



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

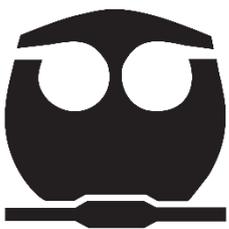
**TESIS: “Análisis *in silico* e *in vitro* de péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas y de leguminosas para la formulación de bebidas vegetales obtenidos por acción enzimática”**

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

**PRESENTA**

**Mariana Valdés Anaya**

**CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX, 2025**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

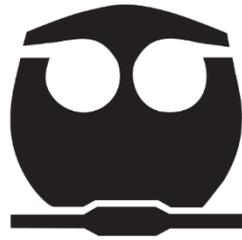
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL



De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “Análisis *in silico* e *in vitro* de péptidos bioactivos provenientes de proteínas lácteas y de leguminosas para la formulación de bebidas vegetales obtenidos por acción enzimática” que presenté para obtener el título/grado de Química de Alimentos es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Mariana Valdés Anaya, no. de cuenta: 316729875

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Verónica Hernández Briones

**VOCAL:** Profesor: Eva Patricia Bermúdez García

**SECRETARIO:** Profesor: Sofía Morán Ramos

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Iliana Elvira González Hernández

**2° SUPLENTE:** Profesor: Andrea Rivera del Río

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 4B, edificio A,  
Facultad de Química, UNAM

**Asesor del tema:**



**Eva Patricia Bermúdez García**

**Sustentante:**



**Mariana Valdés Anaya**

## Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	12
METODOLOGÍA.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	46
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS.....	47
ANEXOS.....	58

## INTRODUCCIÓN

La alimentación mundial está sufriendo cambios por motivos como el crecimiento de la población global, que exige proveer de alimento nutritivo a billones de personas (Fróna et al., 2019). Algunos han optado por reemplazar a los alimentos de origen animal, migrando a una dieta más sostenible (Hargreaves et al., 2021). Este es el caso de la sustitución de la leche de vaca por bebidas con bases de proteína vegetal. También se hace mayor conciencia sobre el impacto de la alimentación en la salud, buscando consumir alimentos funcionales. Éstos mejoran la salud y previenen enfermedades, representando un sector en crecimiento (Temple, 2022; Essa et al., 2023). Así, surge un nuevo reto para hallar alimentos nutritivos, sostenibles y funcionales. Diversos alimentos ricos en proteínas como la leche de vaca y leguminosas se estudian como fuentes de péptidos bioactivos (BAP, por sus siglas en inglés), que son cadenas peptídicas cortas (3-20 aminoácidos) producidas a partir de la hidrólisis de proteínas alimentarias y que tienen beneficios para la salud y prevención de enfermedades (Tu et al., 2018; Montesano et al., 2020). Actualmente, el análisis de estos compuestos comienza *in silico* y posteriormente se prueba *in vitro*.

El objetivo del presente trabajo es la identificación y caracterización de BAP generados por digestión enzimática de las principales proteínas de la leche de vaca y de proteína de *Pisum sativum* (chícharo) y *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), fuentes usadas para la elaboración de bebidas vegetales análogas a la leche, para comparar las actividades encontradas y estimar los beneficios a la salud asociados con el consumo de cada alimento a partir de ensayos *in silico* e *in vitro*.

En este trabajo, las tres proteínas estudiadas mostraron resultados positivos *in silico* para distintas bioactividades. No obstante, solo las proteínas de la leche y chícharo fueron estudiadas *in vitro* por manifestar la mayor cantidad de bioactividades. Finalmente, se demostró que los péptidos de estas 2 fuentes muestran actividad antihipertensiva, la cual fue estudiada experimentalmente y resultó comparable con la actividad exhibida por el Captopril (fármaco para la hipertensión) en una concentración 80 nM.

## MARCO TEÓRICO

### PEPTIDOS BIOACTIVOS

El estudio de los péptidos bioactivos (BAP) ha cobrado relevancia en los últimos años gracias a sus efectos benéficos sobre la salud del consumidor (Kadam et al., 2015). Estos compuestos son fragmentos de secuencias específicas de aminoácidos (usualmente de 3-20 monómeros) que se producen a partir de la proteína de los alimentos y poseen actividad biológica relevante para la salud humana al beneficiar el tratamiento de enfermedades o promover la salud (Tu et al., 2018; Montesano et al., 2020; Bizzotto et al., 2024). La secuencia de aminoácidos de estos péptidos es de suma relevancia, pues en gran parte determina su bioactividad tras ser liberados de la proteína precursora (Sánchez & Vázquez, 2017). Así, estos compuestos pueden presentar una variedad de actividades benéficas para nuestros organismos, las cuales los clasifican en rubros distintos (Figura 1):

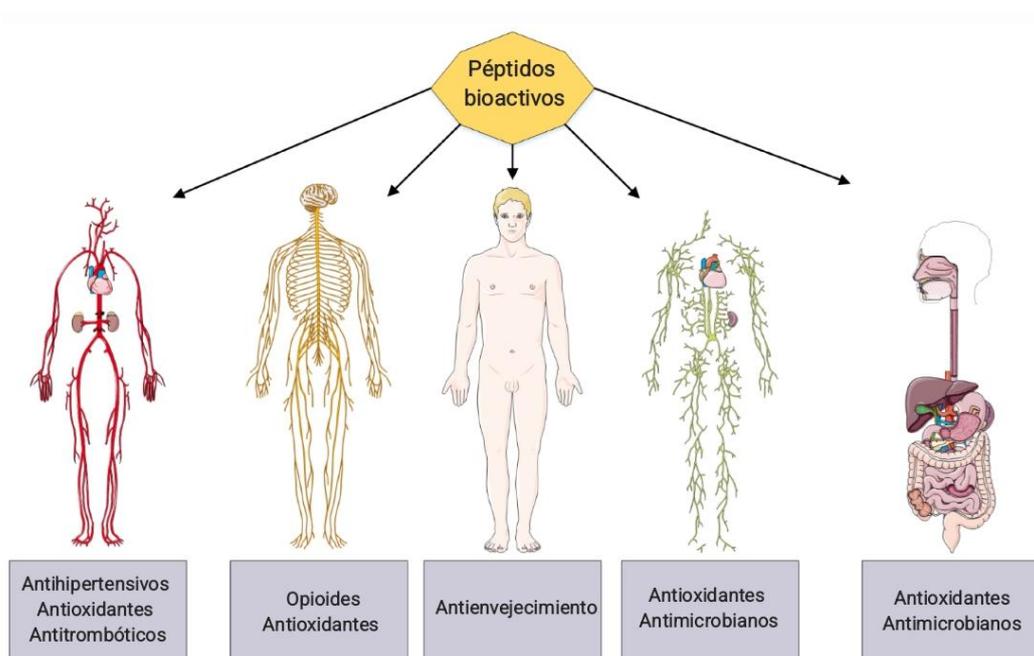


Figura 1. Algunos tipos de péptidos bioactivos y los sistemas sobre los que se aplican. Imagen tomada y modificada de Akbarian et al. (2022).

- **Antihipertensivos:** son péptidos capaces de regular la presión arterial a través de distintos medios como la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina o la inhibición de la renina (Bizzotto et al., 2024). Así, la actividad ACEI (inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I, por sus siglas en inglés) de los péptidos bioactivos se refleja al inhibirse esta

enzima. La enzima convertidora de angiotensina I (ACE) se encarga de transformar la angiotensina I en angiotensina II —cuyos efectos terminan por incrementar la presión arterial—, pero también hidroliza la bradiquinina, que es un potente vasodilatador. Así, al impedir los efectos de la ACE, se presenta un efecto hipotensivo (Wu et al., 2017; Jo et al., 2024).

- Antidiabéticos: en este grupo se incluyen péptidos cuya acción se basa en disminuir los niveles de glucosa en sangre a través de la inhibición de enzimas que regulan el índice glucémico como la  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa o la proteasa DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV) (Bizzotto et al., 2024). La dipeptidil peptidasa IV es una enzima que tiene efecto en la degradación de incretinas, lo que repercute en la secreción de insulina, síntesis de glucagón y vaciado gástrico. Así, al incrementarse la vida media de estas incretinas, también se incrementa la secreción de insulina, lo que permite tener un efecto benéfico para pacientes diabéticos (Berraquero-García et al., 2023).
- Antitrombóticos: Se trata de péptidos cuyo efecto consiste en la inhibición de la formación de coágulos que puedan obstruir las venas o arterias y que deriven en problemas serios de salud como los infartos o los accidentes cerebrovasculares. Uno de los mecanismos de acción propuestos para que este tipo de BAP actúen de esta manera es la inhibición de la agregación de plaquetas al impedir la unión entre el fibrinógeno y su receptor plaquetario (Mulero Cánovas et al., 2011; T. Zhao et al., 2024).
- Antimicrobianos: se trata de péptidos que presentan propiedades disruptivas contra bacterias u hongos (Bizzotto et al., 2024). Una de las maneras en que los BAP de este tipo inhiben a los microorganismos es al interactuar con el ADN o ARN, impidiendo la división celular o síntesis de proteínas (Mulero Cánovas et al., 2011). Además, se incluyen péptidos antivirales, que afectan la replicación de virus por diversos mecanismos como la inhibición de la penetración de las células del hospedero, la prevención de la formación de partículas de virus maduras, la restricción de la transcripción de su material genético, etc. (Lee et al., 2022).

- **Antioxidantes:** aunque los radicales libres son especies generadas naturalmente en nuestro cuerpo durante los procesos celulares, existen diversos factores que ocasionan un desequilibrio en su producción. Esto puede desencadenar envejecimiento celular y enfermedades (Mulero Cánovas et al., 2011). Así, los péptidos de este tipo reducen el estrés oxidativo en el organismo, pues son capaces de donar electrones y estabilizar estas especies reactivas antes de que interactúen con moléculas presentes en microambientes celulares como la membrana plasmática o el núcleo (Mulero Cánovas et al., 2011); (López-García et al., 2022).
- **Antienvjecimiento:** son péptidos cuya naturaleza les permite retardar el envejecimiento de la piel por distintas vías. Se describen al menos tres mecanismos por los que éstos actúan: péptidos de señal (estimulan fibroblastos), péptidos acarreadores (liberan cofactores enzimáticos para cicatrización), péptidos inhibidores de enzimas (refrenan la actividad de la colagenasa, por ejemplo) (Ngoc et al., 2023). Además, algunos péptidos con actividad antioxidante se incluyen en este apartado (Zhao et al., 2021; Veiga et al., 2023; R et al., 2024).
- **Opioides:** se definen como péptidos que tienen una afinidad por receptores opiáceos teniendo efectos sobre la motilidad intestinal, secreción de hormonas, etc. (Mulero Cánovas et al., 2011). Entre los receptores a los que pueden unirse están los receptores  $\mu$ , que son neuromoduladores de distintas funciones fisiológicas, por lo que generan efectos opioides (Pihlanto-Leppälä, 2002; Herman et al., 2024).

## FUENTES DE BAP

Respecto a las matrices alimentarias de las que se pueden obtener estos compuestos, los alimentos de origen animal como los lácteos, carne, huevo o pescado, son los más estudiados (Park & Nam, 2015; Akbarian et al., 2022). Así, para las fuentes animales, se han reportado péptidos con actividad antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante y opioide, por mencionar algunas. Se ha mencionado que debido al carácter tan versátil de los biopéptidos generados de fuentes animales, se consideran ingredientes de alta importancia para el desarrollo de productos funcionales (Bhat et al., 2015). Por ejemplo, la

producción de BAP a partir de matrices como la carne de res se ha considerado también una manera para aprovechar desechos generados por la industria. Así, productos secundarios como huesos o tejidos que usualmente se descartan o se utilizan para productos de bajo valor, pueden usarse para la generación de péptidos bioactivos (López-Pedrouso et al., 2023). Sin embargo, este tipo de producción no es exclusiva de la res, sino que se ha aplicado también en pollo (patas), cerdo (piel) y demás especies de las que se han derivado péptidos con bioactividades como la antioxidante o la antihipertensiva (Vasconcellos et al., 2024).

## LECHE Y DERIVADOS

Las proteínas de la leche son consideradas como una de las fuentes más importantes de BAP, mostrando actividades beneficiosas sobre el sistema cardiovascular, digestivo, endócrino, entre otros (Marccone et al., 2017).

Su fracción proteica de aproximadamente 32 g/L, es considerada de alta calidad al tomar en cuenta los requerimientos humanos de aminoácidos, su digestibilidad y biodisponibilidad, componiéndose de diversas proteínas que varían en abundancia y características (Pereira, 2014). Se definen dos porciones principales en la proteína de la leche: proteínas del suero —o proteínas solubles— y caseínas, que son insolubles y representan aproximadamente el 80% de la fracción (Séverin & Wenshui, 2005). De acuerdo con Farrell et al. (2004), las proteínas cuya abundancia es mayor al 0.1% en esta matriz alimentaria son  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbumina, albúmina del suero e inmunoglobulina G1.

No obstante, a pesar de los beneficios nutricionales del consumo de la leche de vaca, actualmente se ha optado por desarrollar productos que sustituyan su consumo por diversas razones. Algunas de las principales son la eliminación de productos animales de la dieta o la búsqueda de una opción más sustentable. También se toman en cuenta cuestiones de salud, como las alergias o problemas derivados de su composición. Aunque hoy en día el consumo de leche no se asocia con un mayor riesgo de padecer enfermedades metabólicas, e incluso se ha mencionado que podrían estar inversamente relacionados, la población en general mantiene la opinión de que las grasas lácteas contribuyen a la ganancia de peso y enfermedades cardiovasculares (Insel et al., 2013; Kratz et al., 2013;

Jin & Je, 2021). De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), de 2010 a 2017 el consumo de leche animal decreció 1.5% más que en la década anterior (Steward, 2020).

Así, los productos basados en plantas han ganado relevancia, representando actualmente el 15% de las ventas totales de leche (Johns Hopkins University, 2023).

Las fuentes vegetales de proteína utilizadas para la elaboración de estos productos también son fuentes de BAP, aunque han sido estudiadas en menor medida (Nelson et al., 2016; Marcone et al., 2017).

## LEGUMINOSAS Y CEREALES COMO FUENTES DE BAP

Uno de los aspectos más importantes para el desarrollo de bebidas vegetales análogas a la leche es su composición. Las bases proteicas utilizadas condicionan frecuentemente los beneficios nutricionales del producto, por lo que suelen utilizarse diversas materias primas como cereales (avena), pseudocereales (amaranto), leguminosas (chícharo), nueces (almendra), entre otros (Pérez-Rodríguez et al., 2023).

El chícharo es un alimento rico en proteína, almidón y fibra. Además, es un cultivo no transgénico, es de baja alergenicidad, económico y se deriva de un cultivo sustentable (Shanthakumar et al., 2022). Este vegetal resulta atractivo para la industria de los alimentos, pues además de presentar una serie de propiedades funcionales útiles para el desarrollo de nuevos productos, la proteína de este alimento es considerada de alta calidad. De acuerdo a la *Figura 2*, del 25% que representa la proteína total encontrada en este alimento, el 70-80% corresponde a las proteínas de almacenamiento vicilina, convicilina y legumina (Owusu-Ansah & McCurdy, 1991), las cuales son fuentes de péptidos bioactivos (Kumar et al., 2022). En un estudio efectuado por (Asledottir et al., 2023), se concluyó que la proteína de chícharo muestra propiedades inmunomoduladoras tras haber sido sometida a un tratamiento enzimático que simulaba la digestión gastrointestinal humana *in vitro*.

Por otra parte, el amaranto también es utilizado para la elaboración de bebidas vegetales por su contenido proteico. Éste es un cultivo mexicano de alto valor nutricional, rápido crecimiento, tolerancia a condiciones extremas y tiene habilidad para crecer en tierra baja en nutrientes (Valenzuela & Segura, 2022). Su

fracción proteica representada en la *Figura 2* consta de un 15.6% y está compuesta principalmente por albúminas y globulinas, por lo que ha sido estudiado como fuente de BAP (Taniya et al., 2020; Hadidi et al., 2024). Entre las bioactividades estudiadas para los hidrolizados y péptidos derivados de esta proteína, está la antioxidante, la cual se ha presentado en diversas especies de amaranto. *Amaranthus hypochondriacus* es una especie originada en México y la parte central de Estados Unidos, la cual también ha sido atribuida con bioactividades como la antitrombótica o la antidiabética (Zhu, 2023; North Carolina State University, 2024).

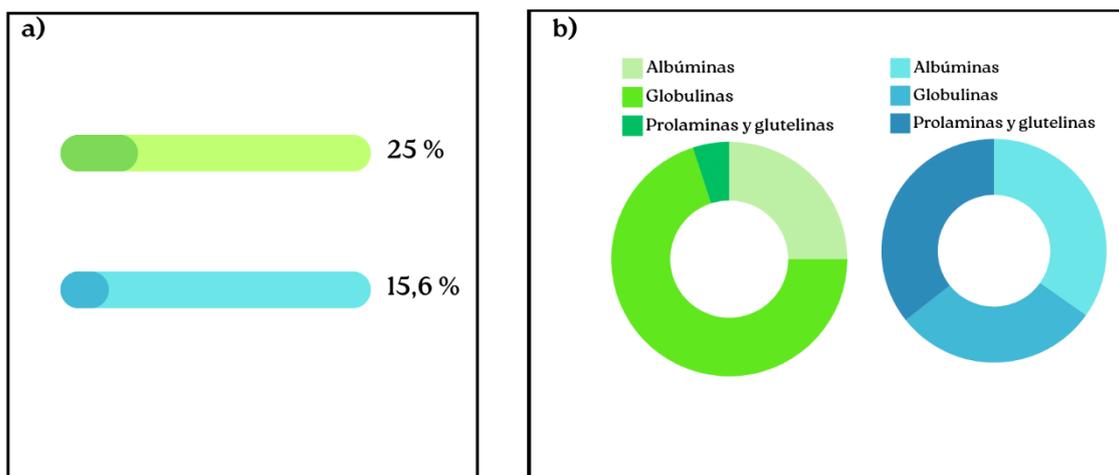


Figura 2. a) Porcentaje de proteína en *Pisum sativum* (verde) y *Amaranthus hypochondriacus* (azul). b) Fracción proteica correspondiente a albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas en *Pisum sativum* (verde) y *Amaranthus hypochondriacus* (azul). Fuentes: Owusu-Ansah & McCurdy (1991), Emkani et al. (2023), Hadidi et al. (2024).

## OBTENCIÓN DE BAP

En cuanto a la obtención de estos compuestos, algunos se encuentran naturalmente disponibles en matrices alimentarias, pero la mayoría están encriptados en la estructura de las proteínas y se liberan principalmente por procesos enzimáticos, como la digestión (Sánchez & Vázquez, 2017). Así, bajo condiciones de pH y temperatura controladas, suelen utilizarse enzimas digestivas como la pepsina, tripsina o quimotripsina para la producción de BAP. Este es el tipo de producción más utilizado ya que, a diferencia de otros métodos como la hidrólisis microbiana o mediante el uso de ácidos/bases, presenta mayor especificidad, condiciones suaves y no usa reactivos tóxicos (Ulug et al., 2021). De esta forma, dependiendo del tipo de enzima que se utilice, serán los péptidos que se lograrán obtener. Por ejemplo, la tripsina (E.C. 3.4.21.4), cuenta con sitios

de corte en lisina (K) y arginina (R); la pepsina (E.C. 3.4.23.1), corta en fenilalanina (F) y leucina (L); y la quimotripsina (E.C. 3.4.21.2), tiene sitios de corte en leucina (L), tirosina (Y), prolina (P), metionina (M), triptófano (W), ácido glutámico (E), glutamina (Q) y asparagina (N) (Minkiewicz et al., 2019; Chang et al., 2021).

