mellitus, la hipercolesterolemia, el sobrepeso y obesidad aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal y otras complicaciones de la HTA (OMS, 2013).

Por otra parte, condicionantes sociales como lo son el ingreso, la educación y la vivienda suelen influir de manera negativa en la salud, convirtiéndose en factores de riesgo para la aparición de la hipertensión. La urbanización acelerada genera entornos insalubres que propician un consumo más frecuente de alimentos con alto contenido de grasas saturadas, azúcares añadidos y sodio, además fomenta el sedentarismo y diversas adicciones asociadas al consumo de alcohol y cigarro. Por último, el riesgo de padecer hipertensión aumenta con la edad, debido al endurecimiento de las arterias. Sin embargo una vida saludable compuesta de ejercicio y una correcta alimentación reducida en sal, juega un papel importante para retrasar el envejecimiento de los vasos sanguíneos (OMS, 2013).

4.1.4 Tratamiento de la hipertensión arterial

Existen dos estrategias ampliamente establecidas para reducir la presión arterial: las intervenciones en el estilo de vida y el tratamiento farmacológico. No hay duda de que las intervenciones en el estilo de vida pueden reducir la PA y en algunos casos, el riesgo cardiovascular, pero la mayoría de los pacientes hipertensos requieren además tratamiento farmacológico (Williams et al., 2018).

❖ Tratamiento farmacológico

La gran variedad de fármacos antihipertensivos en la actualidad es muy amplia con diversos mecanismos de acción. La utilización de estos fármacos antihipertensivos debe basarse en diferentes parámetros, tales como el costo, presencia de enfermedades asociadas, efectividad, efectos secundarios, tolerancia o impacto sobre la calidad de vida. Se han desarrollado diferentes fármacos para el tratamiento de la hipertensión, incluidos los inhibidores de la ECA, los antagonistas de los receptores de angiotensina II tipo 1, los beta-bloqueadores, los antagonistas del calcio y los diuréticos (Sieber et al., 2010). Sin embargo, los inhibidores de la ECA (IECA) son actualmente considerados fármacos de primer orden en el tratamiento de la HTA, debido a que han demostrado su capacidad de prevenir episodios cardiovasculares en pacientes hipertensos no complicados. Cabe mencionar que una de las mayores ventajas que poseen los IECA es que pueden administrarse de manera segura en la mayoría de situaciones en las que la HTA va acompañada de otras enfermedades asociadas. Algunos de los IECA más comúnmente utilizados son: benazepril, captopril, cilazapril, enalapril, entre otros (Bragulat & M.T., 2001).

❖ Tratamiento no farmacológico

Se puede recurrir a un tratamiento no farmacológico inicial en aquellos pacientes con HTA leve y con un riesgo cardiovascular global que no es alto. Si la presión arterial no se normaliza al cabo de algunos meses, debe adicionarse medicamentos antihipertensivos. Diversos estudios han demostrado que una restricción moderada de sal, disminuye la presión arterial de las personas con hipertensión y de las normotensas, en todos los grupos de edad y en todos los grupos étnicos, aunque existen variaciones en la magnitud

de la reducción. Además una dieta saludable como la dieta DASH (del inglés, Dietary Approaches to Stop Hypertension) que enfatiza una alta ingesta de productos lácteos, frutas y verduras así como un aporte de potasio adecuado, ha mostrado que la dieta es una herramienta exitosa para reducir la hipertensión. Finalmente realizar ejercicio físico, así como evitar el consumo de tabaco y alcohol en exceso, brinda beneficios respecto de la presión arterial (OMS, 2013 ; Soto, 2018 y . Nilsen et al., 2016).

4.2 EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los péptidos antihipertensivos son los péptidos que una vez liberados de la proteína original tienen la capacidad de modular los sistemas renina-angiotensina y regular la presión arterial en el cuerpo. Este efecto antihipertensivo ya se ha utilizado con la aplicación de fármacos comerciales y ahora, también se sabe que este efecto lo demuestran los péptidos inhibidores de la ECA que se han aislado de diversos alimentos incluidos los productos lácteos. Cabe mencionar que actualmente la leche se considera la fuente más importante de péptidos bioactivos (Bhandari et al., 2019 y Hernández-Ledesma et al., 2011).

4.2.1 Mecanismo de acción de la actividad antihipertensiva

El mecanismo más estudiado por el cual los péptidos bioactivos derivados de alimentos ejercen sus efectos reductores de la presión arterial es la inhibición de la ECA. También se han reportado en menor medida otros posibles mecanismos como la inhibición de la renina, la vasodilatación medida por óxido nítrico (NO) y aumento de la respuesta antioxidante. Sin embargo los péptidos inhibidores de la ECA constituyen la mayoría de los péptidos bioactivos detectados e investigados en el queso (Martínez-Sánchez et al., 2020 y Jerónimo & Malcata, 2015).

Como se muestra en la Figura 4.4, el angiotensinógeno es una glicoproteína que se produce en el hígado y es el sustrato inicial del sistema renina-angiotensina-aldosterona. A su vez la renina es la responsable de liberar la angiotensina I una vez que reacciona con el angiotensinógeno circulante (Torruco-Uco et al., 2008).

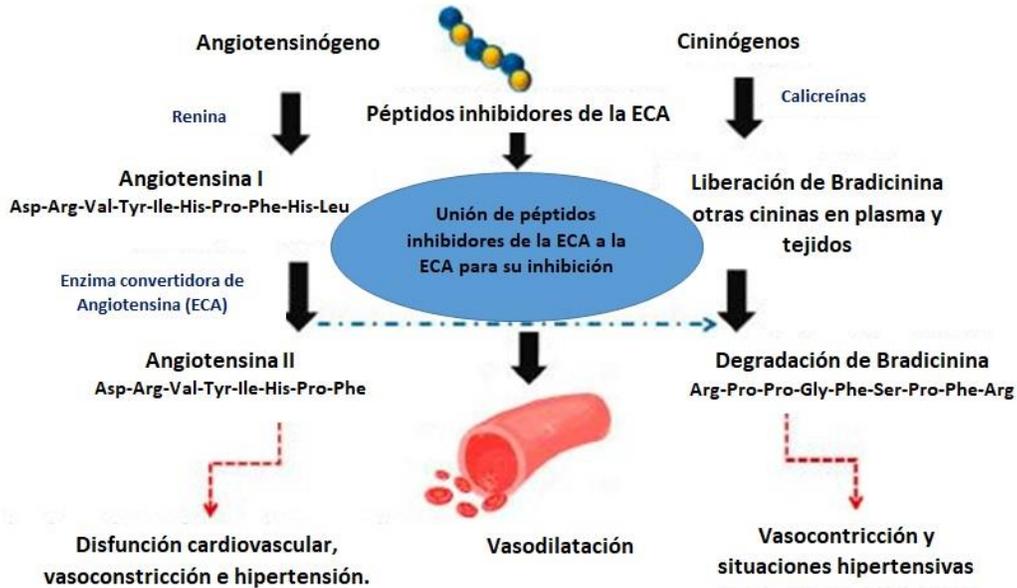


Figura 4.4. Mecanismo de acción de la actividad antihipertensiva de péptidos bioactivos. Modificado de (Shivanna & Nataraj, 2020).

La ECA, es la enzima más importante en la regulación de la presión arterial. Es una dipeptidil carboxipeptidasa I, (kininasa II, EC 3,4,15,1) zinc metalopeptidasa, la cual es sintetizada en el pulmón. La ECA rompe el dipéptido del C-Terminal de la Ang-I (decapéptido inactivo) convirtiéndola en angiotensina-II (octapéptido activo). Esta última se une a los receptores AT1 y AT2 (ubicados en leucocitos y celulares musculares) y regula las funciones fisiológicas que conducen a disfunción vascular, vasoconstricción, e hipertensión. La angiotensina-II también inactiva la bradicinina (nanopéptido) (vasodilatador dependiente del endotelio) lo que conduce a un aumento de la presión arterial (Bhandari et al., 2019; Erdmann et al., 2008; Torruco-Uco et al., 2008 y Shivanna & Nataraj, 2020).

