



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

**DETECCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS GENERADOS DURANTE LA
DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro* DE CASEÍNA MEDIANTE**

HPTLC–BIOENSAYO



LUZ DARY GUERRA FAJARDO

Tesis presentada a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

Profesor Guía: Dra. Karem Henríquez Aedo

Profesor co-Guía: Dr. Mario Aranda Bustos

Grupo de Investigación: Laboratorio de Biotecnología y Genética de los Alimentos (BGA)

Septiembre 2020

Concepción, Chile

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.



2019, Luz Dary Guerra Fajardo.

Profesor Guía

Dra. Karem Henríquez Aedo
Depto. de Ciencias y Tecnología de los Alimentos
Facultad de farmacia
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Mario Aranda Bustos
Depto. De Farmacia
Facultad de Química y de Farmacia
Pontificia Universidad Católica de Chile

Evaluador externo



Dra. Apolinaria García Cancino
Depto. de Microbiología
Universidad de Concepción

Director del programa

MSc. Sigrid Mennickent Cid
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción



*A Dios, a mis padres y a mis hermanos, gracias por hacer posible este
sueño.*

AGRADECIMIENTOS.

Al Proyecto FONDECYT N° 1171857, por el financiamiento de este trabajo de investigación.

A la dirección de postgrado de la Universidad de Concepción por las becas de arancel y estipendio, así como el financiamiento para la participación en congreso nacional e internacional para la difusión de resultados.

A mi tutor de tesis, Dra. Karem Henríquez Aedo, profesora a quien, respeto y tengo gran aprecio. Contribuyó activamente con mi formación durante todo este proceso. Gracias por su apoyo y paciencia.

A mi co-tutor de tesis, Dr. Mario Aranda Bustos, profesor a quien respeto y tengo gran estima, su direccionamiento han sido de gran ayuda para llevar a término este trabajo. Gracias por la confianza y apoyo en todo este tiempo.

Al laboratorio de Biotecnología y Genética de los Alimentos de la Universidad de Concepción

Al laboratorio de Investigación en Fármacos y Alimentos de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

A Darlene Fonseca, gracias por todo lo que me ha enseñado y gran amistad

A la profesora Sigrid Mennickent directora del programa, gracias por el cariño y apoyo brindado.

A mis compañeras Diana Correa y Sandra Lojano, a quienes, tengo un gran cariño, gracias por su amistad, su apoyo, sus consejos y su compañía.

A mi familia, por todo el amor y apoyo incondicional, por ser mi fortaleza y la fuente más grande de inspiración. Gracias por ser el motor de mi vida.

A mi novio Andrés Zapata, por ser mi compañero desde que empezó este sueño, gracias por creer en mí, por su apoyo y por sus palabras de motivación.

Contenido.