La fermentación microbiana emplea hidrolasas bacterianas para degradar las proteínas. Algunas de las bacterias aprovechadas para este método son las pertenecientes al orden *Lactobacillales*, entre las cuales están *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus delbruekii*, que tienen sistemas proteolíticos con dipeptidasas, endopeptidasas, etc. (Akbarian et al., 2022). Por otra parte, la producción química utiliza ácidos o bases para degradar los enlaces de la proteína y así liberar los péptidos. Este último método puede ser menos costoso que los anteriores, sin embargo, resulta difícil controlar la hidrólisis (obteniendo hidrolizados variables) y se ha visto que presentan menores cualidades nutricionales que los BAP obtenidos por otras vías (Ulug et al., 2021).

#### MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE BAP

El estudio de los BAP puede hacerse a través de métodos tradicionales, pero suele tomar largos periodos de tiempo y ser costoso (Tu, Cheng, et al., 2018), por lo que generalmente se basa en dos etapas: la etapa *in silico* y la etapa *in vitro*. Los ensayos *in silico* se basan en métodos computacionales que permiten investigar la probabilidad de obtener BAP a partir de una proteína utilizando bases de datos y otras herramientas de análisis informático para proponer la funcionalidad de estas secuencias (Moore, 2021). Entre otras cosas, parámetros como A (frecuencia con la que se encuentran fragmentos bioactivos en una proteína) y  $DH_t$  (grado teórico de hidrólisis proteica con enzimas específicas) son calculados (Minkiewicz et al., 2019).

La bioactividad de los compuestos debe aportar beneficios a la salud y excluir efectos dañinos (Möller et al., 2008). Por ello, también se estudia bioinformáticamente la seguridad de los compuestos. Esto se hace a través de un análisis ADMET (sigla anglófona usada para referirse a la absorción química, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de un compuesto) al que se somete frecuentemente a los fármacos.

Entre las pruebas que se hacen para conocer la absorción del compuesto una muy utilizada es la Regla de los 5 (*The Rule of 5*), herramienta propuesta por Lipinski et al. (2001) que se basa en cuatro parámetros —cuyos valores son cercanos a 5 o múltiplos de 5— que permiten conocer si el compuesto presentará una absorción pobre o no. Éstos son: masa molecular < 500 kDa, grupos donadores de hidrógeno (NH y OH) < 5.0, aceptores de hidrógeno (N u O) < 10.0, LogP (lipofilidad expresada como la proporción de solubilidad en octanol entre la solubilidad acuosa) < 5.0.

Aunado a esta herramienta, también se evalúa la permeabilidad en células Caco-2, las cuales son utilizadas por presentar una permeabilidad muy parecida a la de los enterocitos humanos (N.-N. Wang et al., 2016). Como una tercera evaluación se tiene la absorción intestinal humana (HIA por sus siglas en inglés), que nos permite conocer más acerca de la permeabilidad y absorción de los compuestos en el tracto gastrointestinal (N.-N. Wang et al., 2017).

El volumen de distribución ( $v_d$ ) del compuesto en el cuerpo, el cual no se refiere a un volumen medible, sino al equilibrio establecido entre la proporción de compuesto en el plasma sanguíneo y la cantidad total de compuesto en el cuerpo. Este parámetro depende de distintos factores, como el carácter lipofílico o hidrofílico del compuesto. Su relevancia radica en que a través de él puede calcularse la dosis inicial adecuada de un fármaco, además de que se da una idea de la distribución del compuesto de la sangre a los tejidos (Nnane, 2005).

Para la excreción se utiliza el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) estimando el periodo en el que un compuesto reduce su concentración a la mitad en la circulación sanguínea (Kerns & Di, 2008).

Finalmente, uno de los parámetros más importantes en el estudio de estos compuestos es la toxicidad aguda, cuya relevancia radica en proveer información sobre la dosis segura del compuesto y su habilidad para provocar toxicidad aguda (Pawar et al., 2023).

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

La obtención de los parámetros anteriores se facilita a través de herramientas bioinformáticas que hacen uso de un lenguaje de notación química denominado SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*). Éste es específico para uso en cómputo y designa estructuras moleculares únicas a cada compuesto a

través de reglas simples, permitiendo su reconocimiento en las bases de datos (Weininger, 1988). Los sistemas de bases de datos desarrollados gracias a los avances de la bioinformática son cruciales en este tipo de análisis, pues proveen información acerca de los péptidos bioactivos que pueden encontrarse en proteínas alimentarias, aunque también permiten conocer detalles acerca de las proteasas utilizadas para liberar estos péptidos (Langyan et al., 2021). Una de las bases de datos más utilizadas es BIOPEP, la cual contiene información sobre diferentes grupos de sustancias como proteínas, péptidos bioactivos, proteínas alérgicas, etc. Esta herramienta permite encontrar secuencias bioactivas en las proteínas, estimar valores de parámetros que describen el carácter bioactivo de los péptidos y simular proteólisis, por ejemplo (Iwaniak et al., 2024).

### PRUEBAS *IN VITRO*

El término *in vitro*, originado del latín, hace referencia a estudios que se llevan a cabo en laboratorios, donde se monta un ambiente artificial y se experimenta fuera de organismos vivos (Jain et al., 2018). A pesar de que las técnicas utilizadas no permiten tomar en cuenta procesos biológicos en los análisis como la interacción entre células, tejidos o sistemas, son bastante útiles y capaces de proveer inferencias adecuadas sobre el tema estudiado (Schlesinger & Gardner, 2014; Jain et al., 2018). Así, los ensayos *in vitro* suelen utilizarse ampliamente en diversas ciencias como la biología, química, medicina, etc.

Este tipo de ensayos se utiliza de manera conjunta con los análisis *in silico* para confirmar los resultados obtenidos bioinformáticamente (Minkiewicz et al., 2022). Es muy amplia la variedad técnicas y experimentos *in vitro* que se llevan a cabo como validación, pues dependen de los objetivos del estudio que se esté desarrollando (Ediriweera et al., 2019). De esta forma, los análisis *in silico* con validación *in vitro* se han utilizado en una gran variedad de estudios. Xu et al. (2023) condujo una investigación con ambas etapas, donde se buscaban compuestos que tuvieran efecto sobre la polimerasa del virus sincitial respiratorio. Por su parte, Q. Zhu et al. (2023) desarrolló el estudio de una firma génica de 5 genes para predecir la incidencia de cáncer de colon. En el área de los péptidos bioactivos también varios estudios han sido efectuados. Por ejemplo, Xiao et al. (2022) estudió biopéptidos con potencial antioxidante obtenidos del pollo.

Así, en la constante búsqueda de la población por opciones más saludables, sostenibles y funcionales para la dieta, los BAP representan una alternativa. Es por ello que resulta indispensable estudiar su generación y caracterizarlos para su futura aplicación en la dieta.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar biopéptidos generados por digestión enzimática de las principales proteínas de la leche de vaca y de fuentes alternativas de proteína (*Pisum sativum* y *Amaranthus hypochondriacus*) utilizadas en la elaboración de bebidas vegetales análogas a la leche, para comparar su actividad biológica y evaluar sus potenciales efectos a la salud mediante ensayos *in silico* e *in vitro*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener la secuencia de aminoácidos de las principales proteínas contenidas en las matrices alimentarias de interés (leche de vaca y bebidas vegetales con proteína de chícharo y amaranto respectivamente) a partir de la búsqueda en bases de datos.
- Predecir y caracterizar los posibles péptidos bioactivos generados por digestión enzimática a partir de las proteínas de interés mediante técnicas bioinformáticas, para seleccionar las principales bioactividades.
- Evaluar *in silico* las características de absorción, metabolismo y excreción de los péptidos generados para predecir su eficacia, seguridad y viabilidad como medicamentos o productos biológicos.
- Comprobar los resultados bioinformáticos mediante ensayos *in vitro* para obtener fracciones proteicas con la actividad biológica de interés.
- Comparar la actividad de los biopéptidos obtenidos de proteína animal y de las fuentes vegetales para estimar los posibles beneficios a la salud asociados al consumo de estos alimentos.

## METODOLOGÍA

Reactivos y materiales: Las muestras de leche utilizadas fueron aislados de proteína comerciales (caseína FudTech®, proteína del suero Nutrical®) también se utilizó proteína de chícharo comercial Nature's Blessings®. La quimotripsina C ( $\geq 40$  U/mg), enzima convertora de la angiotensina ( $\geq 2.0$  U/mg) y péptido hipuril-histidil-leucina (HHL) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich®. El Captopril usado como control positivo en la prueba ACEI fue comprado en la Farmacia del Ahorro®. Adicionalmente, se utilizaron tubos Vivaspin Turbo 15 marca Sartorius® con MWCO de 10 y 5 kDa para filtrar las fracciones peptídicas y una cámara de electroforesis MiniProtean Tetra Cell marca BioRad®.

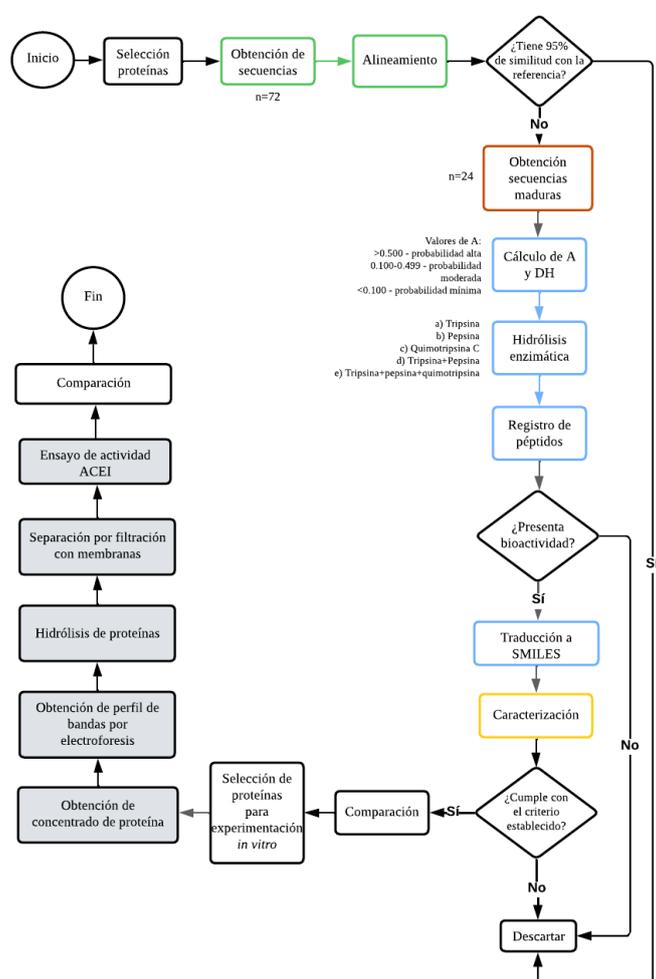


Figura 3. Metodología empleada en el análisis. Recuadro verde—operaciones hechas en UNIPROT; recuadro azul—operaciones hechas en BIOPEP; recuadro amarillo—operaciones en ADMETlab 2.0; recuadro naranja—operaciones en otras herramientas bioinformáticas; recuadro negro—sin uso de herramientas bioinformáticas; recuadros con relleno gris — actividades experimentales.

La metodología utilizada para este trabajo comenzó al seleccionar las proteínas de almacenamiento más abundantes de las especies de estudio: chícharo (*Pisum sativum*), amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y la leche de vaca (*Bos taurus*) con base en la literatura (Owusu-Ansah & McCurdy, 1991; Farrell et al., 2004; Parodi, 2007; Luna-Suárez et al., 2010; Hadidi et al., 2024)

Posteriormente, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de cada proteína utilizando la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (Bateman et al., 2025), incluyendo todas las variantes reportadas con secuencia completa y priorizando las curadas por la base de datos. Aquellas variantes de la misma proteína con más del 95% de similitud con la secuencia de referencia (la secuencia completa curada por la base de datos) se tomaron como la misma, y por tanto no se incluyeron en los siguientes análisis. Las secuencias resultantes se analizaron con SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) (Almagro Armenteros et al., 2019) para identificar y descartar el péptido señal y obtener la secuencia madura. Posteriormente, éstas se sometieron a un análisis *in silico* basado en la metodología propuesta por Iwaniak et al. (2020) con algunas modificaciones para conocer su potencial como fuentes de BAP y en dado caso, caracterizar los péptidos bioactivos generados.

El valor A de una secuencia proteica hace referencia a la frecuencia con la que se encuentran péptidos bioactivos en ella. Éste fue calculado a través de la ecuación 1 y se determinó en BIOPEP (Minkiewicz et al., 2019) disponible en <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>. Para ello se utilizó el comando de trabajo: BIOPEP-UWM Virtual→Analysis→Calculations→For your sequence→[Pegar secuencia de aminoácidos]→Report..

$$A = \frac{a}{N} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde,

*a*: número de fragmentos con bioactividad en la secuencia de una proteína.

N: número de residuos en la proteína.

Haciendo uso de esta misma herramienta se realizó la hidrólisis *in silico* con las proteasas seleccionadas: tripsina, pepsina, quimotripsina C. Adicionalmente se evaluaron 2 modelos de digestión: tripsina y pepsina (digestión gástrica simplificada), y tripsina, pepsina y quimotripsina C (modelo de digestión gástrica). Para conocer el grado teórico de hidrólisis con las enzimas utilizadas, se calculó el valor  $DH_t$  con la ecuación reportada por Iwaniak et al. (2020):

$$DH_t = \frac{d}{D} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde,

$d$ : número de enlaces peptídicos hidrolizados.

$D$ : número total de enlaces peptídicos en una cadena proteica.

El análisis posterior se centró sólo en aquellos péptidos que mostraron bioactividad. Para poder ser introducidos en la base de datos utilizada para la caracterización, los péptidos fueron traducidos al lenguaje SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) utilizando BIOPEP.

La caracterización bioinformática se hizo en ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) (Xiong et al., 2021) y se basó en los 6 criterios establecidos en la

Tabla 1. Es importante mencionar que el valor del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) fue calculado en horas a través de la Ec. 3 (Kerns & Di, 2008), a partir de los valores de  $v_d$  y CL proporcionados directamente por el software.

$$t_{1/2} = 0.693 \frac{v_d}{CL} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde,  $v_d$ : volumen de distribución del compuesto.

CL: depuración, también llamado *clearance*.

Finalmente, los BAP que cumplieron con todos los valores deseados o, en su caso, 3 de 4 parámetros, fueron aceptados y usados para comparar las matrices

alimentarias en términos de péptidos bioactivos y concluir respecto a su bioactividad.

Tabla 1. Parámetros establecidos y valores adecuados según ADMETlab 2.0 para la caracterización de los péptidos bioactivos.

<b>Parámetro</b>	<b>Información que provee</b>	<b>Valores aceptables según Minkiewicz et al. (2019)</b>
Regla de los 5	Absorción del compuesto por sus propiedades químicas.	Peso molecular (PM) ≤ 500 kDa, LogP ≤ 5, aceptores de H ≤ 10, donadores de H ≤ 5
Permeabilidad de células Caco-2	Permeabilidad del compuesto en células Caco-2, muy similares a los enterocitos humanos.	> -5.15 log cm/s
Absorción intestinal humana (HIA)	Absorción intestinal del compuesto.	> 30%
Volumen de distribución ( $V_d$ )	Equilibrio establecido entre la proporción de compuesto en el plasma sanguíneo y la cantidad total de compuesto en el cuerpo.	0.04-20 L/kg
Tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ )	Tiempo en el que un compuesto reduce su concentración a la mitad en la circulación sanguínea.	< 3 h
Toxicidad aguda en ratas	Toxicidad oral aguda en ratas que permite evaluar la seguridad de su consumo.	> 500 mg/kg

## METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES

### **Obtención de fracciones proteicas de las fuentes de estudio**

Las proteínas del suero de la leche y caseínas fueron trabajadas a partir de concentrados comerciales, por lo que únicamente se desarrolló un procedimiento experimental para obtener la fracción proteica vegetal a partir de proteína de chícharo comercial.

El concentrado de proteína de chícharo fue preparado a partir de la proteína de chícharo comercial con base en el procedimiento descrito por Adewole et al. (2024) con ligeras modificaciones. Con el fin de eliminar componentes como el almidón y la fibra de la proteína comercial (Hedieh Alavi Talab, 2018), una disolución 1:5 de la proteína comercial se sometió a agitación por 3 h a pH 8.0. Esta disolución se centrifugó (con equipo IEC Model CL, International Equipment Company, EUA) a 5000 rpm por 20 min para finalmente recuperar el sobrenadante y precipitar la proteína soluble a través de la disminución del pH a 4.5 con HCl. Posteriormente se centrifugó con las condiciones antes descritas, obteniendo un pellet de proteína de chícharo. La cantidad de proteína en el pellet fue determinada por el método de Biuret (Iturbe & Sandoval, 2013).

### **Visualización del perfil de proteínas por SDS-PAGE**

Para el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) en condiciones desnaturalizantes se cargaron 150 µg de proteína disueltos en buffer de carga con β-mercaptoetanol en geles de poliacrilamida al 12% según lo descrito por (Laemmli, 1970) en una cámara MiniProtean Tetra Cell.

### **Obtención de los hidrolizados de proteína**

#### **Optimización de condiciones de hidrólisis**

Para todas las fracciones proteicas, el procedimiento seguido para la hidrólisis enzimática es el descrito por Adewole et al., 2024 con modificaciones. Se sometieron a tratamiento 25 mL de una disolución de proteína a 10 mg/mL utilizando quimotripsina C en una relación 1:400 (E:S). En los tiempos 0, 1, 2 y

4 h, se tomaron muestras de la mezcla de reacción para determinar el tiempo óptimo de hidrólisis de las proteínas.

### **Determinación de grado de hidrólisis**

Se determinó el grado de hidrólisis experimental ( $DH_e$ ) con base en lo descrito por Adewole et al. (2024). Así, se mezclaron volúmenes equivalentes (2 mL) de los hidrolizados al tiempo  $n$  con una disolución de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Las disoluciones se dejaron reposar por 30 minutos en un baño de hielo y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos. Finalmente, se determinó el contenido de proteína soluble por el método de Biuret directamente a la mezcla (proteína total) y al sobrenadante luego de la precipitación con TCA (proteína soluble en TCA) de acuerdo con lo descrito por (Iturbe & Sandoval, 2013).