Por tanto, la inhibición de la actividad de la ECA es un paso importante en la regulación de la presión arterial así como en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Shivanna & Nataraj, 2020). Cabe mencionar que la ECA es un objetivo bien reconocido para las estrategias antihipertensivas y explica por qué las evaluaciones de la actividad biológica se han limitado casi exclusivamente a ensayos que cuantifican la inhibición *in vitro* de la ECA. (Bhandari et al., 2019 y Erdmann et al., 2008).

4.2.2 Características estructurales de los péptidos bioactivos

La actividad biológica específica de un péptido, está estrechamente relacionada con su estructura química, es decir, la composición de aminoácidos, el tipo de aminoácidos terminales *N* y *C*, la longitud de la cadena peptídica, el carácter de carga de los aminoácidos que forman el péptido, las características hidrofóbicas/hidrofílicas de la cadena de aminoácidos, entre otros (Sharma et al., 2017 y Wang et al., 2018).

Se han identificado varias características estructurales que influyen en la potencia de los péptidos inhibidores de la ECA derivados de los alimentos. Generalmente, estos péptidos bioactivos se consideran sustratos competitivos para ECA y los residuos hidrófobos en el extremo C-terminal son el actor principal en el proceso de unión (Erdmann et al., 2008). La mayoría de los péptidos inhibidores de la ECA son secuencias relativamente cortas que contienen de 2 a 12 aminoácidos, ya que estudios de cristalografía han demostrado que el sitio activo de la ECA no puede acomodar moléculas peptídicas grandes. También se ha demostrado a partir de diversos péptidos inhibidores de la ECA de diferentes fuentes de alimentos, que los residuos de tripéptidos C-terminales desempeñan un papel predominante en la unión competitiva al sitio activo de la ECA. Se ha descrito que esta enzima prefiere sustratos o inhibidores que contienen residuos de aminoácidos hidrófobos (aromáticos o cadenas laterales ramificadas) en cada una de las tres posiciones C-terminales. Los péptidos inhibidores de la ECA más eficaces identificados contienen Tyr, Phe, Trp y/o Pro en el C-terminal (Hernández-Ledesma et al., 2011 y Gallego et al., 2018).

También se ha sugerido, que el aminoácido Leu puede contribuir significativamente a aumentar el potencial inhibidor de la ECA. Además, otros aminoácidos alifáticos de cadena ramificada como Ile y Val son predominantes en inhibidores altamente peptídicos. Además, datos de estructura-actividad sugieren que la carga positiva de Lys (grupo ϵ -amino) y Arg (grupo guanidina) como residuo C-terminal puede contribuir a la potencia inhibidora (Gallego et al., 2018 y Sharma et al., 2017).

4.3 ESTUDIOS EN MODELOS ANIMALES Y ENSAYOS CLÍNICOS

Como se mencionó anteriormente hay diferentes fármacos disponibles para el tratamiento de la hipertensión, pero sus altos costos y efectos secundarios negativos han llevado a un interés creciente en la investigación de péptidos bioactivos (Gallego et al., 2018). Por lo

tanto, las fuentes de alimentos naturales que contienen estos péptidos, actualmente se consideran la próxima ola de opciones prometedoras para prevenir o tratar posibles problemas de salud crónicos y agudos, incluida la hipertensión en conjunto con la elección de un estilo de vida saludable en los primeros tratamientos de las personas hipertensas (Bhandari et al., 2019 y Ganguly et al., 2019).

Se sabe que los péptidos inhibidores de la ECA derivados de productos lácteos son menos potentes que el fármaco comúnmente utilizado para controlar la presión arterial alta en individuos hipertensos (Santiago-López et al., 2018). Sin embargo, los péptidos bioactivos del queso y otros productos lácteos pueden constituir un enfoque dietético natural con el potencial de controlar la hipertensión teniendo la ventaja de que no están asociados con efectos secundarios (Jerónimo & Malcata, 2016). Además, el queso es un producto que se consume ampliamente en todo el mundo y el uso de estudios clínicos y en animales ha indicado que su consumo puede contribuir a reducir la incidencia de factores de riesgo cardiovascular así como otras enfermedades (Santiago-López et al., 2018).

Es importante mencionar que la mayoría de los péptidos que han mostrado un efecto antihipertensivo en estudios *in vivo* se identifican principalmente como péptidos inhibidores de la ECA, posteriormente algunos de ellos han demostrado actividad antioxidante o antiinflamatoria. (Martínez-Sánchez et al., 2020).

4.3.1 Modelos animales

Se han realizado estudios que utilizan modelos animales para evaluar el efecto del proceso de maduración en la mejora de los efectos beneficiosos del queso (Santiago-López et al., 2018). Los efectos antihipertensivos pueden evaluarse mediante experimentos *in vivo* utilizando SHR (rata espontáneamente hipertensa) que constituye un modelo animal aceptado para estudiar la hipertensión esencial humana. Un gran número de estudios han abordado los efectos de la administración tanto a corto como a largo plazo de posibles péptidos antihipertensivos utilizando este modelo animal (Hernández-Ledesma et al., 2011).

En un estudio realizado por Bernabucci et al., (2014) se evaluó la acción hipotensora de los WSE liofilizados de quesos Parmigiano Reggiano y Grana Padano (32 meses de

maduración) en ratas espontáneamente hipertensas. Los valores IC_{50} de ambos quesos resultaron muy similares a los mostrados por una serie de péptidos individuales que fueron aislados de diferentes variedades de queso, los cuales mostraron una eficiente inhibición de la ECA *in vitro*. Sin embargo la administración *in vivo* de los WSE de PR y GP no indujo una reducción de la presión sistólica y diastólica después de diez semanas de tratamiento. El autor menciona que una de las razones que explican la ausencia de un efecto hipotensor *in vivo* de los WSE de los quesos puede ser la falta de biodisponibilidad de los péptidos activos presentes en el WSE necesarios para su bioactividad. Por lo que se concluyó en el estudio que la actividad inhibidora de la ECA *in vitro* no puede utilizarse como criterio exclusivo para evaluar sustancias hipotensivas potenciales, sino que es necesario probar los efectos antihipertensivos beneficiosos de los péptidos bioactivos *in vivo*, ya que su degradación enzimática y absorción reducida pueden ocurrir *in vivo*.

Por otra parte, diversas investigaciones también sugieren que el consumo de productos lácteos puede contribuir a reducir la incidencia de factores de riesgo cardiovascular, como lo son la obesidad, la dislipidemia y la diabetes mellitus tipo 2. En un estudio realizado por Geurts et al., (2012) se trataron ratones macho genéticamente obesos y con diabetes mellitus tipo 2. El ensayo se realizó durante 4 semanas con una dieta complementada con queso Camembert de diferente tiempo de maduración (0, 15 o 35 días). Se encontró que el tiempo de la maduración de las matrices de queso es un factor importante que interfiere con el impacto fisiológico de la ingesta de productos lácteos, ya que el queso con 35 días de maduración produjo efectos más pronunciados en los ratones; mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa, sin afectar la secreción de insulina; disminuyó significativamente los marcadores de peróxido de lípidos del tejido adiposo y redujeron el contenido de lípidos hepáticos. Por lo tanto, estos resultados indican que la maduración del queso puede impactar de manera diferencial y positiva la homeostasis de glucosa y lípidos en ratones obesos y con diabetes mellitus tipo 2. Cabe destacar que el autor menciona que aún se requieren investigaciones específicas para descifrar esta compleja interacción entre la fermentación de productos lácteos, los lípidos de la dieta, las matrices alimentarias y el metabolismo del huésped.