| | |
|---|-------------------------------------|
| Índice de tablas..... | x |
| Índice de figuras..... | xi |
| RESUMEN..... | Error! Bookmark not defined. |
| INTRODUCCIÓN..... | 16 |
| 1 MARCO TEÓRICO..... | 19 |
| 1.1 Leche y su composición química..... | 19 |
| 1.2 Generación de péptidos durante la digestión gastrointestinal de proteínas lácteas..... | 21 |
| 1.3 Péptidos bioactivos..... | 23 |
| 1.4 Actividades biológicas de los péptidos bioactivos..... | 24 |
| 1.4.1 Actividad antidiabética de los péptidos..... | 26 |
| 1.4.2 Actividad antineurodegenerativa de los péptidos..... | 28 |
| 1.4.3 Actividad antioxidante de los péptidos..... | 30 |
| 1.4.4 Actividad antimicrobiana de los péptidos..... | 32 |
| 1.5 Métodos de obtención de péptidos..... | 33 |
| 1.5.1 Hidrólisis enzimática..... | 34 |
| 1.5.2 Fermentación microbiana..... | 38 |
| 1.6 Digestión gastrointestinal..... | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.7 | Determinación analítica de péptidos..... | 43 |
| 1.7.1 | Separación de péptidos mediante HPTLC..... | 44 |
| 1.7.2 | Bioensayo..... | 45 |
| 2 | HIPÓTESIS DE TRABAJO..... | 48 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 49 |
| 3.1 | Objetivo general..... | 49 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 49 |
| 4 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 50 |
| 4.1 | Reactivos y sustancias químicas..... | 50 |
| 4.2 | Producción de péptidos de caseína mediante hidrólisis enzimática..... | 51 |
| 4.3 | Optimización de la fase móvil..... | 54 |
| 4.4 | Análisis de péptidos de caseína mediante HPTLC..... | 55 |
| 4.5 | Bioensayo en placa HPTLC para evaluar bioactividad de péptidos..... | 57 |
| 4.5.1 | Actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa..... | 57 |
| 4.5.2 | Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa a través de HPTLC-AchE..... | 59 |
| 4.5.3 | Capacidad antioxidante..... | 61 |
| 4.6 | Bioautografía directa para detectar actividad antibacteriana de los péptidos de caseína..... | 62 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.6.1 | Actividad inhibitoria contra la bacteria <i>L. plantarum</i> J16 y <i>B. subtilis</i> mediante HPTLC-Bioautografía. | 63 |
| 4.7 | Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> simulada (DGIS)..... | 65 |
| 5 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 68 |
| 5.1 | Optimización de parámetros cromatográficos | 68 |
| 5.2 | Obtención de péptidos de caseína a partir de la hidrólisis con enzimas digestivas..... | 72 |
| 5.3 | Determinación de péptidos inhibidores de la enzima α -glucosidasa..... | 78 |
| 5.4 | Determinación de péptidos bioactivos inhibidores de la enzima AchE..... | 81 |
| 5.5 | Determinación de los péptidos con capacidad antioxidante | 83 |
| 5.6 | Determinación de péptidos antimicrobianos <i>frente a L. plantarum</i> y <i>B. subtilis</i> | 86 |
| 6 | Formación de péptidos de caseína mediante la simulación de la digestión gastrointestinal..... | 91 |
| 6.1.1 | Impacto de las etapas de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> en la formación de péptidos y su efecto en las propiedades bioactivas. | 91 |
| 6.1.2 | Efecto de la digestión gastrointestinal simulada en la bioactividad de los péptidos a lo largo de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 94 |
| 7 | CONCLUSIONES..... | 97 |

| | | |
|----|------------------|-----|
| 8 | GLOSARIO..... | 100 |
| 9 | REFERENCIAS..... | 103 |
| 10 | ANEXOS..... | 126 |



Índice de tablas.

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Concentración de las principales proteínas de la leche de vaca ... | 20 |
| Tabla 2. Estudios de digestión <i>in vitro</i> de proteínas lácteas y alternativas analíticas desarrolladas. | 22 |
| Tabla 3. Condiciones empleadas para la hidrólisis enzimática..... | 38 |
| Tabla 4. Propiedades Físicas y químicas. | 71 |
| Tabla 5. Enzimas aplicadas con hidrólisis enzimática, y las condiciones operativas.. | 76 |
| Tabla 6. Condiciones de crecimiento para <i>L. plantarum</i> J16 y <i>B. subtilis</i> utilizadas en bioautografía HPTLC-Bioautografía directa. | 89 |



Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Funcionalidad de los péptidos bioactivos derivados de la leche en el sistema corporal..... | 26 |
| Figura 2. Mecanismo de acción de los inhibidores de la α -glucosidasa..... | 28 |
| Figura 3. Hidrólisis de proteínas alimentarias por fermentación microbiana o por varias enzimas digestivas durante el proceso de digestión, lo que resulta en la liberación de péptidos bioactivos. | 34 |
| Figura 4. Barreras potenciales de activación o inactivación de las proteínas durante la digestión y absorción gastrointestinal. | 42 |
| Figura 5. Procedimiento de hidrólisis enzimática de la caseína..... | 54 |
| Figura 6. Reacción de diazotación para la detección de inhibición de α -glucosidasa..... | 59 |
| Figura 7. Reacción de diazotación para la detección de inhibición de acetilcolinesterasa con acetato de 1-naftilo. | 61 |
| Figura 8. Reacción del radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) con eliminadores de radicales. | 62 |
| Figura 9. Detección de la actividad deshidrogenasa de microorganismos por reducción de sales de tetrazolio..... | 64 |
| Figura 10. Procedimiento que describe las condiciones del método simulado de digestión <i>in vitro</i> estático..... | 67 |
| Figura 11. Estrategia de optimización de solventes - 'Esquema de cuatro niveles'..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Separación de péptidos digeridos mediante hidrólisis enzimática..... | 72 |
| Figura 13. Péptidos digeridos mediante hidrólisis enzimática..... | 77 |
| Figura 14. Cromatogramas de HPTLC de péptidos inhibidores de la α -glucosidasa obtenidos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de caseína..... | 81 |
| Figura 15. Cromatograma de HPTLC de péptidos inhibidores de la AchE obtenidos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de caseína. | 82 |
| Figura 16. Cromatograma de HPTLC de péptidos antioxidantes..... | 86 |
| Figura 17. Bioautografía de péptidos antibacterianos sobre <i>B. subtilis</i> obtenidos durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de caseína. | 90 |
| Figura 18. Péptidos de caseína generados durante la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> | 94 |

RESUMEN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) se caracterizan por ser de larga duración, lenta progresión, que no se resuelven espontáneamente. Uno de los principales responsables es una dieta poco saludable. La actual preocupación por la morbilidad de las ECNT ha despertado un gran interés en el consumo de alimentos de calidad nutricional y que tengan un efecto saludable en el organismo. La leche es uno de los alimentos más consumidos, rica en proteínas como las caseínas, que, al ser digeridas durante la digestión gastrointestinal, se generan péptidos bioactivos.

El objetivo de esta tesis fue evaluar la generación de péptidos bioactivos durante la simulación gastrointestinal *in vitro* de caseína. Para ello se utilizó el modelo de digestión *in vitro* y se evaluó la actividad biológica. Los péptidos producidos se detectaron mediante cromatografía planar de alta eficiencia combinada con bioensayo (HPTLC-bioensayo).

Se aplicó el protocolo de digestión *in vitro* y obtuvo péptidos bioactivos. El método HPTLC-bioensayo, resulta una valiosa herramienta bioanalítica útil para la detección de péptidos, se detectó actividad antidiabética, antineurodegenerativa, antioxidante y antibacteriana. La simulación de la digestión ha permitido estudiar la variación de la actividad inhibitoria. Se ha observado la resistencia de los péptidos bioactivos formados durante la fase gástrica y/o la formación de nuevos péptidos en la fase intestinal.

PALABRAS CLAVE: Caseína, Alimentos funcionales, Péptido bioactivo, Digestión *in vitro*, Bioensayo HPTLC

ABSTRACT.

Chronic noncommunicable diseases (NCDs) are characterized by their long duration, slow progression that not resolve spontaneously. One of the main responsible is an unhealthy diet. The current concern about morbimortality of NCDs has sparked a great interest in the consumption of foods of nutritional quality and that have a healthy effect on the body. Milk is one of the most consumed foods, rich in proteins such as caseins, which, when digested during gastrointestinal digestion, generate bioactive peptides.

The objective of this thesis was to evaluate the generation of bioactive peptides during *in vitro* gastrointestinal simulation of casein. For this, *in vitro* digestion model was used and the biological activity was evaluated. The peptides produced were detected by high efficiency planar chromatography combined with bioassay (HPTLC-bioassay).

The *in vitro* casein digestion protocol was applied and bioactive peptides were obtained. The method HPTLC-bioassay is a valuable bioanalytical tool useful for the detection of peptides. antidiabetic, anti-neurodegenerative, antioxidant and antibacterial activity was detected. The simulation of the digestion has allowed studying the variation of the inhibitory activity. There has been observed the resistance of bioactive peptides formed during the gastric phase and/or the formation of new peptides in the intestinal phase.

Keywords: Casein, Functional foods, Bioactive peptide, in vitro digestion, HPTLC-Bioassay.



INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son enfermedades que presentan una larga duración, lenta progresión, que no se resuelven espontáneamente y que rara vez logran una curación total [1]. La OMS informa que cada año se producen 41 millones de muertes por ECNT, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en el mundo. Las principales incluyen las enfermedades cardiovasculares (CV) 44%, cánceres 22%, respiratorias crónicas 9.6% y diabetes 4%, estas cuatro patologías representan el 80% de las muertes [2]. En Chile, según el informe de la OMS al año 2018, las ECNT constituyen el 85% del total de muertes en el país, convirtiéndose en el principal problema de salud pública [2].

Una de las principales causas que ha llevado a un aumento de las ECNT es el estilo de vida, como: alimentación poco saludable, inactividad física, consumo de tabaco y uso nocivo de alcohol, comportamientos modificables que se han afianzado debido a la transición económica, social, cultural y los modos de vida del siglo XXI [1, 3, 4]. Siendo una dieta poco saludable uno de los principales factores de riesgo conductuales por los que se adquieren estas enfermedades. Hoy en día, se busca promover y proteger la salud a partir del consumo de dietas saludables como estrategia para prevenir y controlar las ECNT [5, 6]. Conjuntamente, la comunidad científica como la industria alimentaria se han interesado en la búsqueda de medidas preventivas relacionadas con la dieta, debido al aporte que los componentes de algunos alimentos desempeñan en la prevención de alguna de ellas [7]. Este interés

ha generado una concientización en el consumo de alimentos saludables, lo que ha estimulado el crecimiento de alimentos funcionales, siendo estos una alternativa para combatir la epidemia mundial de las ECNT [8].

Los alimentos funcionales satisfacen necesidades nutricionales básicas y ejercen un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo [9]. El término nació en Japón en 1991, y esta categoría de alimentos fue denominada “alimentos de uso específico para la salud” (FOSHU) [10], los cuales han demostrado un efecto beneficioso, reduciendo la incidencia de las ECNT [11]. En Chile, en la última década se ha incrementado la tasa de obesidad y el aumento de los niveles de mortalidad, situación que ha promovido la implementación de políticas públicas [12].

La necesidad de disminuir la morbimortalidad por ECNT, a partir de cambios en la dieta, donde se tenga en cuenta además del contenido calórico y nutrientes otros constituyentes no nutritivos de los alimentos, los cuales han demostrado un beneficio concreto en la salud [10, 13, 14]. Dentro de estos alimentos la leche es una fuente de nutrientes y moléculas bioactivas que tienen un efecto saludable [15].

La leche ha recibido considerable atención de los científicos y es reconocida como alimento clave en la nutrición. Sin embargo, no se han estudiado en profundidad los productos que se generan durante la digestión gastrointestinal cómo, por ejemplo, los péptidos con actividad biológica generados a partir de las proteínas de la leche. Así también, se desconoce las consecuencias de la interacción entre la caseína y el tracto digestivo. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la generación de péptidos a partir de caseína de

la leche durante la digestión gastrointestinal *in vitro* con propiedades bioactivas, específicamente capacidad antioxidante, antimicrobiana e inhibidores enzimáticos. Para evaluar la generación de péptidos bioactivos, producidos durante la digestión gastrointestinal (GI) simulada, se utilizó cromatografía en capa fina de alta eficiencia acoplado a bioensayo HPTLC-bioensayo. En consecuencia, este trabajo comparó el perfil peptídico de los digeridos de cada etapa del proceso digestivo para evaluar el impacto de la digestión en la formación de péptidos y su efecto y variación sobre las propiedades bioactivas. Para lo cual ha sido necesario plantearse las siguientes preguntas ¿Cómo influye el consumo de leche en la generación de péptidos con actividad funcional?, ¿Cómo se modifica la actividad funcional de los péptidos durante la digestión gastrointestinal? ¿La técnica HPTLC permitirá evaluar los péptidos bioactivos de caseína generados durante la digestión gastrointestinal? El problema descrito anteriormente ha motivado la constante búsqueda de péptidos con actividad funcional obtenidos durante la digestión gastrointestinal y nuevas herramientas analíticas que permitan el estudio de los mismos.