Estos valores permitieron calcular el grado de hidrólisis experimental ( $DH_e$ ) al tiempo  $n$  a través de la ecuación 4:

$$DH_e (\%) = \frac{\text{Proteína soluble en TCA}}{\text{Proteína total}} 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

### **Separación por filtración con membranas (MWCO 5 y 10 kDa)**

Para separar las fracciones obtenidas en los hidrolizados proteicos en función a su peso molecular se utilizaron tubos Vivaspin® Turbo 15 con MWCO de 5 y 10 kDa respectivamente. Las muestras de los hidrolizados se ajustaron a una concentración de proteína de 3 mg/mL, se cargaron en los tubos con MWCO de 10 kDa y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 minutos (solo el chicharo se centrifugó 10 min). Se reservó la fracción >10 kDa y la fracción <10 kDa se cargó en los tubos con MWCO de 5 kDa. Estos tubos fueron centrifugados a 6000 rpm durante 35 minutos y las fracciones >5 kDa y <5 kDa se reservaron. Previo a su uso para el análisis de actividad ACEI, se determinó la concentración en mg/mL de proteína de cada fracción por midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm y aplicando la ecuación siguiente a partir del método de Warburg & Christian (1941):

$$[\text{proteína}] = (1.55 \cdot Abs_{280}) - (0.76 \cdot Abs_{260}) \quad (\text{Ec. 5})$$

## Ensayo de actividad ACEI

La metodología utilizada para este ensayo fue la descrita por Darwish et al. (2024) con modificaciones. La mezcla de reacción se preparó con el volumen equivalente a 0.01 mg de proteína de la disolución filtrada de la muestra aforando a 20 uL, 10 µL de disolución de ACE y 50 µL de una disolución 8 mM del péptido hipuril-histidil-leucina. La reacción se dejó incubar por 1 h a 37 °C para posteriormente ser detenida con 62.5 µL de HCl 1 N. Durante esta reacción se busca que la enzima actúe sobre el péptido, generando el dipéptido HL y ácido hipúrico, el cual será cuantificado de manera espectrofotométrica (Cushman & Cheung, 1971).

El ácido hipúrico formado se extrajo por triplicado con 375 uL de acetato de etilo, el cual finalmente se dejó evaporar durante una noche. Posteriormente se hizo una resuspensión en 700 uL de agua desionizada y se midió su absorbancia a 228 nm. Simultáneamente fueron preparados el blanco de reacción y el blanco de muestra sustituyendo con buffer de fosfatos pH 8.3 la disolución ACE y la muestra, respectivamente. El control positivo se preparó de la misma forma, sustituyendo el hidrolizado proteico por una solución de Captopril 80 nM.

El porcentaje de inhibición se calculó por medio de:

$$\frac{(Abs\ muestra - Abs\ blanco\ de\ rx)(5.6E-3)}{(Abs\ blanco\ de\ muestra - Abs\ blanco\ de\ rx)(5.6E-3)} \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde el factor  $5.6 \times 10^{-3}$  se deriva de:  $\epsilon_{228}$  ácido hipúrico:  $9.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; la fracción de ácido hipúrico extraído: 0.91; la fracción transferida de acetato de etilo extraído: 0.67; el tiempo mínimo de incubación: 30 min.

### Análisis estadístico

Se efectuó en Excel un análisis estadístico ANOVA de un solo factor a los resultados obtenidos para la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I de cada una de las fracciones. Como análisis posterior, se realizó la prueba de Tukey en R con los paquetes Tidyverse y Ggplot2 para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Selección de proteínas y obtención de secuencias de aminoácidos

La selección de proteínas de almacenamiento de cada matriz alimentaria con las que se trabajaría se realizó a partir de una búsqueda bibliográfica para identificar las proteínas más abundantes de cada fuente (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas de almacenamiento seleccionadas y su abundancia en la fracción proteica de cada matriz alimentaria.

Matriz alimentaria	Proteínas (proporción)	Referencia
Amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> )	Albúminas (11-52%), globulinas (16-51%): 11S.	(Barba de la Rosa et al., 1992; Luna-Suárez et al., 2010; Hadidi et al., 2024)
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )	Globulinas (65-80%): vicilina, convicilina, legumina.	(Owusu-Ansah & McCurdy, 1991)
Leche de vaca ( <i>Bos taurus</i> )	Caseínas (80%): $\alpha_{s1}$ , $\alpha_{s2}$ , $\beta$ , $\kappa$ ; proteínas del suero (20%): albúmina, $\alpha$ -lactalbúmina, $\beta$ -lactoglobulina.	(Séverin & Wenshui, 2005)

Se realizó la búsqueda de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas en UniProt, obteniéndose 72 secuencias considerando las variantes de cada proteína. En el caso del amaranto, no están reportadas las secuencias para las albúminas ni en ésta, ni en otras bases de datos, por lo que sólo se trabajó con la globulina 11S. No obstante, su análisis sigue siendo relevante porque la amarantina (globulina 11S) es la proteína de almacenamiento predominante en este pseudocereal (Luna-Suárez et al., 2010).

### Estimación bioinformática de bioactividad de las proteínas de interés por el parámetro A

Las 72 secuencias obtenidas en su forma madura, es decir, sin péptido señal se sometieron, al análisis *in silico* para determinar en primer lugar, su valor de A que permite conocer la probabilidad de que la secuencia sea fuente de péptidos

bioactivos. En las figuras 4, 5 y 6 se presenta el promedio obtenido para cada proteína y las posibles bioactividades estimadas por BIOPEP.

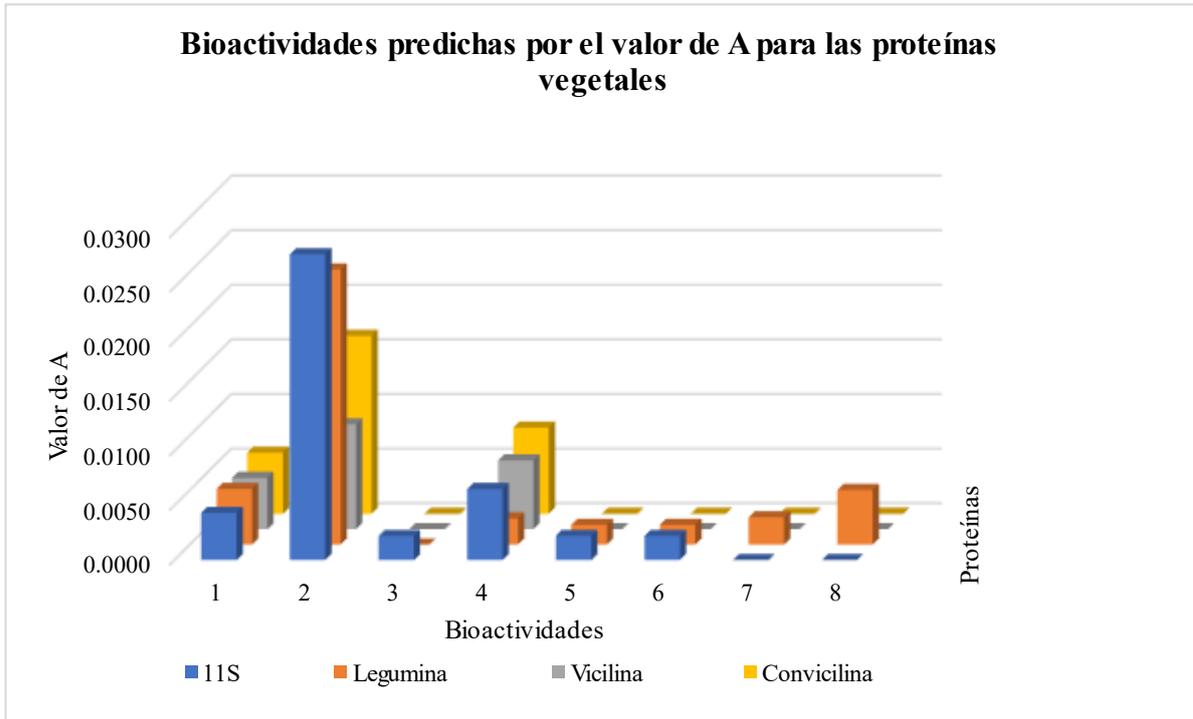


Figura 4. Gráfico de posibles bioactividades para las proteínas vegetales conforme a su valor A. Los números en el eje x indican la posible actividad de los péptidos: 1-ACEI, 2-antiviral, 3-supresor de amargor, 4-inhibidor de calpaína-1, 5-inhibidor de dipeptidil peptidasa IV, 6-inhibidor de XIAP, 7-anticáncer, 8-inhibidor de ciclooxigenasa-2. Proteínas: 11S (*Amaranthus hypochondriacus*), legumina, vicilina y convicilina (*Pisum sativum*).

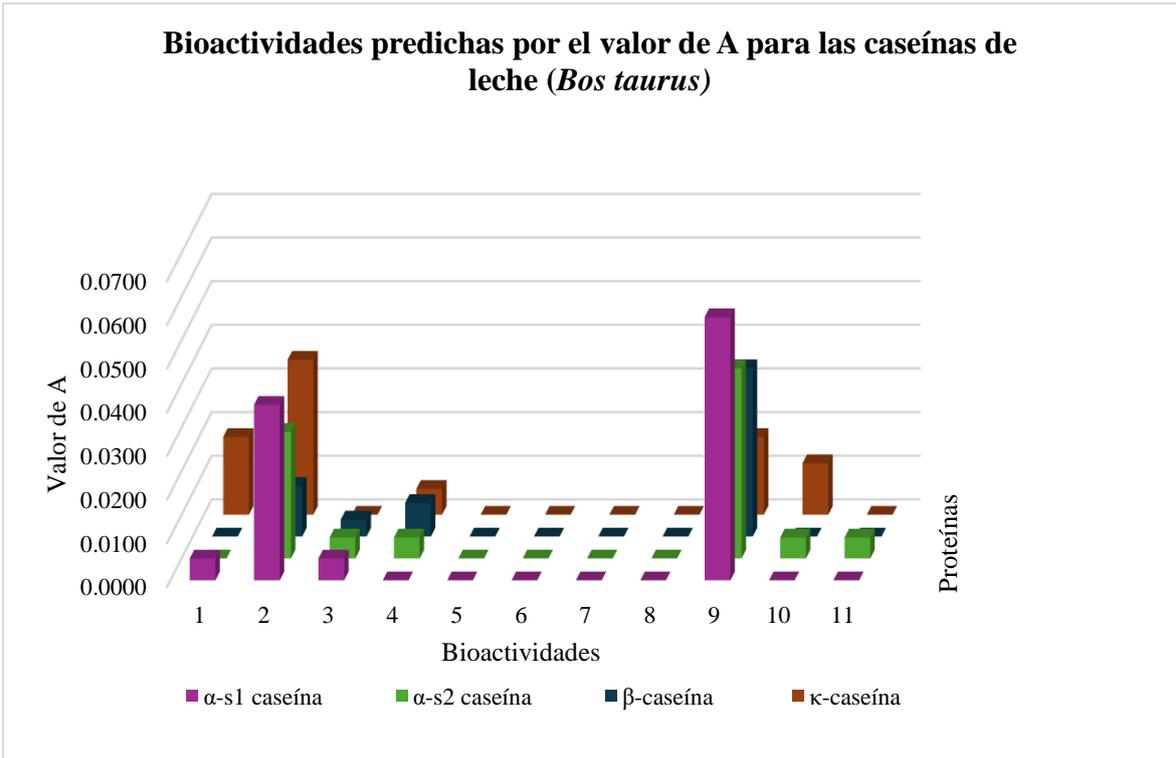


Figura 5. Gráfico de posibles bioactividades para las caseínas de leche de vaca conforme a su valor A. Actividad de péptidos: 1-ACEI, 2-antiviral, 3-supresor de amargor, 4-inhibidor de calpaína-1, 5-inhibidor de dipeptidil peptidasa IV, 6-inhibidor de XIAP, 7-anticáncer, 8-inhibidor de ciclooxigenasa-2, 9-antitrombótico, 10-antioxidante, 11-inhibidor de furina.

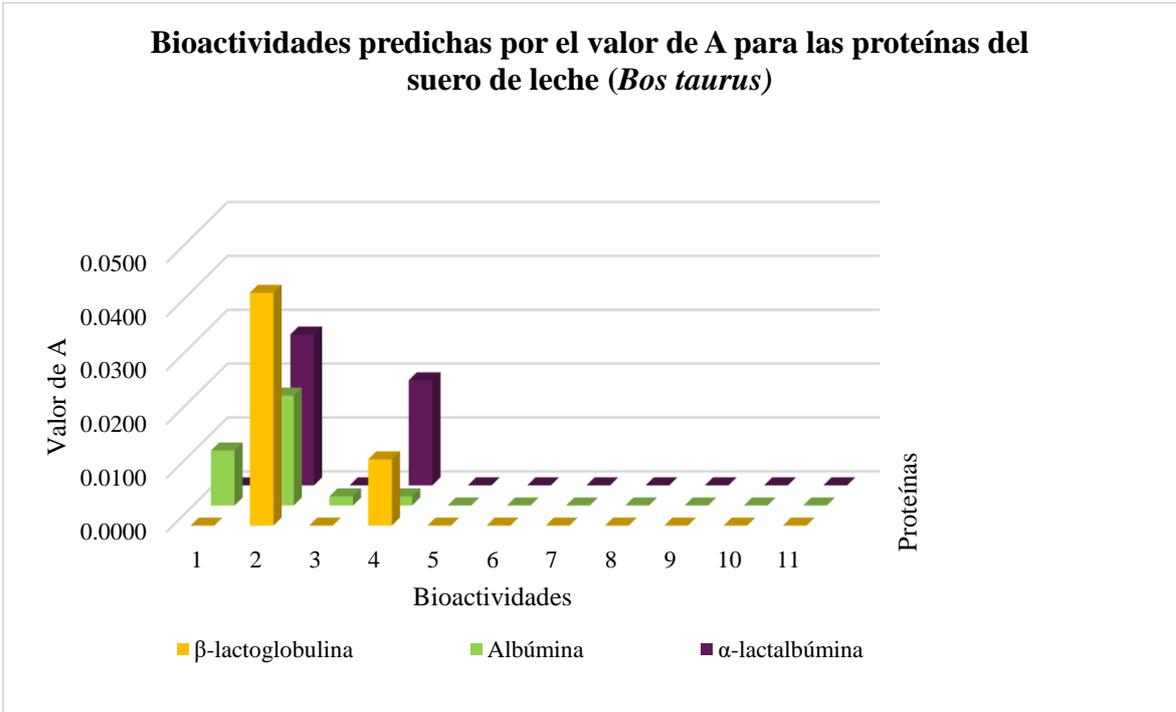


Figura 6. Gráfico de posibles bioactividades para las proteínas del suero de leche de vaca conforme a su valor A. Actividad de péptidos: 1-ACEI, 2-antiviral, 3-supresor de amargor, 4-inhibidor de calpaína-1, 5-Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV, 6-inhibidor XIAP, 7-anticáncer, 8-inhibidor ciclooxigenasa-2, 9-antitrombótico, 10-antioxidante, 11-inhibidor de furina.

Según lo que se observa en las figuras 4 a 6 y con base en lo descrito por Iwaniak et al. (2020) todos los valores de A obtenidos fueron denominados como menores<sup>1</sup>. A pesar de esto, su estudio continúa siendo relevante, pues existen otros reportes en los que se han detectado BAP para varias muestras (caseínas; leguminas de calabaza, avena, soya, arroz; entre otras) y solo en casos excepcionales se cuenta con valores mayores a 0.1 (Dziuba et al. 2003). Respecto a los gráficos presentados anteriormente, es observable que la bioactividad prominente en todas las proteínas analizadas es la antiviral, siendo la  $\beta$ -lactoglobulina la que reporta mayor valor con 0.0432. Esto resulta atractivo hoy en día tras la reciente pandemia, dado que los péptidos han demostrado efectos preventivos y terapéuticos contra diversos coronavirus (Rani et al., 2022).

En cuanto a la comparación entre matrices vegetales y animales, en promedio las proteínas vegetales presentan mayor número de bioactividades. De hecho, de todas las proteínas analizadas, la legumina es la que más bioactividades tiene, con 7 distintas. Esto resulta interesante, ya que a pesar de que las fuentes animales de BAP son las más estudiadas, recientemente se han considerado con mayor detenimiento a los cereales y las legumbres como fuentes principales de BAP (Montesano et al., 2020). No obstante, la  $\alpha_{s2}$ -caseína muestra casi la misma cantidad de bioactividades, presentando 6.

Aunque existen algunas bioactividades comunes entre ambos tipos de matrices, ciertamente también existen diferencias. Por ejemplo, las proteínas vegetales presentaron actividades como inhibidores de dipeptidil peptidasa IV, inhibidores de XIAP, anticáncer, inhibidores de ciclooxigenasa-2 que no presentó ninguna de las proteínas lácteas. Por su parte, las de origen animal presentaron bioactividades como la antitrombótica, antioxidante e inhibidores de furina. En este sentido, comienza a elucidarse que los efectos del consumo de cada bebida (leche de vaca o bebidas vegetales) tiene impactos distintos en la salud. Esto coincide con la literatura, pues derivados de la leche de vaca se reportan mayormente péptidos antioxidantes y antitrombóticos, por ejemplo (Marcone et

---

<sup>1</sup> Iwaniak et al. (2020) denomina como *altos* a los valores de A mayores a 0.500; *moderados*, 0.100-0.499 y *menores*, 0.000-0.099.

al., 2017). Por su parte, para el chícharo y el amaranto se reportan bioactividades como la antihipertensiva, antiviral, antidiabética (asociada a la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV, la cual se encarga de destruir incretinas necesarias para la producción de insulina) (Giugliano et al., 2013; J. Wang et al., 2022; Zhu, 2023).

Así, esta primera aproximación a las bioactividades de las proteínas de interés se toma como referencia, pero debe estudiarse más a fondo a través de otros análisis bioinformáticos como la hidrólisis para evaluar de manera más certera a los péptidos generados de cada fuente.

### **Determinación *in silico* del grado teórico de hidrólisis**

Posteriormente, se calculó el valor de DHt, el cual hace referencia al grado teórico de hidrólisis de la proteína con las enzimas seleccionadas. Con base en Durand et al. (2021), se considera un valor bajo de DH si es <10% y un valor alto si es mayor a 10%. Como se trabajó con múltiples variantes de una misma proteína, los valores de DHt mostrados en la Figura 7 y Figura 8 son el promedio de todos los resultados obtenidos para esa proteína.

El mayor grado de hidrólisis se obtuvo con quimiotripsina C, proteasa que hidroliza en el extremo -C de los aminoácidos aromáticos; y con el modelo de digestión que hace uso de quimiotripsina, tripsina y pepsina. Para algunas combinaciones proteína-proteasa no se reportaron valores de hidrólisis, por lo que el DHt se reporta como cero. Esto se debe a la especificidad que tienen las proteasas; por ejemplo, se reporta que la quimiotripsina C puede hacer cortes en 7 posiciones (L, Y, P, M, W, N, Q), mientras que la tripsina solo en 2 (K, R) (Minkiewicz et al., 2019; BRENDA, 2023). Así, debido a su menor especificidad, y a que genera un mayor número de cortes, los valores de DHt para quimiotripsina son mayores a los de tripsina y pepsina en todos los casos. Esta misma tendencia es observada en otros trabajos, tal como el caso de León-Espinosa et al. (2021), donde se hidroliza *in silico* albúmina bovina sérica con pepsina y quimiotripsina, generándose más de 100 péptidos con ésta última enzima y 96 con pepsina.