También se ha demostrado, que las bacterias probióticas pueden controlar la HTA mediante la ingesta de alimentos con probióticos. La acción proteolítica de estas bacterias

sobre las proteínas de la leche puede generar péptidos bioactivos que pueden disminuir la hipertensión. En una investigación realizada por Lollo et al., (2015) se evaluó el efecto de la ingesta de queso Minas Frescal, un queso popular Brasileño con una vida útil comercial de 14 a 21 días. En el estudio, un grupo de ratas espontáneamente hipertensas se alimentó con 20 g de queso tradicional y el otro grupo con un queso que contenía bacterias probióticas, (*L. acidophilus* y *Bifidobacterium animalis*) ambos durante 15 días. Los resultados mostraron que el grupo alimentado con el queso probiótico exhibió una presión arterial significativamente más baja en comparación con el queso tradicional. También se observó una mejora en los lípidos en sangre como disminución de los niveles de colesterol LDL (del inglés, Low Density Lipoproteins) y triglicéridos, así como un aumento del colesterol HDL (del inglés, High Density Lipoproteins).

La disminución de la presión arterial puede deberse a la actividad proteolítica del probiótico en el queso, generando péptidos con acción antihipertensiva. Por otro lado los posibles mecanismos responsables de la reducción del colesterol por parte de los probióticos son: la incorporación de colesterol a la membrana celular durante el crecimiento bacteriano en el intestino delgado, disminuyendo la absorción del mismo y por la acción de hidrolasa de sales biliares (HSB), ya que esta enzima en algunas cepas probióticas, incrementa la hidrólisis de las sales biliares conjugadas aumentando las tasas de excreción, dejando así menos colesterol disponible para la absorción intestinal y reducido el colesterol en sangre (Rolim et al., 2020 y López et al. 2017).

Por lo tanto estos hallazgos sugieren que el queso Minas Frescal puede ser un vehículo eficiente para el suministro de probióticos, ya que es capaz de atenuar la presión arterial en SHR, con un efecto potencial al final de su vida útil.

1.3.2 Ensayos clínicos

El efecto antihipertensivo de algunos péptidos derivados de los alimentos se ha realizado en estudios en humanos para determinar si estos péptidos poseen un efecto antihipertensivo en personas con presión arterial normal, alta e hipertensión leve. Cabe mencionar, que la actividad antihipertensiva más comprobada en seres humanos se ha obtenido para los productos lácteos fermentados e hidrolizados comerciales que contienen los péptidos inhibidores de la ECA IPP y VPP después de la administración a largo plazo. Por ejemplo, el efecto antihipertensivo del producto leche agria Calpis[®],

comercializado en Japón, se realizó en un estudio clínico con pacientes levemente hipertensos. Del mismo modo, un producto derivado de la leche obtenido por fermentación con *Lb. helveticus* LBK-16H (Evolus®) ha sido probado en humanos mostrando efectos antihipertensivos después de su ingestión diaria (Hernández-Ledesma et al., 2011).

Por otro lado, diversos estudios han informado que para ejercer un efecto antihipertensivo *in vivo* después de la ingesta oral, los péptidos inhibidores de la ECA deben ser absorbidos en forma intacta desde el intestino sin ser degradados por la acción de las peptidasas intestinales, intracelulares y plasmáticas para llegar a sus sitios de destino en forma bioactiva y en concentración suficiente (Bernabucci et al., 2014). Aunque se han encontrado péptidos inhibidores de la ECA en muchos quesos, pocos estudios describen su efecto en humanos (Rita Nilsen et al., 2016). El transporte *in vivo* de péptidos bioactivos intactos en el epitelio intestinal es una prerrogativa importante para demostrar su biodisponibilidad (Caira et al., 2016). Es importante mencionar, que el transporte intestinal de los péptidos bioactivos está influenciado por varias propiedades de los péptidos, como el tamaño, el peso molecular, la carga, la hidrofobicidad, la composición de AA y la flexibilidad de la cadena lateral (Xu et al., 2019).

Recientemente se detectaron por primera vez péptidos de caseína y caseinofosfopéptidos (CPP) en plasma humano después de la ingesta de queso Parmigiano Reggiano. Los CPP eran derivados de α_{s1} y α_{s2} -CN, como α_{s1} -CN (f43-52 y f43-50) y α_{s2} -CN (f8-12), (f7-12) y (f6-12), así como cuatro péptidos no fosforilados que pertenecen al extremo C-terminal de β -CN (f193-209, f194-209, f200-209). El estudio consistía en investigar la biodisponibilidad de los fosfopéptidos en cuatro sujetos sanos que consumieron durante una semana 100 g/día de queso Parmigiano Reggiano (30 meses de maduración) después de una semana de una dieta libre de productos lácteos. En pocas palabras los datos indicaron, que los oligopéptidos de caseína están biodisponibles después de una ingesta continua de queso (Caira et al., 2016).

En particular, los CPP son capaces de estabilizar los iones de calcio y fosfato en condiciones neutras y alcalinas, formando soluciones metaestables que están sobresaturadas con respecto a las fases básicas de fosfato de calcio. En estas condiciones, los CPP pueden unirse al calcio y al fosfato, lo que los hace biodisponibles.

Por lo tanto esto podría ser favorable con respecto a la hipertensión, ya que se ha demostrado que tanto el calcio como el potasio de la dieta reducen la presión arterial sistólica y diastólica y disminuyen el riesgo de hipertensión en, por ejemplo, mujeres de mediana y de mayor edad (Caira et al., 2016 y Nilsen et al., 2016).

Un aspecto importante es que la simple ingesta de queso, en lugar de la caseína y los hidrolizados de caseína por separado, incluidos los CPP, no permite establecer el mecanismo preciso del origen de los péptidos que se encuentran en la sangre, ya que podrían estar ya presentes en el queso o podrían resultar de la hidrólisis gradual de la caseína a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, incluido el metabolismo de la microbiota intestinal. Por lo tanto se requieren estudios futuros para determinar este hallazgo en una población más amplia y para aclarar los mecanismos detrás de la bioaccesibilidad y absorción de los CPP (Caira et al., 2016).

❖ Efecto antihipertensivo asociado al consumo de queso madurado

Con respecto al efecto antihipertensivo, Rita Nilsen et al., (2016) investigaron si el consumo de queso Gamalost podría disminuir la presión arterial durante 8 semanas de intervención. El estudio se realizó a 153 personas de la población en general. Entre los participantes se encontraban personas con PA óptima (<120 / <80 mmHg), con PA normal-alta (120-139 / 80-89 mmHg) e hipertensos (>140 / > 90 mmHg) y fueron asignados al azar a uno de tres grupos: queso alto en péptidos inhibidores de la ECA (Gamalost), queso tipo Gouda y control. A los participantes del grupo de Gamalost® se les indicó que consumieran 50 g/día de queso, mientras que a los participantes del grupo de quesos tipo Gouda se les indicó que consumieran 80 g / día de queso (Tabla 4.1), de tal manera que se consumiera la misma proporción de proteína y los del grupo control consumieron otros tipos de quesos como azul o mozzarella.

Tabla 4.1. Composición nutrimental por 100 g e ingesta diaria de los quesos de intervención. (Rita Nilsen et al., 2016).

Nutriente	Gamalost®		Queso tipo Gouda	
	100 g	Ingesta diaria, 50 g	100 g	Ingesta diaria, 80 g
Energía ^a , kcal	213	107	351	281
Proteína ^a , g	50	25	27	22
Grasa ^a , g	1	0.5	27	22

Hidratos de carbono ^a , g	1	0.5	0	0
Calcio ^a , mg	160	80	800	640
Sodio ^a , mg	24	12	402	322
Magnesio ^a , mg	13	7	33	26
Potasio ^a , mg	98	49	77	62
IC ₅₀ Inhibición de la ECA ^b	0.34	0.34	0.59	0.59
Potencial inhibitorio de la ECA ^c , mg	0.24	0.12	0.03	0.02

^aDe TINE SA, fabricante de los dos quesos; ^bIC₅₀ por unidad de peso de fracción soluble (SF) liofilizada a pH 4,6, expresada como mg de pH 4,6 SF por mL; Potencial inhibidor de la °ECA, expresado en mg de equivalentes de captopril por peso de queso.