1 MARCO TEÓRICO.

1.1 Leche y su composición química

La leche es un alimento clave en la nutrición, suministra energía y cantidades significativas de proteína de alto valor biológico, y es la única fuente de nutrición en las primeras etapas de la vida [10, 16-19]. Hace una década, la importancia en el consumo de leche radicaba principalmente en el crecimiento y la salud ósea, mientras que los efectos a largo plazo tenían relevancia limitada; sin embargo, hoy en día, los efectos del consumo de leche se han asociado con un riesgo reducido de ECNT [16, 20, 21]

La leche está constituida principalmente por agua (87.3%), carbohidratos (4.6%), proteínas (3.2%), lípidos (3.9%) y minerales (0,7) [22]. Las proteínas se dividen en dos grupos principales, la caseína que comprende el 80% y las proteínas de suero el 20% [22, 23]. La caseína (CN), se trata de un grupo de proteínas que permanecen insolubles a pH 4.6 y 20°C, presentan un carácter ácido por ser ricas en ácido glutámico y aspártico [17]. Las caseínas se han clasificado como α_{s1} , α_{s2} , β y κ -caseína [23-25]. Tabla 1. La caseína está compuesta por aminoácidos (AA) como alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina [26]. La alta cantidad de residuos de prolina que contiene, interrumpen la formación de la estructura secundaria confiriéndole una estructura relativamente abierta y flexible que les hace altamente susceptibles a la

proteólisis permitiendo la liberación de una gran número y variedad de péptidos [27]. Esta composición de AA hace que la caseína sea ampliamente utilizada como ingrediente funcional en productos alimenticios debido al aporte de péptidos, con múltiples actividades de promoción de la salud y prevención de enfermedades [28-31]. Los beneficios para la salud más importantes de las proteínas lácteas se obtienen después de la digestión gastrointestinal y la liberación de péptidos [32].

Tabla 1. Concentración de las principales proteínas de la leche de vaca. Adaptado de Huerta E., Severin et al., y Ronquillo M. [25, 33, 34].

| Proteínas | Concentración en la leche (g/L) | Porcentaje de proteínas con respecto a la concentración total (p/p) |
|--|---------------------------------|---|
| Proteína Total | 33.0 | 100.0 |
| Caseína | 26.0 | 79.5 |
| α _{s1} -caseína | 10.0 | 30.6 |
| α _{s2} -caseína | 2.6 | 8.0 |
| β-caseína | 9.3 | 28.4 |
| κ-caseína | 3.3 | 10.1 |
| γ-caseína | 0.8 | 2.4 |
| PROTEÍNAS DEL SUERO | 6.3 | 19.3 |
| β-lactoglobulina | 3.2 | 9.8 |
| α-lactoalbúmina | 1.2 | 3.7 |
| Inmunoglobulinas | 0.7 | 2.1 |
| Seroalbúmina | 0.4 | 1.2 |
| Varias (Proteosa-peptona) | 0.8 | 2.4 |
| PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA DEL GLOBULO GRAS | 0.4 | 1.2 |

1.2 Generación de péptidos durante la digestión gastrointestinal de proteínas lácteas.

Recientemente se estudió el peptidoma de los digeridos yeyunales obtenidos después de la digestión gastrointestinal de la caseína [35]. Se identificaron dominios de proteínas de secuencias ya informadas que podrían tener un posible efecto fisiológico (antihipertensivo y opioide) al interactuar directamente con el epitelio intestinal o al ser absorbidos por el torrente sanguíneo [36]. Estos péptidos son muy atractivos para futuros y detallados estudios de inhibición, por lo que para evaluar el papel fisiológico en el organismo, los métodos de digestión *in vitro* son una gran herramienta y se han usado ampliamente para simular el proceso de digestión de las proteínas en el desarrollo de productos nutracéuticos [37-39]. A pesar de las limitaciones del método de digestión *in vitro* su modelado se ha propuesto como una estimación de la bioaccesibilidad de los péptidos o hidrolizados lácteos producidos durante el proceso de digestión [38-40]. En particular, los estudios de investigación se han centrado en la obtención de péptidos por hidrólisis con tripsina y por fermentación láctica de la caseína para determinar específicamente la actividad inhibitoria de la ECA de los péptidos producidos [28, 41-45].