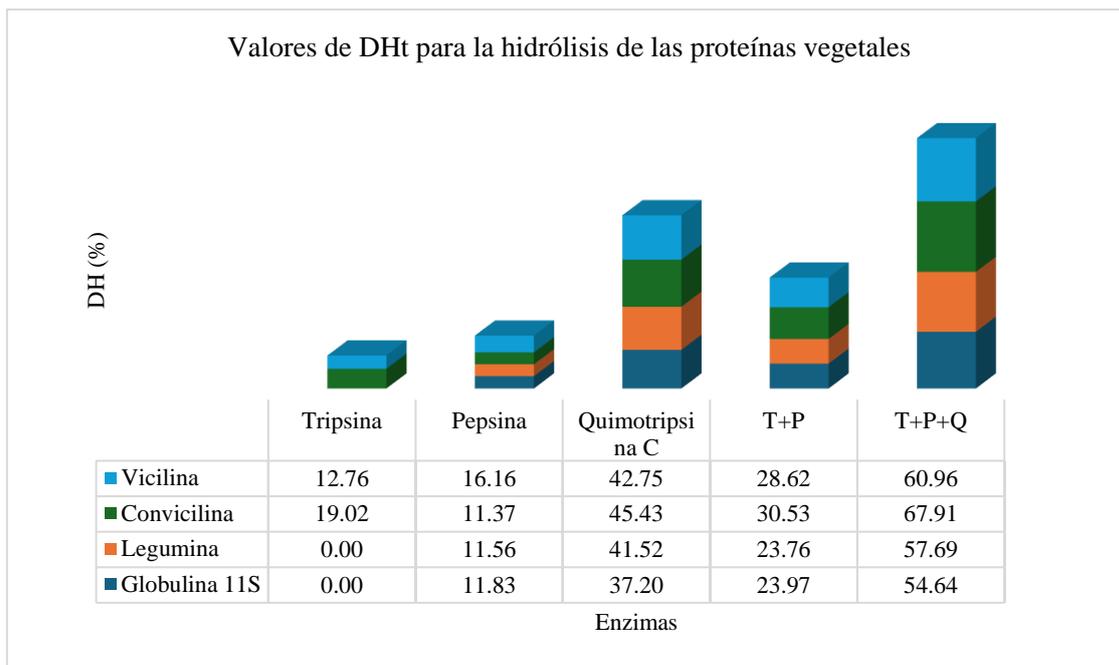


Figura 7. Valores de DHt (%) para las proteínas de origen vegetal con distintas enzimas. Enzimas: T+P (tripsina y pepsina), T+P+Q (tripsina, pepsina y quimotripsina C). Proteínas: *Pisum sativum*-vicilina, convicilina y legumina; *Amaranthus hypochondriacus*-globulina 11S.

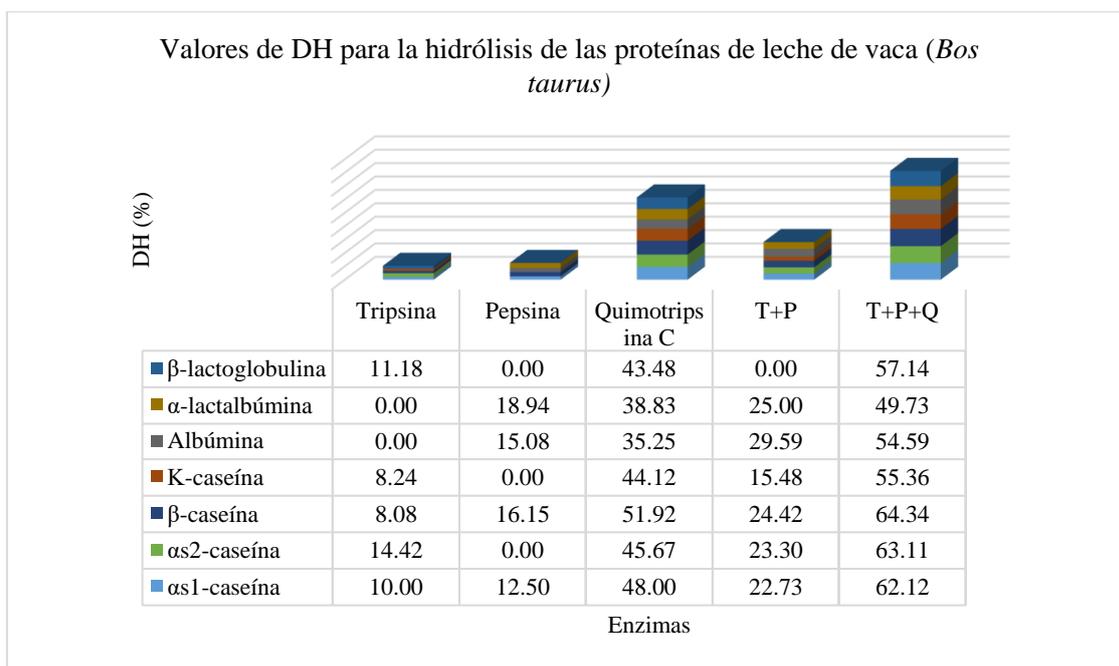


Figura 8. Valores de DHt (%) para las proteínas de origen animal (*Bos Taurus*) con distintas enzimas. Enzimas: T+P (tripsina y pepsina), T+P+Q (tripsina, pepsina y quimotripsina C).

## Evaluación *in silico* de la generación de biopéptidos a partir de las proteínas de interés

Con la hidrólisis enzimática *in silico* se generaron diversos péptidos a partir de cada proteína, de los cuales solo algunos tenían bioactividad según BIOPEP. La base de datos puede estimar la probabilidad de las proteínas de ser precursores de BAP con base en 3 criterios: su valor de A, el valor B (*potencial de bioactividad de una proteína*) o el *perfil de actividad biológica potencial*, que se refiere al tipo y localización de fragmentos bioactivos en una proteína (Minkiewicz et al., 2019). Las figuras 9 a 19 muestran la cantidad de péptidos bioactivos obtenidos tras la hidrólisis con cada enzima, además de detallar la actividad que éstos presentan. La cantidad total de péptidos generados en cada proteólisis se muestran en paréntesis en el eje x. En primera instancia se muestran los resultados de las proteínas vegetales (Figura 9 a Figura 12).

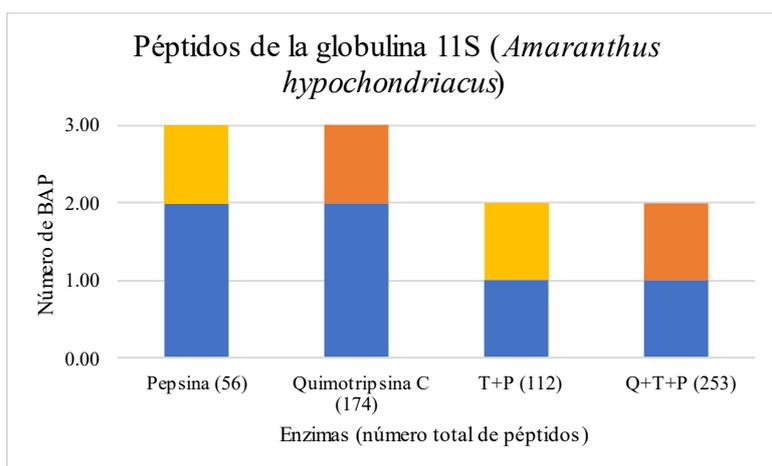


Figura 9. Bioactividades de la globulina 11S de *Amaranthus hypochondriacus*. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1, amarillo-multifuncional (inhibidor de dipeptidil peptidasa, ACEI, inhibidor XIAP). En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

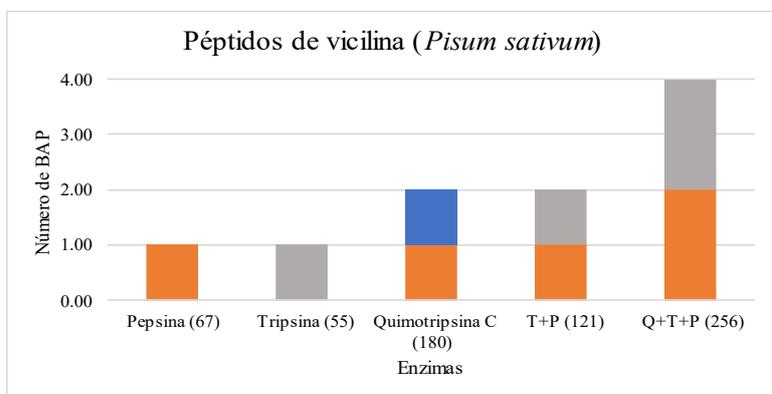


Figura 10. Bioactividades de la vicilina de *Pisum sativum* spp. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1, gris-ACEI. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

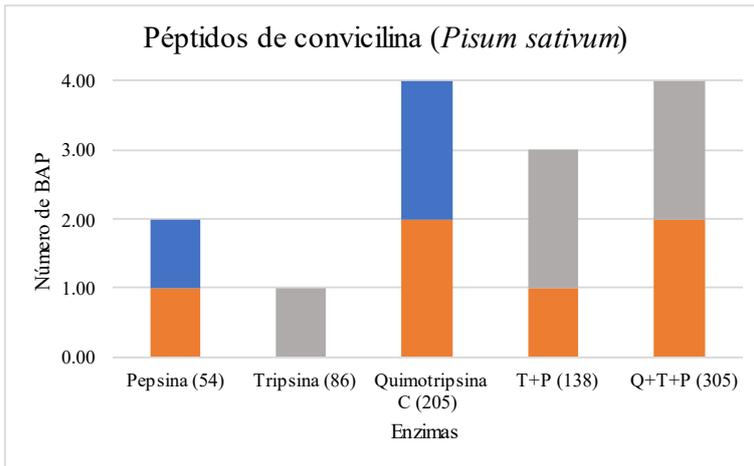


Figura 11. Bioactividades de la convicilina de *Pisum sativum* spp. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1, gris-ACEI. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

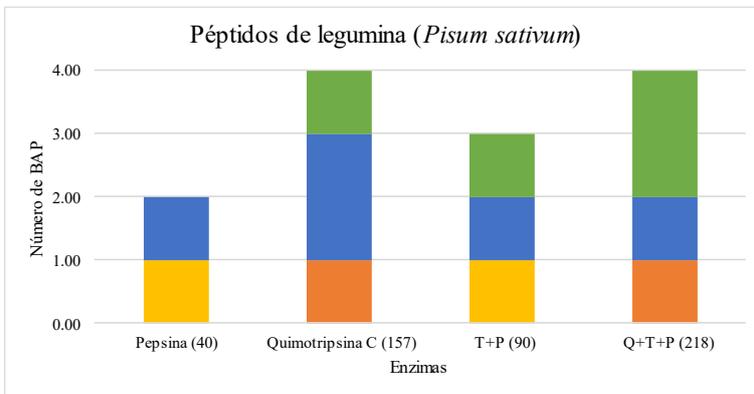


Figura 12. Bioactividades de la legumina de *Pisum sativum* spp. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1, amarillo-multifuncional (inhibidor de dipeptidil peptidasa, ACEI, inhibidor XIAP), verde-inhibidor de ciclooxigenasa 2. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

Los resultados de las proteínas de la leche de vaca se detallan a continuación.

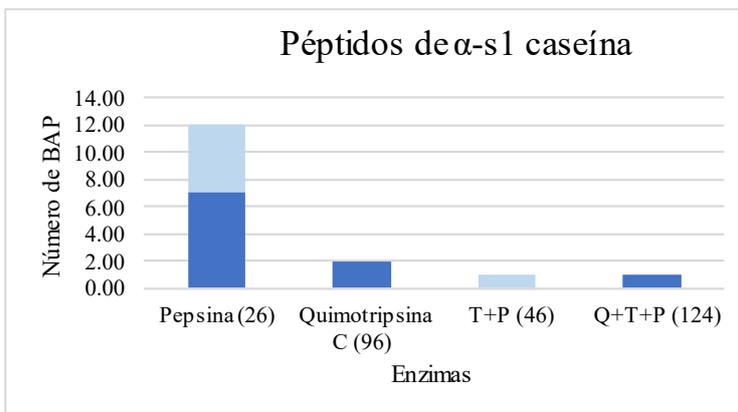


Figura 13. Bioactividades de la  $\alpha$ -s1 caseína de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul oscuro-antiviral, azul cielo-antitrombótico. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

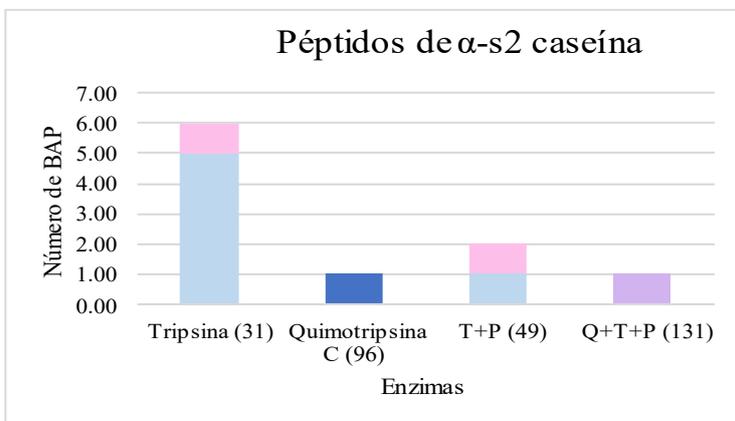


Figura 14. Bioactividades de la  $\alpha$ -s2 caseína de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul oscuro-antiviral, azul cielo-antitrombótico, rosa-antioxidante, morado-inhibidor de furina. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

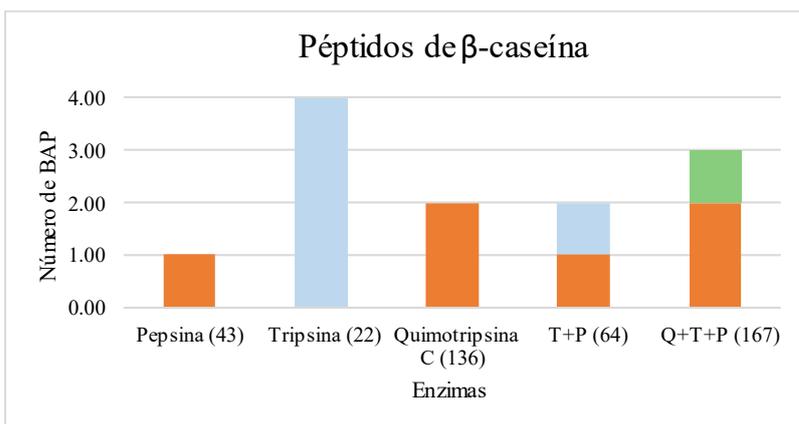


Figura 15. Bioactividades de la  $\beta$ -caseína de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul cielo-antitrombótico, naranja-inhibidor de calpaína 1, verde-supresor de amargor. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

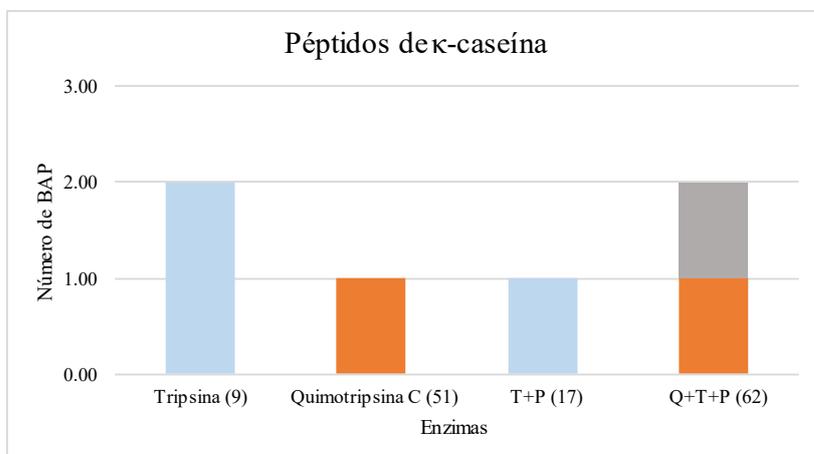


Figura 16. Bioactividades de la  $\kappa$ -caseína de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul cielo-antitrombótico, naranja-inhibidor de calpaína 1, gris-ACEI. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

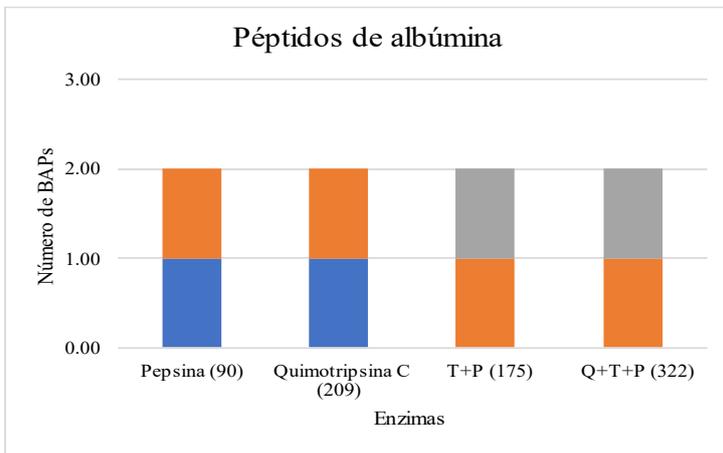


Figura 17. Bioactividades de la albúmina de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1, gris-ACEI. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

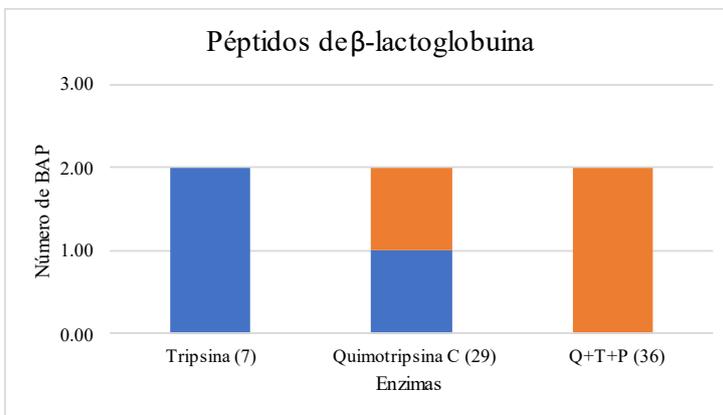


Figura 18. Bioactividades de la  $\beta$ -lactoglobulina de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

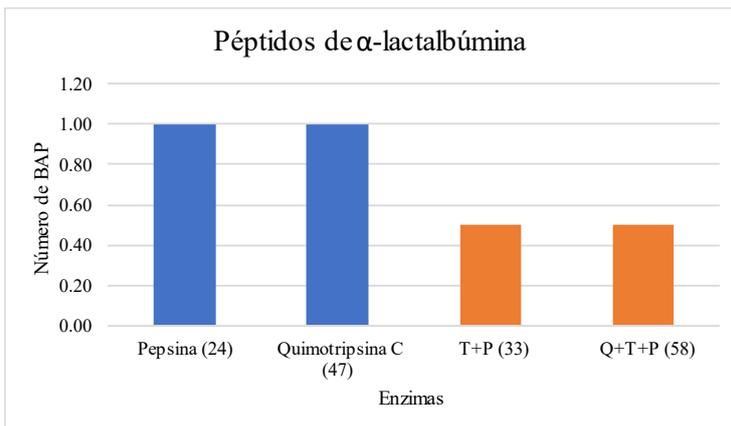


Figura 19. Bioactividades de la  $\alpha$ -lactalbúmina de *Bos taurus*. Bioactividades: Azul-antiviral, naranja-inhibidor de calpaína 1. En el eje x entre paréntesis se indica la cantidad total de péptidos generados en la hidrólisis. Abreviaturas: T+P (tripsina y pepsina), Q+T+P (quimotripsina, tripsina y pepsina).