De manera general los resultados indicaron que la PA sistólica se redujo en todos los grupos de intervención, así como reducciones en la PA diastólica en el grupo Gamalost, después de 8 semanas, sin embargo ambos grupos de queso no difirieron del control. Pero cuando se observó el análisis estratificado según la categoría de presión arterial, la PA sistólica se redujo significativamente en los participantes hipertensos tanto en el grupo Gamalost como en el grupo control, pero no en el grupo de tipo Gouda. Esto podría explicarse ya que este grupo presentaba menos personas con hipertensión en comparación con los otros dos grupos. Con respecto a la PA diastólica solo se redujo significativamente en los participantes con una presión arterial normal-alta en el grupo de Gamalost en comparación con el grupo de control.

Por lo tanto, el consumo de un queso, como Gamalost, rico en péptidos inhibidores de la ECA, tuvo un pequeño efecto en la reducción de la presión arterial diastólica en personas con presión arterial normal-alta. Los hallazgos sugieren que el queso puede ser uno de los enfoques dietéticos para reducir la presión arterial en personas con hipertensión arterial límite. Se ha estimado que una pequeña reducción de la PA diastólica de 2 mm Hg podría reducir el riesgo de enfermedad coronaria en un 6%, lo que indica que solo se necesitan pequeñas reducciones para que el queso y los productos lácteos tengan un efecto clínicamente significativo sobre la PA (Nilsen et al., 2014 y Nilsen et al., 2016).

Finalmente, el autor menciona que es importante, se realicen más estudios que contemplen el consumo de queso Gamalost® y otros quesos con alto contenido de péptidos bioactivos inhibidores de la ECA, en dónde se excluyan participantes con presión arterial óptima, debido a que es posible que este estudio en realidad no tenga el poder

estadístico suficiente, ya que no se espera una reducción de la PA en aquellas personas con PA normal. Además, menciona que es posible observar un verdadero efecto reductor de la PA de Gamalost® si se aumentara la ración, sin embargo se considera poco probable que los consumidores habituales y los no consumidores toleren una ración mayor.

Por otra parte, Crippa et al., (2018) evaluaron si la suplementación dietética con 30 g/día de queso Grana Padano (DOP) de 12 meses de maduración, era capaz de reducir la PA en personas con hipertensión grado 1 (>140 y/o > 90 mmHg), clasificación de acuerdo con la Sociedad Europea de Cardiología. Cabe mencionar que el análisis del queso utilizado para el estudio confirmó la presencia de péptidos IPP (3.18 mg/kg), VPP (3.95 mg/kg), LHLPLP (1.95mg/kg), HLPLP (0.53mg/kg) y RYLG (1.93 mg/kg).

De manera general, se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en 30 sujetos hipertensos. Todos los pacientes recibieron, de forma aleatoria, un suplemento dietético con Grana Padano (30 g diarios) y placebo (obtenido con pan aromatizado mezclado con grasa y sal en cantidades iguales a las del queso) como se muestra en la Tabla 4.2. La PA se evaluó al inicio y al final de los tratamientos activos y placebo (2 meses cada uno) mediante: PA del consultorio (OBP); PA automatizada en el consultorio (AOBP) y monitorización de la presión arterial ambulatoria (ABP) las 24 horas.

Tabla 4.2. Composición química (g/100 g) de Grana Padano y placebo (Crippa et al., 2018).

Nutrientos	Grana Padano	Placebo
Lípidos	28.92	28.94
Proteínas	31.43	12.65
Sodio	0.56	0.53
Calcio	0.88	0.86

Como resultado se obtuvo que la integración dietética con el queso Grana Padano, mostró una disminución significativa en la PA de consultorio, automatizada y ambulatoria. La disminución media (frente a placebo) para la PA de 24 horas fue de -3,5 mmHg para la PA sistólica y -2,4 mmHg para la PA diastólica. Por lo tanto en este estudio se concluye que la integración dietética diaria con 30 g de queso Grana Padano DOP reduce

eficazmente la PA y puede ayudar a los pacientes con hipertensión grado 1 a alcanzar un objetivo de PA.

❖ **Consumo de queso Camembert por personas hipercolesterolémicas**

Debido a que el queso y otros productos lácteos son fuentes importantes de grasas saturadas, se habían considerado como un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular (ECV). Sin embargo, algunos estudios han encontrado que una mayor ingesta de productos lácteos se asocia con un riesgo reducido de ECV, y recientemente se descubrió que la ingesta de queso se asocia negativamente con el síndrome metabólico. Parte de la razón por la que el queso puede proteger contra las enfermedades cardiovasculares podría ser la presencia de péptidos bioactivos (Nilsen et al., 2014).

Dado que el nivel de colesterol en sangre y la presión arterial son factores de riesgo importantes y bien establecidos para las ECV, es fundamental evaluar el efecto del queso sobre estos dos parámetros. Los estudios de intervenciones en humanos y las pautas dietéticas actuales para adultos con hipercolesterolemia se basan en una reducción de los ácidos grasos saturados en la dieta (Schlienger et al., 2014)

Con respecto a lo anterior, en un estudio realizado por Schlienger et al., (2014) se investigó el efecto sobre los lípidos séricos, del consumo dos raciones diarias de queso Camembert de individuos con hipercolesterolemia moderada. Los resultados mostraron que el consumo diario por 5 semanas de 60 g de queso Camembert no modificó ni los niveles de lípidos plasmáticos ni la presión arterial de las personas con hipercolesterolemia moderada. Por lo tanto, el consumo moderado de queso fermentado como el Camembert podría incluirse en la dieta sin consecuencias sobre el riesgo cardiovascular.

DISCUSIÓN

Diversos investigadores se han dado a la tarea de identificar las secuencias de aminoácidos que conforman los péptidos con capacidad antihipertensiva en los quesos, que en su mayoría se basan en la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). En términos generales, los péptidos inhibidores de la ECA que se hallaron en las diferentes variedades de quesos fueron secuencias de aminoácidos cortas, así como aminoácidos hidrofóbicos terminales.

En especial, se ha dado énfasis a la identificación de las secuencias VPP e IPP, ya que son péptidos inhibidores de la ECA bien conocidos, que han demostrado exhibir un efecto antihipertensivo *in vivo* en leche fermentada con cepas de *Lactobacillus helveticus*. (Hernández-Ledesma et al., 2011). Sin embargo, estas bacterias ácido lácticas también han sido utilizadas como cultivo iniciador en quesos madurados como el Parmigiano Reggiano y Grana Padano, en dónde efectivamente fueron identificadas estas secuencias. Además, se identificó otro péptido bioactivo como LHLPLP, que ha mostrado una actividad inhibidora de ECA similar a la de VPP e IPP, y los péptidos HLPLP y RYLG, que aunque son menos efectivos también han sido resaltados por su actividad (Crippa et al., 2018). Cabe mencionar que *L. helveticus*, además de utilizarse como cultivo adjunto en el queso Prato, también condujo a una mayor actividad inhibidora de la ECA (Baptista et al., 2020). Por lo tanto la actividad proteolítica de cepas seleccionadas de *L. helveticus* puede ser un factor clave para la liberación de VPP e IPP así como otros péptidos antihipertensivos potentes, durante la maduración del queso (Sieber et al., 2010).