De manera global, aunque cada proteína generó diversos péptidos, algunas secuencias se repitieron en más de una matriz. Por tanto, la cantidad de péptidos bioactivos con secuencias distintas tras la hidrólisis *in silico* fue de 37. Estos BAP se clasifican en 9 categorías: antivirales (34.27%), inhibidores de calpaína

1 (29.37%), antitrombóticos (13.99%), ACEI (12.59%), inhibidores de ciclooxigenasa 2 (4.20%), multifuncionales —inhibidor de dipeptidil peptidasa IV, ACEI, inhibidor XIAP— (2.80%), antioxidantes (1.40%), supresores de amargor (0.70%) e inhibidores de furina (0.70%).

### **Análisis ADMET *in silico* de los péptidos bioactivos**

Los BAP fueron sometidos a un análisis ADMET para evaluar su absorción, metabolismo, excreción/acumulación y obtener información sobre si podrían ser aprovechados por el cuerpo sin ser tóxicos. De la totalidad de péptidos bioactivos, solo 7 cumplieron con los valores establecidos Tabla 1 para ser aceptados, éstos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de la caracterización de péptidos bioactivos aceptados.

Péptido	Fuente <sup>[1]</sup>	R5 <sup>[2]</sup>	Permeabilidad <sup>[3]</sup>	HIA <sup>[4]</sup> [%]	Vd <sup>[5]</sup> [L/kg]	T <sub>1/2</sub> <sup>[6]</sup> [h]	Toxicidad <sup>[7]</sup> [mg/kg]
RL	A, Ch, L	Cumple	-6.567	>30	0.609	1.74	>500
CQ	A, Ch	Cumple	-6.491	>30	0.376	1.44	>500
DAY	L	Cumple	-6.570	>30	0.378	1.41	>500
GGL	Ch	Cumple	-6.479	>30	0.441	1.81	>500
AK	Ch, L	Cumple	-6.391	>30	0.626	2.89	>500
VVR	L	Cumple	-6.803	>30	0.560	1.74	>500
DM	L	Cumple	-6.348	>30	0.364	1.30	>500

<sup>[1]</sup>: Fuente de la que se origina el péptido. “A” se refiere al amaranto, “Ch” a chícharo, “L” a leche. <sup>[2]</sup>: Regla de los 5; <sup>[3]</sup>: Permeabilidad de células Caco-2; <sup>[4]</sup>Absorción intestinal humana; <sup>[5]</sup>: Volumen de distribución; <sup>[6]</sup>Tiempo de vida media; <sup>[7]</sup>: Toxicidad aguda en ratas.

Algunos de los parámetros de la Tabla 3 cuentan con valores puntuales, mientras que otros solo cuentan con datos de aprobación o rechazo. Esto se debe a que el análisis realizado con la herramienta ADMETlab 2.0, se basa en distintos modelos que permiten, a partir de la estructura, predecir sus características del compuesto. Algunos parámetros seleccionados, como la permeabilidad de células Caco-2 o el volumen de distribución, se predicen mediante modelos de regresión lineal, por lo que se pueden obtener valores específicos. Por otra parte, los parámetros como la toxicidad o HIA, son predichos a través de modelos de

clasificación, por lo que solamente se arrojan valores de probabilidad de que el compuesto sea adecuado o no.

Además, el caso de la *Regla de los 5* es especial porque ésta es evaluada con base en los parámetros establecidos empíricamente por Lipinski et al. (2001), por lo que se considera que un compuesto cumple con ella si se cumplen mínimo 3 de los 4 rubros que la componen (peso molecular, aceptores de hidrógeno, donadores de hidrógeno y LogP).

Ninguno de los BAP analizados cumplió con el valor deseado de permeabilidad de células Caco-2. Sin embargo, varios de ellos cumplieron con los valores de HIA (parámetro igualmente enfocado en la absorción del compuesto), por lo que se tomaron en cuenta estos valores para el análisis. No obstante, los péptidos que no cumplieron con algún otro parámetro establecido en la Tabla 1 fueron descartados para garantizar su baja toxicidad.

En lo concerniente a la absorción de los compuestos (HIA), la herramienta utilizada hace uso de un modelo de clasificación y aunque no se especifica qué tipo de modelo, frecuentemente se trata de modelos QSAR (quantitative structure-activity relationship). Éstos suelen basarse en distintas características estructurales para determinar propiedades de los compuestos, de las cuales destacan: TPSA<sup>2</sup> (superficie polar topológica), LogP, número de átomos en la molécula, donadores de hidrógeno derivados de OH y de NH, respectivamente (Basant et al., 2016; Esaki et al., 2019). En general, se ha establecido que a menores valores de estos parámetros (a excepción de LogP), hay mejor HIA (Basant et al., 2016). Así, de acuerdo con los datos de los BAP estudiados, se infiere que por sus valores de TPSA, AK es el péptido con mejor HIA, seguido de GGL, DM, CQ, RL, DAY y VVR. En cuanto a sus valores de LogP, explican por qué ningún péptido presentó buena permeabilidad de células Caco-2 ya que este parámetro hace referencia a la lipofilidad, relacionándose altamente con la permeabilidad de la membrana de las células. Se considera que las sustancias que presentan mejores características en análisis ADMET tienen un valor óptimo en el intervalo de 1-4 (Gao et al., 2017; Esaki et al., 2019). No obstante, los

---

<sup>2</sup> Hace referencia a la superficie de una molécula dada solamente por los átomos polares, principalmente O y N, incluyendo sus átomos de H unidos (Vistoli & Pedretti, 2007). ADMETlab 2.0 provee este dato, pero no se reportan en este trabajo.

valores presentados por los péptidos van desde -2.996 hasta -1.519. En este caso, su estudio continúa siendo relevante pues para algunas bioactividades, como la ACEI, no hace falta permear la membrana celular dado que los actores involucrados en el mecanismo se encuentran en la superficie de la célula (Warner et al., 2005).

En lo referente al volumen de distribución, se ha observado una correlación entre el incremento en los valores de  $V_d$  y  $\text{LogD}^3$ . Esto solo se cumple en el caso de *AK*, que presenta un valor de  $\text{LogD}$  de -1.465, siendo el menor de todos y también teniendo el menor  $V_d$  de la tabla. Los compuestos lipofílicos tienen mayor facilidad para penetrar las membranas celulares, lo que debería aumentar su valor de  $V_d$ . Sin embargo, otras características como la acidez o basicidad también influyen en este parámetro, pues se ha visto que entre mayor sea la basicidad, menor  $V_d$  (Lombardo et al., 2021). Algunos aminoácidos básicos son *K* y *R*, justificando los puestos menores de  $V_d$  para *AK* y *RL*. Ahora, recordando que  $V_d$  y  $t_{1/2}$  están directamente relacionados, se observa una tendencia mucho más clara. *DM* presenta el menor  $V_d$  y también  $t_{1/2}$ , mientras que *AK* presenta los mayores valores para los mismos parámetros. Lo deseable para este tipo de compuestos es que ambos valores sean equilibrados, como en los casos de los BAP estudiados. Es decir, un valor muy alto de  $V_d$  y  $t_{1/2}$  podría significar un riesgo de toxicidad por acumulación; mientras que valores muy bajos se ven como un reto, dado que requieren mayores dosis para tener efecto o se excretan antes de poder beneficiar al organismo (Mathur et al., 2018).

El tiempo de vida media de los péptidos fue calculado con la Ecuación 3 (ver sección de metodología) a partir de los datos de ADMET, ya que la plataforma solo permitía obtener la probabilidad de los compuestos de tener una vida media larga. Es notable que ningún compuesto rebasó las 3 h de vida media, lo cual es adecuado con base a ADMETlab 2.0. Aunado a esto, los valores concuerdan con datos de otras investigaciones, como los reportados por Iwaniak et al. (2020), donde también se sostiene que los compuestos, al promover cierta actividad en el organismo, pueden tener tiempos de vida media mayores a 0.5 h de manera usual. Dentro de los valores que resaltan, se encuentra la vida media de *AK*, la

---

<sup>3</sup> Se refiere al Log del coeficiente de reparto octanol/agua en pH fisiológico (7.4), cuyo valor óptimo según ADMETlab 2.0 es 1-3.

cual es de 2.89 h, cercana al límite establecido para considerarlo como un compuesto de vida media larga. Se ha establecido que la estructura de los péptidos influencia en gran medida este parámetro. Por ejemplo, Mathur et al. (2018) menciona que los péptidos ricos en aminoácidos pequeños (A, E, I, L) presentan tiempos de vida media más largos; mientras que los que son ricos en residuos aromáticos o neutros tienden a tener tiempos más cortos. No obstante, esto concuerda solo parcialmente con los resultados vistos en la Tabla 3, ya que *AK* sí cuenta con aminoácidos pequeños. Pero *DM*, tiene la vida media más corta y solo cuenta con un aminoácido neutro. Esto puede deberse a que el cambio de un solo residuo puede alterar la vida media del compuesto en gran manera (Mathur et al., 2018).

En cuanto a la toxicidad aguda de los BAP, otros autores han mencionado que los péptidos tóxicos tienden a tener residuos de C, H, N o P (Gupta et al., 2013). La Tabla 3 nos permite corroborar que en todos los BAP obtenidos no existen estos residuos y presentan valores bajos de toxicidad, a excepción de *CQ*. Gupta et al. (2013) también menciona que Q es un aminoácido presente frecuentemente en péptidos no tóxicos, por lo que podría explicarse el comportamiento no tóxico de *CQ*. Además, se observa que la herramienta utilizada para el análisis fija un valor de 500 mg/kg como mínimo para considerar que no se tiene toxicidad aguda oral. Otras normativas, como la del Ministerio de Agricultura de Columbia Británica en Canadá (Ministry of Agriculture British Columbia (2022)), consideran que cuando una sustancia química tiene un valor de LD50 oral menor de 500 mg/kg, se considera muy tóxico. Este valor equivale a una dosis letal de 0.3 a 30 mL. En este sentido, dado que los BAP analizados tienen valores mayores a los 500 mg/kg, tienen dosis letales mayores a 30 mL de compuesto, lo cual es un volumen mucho mayor a lo que se esperaría consumir en bebidas que los contengan.

Así, la clasificación de estos 7 BAP restantes fue la siguiente: antivirales (42.9%), inhibidores de ciclooxigenasa 2 (14.3%), ACEI (14.3%), inhibidores de furina (14.3%), supresores de amargor (14.3%).

Finalmente, a manera de resumen, en la Tabla 4 se presentan los resultados de los péptidos bioactivos aceptados según las características metabólicas establecidas para este trabajo y la enzima a través de la cual se obtienen.

Además, se incluye el número de repeticiones del péptido que se genera en cada hidrólisis.

Tabla 4. Proteínas, bioactividades y enzimas asociadas a los péptidos bioactivos aceptados por los criterios establecidos en el análisis ADMET.

Bioactividad	Péptido (masa molecular en Dalton)	Proteína asociada	Enzima de corte	Repeticiones del péptido
Antivirales	RL (287.200)	11S	Pepsina	1
			Quimotripsina C	1
		Legumina	Pepsina	1
			Quimotripsina C	1
		Vicilina	Quimotripsina C	1
		Convicilina	Quimotripsina C	2
			Pepsina	1
		$\alpha_{s1}$ -caseína	Pepsina	1
			Quimotripsina C	2
		$\alpha_{s2}$ -caseína	Quimotripsina C	1
		Lactalbúmina	Pepsina	1
			Quimotripsina C	1
	Albúmina	Pepsina	1	
		Quimotripsina C	3	
	CQ (249.080)	11S	Quimotripsina C	1
			Q+T+P	1
		Legumina	Quimotripsina C	1
			Q+T+P	1
DAY (367.140)	$\alpha_{s1}$ -caseína	Quimotripsina C	1	
		Q+T+P	1	
Inhibidor ciclooxigenasa 2	GGL (245.140)	Legumina	Quimotripsina C	1
			T+P	1
			Q+T+P	2
ACEI	AK (217.140)	Vicilina	Tripsina	1
			T+P	1
			Q+T+P	2
		Convicilina	Tripsina	1
			T+P	2
			Q+T+P	2
		k-caseína	Q+T+P	2
		Albúmina	T+P	3
Q+T+P	4			
Inhibidor de furina	VVR (372.250)	$\alpha_{s2}$ -caseína	Q+T+P	1
Supresor de amargor	DM (264.080)	$\beta$ -caseína	Q+T+P	1

Como se observa en la Tabla 4 existen diferencias entre la cantidad de BAP que se generan con cada enzima. De esta manera, la proteasa involucrada en la mayoría de la obtención de estos péptidos fue la quimotripsina C (12), seguida de la mezcla de quimotripsina, tripsina y pepsina (10), pepsina (6), tripsina y pepsina (4) y tripsina (2). Este comportamiento puede deberse a que la quimotripsina tiene más sitios de corte que la tripsina y pepsina individualmente, por lo que reconoce mayor cantidad de aminoácidos para efectuar cortes y genera más péptidos (Minkiewicz et al., 2019). No obstante, cuando actúa en conjunto con otras enzimas, los cortes podrían verse afectados, dado que se compite por algunos mismos sitios de corte. Por ejemplo, la pepsina y quimotripsina comparten un sitio de corte, L. Sin embargo, al ser una enzima gástrica, la pepsina es quien puede hacer este corte primero, ocasionando la disminución de aquellos que podría hacer la quimotripsina en el intestino. Así, la formación de BAP más probable en organismos humanos corresponde a la del modelo que considera múltiples enzimas, pues ese es el escenario que se presenta durante la digestión.

Con respecto a las matrices alimentarias, en el amaranto se encontró la menor cantidad de BAP que cumplen con los rubros establecidos, dado que solamente estuvo en la categoría de BAP antivirales. Por su parte, el chícharo tuvo una mayor diversidad de bioactividades (3) casi igualando en número a la leche. Sin embargo, resulta importante destacar que las proporciones de BAP se ven influenciadas por el número de proteínas analizadas de cada matriz. Se analizaron 3 globulinas para el chícharo, 7 proteínas para la leche y solo la globulina 11S para el amaranto a causa de su ausencia en las bases de datos consultadas. En este sentido, resulta interesante ver que el chícharo presentó, con menos de la mitad de proteínas analizadas, casi la misma cantidad de bioactividades que la leche. Esto confirma que, tal como se ha establecido por otros autores, las legumbres son fuentes de BAP con amplio potencial (Kiersnowska & Jakubczyk, 2022). También con los resultados obtenidos se observa que existen BAP comunes para las tres matrices, como *RL* y otros más que son exclusivos de la leche (*DAY*, *VVR*, *DM*). De igual forma, el chícharo también tiene péptidos únicos, como *GGL* e incluso otro compartido con la leche de vaca, *AK*.

La importancia de esto radica en que hoy en día se elaboran bebidas vegetales como alternativa al consumo de leche de vaca. En la elaboración de estas bebidas es importante estudiar su aporte nutricional (proteico), además de su funcionalidad e impacto sobre la salud de los consumidores y compararlo con respecto a lo que proporciona la leche de vaca. Entre las proteínas que más se utilizan para la elaboración de estas alternativas está el chícharo (o arveja), el amaranto o ambos, tal como en algunas bebidas de la marca NotMilk® o Heartbest®, respectivamente. En ese sentido, las bebidas que contienen ambas proteínas aumentarían la probabilidad de contener BAP antivirales, además de presentar las bioactividades propias del chícharo.

La relevancia de estos resultados aumenta gracias a la actual preocupación por los consumidores de ingerir alimentos que les provean de beneficios a la salud. En la encuesta de *Tendencias globales de alimentos y bebidas 2024* desarrollada por Mintel, se establece que en América Latina los consumidores buscan productos que aporten beneficios específicos a la salud como: salud cardíaca, aumento de inmunidad, digestión, entre otros. Además, se prefieren alimentos ricos en fibra, proteínas, vitaminas, etc. (Mintel, 2024).

En cuanto a la diversidad de bioactividades, los resultados de este trabajo identificaron 3 bioactividades en las proteínas de chícharo y 4 bioactividades en las de la leche de vaca, aunque una de ellas es más bien como supresora de amargor.

Por ejemplo, se observa que tanto las proteínas vegetales como las animales mostraron BAP con actividad antiviral. No obstante, la cantidad neta de BAP antivirales generados por la leche es más abundante que en el caso de las bebidas vegetales. Igualmente, tanto el chícharo como la leche presentan actividad ACEI (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I, por sus siglas en inglés). Esto se refiere a compuestos que impiden que una enzima convierta la angiotensina I en angiotensina II, que hace más angostas las venas y arterias, además de degradar la bradiquinina activa (Wong, 2016). En este sentido, los BAP con este perfil permiten reducir la presión arterial (Mora et al., 2018). Este efecto hace a la leche o a las bebidas de chícharo una buena opción para personas con problemas de presión arterial alta o cardíacos.

De manera particular, el chícharo también tiene bioactividad como inhibidor de la ciclooxigenasa-2, la cual es una enzima que promueve los procesos de dolor e inflamatorios, como los del cáncer (Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud, 2024). Por ello, los inhibidores de esta enzima son prometedores para detener la inflamación y recientemente han sido estudiados como medicamentos para el cáncer (Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud, 2024).

Por su parte, la bioactividad particular de la leche es como inhibidora de la furina. Ésta es una proteasa que permite la activación del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) en el huésped. La furina, situada en la membrana de la célula hospedera, corta la proteína spike del virus, permitiendo su activación (Kumar et al., 2022). Con una sociedad recientemente afectada por dicho virus, la bioactividad de inhibición de furina cobra gran importancia.

En cuanto a la supresión de amargor de los BAP de la leche puede ser bastante beneficiosa en otros casos, como la formulación de nuevos productos alimentarios o fármacos en donde se busque disminuir resabios desagradables. Incluso el uso de los péptidos bioactivos en productos alimenticios puede verse dificultado por el amargor que éstos presentan. Se ha estudiado que el perfil amargo de un péptido tiene que ver con su estructura e hidrofobicidad, especificando que la hidrofobicidad de la cadena lateral intensifica este resabio gracias a que ofrece un sitio de unión a receptores de amargor en la lengua (Soltani et al., 2013). Así, cobra relevancia el estudio de los péptidos supresores de amargor, para los cuales se ha planteado que pueden actuar por distintos mecanismos, como el bloqueo de receptores de amargor o disminuyendo la afinidad del péptido por los receptores (Prashen & Rotimi, 2019).

Finalmente, de manera global el análisis *in silico* arrojó resultados en los que la leche de vaca se sitúa como la mejor fuente de BAP para obtener una mayor diversidad de bioactividades (antiviral, ACEI, inhibidor de furina, supresor de amargor). No obstante, en términos directamente relacionados con efectos sobre la salud, tanto las bebidas de chícharo como la leche de vaca presentan la misma diversidad. De esta forma, se puede proponer que las bebidas vegetales con base proteica mixta, como las de amaranto y chícharo ya disponibles en el

mercado tienen mayor probabilidad de mostrar beneficios antivirales a diferencia del consumo de bebidas con una sola de estas bases vegetales.

A partir de los resultados *in silico*, se prosiguió con ensayos *in vitro* que permitieron validar los resultados bioinformáticos. Estos análisis se centraron en la digestión enzimática de las proteínas con quimotripsina C (proteasa que generó la mayor cantidad de BAP *in silico*) y la verificación de la actividad ACEI de los hidrolizados, la cual fue una de las bioactividades más importantes reflejadas y la segunda más encontrada tras el estudio bioinformático. En este caso, se trabajó con las proteínas que presentaron la mayor cantidad de BAP: proteínas lácteas y de chícharo.