Otro aspecto importante es que en diferentes variedades de quesos se analiza el comportamiento de los péptidos inhibidores de la ECA en diferentes etapas de la maduración, esto permitió conocer el tiempo en el cual se forma una mayor concentración de péptidos activos y por lo tanto una mayor actividad antihipertensiva. Ciertamente, como ya lo han mencionado diversos autores, la mayoría de los quesos mostró un aumento de la concentración de los péptidos inhibidores de la ECA a medida que progresa la maduración, sin embargo disminuye, hasta un cierto nivel (Martini et al., 2020; Lu et al., 2016 y Sieber et al., 2010). Esto quiere decir que una extensa proteólisis puede provocar la degradación e inactivación de los péptidos y por lo tanto una menor bioactividad. Una alternativa para retrasar la proteólisis de un queso con alto contenido de péptidos

bioactivos podría ser mediante la congelación ya que este procedimiento no afecta a la actividad inhibitoria de la ECA de los péptidos (Rita Nilsen et al., 2016). Cabe mencionar que en el caso de los quesos de maduración larga como el Parmigiano Reggiano, Grana Padano y Cheddar la concentración de péptidos es elevada en un periodo de tiempo menor a dos años. Por lo tanto, el tiempo de maduración en el cual se produce la mayor actividad inhibidora de la ECA, también podría dar indicios de si el producto comercializado posee un contenido significativo de péptidos bioactivos que pueda ejercer un efecto a la salud (Hernández-Galán et al., 2016).

Por otra parte, es necesario que se realice la evaluación del potencial inhibidor de la ECA de los péptidos, mediante su digestión gastrointestinal *in vitro*, ya que estos pueden ser degradados por las proteasas gastrointestinales después de la ingestión (Stuknyte et al., 2015). Por ende, un alto nivel de proteólisis en el queso, no puede considerarse por sí solo como un factor promotor de la liberación de péptidos bioactivos, sino también debe tomarse en cuenta la especificidad de las enzimas para su hidrólisis, el tiempo de acción de la enzima, las condiciones de la proteólisis, así como la integridad y contenido de proteína (Bhandari et al., 2019). En el caso del queso Parmigiano Reggiano, los péptidos inhibidores de la ECA, mostraron una tendencia creciente después de la digestión gastrointestinal *in vitro*, siendo los péptidos IPP y VPP resistentes a la degradación por las enzimas digestivas ya que se encontraron antes y después de la digestión (Martini et al., 2020). Además, se favoreció la formación del péptido YPFPGPI. Por el contrario en el queso Grana Padano sólo se identificaron al final de la digestión los péptidos HLPLP y LHLPLP. Esto quiere decir que la digestión gastrointestinal puede causar tanto la degradación o conducir a la formación de péptidos inhibidores de la ECA y para tener una evaluación confiable del efecto hipotensor de cualquier queso, debe evaluarse sólo después de la digestión (Stuknyte et al., 2015).

El proceso de fabricación del queso, también puede influir en las diferencias de concentración de los péptidos y su actividad inhibidora de la ECA. Esto se vio reflejado en los quesos Cheddar y crema de Chiapas. En el caso los quesos Cheddar de dos diferentes marcas comerciales, la cantidad y tipos específicos de péptidos inhibidores de la ECA detectados cambiaron según el fabricante y el tiempo de maduración. Con respecto al queso Crema de Chiapas también hubo variación en la actividad inhibidora de

la ECA sin importar que se tratase de la misma variedad. Estas diferencias pueden ser atribuidas a variaciones en prácticas de fabricación específicas, así como las cepas de cultivo iniciador utilizadas y la microbiota NSLAB (Lu et al., 2016 y Gonzalez et al., 2019).

Por otra parte, es importante mencionar que la utilización de leche cruda es uno de los rasgos característicos de muchos quesos. Algunas de las ventajas de la elaboración de queso con este tipo de leche, es que puede atribuirse una mayor presencia de enzimas proteolíticas de la microbiota láctea NSLAB y pueden estar presentes enzimas autóctonas de la leche que son inactivadas con el tratamiento térmico que puedan contribuir a la liberación de péptidos bioactivos específicos (Pisanu et al., 2015). Es importante considerar que la pasteurización a pesar de conferir mayor seguridad para el consumo de queso, puede influir de manera negativa en la bioactividad de los péptidos (Pisanu et al., 2015). Esto se ha presentado en quesos como el Cheddar que aunque frecuentemente se realiza con leche pasteurizada, mostró una disminución en la actividad inhibidora de la ECA al aumentar la temperatura de pasteurización (Santiago-López et al., 2018). En el caso de los quesos madurados con moho, que se reconocen por su intensa actividad proteolítica, también se evaluó el efecto de la pasteurización. El queso Roquefort de leche cruda, presentó mayor actividad inhibidora de la ECA que los elaborados con leche pasteurizada y fue uno de los quesos con valores menores de IC_{50} analizados en esta investigación ($IC_{50}=0.34$ mg/mL) (Meister et al., 2012). En el caso del queso Camembert, los quesos elaborados con leche cruda presentaron una diferenciación mejor definida del perfil peptídico en comparación con los quesos obtenidos de la leche pasteurizada (Domingues Galli et al., 2019). Por lo tanto, aunque el tratamiento térmico facilita la desnaturalización de la proteína de la leche también pueden ocurrir otros cambios químicos que provocan que la proteína se vuelva menos susceptible a la proteólisis, por lo tanto, los quesos elaborados con leche cruda podrían representar una fuente potencial de péptidos inhibidores de la ECA (Pisanu et al., 2015).

Con respecto a los quesos mexicanos, el queso Crema de Chiapas y el Cotija, demostraron tener en su microbiota nativa cepas altamente proteolíticas capaces de liberar péptidos inhibidores de la ECA (Gonzalez et al., 2019 y Hernández-Galán et al., 2016). Además en el queso Crema, se encontraron cantidades importantes de GABA que también se considera un compuesto bioactivo con efecto hipotensor (Gonzalez et al.,

2019). Por lo tanto, sería ideal que en México se impulse el consumo de queso madurado nacional, así como la búsqueda de estrategias que puedan favorecer las características funcionales del queso como la utilización de cultivos probióticos así como el aprovechamiento del suero que es un subproducto de la industria láctea el cuál puede utilizar para la obtención de péptidos bioactivos. Como en el caso de Brasil, que debido a la asociación entre la ingesta excesiva de sodio y la prevalencia de hipertensión, se dieron la tarea de evaluar el efecto de la reducción de sal, la adición de *Lactobacillus helveticus* LH-B02 y el tiempo de maduración sobre la actividad inhibidora de la ECA. En ese estudio se obtuvieron resultados positivos y se observó que la reducción de sal no tuvo un efecto negativo en la estabilidad de los péptidos. Sería de gran interés realizar más investigación en otros quesos y evaluar el tiempo de maduración en el cuál los péptidos permanezcan activos para obtener un queso con doble beneficio.

Una vez realizada la evaluación de la actividad inhibidora de la ECA *in vitro* de los quesos con alta concentración de péptidos activos, se deben considerar los estudios en modelos animales y en humanos para tener mayor certeza de un posible efecto hipotensor al consumir alguna variedad de queso. Aunque en modelos animales no se encontraron resultados favorables para los quesos Parmigiano Reggiano y Grana Padano de 32 meses de maduración, otros estudios mostraron que el consumo de queso Camembert puede contribuir a reducir la incidencia de otros factores de riesgo cardiovascular como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, siendo el tiempo de maduración del queso un factor importante que interfiere con un impacto fisiológico positivo (Geurts et al., 2012). Además, también se demostró que el consumo de queso Camembert, no modificó los niveles de lípidos plasmáticos ni la presión arterial de las personas con hipercolesterolemia. Estos resultados son de gran importancia, ya que anteriormente el consumo de queso y productos lácteos se asociaban con el riesgo cardiovascular por lo que eran eliminados de la dieta (Durán Agüero et al., 2015). Esto en gran parte, debido al alto contenido de grasas saturadas, el colesterol y el contenido de sal. Sin embargo existen otros componentes grasos del queso como ácidos grasos de cadena corta o lípidos funcionales como el ácido linoleico conjugado que pueden asociarse con beneficios a la salud cardiovascular (Ash & Wilbey, 2010).

Actualmente, aún son escasos los ensayos clínicos en humanos, sin embargo, ya se han detectado péptidos de caseína y CCP en plasma humano después de la ingesta de queso Parmigiano Reggiano, lo que confirma su biodisponibilidad al tener una continua ingesta de queso (Caira et al., 2016). Con respecto al efecto hipotensor, no se obtuvieron resultados concluyentes en el queso Gamalost ya que en el estudio también participaron personas con presión arterial normal (Rita Nilsen et al., 2016). Por el contrario, en el caso del queso Grana Padano, en dónde sólo se incluyeron personas hipertensas, se redujo eficazmente la presión arterial sistólica y diastólica al incluir la integración dietética diaria con 30 g de queso Grana Padano DOP. Por lo tanto estos resultados, abren las puertas de considerar el consumo de queso Grana Padano como una nueva alternativa para la prevención y tratamiento de la hipertensión y la oportunidad de reducir el consumo de los medicamentos (Crippa et al., 2018). Cabe mencionar que en el queso Grana Padano, fueron hallados los péptidos VPP e IPP junto con otros inhibidores de la ECA potentes, lo que podría explicar el efecto hipotensor del consumo de queso (Crippa et al., 2018). Sin embargo se necesitan más estudios para explicar los efectos de los efectos de las enzimas digestivas sobre la concentración de los péptidos y los mecanismos involucrados en la actividad biológica.

CONCLUSIONES

- Los péptidos bioactivos que incluyen la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal como prolina, han reportado una mayor capacidad de inhibir a la ECA.
- Durante el periodo de maduración del queso se libera un gran número de péptidos ricos en aminoácidos hidrofóbicos que han demostrado ejercer actividad inhibidora de la ECA *in vitro*.
- La actividad de los péptidos bioactivos aumenta, a medida que progresa la proteólisis, pero disminuye en un determinado tiempo de maduración como resultado de una extensa degradación proteolítica.
- Los péptidos bioactivos pueden hidrolizarse adicionalmente durante la digestión gastrointestinal, lo que conduce a la formación pero también a la degradación de péptidos inhibidores de la ECA.
- Existen otros factores que influyen en la generación y actividad de péptidos inhibidores de la ECA como el tiempo de maduración, las prácticas de fabricación, el tratamiento térmico y la actividad proteolítica de las enzimas involucradas.
- Hasta ahora existen estudios limitados sobre los efectos *in vivo* del queso madurado con relación a su efecto hipotensor y algunos de ellos no son del todo concluyentes, sin embargo, una porción de 30 g diarios de queso Grana Padano, mostró tener potencial para disminuir la presión arterial en personas con hipertensión arterial grado 1.
- El consumo de queso junto con una dieta y estilo de vida saludable, podría contribuir al controlar o prevenir la hipertensión arterial así como otras enfermedades cardiovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alavi, F., & Momen, S. (2020). Aspartic proteases from thistle flowers: Traditional coagulants used in the modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107(1), 1–9.
2. Ash, A., & Wilbey, A. (2010). The nutritional significance of cheese in the UK diet. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 305–319.
3. Baglietto-Hernández, J. M., Mateos-Bear, A., & Nava-Sánchez, José Pablo Rodríguez-García, Paulina Rodríguez-Weber, F. (2020). Nivel de conocimiento en hipertensión arterial en pacientes con esta enfermedad de la ciudad de México. *Med Int Méx*, 36(1), 1–14.
4. Banks, J. M. (2011). Cheese: Cheddar-Type Cheeses. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2(1), 706–711.
5. Baptista, D. P., Negrão, F., Eberlin, M. N., & Gigante, M. L. (2020). Peptide profile and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of Prato cheese with salt reduction and *Lactobacillus helveticus* as an adjunct culture. *Food Research International*, 133(1), 1–10.
6. Barač, M., Pešić, M., Vučić, T., Vasić, M., & Smiljanić, M. (2017). White cheeses as a potential source of bioactive peptides. *Mljekarstvo*, 67(1), 3–16.
7. Barrón, C. (2012). *Centro de Investigación en Alimentación*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
8. Basiricò, L., Catalani, E., Morera, P., Cattaneo, S., Stuknyte, M., Bernabucci, U., De Noni, I., & Nardone, A. (2015). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitor peptides during in vitro gastrointestinal digestion of Parmigiano Reggiano PDO cheese and their absorption through an in vitro model of intestinal epithelium. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 7595–7601.
9. Bernabucci, U., Catalani, E., Basiricò, L., Morera, P., & Nardone, A. (2014). In vitro ACE-inhibitory activity and in vivo antihypertensive effects of water-soluble extract by Parmigiano Reggiano and Grana Padano cheeses. *International Dairy Journal*, 37(1), 16–19.
10. Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2019). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139–150.

11. Bidot, A. (2017). Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra:revisión bibliográfica. *Revista de Producción Animal*, 29(2), 32–41.
12. Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment¹. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611–3629.
13. Bragulat, E., & M.T., A. (2001). Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial : fármacos antihipertensivos. *Medicina Inegral*, 37(5), 215–221.
14. Bütikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., & Wechsler, D. (2007). Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, 17(8), 968–975.
15. Caira, S., Pinto, G., Vitaglione, P., Dal Piaz, F., Ferranti, P., & Addeo, F. (2016). Identification of casein peptides in plasma of subjects after a cheese-enriched diet. *Food Research International*, 84(1), 108–112.
16. Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Flores-Coria, A., Gómez-Álvarez, E., & Barquera, S. (2019). Prevalencia, diagnóstico y control de hipertensión arterial en adultos mexicanos en condición de vulnerabilidad. Resultados de la Ensanut 100k. *Salud Pública de México*, 61(6), 888–896.
17. CANILEC. (2019). Estadísticas del Sector Lácteo 2010-2018. In *CANILEC*.
- Carrasco Alvarado, C., & Guerra, M. (2010). Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales Venezolanos de Nutricion*, 23(1), 42–49.
18. Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1–17.
19. Chalamaiah, M., Keskin Ulug, S., Hong, H., & Wu, J. (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58(1), 123–129.
20. Crippa, G., Zabzuni, D., Bravi, E., Piva, G., De Noni, I., Bighi, E., & Rossi, F. (2018). Randomized, double blind placebo-controlled pilot study of the antihypertensive effects of Grana Padano D.O.P. cheese consumption in mild - Moderate hypertensive subjects. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(21), 7573–7581.
21. Domingues Galli, B., Parra Baptista, D., Giacometti Cavalheiro, F., Negrão, F., Nogueira Eberlin, M., & Gigante, M. L. (2019). Peptide profile of Camembert-type cheese: Effect of heat treatment and adjunct culture *Lactobacillus rhamnosus* GG.