### **Obtención de concentrados de proteína**

Para el inicio de los ensayos fue necesaria la obtención del concentrado de proteína de chícharo. Tras el tratamiento de la proteína de chícharo comercial, se obtuvo un promedio de  $24.11 \pm 1.15$  % de proteína. De acuerdo a Kelly (2002), los concentrados de proteína contienen entre un 20-80% este macronutriente. Por tal motivo el pellet de proteína obtenido puede considerarse un concentrado, no obstante, es importante mencionar que para obtener un mayor contenido de proteína pudo resultar más beneficioso utilizar otros métodos, como la filtración por membranas o la eliminación de componentes no proteicos de la matriz. En cuanto a las otras matrices, se utilizaron proteínas comerciales, las cuales presentaban un grado de pureza de 91.34% para las proteínas del suero de la leche y 90.00% para las caseínas.

Con el fin de conocer el patrón de bandas de cada una de las proteínas, se efectuó un análisis de SDS-PAGE condiciones desnaturalizantes, el cual se muestra a continuación.

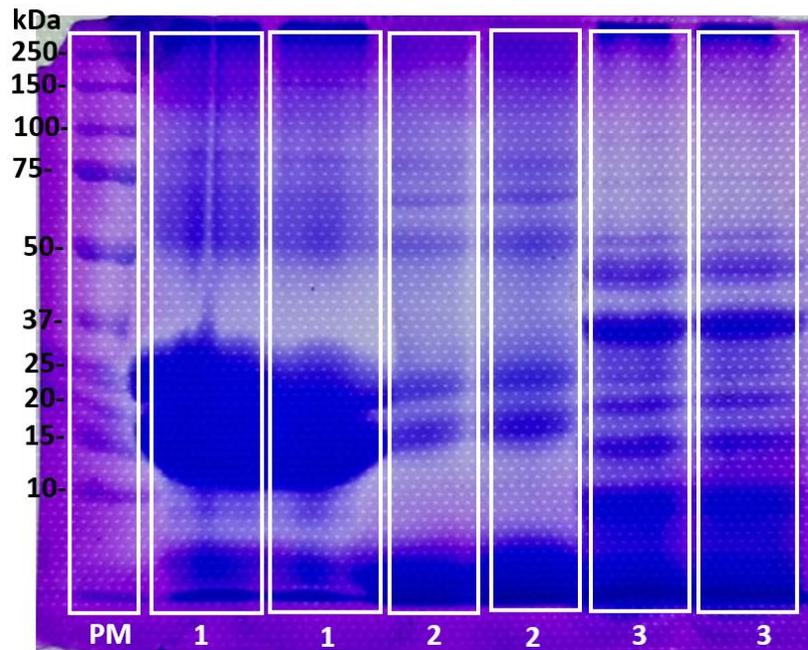


Figura 20. Patrón de bandas de proteínas en análisis SDS-PAGE: (PM) marcador de peso molecular (kDa), (1) aislado de caseína de leche de vaca, (2) aislado de proteínas del suero de la leche de vaca (WPI, por sus siglas en inglés), (3) concentrado de proteína de chícharo.

El análisis SDS-PAGE, mostró que en el caso de la caseína de leche de vaca, la mayor parte de las proteínas se encuentran en el rango de 25 a 10 kDa. De acuerdo a Farrell et al. (2004), este es el sitio donde encontramos las proteínas de interés en el estudio:  $\alpha_{s1}$ -caseína (23.579 kDa),  $\alpha_{s2}$ -caseína (25.226 kDa),  $\beta$ -caseína (24.033 kDa) y  $\kappa$ -caseína (19.020 kDa). Para el caso de las proteínas del suero, las bandas más prominentes se observan de 15 a 25 kDa; donde se encuentran proteínas como la  $\beta$ -lactoglobulina (18.320 kDa) y  $\alpha$ -lactalbúmina (14.178 kDa). No obstante, ligeras bandas se observan en la parte superior, las cuales corresponden a otras proteínas como la albúmina (66.399 kDa), la cual es la tercera proteína del suero que es interés para este trabajo. Finalmente, para la proteína de chícharo se encuentran proteínas compuestas de subunidades más pequeñas. Así, la legumina se compone de 6 pares de subunidades de 20 y 60 kDa (Owusu-Ansah & McCurdy, 1991); la vicilina consiste en 3 subunidades cuyos pesos moleculares son de 47, 50 y 34 kDa (Schroeder, 1982; Kumar et al., 2019); la convicilina se compone de subunidades de 4 a 10 kDa (Shrestha et al., 2023), lo cual es notable en la parte inferior del gel.

## Hidrólisis enzimática con quimotripsina C

Así, tras haber conocido los pesos moleculares de las proteínas nativas, éstas se sometieron a hidrólisis con quimotripsina C con una relación E:S de 1:400 a 37°C según las condiciones óptimas de la enzima. Para conocer el grado de hidrólisis óptimo se realizó un seguimiento de la reacción durante 4 h tomando muestras en los tiempos 0, 1, 2 y 4 h. Los resultados promedio del grado de hidrólisis experimental se realizó un seguimiento de la reacción durante 4 h tomando muestras en los tiempos 0, 1, 2 y 4 h. Los resultados promedio del grado de hidrólisis experimental ( $DH_e$ ) alcanzado en cada tiempo de muestreo se presentan en la *Figura 21*.

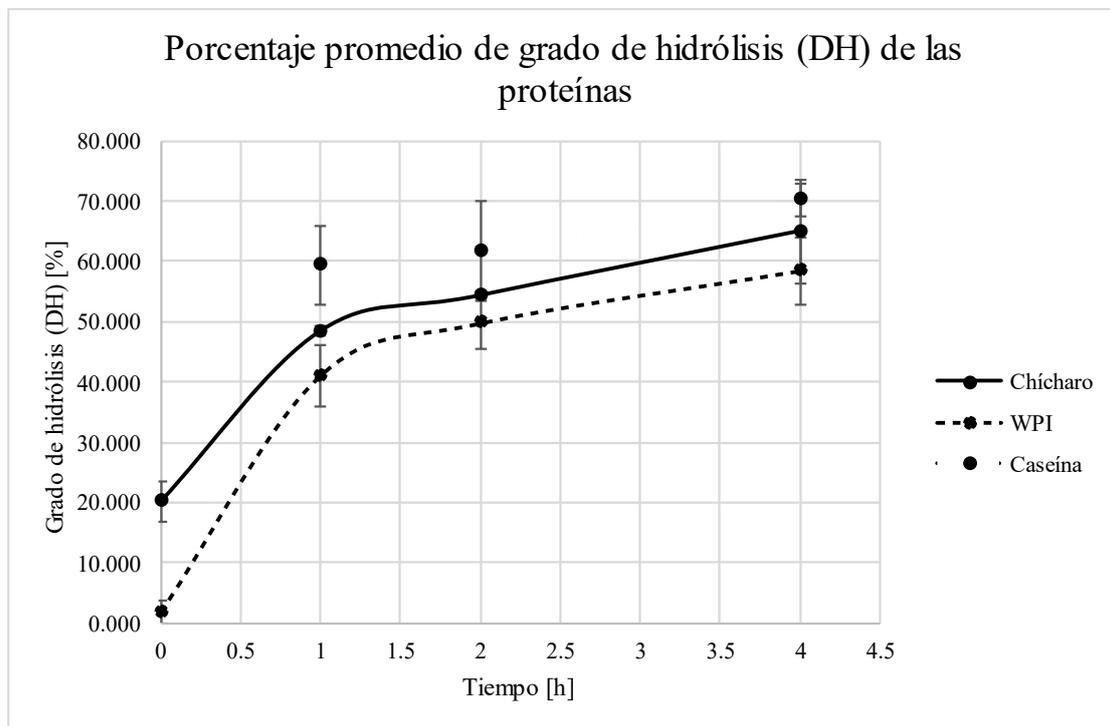


Figura 21. Gráfico de grado de hidrólisis experimental conforme al tiempo de las proteínas analizadas. WPI: aislado de proteína del suero de leche, por sus siglas en inglés.

Conforme al gráfico anterior, se visualiza el comportamiento de las tres proteínas analizadas tras 4 horas de hidrólisis, donde es observable que el grado de hidrólisis más conveniente para este trabajo se encuentra a las 4 h de reacción. Este grado de hidrólisis experimental indica que fue un tratamiento extensivo, lo que de acuerdo a Silvestre et al. (2013) genera péptidos de peso molecular <3 kDa, que es deseable para verificar su bioactividad.

Además, puede notarse que la proteína de chícharo comenzó su hidrólisis con un porcentaje aproximado de 20% de  $DH_e$ , esto pudo haber sucedido por los cambios de pH inducidos durante la obtención del concentrado, pues la

estabilidad de las proteínas depende de las variables a su alrededor como el pH o la temperatura (Kishore et al., 2012).

Con respecto a los resultados del grado de hidrólisis obtenidos bioinformáticamente en la Figura 7 y Figura 8, al calcular el promedio de DHt de cada proteína en la hidrólisis con quimotripsina se observa el mismo comportamiento que en la hidrólisis *in vitro*: caseína presenta el mayor DH, seguido del chícharo y finalmente las proteínas del suero. No obstante, en todos los casos, DH fue subestimado en los valores bioinformáticos, pues se situó en promedio 21.3 unidades por debajo del valor promedio obtenido *in vitro*. BIOPEP, herramienta utilizada para calcular este parámetro *in silico*, no describe las condiciones a las que se define el valor de DH, por lo que se hipotetiza que las diferencias entre los valores de DH<sub>t</sub> y DH<sub>e</sub> pueden deberse a que las condiciones en las que son determinados son distintas.

### Filtración por membranas de los hidrolizados proteicos

Para separar los hidrolizados obtenidos en la etapa anterior con base en el tamaño de los péptidos, éstos se diluyeron hasta una concentración de proteína de 3 mg/mL y se filtraron a través de membranas de 5 y 10 MWCO. Así, se obtuvieron 3 fracciones peptídicas de distinta masa molecular para cada proteína: mayores a 10 kDa; entre 5 y 10 kDa y menores a 5 kDa; que posteriormente se evaluaron para determinar su bioactividad. La cantidad de péptidos bioactivos con cierto peso molecular permite visualizar el efecto de la hidrólisis y el estado inicial de las proteínas analizadas. Los resultados de la abundancia de cada fracción se presentan a continuación.

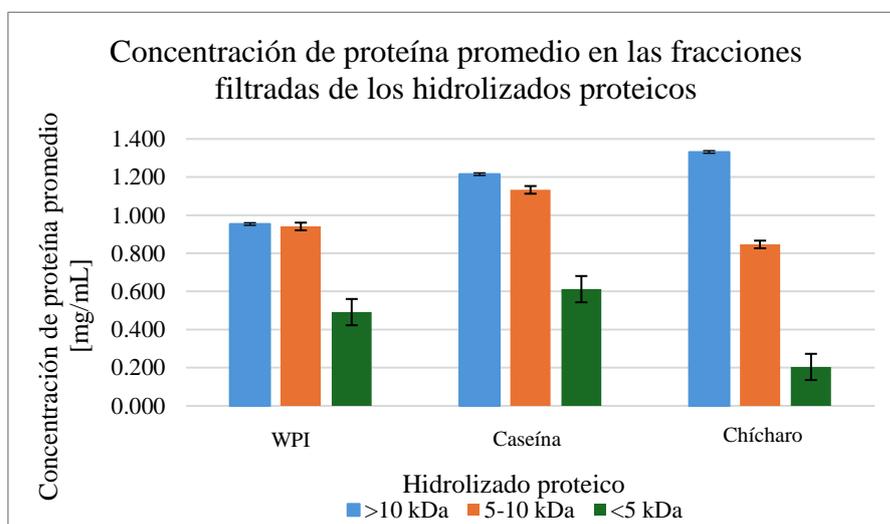


Figura 22. Concentración de proteína promedio obtenida en las fracciones peptídicas de cada matriz.

En la figura anterior, se observa la misma tendencia en la distribución de peso molecular para las 3 matrices. Esto a causa del uso de condiciones estandarizadas (en tiempo y concentraciones de proteína y de enzima) para las hidrólisis. Se observa que, con esa duración de hidrólisis y relación enzima-sustrato, la mayor parte de los péptidos obtenidos tiene un peso molecular >10 kDa. No obstante, se obtuvieron concentraciones adecuadas (mínimo 0.5 mg/mL) para la prueba ACE de péptidos con peso molecular menor a 10 kDa, denominados de bajo peso molecular, los cuales se han asociado con anterioridad a presentar más prominentemente bioactividades como la antioxidante y antihipertensiva (Daliri et al., 2017).

En cuanto a la distribución de peso molecular de los péptidos, ésta podría relacionarse con el DHe alcanzado. De acuerdo con un estudio hecho por (Aguilar-Ovando et al., 2021), tras la hidrólisis de  $\beta$ -lactoglobulina con quimotripsina durante 2 horas, se generó un DHe de 22% con péptidos de entre 8 y 9 kDa; mientras que con 4 horas de tratamiento se tuvo un DHe de 25.52% y péptidos de 7-5 kDa. Así, a pesar de que todas las proteínas tuvieron valores de DHe mayores al 50%, existen diferencias que pueden relacionarse con el tamaño inicial de las proteínas y la cantidad de sitios de corte de la enzima presentes en ella. De esta manera, con base en los datos de la cantidad de cortes totales estimados por BIOPEP, el chícharo presenta las proteínas de mayor peso molecular y también mayor número de sitios de corte, lo que finalmente se refleja en ser la proteína con menor proporción de péptidos menores a 10 kDa y menor DHe. Por su parte, las proteínas del suero (WPI) tienen los menores pesos moleculares en su estado nativo, siendo en su mayoría ya cercanas a 10 kDa, por lo que se puede justificar que sea la proteína con mayor proporción de péptidos menores a 10 kDa luego de la hidrólisis.

### **Ensayos de inhibición de la ACE**

Finalmente, se estimó el porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) de cada una de las fracciones obtenidas y se comparó contra Captopril, un fármaco comúnmente utilizado para el control de la presión arterial. En la *Figura 23* se presentan solo las fracciones que mostraron la actividad inhibidora de ACE, por lo tanto, las fracciones de 5-10 kDa de WPI y

caseína y la fracción con peso molecular menor a 5 kDa de chícharo no presentaron esta bioactividad.

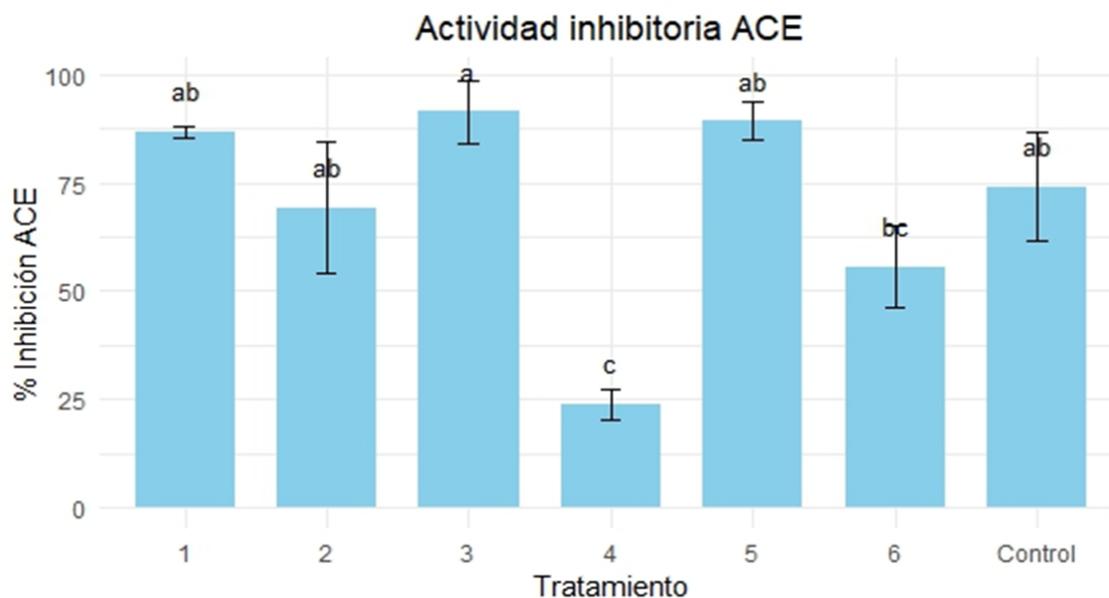


Figura 23. Porcentaje de inhibición de ACE promedio para las fracciones peptídicas de cada fuente estudiada frente al control positivo. Tratamiento 1, fracción >10 kDa de WPI; tratamiento 2, fracción <5 kDa de WPI; tratamiento 3, fracción >10 kDa de caseína; tratamiento 4, fracción <5 kDa de caseína; tratamiento 5, fracción >10 kDa de chícharo; tratamiento 6, fracción 5-10 kDa de chícharo; tratamiento 7, control positivo (Captopril).

Adicionalmente, se efectuó el análisis de varianza y prueba de Tukey de los tratamientos cuyos resultados también pueden observarse en la *Figura 23* (para conocer los resultados numéricos consultar la *Tabla 8* y *Tabla 9* del anexo IV).

Con respecto a la *Figura 23* se observa que, a pesar de que la fracción >10 kDa de la caseína (tratamiento 3) tuvo la media más alta, no presenta diferencia significativa con los tratamientos 1, 2, 5 y el control en la concentración utilizada. De hecho, de las 6 fracciones que presentaron bioactividad, 5 no presentan diferencias significativas frente al Captopril en concentración de 80 nM, lo cual equivale a la toma oral de  $1 \times 10^{-4}$  mg de tableta. Este fármaco fue el primer inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina en ser ampliamente difundido para el tratamiento oral de la hipertensión (TANEL & LEVIN, 2006; Bylund, 2017) y presenta su mayor efecto hipotensivo entre 30 y 90 minutos después de su toma oral (Grossman & Messerli, 2007). De acuerdo a la fundación Mayo para la Educación Médica e Investigación (Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER), 2024), la dosis oral recomendada de Captopril para el tratamiento de presión arterial alta en adultos es de 2 o 3

tomas de 25 mg al día, aunque varía conforme al paciente. Esto quiere decir que la concentración a la que se probó el Captopril en la prueba ACEI equivale al 0.0004% de la dosis oral recomendada.

Por otra parte, a excepción del tratamiento 6 (fracción peptídica de 5-10 kDa del chícharo), todos los tratamientos y el control tienen diferencia significativa con el tratamiento 4 (fracción peptídica <5 kDa de la caseína). Así, a diferencia de lo establecido en otras investigaciones (Tu, Wang, et al., 2018), esta fracción fue la menos eficiente de aquellas que sí presentaron actividad. Inclusive, es observable que a pesar de que los péptidos de bajo peso molecular son los que más frecuentemente se relacionan con bioactividades, todas las fracciones con peso >10 kDa presentaron actividad ACEI, mientras que las de menor peso molecular no. Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, las proteínas de la leche de vaca han sido estudiadas con mayor detenimiento que las proteínas vegetales, por lo que resulta importante destacar que el chícharo presentó actividad ACEI en la fracción >10 kDa y fue la única fuente que mostró actividad en la fracción de 5-10 kDa, resultando equiparable a las proteínas animales estudiadas y al control.