- Food Research International*, 123(1), 393–402.
22. Durán Agüero, S., Torres García, J., & Sanhueza Catalán, J. (2015). Consumo de queso y lácteos y enfermedades crónicas asociadas a obesidad, ¿amigo o enemigo? *Nutricion Hospitalaria*, 32(1), 61–68.
 23. Egger, L., & Ménard, O. (2017). Update on bioactive peptides after milk and cheese digestion. *Current Opinion in Food Science*, 14(1), 116–121.
 24. ENSANUT. (2018). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. *Ensanut*, 1, 47. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
 25. 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.
 26. FIRA. (2019). *Panorama Agroalimentario. Leche y lácteos 2019*. 1–24.
 27. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. In P. F. Fox (Ed.), *Fundamentals of Cheese Science* (2nd ed.). Springer Nature.
 28. Gallego, M., Mora, L., & Toldrá, F. (2018). Health relevance of antihypertensive peptides in foods. *Current Opinion in Food Science*, 19(1), 8–14.
 29. Galván, M. (2005). Proceso básico de la leche y el queso. *Revista Digital Universitaria*, 6(9), 3–17.
 30. Ganguly, A., Sharma, K., & Majumder, K. (2019). Food-derived bioactive peptides and their role in ameliorating hypertension and associated cardiovascular diseases. In A. Ganguly (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 89, pp. 165–207). Elsevier Inc.
 31. Geurts, L., Everard, A., Le Ruyet, P., Delzenne, N. M., & Cani, P. D. (2012). Ripened dairy products differentially affect hepatic lipid content and adipose tissue oxidative stress markers in obese and type 2 diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(8), 2063–2068.
 32. Giromini, C., Cheli, F., Rebucci, R., & Baldi, A. (2019). Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 929–942.
 33. Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & 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(1–2), 269–277.
34. Gonzalez, C. R., Machado, J., Correia, S., McCartney, A. L., Stephen Elmore, J., & Jauregi, P. (2019). Highly proteolytic bacteria from semi-ripened Chiapas cheese elicit angiotensin-I converting enzyme inhibition and antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 111(1), 449–456.
 35. González, K. N. D. (2014). El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(1), 58–65.
 36. Gösta Bylund, Bozena Malmgren, Andrzej Holanowski, M., Hellman, G., Mattsson, B., Svensson, H., Pålsson, K., Lauritzen, T., Vilsgaard, E., Verweij, E., Bronsveld, N., Adamson, J., Pearse, P., Kouroutsidis, J., Mathisson, F., Franz, C., & Svensson Rehn, U. (2015). Queso. In B. Gösta Bylund (Ed.), *Manual de procesamiento de lácteos Tetra Pack* (4th ed., pp. 1–486). TETRA PACK INTERNACIONAL. S.A.
 37. Griffiths, M. W., & Tellez, A. M. (2013). *Lactobacillus helveticus*: The proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*, 4(30), 1–9.
 38. Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600.
 39. Harbutt, J. (2015). *World Cheese Book* (J. Harbutt (ed.); 2nd ed.). Penguin Random House.
 40. Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., López-del-Castillo, M., Picque, D., Spinnler, H. E., & Martín del Campo, S. T. (2017). Actividad antioxidante e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina en queso fresco de cabra preparado sin cultivos iniciadores: estudio preliminar. *CYTA - Journal of Food*, 15(1), 49–57.
 41. Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., Picque, D., Spinnler, H. E., López-del-Castillo Lozano, M., & Martín del Campo, S. T. (2016). ACEI and antioxidant peptides release during ripening of Mexican Cotija hard cheese. *Journal of Food Research*, 5(3), 85.
 42. Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1), 23–35.
 43. Hernández, Á. (2010). *Tratado de Nutrición. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos* (M. D. Ruiz López (ed.); 2nd ed.). Editorial Médica Panamericana.

44. Hill, A. R., & Kethireddipalli, P. (2012). Dairy Products: Cheese and Yogurt. In A. R. Hill (Ed.), *Biochemistry of Foods* (3rd ed., pp. 319–362). Elsevier.
45. Hossain, S., Khetra, Y., Ganguly, S., Kumar, R., & Sabikhi, L. (2020). Effect of heat treatment on plasmin activity and bio-functional attributes of Cheddar cheese. *LWT - Food Science and Technology*, *120*(1), 1–7.
46. Jerónimo, E., & Malcata, F. X. (2016). Cheese: Composition and Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health*, *1*(1), 741–747.
47. Juárez Iglesias, M., De la Fuente Layos, M. Á., & Fontecha Alonso, J. (2015). Los nutrientes de la leche en la salud cardiovascular. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(2), 26–32.
48. Juillard, V., Lopez-Kleine, L., & Monnet, V. (2021). Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria (LAB). In *Reference Module in Food Science* (1st ed., pp. 1–7). Elsevier.
49. Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science and Technology*, *88*(1), 343–360.
50. 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. *LWT-Food Science and Technology*, *123*(1), 1–7.
51. Kongo, J. M., & Malcata, F. X. (2015). Cheese: Types of Cheese - Medium. In J. M. Kongo (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd.
52. Li, Q., & Zhao, Z. (2019). Acid and rennet-induced coagulation behavior of casein micelles with modified structure. *Food Chemistry*, *291*(1), 231–238.
53. Lisak Jakopović, K., Barukčić, I., & Božanić, R. (2019). Bioactive components derived from bovine milk. *Mljekarstvo*, *69*(3), 151–161.
54. Lollo, P. C. B., Morato, P. N., Moura, C. S., Almada, C. N., Felicio, T. L., Esmerino, E. A., Barros, M. E., Amaya-Farfan, J., Sant'Ana, A. S., Raices, R. R. S., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Research International*, *76*(1), 611–617.
55. Lopes Fialho, T., Clícia Carrijo, L., Magalhães Júnior, M. J., Baracat-Pereira, M. C., Hilsdorf Piccoli, R., & De Abreu, L. R. (2018). Extraction and identification of antimicrobial peptides from the Canastra artisanal minas cheese. *Food Research International*, *107*(1), 406–413.

56. López-Expósito, I., Miralles, B., Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Health Effects of Cheese Components with a Focus on Bioactive Peptides. In J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, & E. Peñas (Eds.), *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (1st ed., pp. 239–273). Elsevier Inc.
57. Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., & Lucey, J. A. (2016). Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *Journal of Dairy Science*, *99*(1), 41–52.
58. Mancia, R., Fragard, R., & Zannad, F. (2013). Epidemiología de la hipertensión Aspectos Epidemiológicos , Definición y Clasificación de la Hipertensión Arterial. *European Heart Journal*, *1*(1), 6–9.
59. Márquez-Villalobos, F., López-Lemus, H., Reyes-Escogido, M., & Ramírez-Emiliano, J. (2017). iMedPub Journals Uso de Probióticos para el Control de la Hipercolesterolemia Use of Probiotics for the Control of Hypercholesterolemia Introducción Microbiota Intestinal Mecanismos de Acción para la Reducción del Colesterol Probióticos Disminución de los. *IMedPub Journals*, *13*(4), 1–6.
60. Martínez-Sánchez, S. M., Gabaldón-Hernández, J. A., & Montoro-García, S. (2020). Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food-derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health. *Journal of Functional Foods*, *64*(1), 1–11.
61. Martini, S., Conte, A., & Tagliacuzzi, D. (2020). Effect of ripening and in vitro digestion on the evolution and fate of bioactive peptides in Parmigiano-Reggiano cheese. *International Dairy Journal*, *105*(1), 1–8.
62. McAuliffe, O., Kilcawley, K., & Stefanovic, E. (2019). Symposium review: Genomic investigations of flavor formation by dairy microbiota. *Journal of Dairy Science*, *102*(1), 909–922.
63. McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, *1*(1), 347–360.
64. Meister, S., Daroit, D., Etges Helfer, V., Folmer Corrêa, A. P., Segalin, J., Carro, S., & Brandelli, A. (2012). Bioactive peptides in water-soluble extracts of ovine cheeses from Southern Brazil and Uruguay. *Food Research International*, *48*(1), 322–329.
65. Mikkelsen, P. (2014). World cheese market 2000-2020. In *Pm Food & Dairy Consulting* (Issue 1). <http://pmfood.dk/upl/9735/WCMINFORMATION.pdf>
66. 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.
67. Mohapatra, A., Shinde, A. K., & Singh, R. (2019). Sheep milk: A pertinent functional food. *Small Ruminant Research*, 181(1), 6–11.
 68. Monzón, J. (2012). *ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE Lactococcus lactis RELACIONADAS CON LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA EN LECHES FERMENTADAS*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
 69. Munir, M., Nadeem, M., Mahmood Qureshi, T., Gamlath, C. J., Martin, G. J. O., Hemar, Y., & Ashokkumar, M. (2020). Effect of sonication, microwaves and high-pressure processing on ACE-inhibitory activity and antioxidant potential of Cheddar cheese during ripening. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67(1), 1–7.
 70. 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(1), 673–682.
 71. Nilsen, R., Pripp, A. H., Høstmark, A. T., Haug, A., & Skeie, S. (2014). Short communication: Is consumption of a cheese rich in angiotensin-converting enzyme-inhibiting peptides, such as the Norwegian cheese Gamalost, associated with reduced blood pressure? *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2662–2668.
 72. Nilsen, Rita, Pripp, A. H., Høstmark, A. T., Haug, A., & Skeie, S. (2016). Effect of a cheese rich in angiotensin-converting enzyme-inhibiting peptides (Gamalost®) and a Gouda-type cheese on blood pressure: Results of a randomised trial. *Food and Nutrition Research*, 60(1), 1–9.
 73. Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2011). Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology: Proteinases. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 2(1), 289–296.
 74. Ocampo, R., Gomez, C., Restrepo, D., & Cardona C, H. (2016). Estudio comparativo de parámetros composicionales y nutricionales en leche de vaca, cabra y búfala, Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 8(2), 177–186.
 75. OMS/FAO. (2011). Leche y Productos Lácteos. In FAO/OMS (Ed.), *CODEX Alimentarius* (2nd ed.). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
 76. OMS. (2013). Información general sobre la hipertension en el mundo. OMS.