Las diferencias del porcentaje de inhibición de cada una de las fracciones pueden justificarse a través de los factores que influyen la bioactividad de un péptido, pues ésta no depende únicamente de su peso molecular o la longitud de su cadena. Se ha reportado que la actividad se ve influenciada igualmente por otros componentes estructurales como los aminoácidos que conforman al péptido y su carácter hidrofóbico o hidrofílico (Sitanggang et al., 2021). Por ejemplo, en un estudio efectuado a las globulinas del chícharo, Jakubczyk & Baraniak (2014) establece que la mayor parte de los aminoácidos en los péptidos con actividad ACEI eran hidrofóbicos. En concordancia con esto, se ha reportado que algunos de los péptidos con mayor actividad ACEI presentan aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal, frecuentemente prolina. No obstante, esto no es una regla y se han encontrado péptidos de fuentes vegetales con carácter hipotensivo con aminoácidos distintos a la prolina en este extremo. Es por ello que resultaría recomendable hacer la identificación de las secuencias de los péptidos obtenidos en las fracciones peptídicas analizadas.

Por otra parte, la identificación de péptidos ACEI de la proteína de chícharo se ha dado con anterioridad. Jakubczyk et al. (2013) reportó que, tras el tratamiento

de proteína de chícharo, se obtuvo una fracción con actividad ACEI que fue identificada como KEDDEEEEQGEEE después de su análisis con LC-MS/MS. Otros autores como Bollati et al. (2022) coinciden en que la proteína de chícharo es fuente de péptidos antihipertensivos, mencionando incluso que se encuentran entre los péptidos más potentes con este carácter.

Con base en lo observado en el presente trabajo, las bebidas vegetales análogas a la leche con base proteica de chícharo son una fuente de péptidos bioactivos, por lo que su consumo representaría un beneficio a la salud humana. No obstante, es importante continuar con estudios *in vivo* que permitan establecer la dosis en la que debe consumirse para obtener estos efectos o los compuestos podrían aislarse y consumirse como nutracéuticos.

## CONCLUSIONES

Tras el análisis bioinformático realizado en este trabajo, las 3 matrices alimentarias estudiadas se reconocieron como fuentes de BAP cuyo consumo sería seguro de acuerdo al análisis ADMET. En la validación de resultados que se llevó a cabo de manera *in vitro*, fue observable que las tres proteínas estudiadas experimentalmente (caseínas, proteínas del suero y proteína de chícharo) con la digestión enzimática con quimotripsina C generaron péptidos con actividad ACEI. Lo anterior cobra relevancia porque, a excepción de un caso, la totalidad de las fracciones peptídicas analizadas mostraron la misma efectividad que el Captopril a la concentración utilizada.

Así, se concluye que las proteínas de chícharo y leche de vaca son fuentes de BAP, lo que representaría un beneficio para la salud del consumidor. Así, este trabajo contribuye como referencia para futuras investigaciones que ahonden en las dosis y evaluaciones *in vivo* de los péptidos bioactivos provenientes de estas fuentes.

## PERSPECTIVAS

Realizar la identificación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos presentes en las fracciones con actividad.

Realizar la evaluación *in vivo* para verificar sus propiedades de absorción, su potencial toxicológico y su actividad biológica.

## REFERENCIAS

- Adewole, T. S., Bieni, M. C., Ogundepo, G. E., Odekanyin, O. O., & Kuku, A. (2024). Investigation of functional, antioxidant, anti-inflammatory, and antidiabetic properties of legume seed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids for Health*, 5, 100175. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100175>
- Aguilar-Ovando, B., Calderón-Domínguez, G., García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J., Jardón-Valadez, E., León-Espinosa, E. B., Cruz-Monterrosa, R. G., Cortés-Sánchez, A. de J., Ruíz-Hernández, R., & Díaz-Ramírez, M. (2021).  $\beta$ -lactoglobulin peptides obtained by chymotrypsin hydrolysis. *Agro Productividad*, IV. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i9.2144>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Asledottir, T., Vegarud, G. E., Picariello, G., Mamone, G., Lea, T. E., Røseth, A., Ferranti, P., & Devold, T. G. (2023). Bioactive peptides identified in pea and faba bean after in vitro digestion with human gastrointestinal enzymes. *Journal of Functional Foods*, 102, 105445. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105445>
- Barba de la Rosa, A. P., Paredes-Lopez, Octavio., & Gueguen, Jacques. (1992). Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 937–940. <https://doi.org/10.1021/jf00018a003>
- Basant, N., Gupta, S., & Singh, K. P. (2016). Predicting human intestinal absorption of diverse chemicals using ensemble learning based QSAR modeling approaches. *Computational Biology and Chemistry*, 61, 178–196. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.01.005>
- Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Adesina, A., Ahmad, S., Bowler-Barnett, E. H., Bye-A-Jee, H., Carpentier, D., Denny, P., Fan, J., Garmiri, P., Gonzales, L. J. da C., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G., Ishtiaq, R., Joshi, V., Jyothi, D., ... Zhang, J. (2025). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Berraquero-García, C., Rivero-Pino, F., Ospina, J. L., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., García-Moreno, P. J., & Guadix, E. M. (2023). Activity, structural features and in silico digestion of antidiabetic peptides. *Food Bioscience*, 55, 102954. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102954>

- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377–5392. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>
- Bizzotto, E., Zampieri, G., Treu, L., Filannino, P., Di Cagno, R., & Campanaro, S. (2024). Classification of bioactive peptides: A systematic benchmark of models and encodings. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 23, 2442–2452. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.05.040>
- Bollati, C., Xu, R., Boschini, G., Bartolomei, M., Rivardo, F., Li, J., Arnoldi, A., & Lammi, C. (2022). Integrated Evaluation of the Multifunctional DPP-IV and ACE Inhibitory Effect of Soybean and Pea Protein Hydrolysates. *Nutrients*, 14(12), 2379. <https://doi.org/10.3390/nu14122379>
- BRENDA. (2023, January). *Information on EC 3.4.21.2*.
- Bylund, D. B. (2017). Captopril ☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.96547-4>
- Chang, A., Jeske, L., Ulbrich, S., Hofmann, J., Koblitz, J., Schomburg, I., Neumann-Schaal, M., Jahn, D., & Schomburg, D. (2021). BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D498–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025>
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637–1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- Daliri, E., Oh, D., & Lee, B. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), 32. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Darwish, M. M., Ibrahim, R. S., Metwally, A. M., & Mahrous, R. S. R. (2024). In-depth in silico and in vitro screening of selected edible plants for identification of selective C-domain ACE-1 inhibitor and its synergistic effect with captopril. *Food Bioscience*, 59, 104115. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104115>
- Durand, E., Beaubier, S., Ilic, I., fine, F., Kapel, R., & Villeneuve, P. (2021). Production and antioxidant capacity of bioactive peptides from plant biomass to counteract lipid oxidation. *Current Research in Food Science*, 4, 365–397. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2021.05.006>
- Dziuba, J., Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. (2003). Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. *Polimery*, 48(01), 50–53. <https://doi.org/10.14314/polimery.2003.050>
- Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., & Samarakoon, S. R. (2019). In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *Journal of Applied Toxicology*, 39(1), 38–71. <https://doi.org/10.1002/jat.3658>
- Emkani, M., Moundanga, S., Oliete, B., & Saurel, R. (2023). Protein composition and nutritional aspects of pea protein fractions obtained by a modified

- isoelectric precipitation method using fermentation. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1284413. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1284413>
- Esaki, T., Ohashi, R., Watanabe, R., Natsume-Kitatani, Y., Kawashima, H., Nagao, C., Komura, H., & Mizuguchi, K. (2019). Constructing an In Silico Three-Class Predictor of Human Intestinal Absorption With Caco-2 Permeability and Dried-DMSO Solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(11), 3630–3639. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.07.014>
- Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Chidambaram, S. B., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R. P., & Qoronfleh, M. W. (2023). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, 60(3), 820–834. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3>
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Fróna, D., Szenderák, J., & Harangi-Rákos, M. (2019). The Challenge of Feeding the World. *Sustainability*, 11(20), 5816. <https://doi.org/10.3390/su11205816>
- Gao, Y., Gesenberg, C., & Zheng, W. (2017). Oral Formulations for Preclinical Studies. In *Developing Solid Oral Dosage Forms* (pp. 455–495). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00017-0>
- Giugliano, D., Sportiello, L., Capuano, A., Maiorino, M., Rossi, F., & Esposito, K. (2013). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapy &ndash; focus on alogliptin. *Drug Design, Development and Therapy*, 989. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S37647>
- Grossman, E., & Messerli, F. H. (2007). Hypertensive Urgencies and Emergencies. In *Comprehensive Hypertension* (pp. 761–774). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03961-1.50066-0>
- Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., & Raghava, G. P. S. (2013). In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. *PLoS ONE*, 8(9), e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>
- Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & Julian McClements, D. (2024). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, 439, 138164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164>
- Hargreaves, S. M., Raposo, A., Saraiva, A., & Zandonadi, R. P. (2021). Vegetarian Diet: An Overview through the Perspective of Quality of life Domains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(8), 4067. <https://doi.org/10.3390/ijerph18084067>
- Hedieh Alavi Talab. (2018). *Starch - protein extraction and separation it's from green pea.*

- Herman, T. F., Cascella, M., & Muzio, M. R. (2024). *Mu Receptors*.
- Insel, P., Ross, D., McMahon, K., & Bernstein, M. (2013). *Discovering nutrition* (4th ed.). Jones and Bartlett Learning.
- Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud. (2024a). *Ciclooxigenasa-2*.
- Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud. (2024b). *Inhibidor de COX-2*.
- Iturbe, F., & Sandoval, J. (2013). *Manual de Análisis de Alimentos y Fundamentos y Técnicas*.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., & Darewicz, M. (2024). BIOPEP-UWM database — present and future. *Current Opinion in Food Science*, 55, 101108. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101108>
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Pliszka, M., Mogut, D., & Darewicz, M. (2020). Characteristics of Biopeptides Released In Silico from Collagens Using Quantitative Parameters. *Foods*, 9(7), 965. <https://doi.org/10.3390/foods9070965>
- Jain, A. K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., & Pandey, A. K. (2018). Models and Methods for In Vitro Toxicity. In *In Vitro Toxicology* (pp. 45–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804667-8.00003-1>
- Jakubczyk, A., & Baraniak, B. (2014). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Obtained after *In Vitro* Hydrolysis of Pea (*Pisum sativum* var. Bajka) Globulins. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/438459>
- Jakubczyk, A., Karaś, M., Baraniak, B., & Pietrzak, M. (2013). The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*, 141(4), 3774–3780. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.095>
- Jin, S., & Je, Y. (2021). Dairy Consumption and Risk of Metabolic Syndrome: Results from Korean Population and Meta-Analysis. *Nutrients*, 13(5), 1574. <https://doi.org/10.3390/nu13051574>
- Jo, D.-M., Khan, F., Park, S.-K., Ko, S.-C., Kim, K. W., Yang, D., Kim, J.-Y., Oh, G.-W., Choi, G., Lee, D.-S., & Kim, Y.-M. (2024). From Sea to Lab: Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition by Marine Peptides—Mechanisms and Applications. *Marine Drugs*, 22(10), 449. <https://doi.org/10.3390/md22100449>
- Johns Hopkins University. (2023). *Plant-Based Milks Gain Prominence Among US Consumers, But Nutritional Profiles and Affordability Remain Challenges*.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and

- bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>
- Kelly, P. M. (2002). MEMBRANE SEPARATION. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1777–1786). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00290-X>
- Kerns, E., & Di, L. (2008). *Drug-like Properties Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. Academic Press.
- Kiersnowska, K., & Jakubczyk, A. (2022). Bioactive Peptides Obtained from Legume Seeds as New Compounds in Metabolic Syndrome Prevention and Diet Therapy. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(20). <https://doi.org/10.3390/foods11203300>
- Kishore, D., Kundu, S., & Kayastha, A. M. (2012). Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric  $\beta$ -galactosidase reveals multiple unfolding pathways. *PloS One*, 7(11), e50380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050380>
- Kratz, M., Baars, T., & Guyenet, S. (2013). The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *European Journal of Nutrition*, 52(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0418-1>
- Kumar, A., Agarwal, D. K., Kumar, S., Reddy, Y. M., Chintagunta, A. D., Saritha, K. V., Pal, G., & Kumar, S. P. J. (2019). Nutraceuticals derived from seed storage proteins: Implications for health wellness. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 710–719. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.044>
- Kumar, A., Narayan, R. K., Prasoon, P., Kumari, C., Kaur, G., Kumar, S., Kulandhasamy, M., Sesham, K., Pareek, V., Faiq, M. A., Pandey, S. N., Singh, H. N., Kant, K., Shekhawat, P. S., Raza, K., & Kumar, S. (2022). Mecanismos del COVID-19 en el cuerpo humano: Lo que sabemos hasta ahora. *Kompass Neumología*, 4(1), 3–20. <https://doi.org/10.1159/000521507>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Langyan, S., Khan, F. N., Yadava, P., Alhazmi, A., Mahmoud, S. F., Saleh, D. I., Zuan, A. T. K., & kumar, A. (2021). In silico proteolysis and analysis of bioactive peptides from sequences of fatty acid desaturase 3 (FAD3) of flaxseed protein. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(10), 5480–5489. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.027>
- Lee, Y.-C. J., Shirkey, J. D., Park, J., Bisht, K., & Cowan, A. J. (2022). An Overview of Antiviral Peptides and Rational Biodesign Considerations. *BioDesign Research*, 2022. <https://doi.org/10.34133/2022/9898241>

- León-Espinosa, E. B., Calderón-Domínguez, G., García-Garibay, M., Díaz-Ramírez, M., Cruz-Monterrosa, R. G., Ruiz-Hernández, R., Pérez-Ruiz, R. V., & Jiménez-Guzmán, J. (2021). Evaluation of the antioxidant activity from bovine serum albumin protein fractions. *Agro Productividad, IV*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i9.2149>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews, 46*(1–3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)
- Lombardo, F., Bentzien, J., Berellini, G., & Muegge, I. (2021). In Silico Models of Human PK Parameters. Prediction of Volume of Distribution Using an Extensive Data Set and a Reduced Number of Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 110*(1), 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.08.023>
- López-García, G., Dublan-García, O., Arizmendi-Cotero, D., & Gómez Oliván, L. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. *Molecules (Basel, Switzerland), 27*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041343>
- López-Pedrouso, M., Zaky, A. A., Lorenzo, J. M., Camiña, M., & Franco, D. (2023). A review on bioactive peptides derived from meat and by-products: Extraction methods, biological activities, applications and limitations. *Meat Science, 204*, 109278. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109278>
- Luna-Suárez, S., Medina-Godoy, S., Cruz-Hernández, A., & Paredes-López, O. (2010). Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology, 148*(4), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.06.009>
- Marcone, S., Belton, O., & Fitzgerald, D. J. (2017). Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology, 83*(1), 152–162. <https://doi.org/10.1111/bcp.13002>
- Mathur, D., Singh, S., Mehta, A., Agrawal, P., & Raghava, G. P. S. (2018). In silico approaches for predicting the half-life of natural and modified peptides in blood. *PloS One, 13*(6), e0196829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196829>
- Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). (2024). *Captopril (oral route)*.
- Ministry of Agriculture, F. and F. (2022). *Pesticide toxicity hazard* .

- Minkiewicz, Iwaniak, & Darewicz. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2022). BIOPEP-UWM Virtual—A Novel Database of Food-Derived Peptides with In Silico-Predicted Biological Activity. *Applied Sciences*, 12(14), 7204. <https://doi.org/10.3390/app12147204>
- Mintel. (2024). *Guía de Tendencias para Alimentos y Bebidas 2024*.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>
- Montesano, D., Gallo, M., Blasi, F., & Cossignani, L. (2020). Biopeptides from vegetable proteins: new scientific evidences. *Current Opinion in Food Science*, 31, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.008>
- Moore, S. (2021, October 27). *What is in Silico?*
- Mora, L., Gallego, M., & Toldrá, F. (2018). ACEI-Inhibitory Peptides Naturally Generated in Meat and Meat Products and Their Health Relevance. *Nutrients*, 10(9), 1259. <https://doi.org/10.3390/nu10091259>
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, 23(5), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Nelson, M. E., Hamm, M. W., Hu, F. B., Abrams, S. A., & Griffin, T. S. (2016). Alignment of Healthy Dietary Patterns and Environmental Sustainability: A Systematic Review. *Advances in Nutrition*, 7(6), 1005–1025. <https://doi.org/10.3945/AN.116.012567>
- Ngoc, L. T. N., Moon, J.-Y., & Lee, Y.-C. (2023). Insights into Bioactive Peptides in Cosmetics. *Cosmetics*, 10(4), 111. <https://doi.org/10.3390/cosmetics10040111>
- Nnane, I. P. (2005). PHARMACOKINETICS | Absorption, Distribution, and Elimination. In *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 126–133). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00458-1>
- North Carolina State University. (2024). *Amaranthus hypochondriacus*. <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/amaranthus-hypochondriacus/>
- Owusu-Ansah, Y. J., & McCurdy, S. M. (1991). Pea proteins: A review of chemistry, technology of production, and utilization. *Food Reviews International*, 7(1), 103–134. <https://doi.org/10.1080/87559129109540903>

- 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. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>
- Parodi, P. (2007). A Role for Milk Proteins and their Peptides in Cancer Prevention. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 813–828. <https://doi.org/10.2174/138161207780363059>
- Pawar, B., Gupta, T., Vasdev, N., Tekade, M., Arafat, B., & Tekade, R. K. (2023). Understanding pharmacotoxicology. In *Essentials of Pharmatotoxicology in Drug Research, Volume 1* (pp. 1–28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15840-7.00025-7>
- Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, 30(6), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Pérez-Rodríguez, M. L., Serrano-Carretero, A., García-Herrera, P., Cámara-Hurtado, M., & Sánchez-Mata, M. C. (2023). Plant-based beverages as milk alternatives? Nutritional and functional approach through food labelling. *Food Research International*, 173, 113244. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113244>
- Pihlanto-Leppälä, A. (2002). MILK PROTEINS | Bioactive Peptides. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1960–1967). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00327-8>
- Prashen, C., & Rotimi, A. (2019). *Food protein-derived peptides as bitter taste blockers*.
- R, K., Kumar, A., Vinod Kumar, K., Sengupta, A., Kundal, K., Sharma, S., Pawar, A., Krishna, P. S., Alfatah, M., Ray, S., Tiwari, B., & Kumar, R. (2024). AagingBase: a comprehensive database of anti-aging peptides. *Database*, 2024. <https://doi.org/10.1093/database/baae016>
- Rani, P., Kapoor, B., Gulati, M., Atanasov, A. G., Alzahrani, Q., & Gupta, R. (2022). Antimicrobial peptides: A plausible approach for COVID-19 treatment. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 17(5), 473–487. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.2050693>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review . *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46.
- Schlesinger, R. B., & Gardner, D. E. (2014). Respiratory Tract Toxicology. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 103–125). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00428-0>
- Schroeder, H. E. (1982). Quantitative studies on the cotyledonary proteins in the genus *Pisum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(7), 623–633. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330707>

- Séverin, S., & Wenshui, X. (2005). Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7–8), 645–656. <https://doi.org/10.1080/10408690490911756>
- Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, S. B., & Najda, A. (2022). The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. *Molecules*, 27(16), 5354. <https://doi.org/10.3390/molecules27165354>
- Shrestha, S., van 't Hag, L., Haritos, V., & Dhital, S. (2023). Comparative study on molecular and higher-order structures of legume seed protein isolates: Lentil, mungbean and yellow pea. *Food Chemistry*, 411, 135464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135464>
- Silvestre, M. P. C., Morais, H. A., Silva, V. D. M., & Silva, M. R. (2013). Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. *Nutrire*, 38(3), 278–290. <https://doi.org/10.4322/nutrire.2013.026>
- Sitanggang, A. B., Putri, J. E., Palupi, N. S., Hatzakis, E., Syamsir, E., & Budijanto, S. (2021). Enzymatic Preparation of Bioactive Peptides Exhibiting ACE Inhibitory Activity from Soybean and Velvet Bean: A Systematic Review. *Molecules*, 26(13), 3822. <https://doi.org/10.3390/molecules26133822>
- Soltani, S., Haghaei, H., Shayanfar, A., Vallipour, J., Asadpour Zeynali, K., & Jouyban, A. (2013). QSBR Study of Bitter Taste of Peptides: Application of GA-PLS in Combination with MLR, SVM, and ANN Approaches. *BioMed Research International*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/501310>
- Steward, H. (2020, December 7). *Plant-Based Products Replacing Cow's Milk, But the Impact Is Small*.
- TANEL, R. E., & LEVIN, M. D. (2006). Pharmacologic Treatment of Heart Disease. In *Pediatric Cardiology* (pp. 237–275). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-02367-2.50020-1>
- Taniya, M. S., MV, R., PS, S., Krishnan, G., & S, P. (2020). Bioactive peptides from amaranth seed protein hydrolysates induced apoptosis and antimigratory effects in breast cancer cells. *Food Bioscience*, 35, 100588. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100588>
- Temple, N. J. (2022). A rational definition for functional foods: A perspective. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.957516>
- Tu, M., Cheng, S., Lu, W., & Du, M. (2018). Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.005>
- Tu, M., Wang, C., Chen, C., Zhang, R., Liu, H., Lu, W., Jiang, L., & Du, M. (2018). Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of

- the inhibitory mechanisms. *Food Chemistry*, 256, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.107>
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.002>
- Valenzuela, F., & Segura, M. R. (2022). Amaranth and Chia: Two Strategic Ancestral Grains for Mexico's Sustainability. *La Val/Se-Food 2022*, 2. <https://doi.org/10.3390/blsf2022017002>
- Vasconcellos, R. S., Volpato, J. A., & Silva, I. C. (2024). Bioactive peptides extracted from hydrolyzed animal byproducts for dogs and cats. *Animal Frontiers*, 14(3), 38–45. <https://doi.org/10.1093/af/vfae012>
- Veiga, E., Ferreira, L., Correia, M., Pires, P. C., Hameed, H., Araújo, A. R. T. S., Cefali, L. C., Mazzola, P. G., Hamishehkar, H., Veiga, F., & Paiva-Santos, A. C. (2023). Anti-aging peptides for advanced skincare: Focus on nanodelivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 89, 105087. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105087>
- Vistoli, G., & Pedretti, A. (2007). Molecular Fields to Assess Recognition Forces and Property Spaces. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II* (pp. 577–602). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00142-5>
- Wang, J., Kadyan, S., Ukhanov, V., Cheng, J., Nagpal, R., & Cui, L. (2022). Recent advances in the health benefits of pea protein (*Pisum sativum*): bioactive peptides and the interaction with the gut microbiome. *Current Opinion in Food Science*, 48, 100944. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100944>
- Wang, N.-N., Dong, J., Deng, Y.-H., Zhu, M.-F., Wen, M., Yao, Z.-J., Lu, A.-P., Wang, J.-B., & Cao, D.-S. (2016). ADME Properties Evaluation in Drug Discovery: Prediction of Caco-2 Cell Permeability Using a Combination of NSGA-II and Boosting. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 56(4), 763–773. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00642>
- Wang, N.-N., Huang, C., Dong, J., Yao, Z.-J., Zhu, M.-F., Deng, Z.-K., Lv, B., Lu, A.-P., Chen, A. F., & Cao, D.-S. (2017). Predicting human intestinal absorption with modified random forest approach: a comprehensive evaluation of molecular representation, unbalanced data, and applicability domain issues. *RSC Advances*, 7(31), 19007–19018. <https://doi.org/10.1039/C6RA28442F>
- Warburg, O., & Christian, W. (1941). . *Biochem Z.*, 384–421.
- Warner, F. J., Lew, R. A., Smith, A. I., Lambert, D. W., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2005). Angiotensin-converting Enzyme 2 (ACE2), But Not ACE, Is Preferentially Localized to the Apical Surface of Polarized Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39353–39362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508914200>

- Weininger, D. (1988). SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 28(1), 31–36. <https://doi.org/10.1021/ci00057a005>
- Wong, M. K. S. (2016). Angiotensin Converting Enzymes. In *Handbook of Hormones* (pp. 263-e29D-4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00254-3>
- Wu, J., Liao, W., & Udenigwe, C. C. (2017). Revisiting the mechanisms of ACE inhibitory peptides from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.011>
- Xiao, C., Toldrá, F., Zhao, M., Zhou, F., Luo, D., Jia, R., & Mora, L. (2022). In vitro and in silico analysis of potential antioxidant peptides obtained from chicken hydrolysate produced using Alcalase. *Food Research International*, 157, 111253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111253>
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5–W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- Xu, E., Park, S., Calderon, J., Cao, D., & Liang, B. (2023). In Silico Identification and In Vitro Validation of Repurposed Compounds Targeting the RSV Polymerase. *Microorganisms*, 11(6), 1608. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061608>
- Zhao, T., Su, G., Zhang, L., Chen, J., Zhang, Y., Liu, W., Zhao, M., Zhang, J., & Huang, Q. (2024). A comprehensive review of specific activity and intrinsic connections of food-derived bioactive peptides for human health. *Food Frontiers*, 5(3), 1145–1165. <https://doi.org/10.1002/fft2.373>
- Zhao, X., Zhang, X., & Liu, D. (2021). Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health. *Journal of Functional Foods*, 86, 104680. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104680>
- Zhu, F. (2023). Amaranth proteins and peptides: Biological properties and food uses. *Food Research International*, 164, 112405. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112405>
- Zhu, Q., Rao, B., Chen, Y., Jia, P., Wang, X., Zhang, B., Wang, L., Zhao, W., Hu, C., Tang, M., Yu, K., Chen, W., Pan, L., Xu, Y., Luo, H., Wang, K., Li, B., & Shi, H. (2023). In silico development and in vitro validation of a novel five-gene signature for prognostic prediction in colon cancer. *American Journal of Cancer Research*, 13(1), 45–65.

## ANEXOS

ANEXO I: Bioactividades predichas para las proteínas estudiadas con base en su valor de A.

Tabla 5. Proteínas analizadas *in silico* con su bioactividad y número de biopéptidos basado en su valor de A.

Proteína	Bioactividad	Número de biopéptidos	Valor de A
11S	ACEI	1	0.0043
	Antiviral	<b>2</b>	<b>0.0280</b>
	Supresor de amargor	3	0.0022
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0065
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0022
	Inhibidor de XIAP	6	0.0022
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
Legumina	ACEI	1	0.0051
	Antiviral	2	0.0252
	Supresor de amargor	3	0.0000
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0024
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0018
	Inhibidor de XIAP	6	0.0018
	Anticáncer	7	0.0025
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0050
Vicilina	ACEI	1	0.0047
	Antiviral	2	0.0096
	Supresor de amargor	3	0.0000
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0063

	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
Convicilina	ACEI	1	0.0056
	Antiviral	2	0.0163
	Supresor de amargor	3	0.0000
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0079
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
$\alpha$ -s1 caseína	ACEI	1	0.0050
	Antiviral	2	<b>0.0402</b>
	Supresor de amargor	3	0.0050
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0000
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
	Antitrombótico	9	<b>0.0603</b>
	Antioxidante	10	0.0000
	Inhibidor de furina	11	0.0000
$\alpha$ -s2 caseína	ACEI	1	0.0000
	Antiviral	<b>2</b>	<b>0.0290</b>
	Supresor de amargor	3	0.0048
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0048

	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
	Antitrombótico	<b>9</b>	<b>0.0435</b>
	Antioxidante	10	0.0048
	Inhibidor de furina	11	0.0048
β-caseína	ACEI	1	0.0000
	Antiviral	2	<b>0.0116</b>
	Supresor de amargor	3	0.0039
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0077
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
	Antitrombótico	9	<b>0.0386</b>
	Antioxidante	10	0.0000
	Inhibidor de furina	11	0.0000
κ-caseína	ACEI	1	0.0178
	Antiviral	<b>2</b>	<b>0.0355</b>
	Supresor de amargor	3	0.0000
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0059
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
	Antitrombótico	9	0.0178
	Antioxidante	10	0.0118
	Inhibidor de furina	11	0.0000
	ACEI	1	0.0000

$\beta$ - lactoglobulina	Antiviral	<b>2</b>	<b>0.0432</b>
	Supresor de amargor	3	0.0000
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0123
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000
	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
	Antitrombótico	9	0.0000
	Antioxidante	10	0.0000
	Inhibidor de furina	11	0.0000
	Albúmina	ACEI	1
Antiviral		<b>2</b>	<b>0.0204</b>
Supresor de amargor		3	0.0017
Inhibidor de calpaína 1		4	0.0017
Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV		5	0.0000
Inhibidor de XIAP		6	0.0000
Anticáncer		7	0.0000
Inhibidor de ciclooxigenasa 2		8	0.0000
Antitrombótico		9	0.0000
Antioxidante		10	0.0000
Inhibidor de furina		11	0.0000
$\alpha$ - lactalbúmina	ACEI	1	0.0000
	Antiviral	<b>2</b>	0.0280
	Supresor de amargor	3	0.0000
	Inhibidor de calpaína 1	4	0.0195
	Inhibidor de dipeptidil peptidasa IV	5	0.0000
	Inhibidor de XIAP	6	0.0000
	Anticáncer	7	0.0000

	Inhibidor de ciclooxigenasa 2	8	0.0000
	Antitrombótico	9	0.0000
	Antioxidante	10	0.0000
	Inhibidor de furina	11	0.0000

ANEXO II: Valores de DHt (%) para las proteínas estudiadas con enzimas independientes y mezclas de éstas (“T+P”, tripsina y quimotripsina; “Q+T+P”, quimotripsina, tripsina y pepsina).

Tabla 6. Datos asociados a la *Figura 7* y *Figura 8*.

<b>Proteína</b>	<b>Enzima</b>	<b>DH (%)</b>
Globulina 11S	Tripsina	NA
	Pepsina	11.83
	Quimotripsina C	37.20
	T+P	23.97
	T+P+Q	54.64
Legumina	Tripsina	NA
	Pepsina	11.56
	Quimotripsina C	41.52
	T+P	23.76
	T+P+Q	57.69
Convicilina	Tripsina	19.02
	Pepsina	11.37
	Quimotripsina C	45.43
	T+P	30.53
	T+P+Q	67.91
Vicilina	Tripsina	12.76
	Pepsina	16.16
	Quimotripsina C	42.75
	T+P	28.62
	T+P+Q	60.96
$\alpha$ 1-caseína	Tripsina	10.00
	Pepsina	12.50
	Quimotripsina C	48.00
	T+P	22.73
	T+P+Q	62.12
$\alpha$ 2-caseína	Tripsina	14.42
	Pepsina	NA
	Quimotripsina C	45.67

	T+P	23.30
	T+P+Q	63.11
$\beta$ -caseína	Tripsina	8.08
	Pepsina	16.15
	Quimotripsina C	51.92
	T+P	24.42
	T+P+Q	64.34
K-caseína	Tripsina	8.24
	Pepsina	NA
	Quimotripsina C	44.12
	T+P	15.48
	T+P+Q	55.36
Albúmina	Tripsina	NA
	Pepsina	15.08
	Quimotripsina C	35.25
	T+P	29.59
	T+P+Q	54.59
$\alpha$ -lactalbúmina	Tripsina	NA
	Pepsina	18.94
	Quimotripsina C	38.83
	T+P	25.00
	T+P+Q	49.73
$\beta$ -lactoglobulina	Tripsina	11.18
	Pepsina	NA
	Quimotripsina C	43.48
	T+P	NA
	T+P+Q	57.14

ANEXO III: Péptidos bioactivos obtenidos tras la hidrólisis enzimática *in silico* y sus actividades.

Tabla 7. Datos de los péptidos bioactivos obtenidos *in silico* (Figura 9 a Figura 19).

Proteína	Enzima	No. De BAP	Bioactividad	
11S	Pepsina	2.00	Antiviral	
		1.00	Multifuncional	
	Quimotripsina C	2.00	Antiviral	
		1.00	Inhibidor de calpaína-1	
	T+P	1.00	Antiviral	
		1.00	Multifuncional	
	Q+T+P	1.00	Inhibidor de calpaína-1	
		1.00	Antiviral	
	Vicilina	Pepsina	1.00	Inhibidor de calpaína 1
			0.00	ACEI
0.00			Antiviral	
Tripsina		0.00	Inhibidor de calpaína 1	
		0.00	Antiviral	
		1.00	ACEI	
Quimotripsina C		0.00	ACEI	
		1.00	Inhibidor de calpaína 1	
		1.00	Antiviral	
		0.00	ACEI	
T+P		0.00	Antiviral	
		1.00	Inhibidor de calpaína-1	
		1.00	ACEI	
Q+T+P		0.00	Antiviral	
		2.00	Inhibidor de calpaína-1	
		2.00	ACEI	
Convicilina		Pepsina	1.00	Inhibidor de calpaína-1
			0.00	ACEI
	1.00		Antiviral	
	Tripsina	1.00	ACEI	
		0.00	Antiviral	
		0.00	Inhibidor de calpaína-1	
	Quimotripsina C	2.00	Inhibidor de calpaína-1	
		0.00	ACEI	
		2.00	Antiviral	
	T+P	1.00	Inhibidor de calpaína-1	
2.00		ACEI		

		0.00	Antiviral
	Q+T+P	2.00	Inhibidor de calpaína-1
		2.00	ACEI
		0.00	Antiviral
		0.00	Antiviral
Legumina	Pepsina	1.00	Antiviral
		1.00	Multifuncional
		0.00	Inhibidor de ciclooxigenasa-2
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
	Quimotripsina C	2.00	Antiviral
		1.00	Inhibidor de ciclooxigenasa-2
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Multifuncional
	T+P	1.00	Inhibidor de ciclooxigenasa-2
		1.00	Multifuncional
		1.00	Antiviral
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
	Q+T+P	2.00	Inhibidor de ciclooxigenasa-2
		1.00	Antiviral
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Multifuncional
$\alpha$ -s1 caseína	Pepsina	7.00	Antiviral
		5.00	Antitrombótico
	Quimotripsina C	0.00	Antitrombótico
		2.00	Antiviral
	T+P	1.00	Antitrombótico
		0.00	Antiviral
	Q+T+P	0.00	Antitrombótico
		1.00	Antiviral
$\alpha$ -s2 caseína	Tripsina	5.00	Antitrombótico
		1.00	Antioxidante
		0.00	Antiviral
		0.00	Inhibidor de furina
	Quimotripsina C	1.00	Antiviral
		0.00	Antioxidante
		0.00	Antitrombótico
		0.00	Inhibidor de furina
	T+P	1.00	Antioxidante
		0.00	Antiviral
1.00		Antitrombótico	

		0.00	Inhibidor de furina
	Q+T+P	1.00	Inhibidor de furina
		0.00	Antioxidante
		0.00	Antitrombótico
		0.00	Antiviral
		0.00	
$\beta$ -caseína	Pepsina	1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antitrombótico
		0.00	Supresor de amargor
	Tripsina	4.00	Antitrombótico
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Supresor de amargor
	Quimotripsina C	2.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antitrombótico
		0.00	Supresor de amargor
	T+P	1.00	Inhibidor de calpaína-1
		1.00	Antitrombótico
		0.00	Supresor de amargor
	Q+T+P	2.00	Inhibidor de calpaína-1
		1.00	Supresor de amargor
		0.00	Antitrombótico
k-caseína	Tripsina	2.00	Antitrombótico
		0.00	Antiviral
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	ACEI
	Quimotripsina C	1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antiviral
		0.00	Antitrombótico
		0.00	ACEI
	T+P	1.00	Antitrombótico
		0.00	ACEI
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antiviral
	Q+T+P	1.00	Inhibidor de calpaína-1
		1.00	ACEI
		0.00	Antiviral
0.00		Antitrombótico	
$\alpha$ -lactalbúmina	Pepsina	1.00	Antiviral
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
	Quimotripsina C	1.00	Antiviral
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
	T+P	0.50	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antiviral
	Q+T+P	0.50	Inhibidor de calpaína-1

		0.00	Antiviral
Albúmina	Pepsina	1.00	Antiviral
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	ACEI
	Quimotripsina C	1.00	Antiviral
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	ACEI
	T+P	1.00	ACEI
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antiviral
	Q+T+P	1.00	ACEI
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
		0.00	Antiviral
$\beta$ -lactoglobulina	Tripsina	2.00	Antiviral
		0.00	Inhibidor de calpaína-1
	Quimotripsina C	1.00	Antiviral
		1.00	Inhibidor de calpaína-1
	Q+T+P	0.00	Antiviral
		2.00	Inhibidor de calpaína-1

\*Las celdas subrayadas en color amarillo indican que no todas las variantes de la proteína correspondiente liberaron el BAP mostrado. El valor presentado en la tabla es el mayor número de BAP generado por alguna de las variantes.

#### ANEXO IV: Análisis estadístico de los datos de inhibición de la ACE de las fracciones peptídicas.

Tabla 8. Análisis de varianza de un solo factor con intervalo de confianza de 0.95 para los datos de la inhibición de la ACE en cada fracción peptídica.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6923.264	6	1153.877	14.390	0.001	3.866
Dentro de los grupos	561.310	7	80.187			
Total	7484.574	13				

Tabla 9. Prueba de Tukey efectuada en R Studio (con los paquetes Tidyverse y Ggplot2) de los resultados de inhibición de ACE de las fracciones peptídicas. Se destacan en amarillo los tratamientos con que presentan diferencias significativas.

Tratamientos	Diferencia	Superior	Inferior	P ajustada
2-1	-17.6725	-53.167653	17.8226532	0.4977369
3-1	4.5425	-30.952653	40.0376532	0.9978128
4-1	-62.968	-98.463153	-27.4728468	0.0022185
5-1	2.3865	-33.108653	37.8816532	0.9999432
6-1	-31.1935	-66.688653	4.3016532	0.0883479
Control-1	-12.7565	-48.251653	22.7386532	0.776362
3-2	22.215	-13.280153	57.7101532	0.2903162
4-2	-45.2955	-80.790653	-9.8003468	0.0147177
5-2	20.059	-15.436153	55.5541532	0.3788896
6-2	-13.521	-49.016153	21.9741532	0.7342029
Control-2	4.916	-30.579153	40.4111532	0.9966515
4-3	-67.5105	-103.005653	-32.0153468	0.0014482
5-3	-2.156	-37.651153	33.3391532	0.9999686
6-3	-35.736	-71.231153	-0.2408468	0.048454
Control-3	-17.299	-52.794153	18.1961532	0.5180416
5-4	65.3545	29.859347	100.849653	0.0017683
6-4	31.7745	-3.720653	67.2696532	0.0817487
Control-4	50.2115	14.716347	85.7066532	0.008353
6-5	-33.58	-69.075153	1.9151532	0.0643097
Control-5	-15.143	-50.638153	20.3521532	0.640829
Control-6	18.437	-17.058153	53.9321532	0.4574879

Tabla 10. Tratamientos y letra de identificación utilizada en el análisis estadístico.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	Control
Letra	ab	a	c	ab	bc	ab	ab