<https://doi.org/WHO/DCO/WHD/2013.2>

77. OMS. (2019). *Hipertensión*. Centro de Prensa. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
78. Panikuttira, B., O'Shea, N., Tobin, J. T., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2018). Process analytical technology for cheese manufacture. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(8), 1803–1815.
79. Park, Y. W., & Nam, M. S. (2015). Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 831–840.
80. Parra Baptista, D., Domínguez Galli, B., Giacometti Cavalheiro, F., Negrão, F., Nogueira Eberlin, M., & Gigante, M. L. (2018). Lactobacillus helveticus LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *International Dairy Journal*, 87(1), 75–83.
81. Pérez Gil, A. (2008). *El mercado del queso en Italia*. [http://www.infaoliva.com/documentos/documentos/EL MERCADO DE ACEITE DE OLIVA EN MEXICO.pdf](http://www.infaoliva.com/documentos/documentos/EL_MERCADO_DE_ACEITE_DE_OLIVA_EN_MEXICO.pdf)
82. Pihlanto, A., & Korhonen, H. (2014). Bioactive peptides from fermented foods and health promotion. In W. Holzapfel (Ed.), *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits* (1st ed., pp. 39–74). Elsevier Ltd.
83. Pisanu, S., Pagnozzi, D., Pes, M., Pirisi, A., Roggio, T., Uzzau, S., & Addis, M. F. (2015). Differences in the peptide profile of raw and pasteurised ovine milk cheese and implications for its bioactive potential. *International Dairy Journal*, 42(1), 26–33.
84. Rodríguez Hernández, G., & Chávez Martínez, A. (2018). Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos. *Interciencia*, 43(1), 50–54.
85. Rodríguez Hernández, G., Rentería Monterrubio, A., Rodríguez Figueroa, J., & Chávez Martínez, A. (2014). Biopéptidos en la leche y sus derivados: funcionamiento y beneficios a la salud. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 281–294.
86. Rolim, F. R. L., Neto, O. C. F., Oliveira, M. E. G., Oliveira, C. J. B., & Queiroga, R. C. R. E. (2020). Trends in Food Science & Technology Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests. *Trends in Food Science & Technology*, 100(1), 138–154.
87. Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *International Journal*

Bioautomation, 15(4), 223–250.

88. Santamaría, R., Gorostidi, M., Gestión, U. De, Nefrología, C. De, Universitario, H., Sofía, R., Investigación, R. De, Santamaría, R., & Gorostidi, M. (2018). Hipertensión arterial secundaria: cuando y como debe investigarse. *Nefroplus*, 7(1), 11–21.
89. Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J. E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A. M., & González-Córdova, A. F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3742–3757.
90. Schlienger, J. L., Paillard, F., Lecerf, J. M., Romon, M., Bonhomme, C., Schmitt, B., Donazzolo, Y., Defoort, C., Mallmann, C., Le Ruyet, P., & Bresson, J. L. (2014). Effect on blood lipids of two daily servings of Camembert cheese. An intervention trial in mildly hypercholesterolemic subjects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(8), 1013–1018.
91. Scott, R., Robinson, R. K., & Wilbey, R. A. (2003). *Fabricación de queso* (A. M. Barrado (ed.); 2nd ed.). Acribia, S.A.
92. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista Chilena de Nutrición*, 37(3), 386–391.
93. Shivanna, S. K., & Nataraj, B. H. (2020). Revisiting therapeutic and toxicological fingerprints of milk-derived bioactive peptides: An overview. *Food Bioscience*, 38(1), 1–13.
94. Sieber, R., Bütikofer, U., Egger, C., Portmann, R., Walther, B., & Wechsler, D. (2010). ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science and Technology*, 90(1), 47–73.
95. Skwarek, A., Darewicz, M., & Borawska-Dziadkiewicz, J. (2018). Ripened cheese as a source of bioactive peptides. *Biotechnology and Food Science*, 82(1), 49–60.
96. Soto, J. R. (2018). Tratamiento No Farmacológico Non – Pharmacological Treatment of High Blood Pressure. *Revista Clínica Las Condes*, 29(1), 61–68.
97. Stuknyte, M., Cattaneo, S., Masotti, F., & De Noni, I. (2015). Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 168(1), 27–33.
98. Summer, A., Formaggioni, P., Franceschi, P., Frangia, F. Di, Righi, F., & Malacarne, M. (2017). Cheese as functional food: The example of parmigiano reggiano and

- grana padano. *Food Technology and Biotechnology*, 55(3), 277–289.
99. Syme, H. M. (2020). Epidemiology of hypertension. *Hypertension in the Dog and Cat*, 2(2), 67–99.
100. Timón, M. L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J. M., & Petró, M. J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3kDa) from Burgos-type cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 359–365.
101. Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*, 267(1), 395–404.
102. Torruco-Uco, J. G., Domínguez-Magaña, M. A., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L. A., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: A review. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 158–168.
103. Upadhyay, V. K., McSweeney, P. L. H., Magboul, A. A. A., & Fox, P. F. (2004). Proteolysis in cheese during ripening. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 1(1), 391–421.
104. Vargas, E., Márquez-hernández, R. I., & Hernández-castellano, L. E. (2019). Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. *Journal of Dairy Research*, 86(1), 136–144.
105. Vélez, M. A., Bergamini, C. V., Ramonda, M. B., Candioti, M. C., Hynes, E. R., & Perotti, M. C. (2015). Influence of cheese making technologies on plasmin and coagulant associated proteolysis. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 282–288.
106. Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Martínez-Hernández, J. L., Aguilar, C. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Production of Bioactive Peptides from Lactic Acid Bacteria: A Sustainable Approach for Healthier Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 1039–1051.
107. Vizcardo, D. L., & Zavala, J. C. (2016). Péptidos bioactivos: pequeños gigantes en salud. *Rev. Soc. Peruana Med. Interna*, 29(4), 150–155.
108. Wang, Y., Huang, Q., Kong, D., & Xu, P. (2018). Production and Functionality of Food-derived Bioactive Peptides: A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(18), 1524–1535.
109. Williams, B., Mancía, G., Spiering, W., Rosei, E. A., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., De Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J.,

- Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., ... Zamorano, J. L. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 39(33), 3021–3104. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy339>
110. Wyss, F., Coca, A., Lopez-Jaramillo, P., Ponte-Negretti, C., Wyss, F. S., Restrepo, G., Ponte-Negretti, C. I., Lanas, F., Pérez, G., Sebba Barroso, W., de la Noval, R., Paris, J. V., Almonte, C., Valdez, O., Gonzales Medina, Á., Valoy, L. V., Puente Barragán, A. C., Cobos, L., Ullauri, V., ... Iñiguez, A. (2020). Position statement of the Interamerican Society of Cardiology (IASC) on the current guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of arterial hypertension 2017–2020. *International Journal of Cardiology: Hypertension*, 6(1), 1–7.
111. Xu, Q., Hong, H., Wu, J., & Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 86(1), 399–411.
112. Yada, R. Y. (2018). *Proteins in Food Processing* (Y. R. Yada (ed.); 2nd ed.). Elsevier, Woodhead Publishing.