Los estudios que hasta el momento se han reportado de la simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro* de proteínas lácteas mediante el protocolo armonizado de digestión estática *in vitro* (IVD) de InfoGest para la generación

de péptidos y evaluación de las propiedades bioactivas, así como las técnicas de análisis empleadas se mencionan a continuación. Tabla 2.

Tabla 2. Estudios de digestión *in vitro* de proteínas lácteas y alternativas analíticas desarrolladas.

| Fuente | Método de digestión | Actividad biológica | Herramienta analítica | Resultados |
|-------------------------------------|---|---|--|---|
| Leche de cabra y Kéfir [46]. | Protocolo de digestión <i>in vitro</i> IVD de InfoGest. | Antidiabético, efecto reductor del colesterol, actividad antioxidante y capacidad de unión mineral. | SDS-PAGE electroforesis. | Algunas actividades de los digeridos aumentaron. |
| Leche descremada en polvo SMP [47]. | Protocolo IVD de InfoGest. | | SDS-PAGE electroforesis y por HPLC-MS. | Se confirmó que el método armonizado muestra una consistencia mejorada de los datos IVD que permite una mejor comparabilidad de los resultados experimentales a la vez, se propone un ensayo estandarizado para la determinación de la actividad de cada enzima añadida |

| | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|--|
| Leche de burro fermentada [48]. | Protocolo (IVD) de InfoGest. | Enzima convertidora de angiotensina (ECA), antioxidante y antibacteriana. | SDS-PAGE electroforesis y HPLC. | Aumento en las actividades evaluadas. |
| Caseína [35]. | Protocolo (IVD) de InfoGest. | | SDS-PAGE electroforesis y HPLC-MS/MS. | El protocolo <i>in vitro</i> es una buena aproximación a la digestión gastrointestinal de las proteínas de la leche. |

Se describe una serie de estudios en los cuales se ha intentado obtener péptidos de caseína mediante la simulación de la digestión gastrointestinal, sugieren que la actividad biológica de las proteínas lácteas está asociada a los péptidos bioactivos y que se requiere de la implementación de nuevas estrategias analíticas para su análisis. Por lo cual, el presente trabajo se enfocó en la obtención de péptidos de la caseína durante la digestión gastrointestinal *in vitro* y evaluación de su actividad biológica *in situ*, utilizando el método de digestión *in vitro* estático estandarizado [37].

1.3 Péptidos bioactivos.

Un péptido es una molécula con una secuencia pequeña de aminoácidos (AA), unidos entre sí por enlaces amida [49]. Aunque algunos existen libres

en su fuente natural, la gran mayoría se encuentran inactivos dentro de la secuencia de la proteína precursora, que, al ser liberados en un proceso de proteólisis por enzimas específicas, que rompen los enlaces químicos de la proteína, se producen péptidos con una secuencia de aminoácidos específica [50-52].

Los péptidos bioactivos (PB) pueden entregarse a los consumidores en alimentos convencionales, suplementos dietéticos o venir incorporados en la formulación de alimentos funcionales y nutracéuticos [52-54]. Estos péptidos pueden regular funciones corporales importantes al influenciar directamente en muchos procesos biológicos por lo que se pueden clasificar según su actividad biológica. Los péptidos con actividad biológica obtenidos de la leche han sido identificados como ingredientes potenciales de alimentos funcionales y están dirigidos especialmente a ECNT relacionadas con la dieta [43, 51, 55].

1.4 Actividades biológicas de los péptidos bioactivos.

La variedad de funciones de los PB puede atribuirse a numerosas secuencias de AA. Es decir, las diferentes actividades se rigen y dependen de la estructura y de las características fisicoquímicas [14, 56, 57]. Se ha descrito que los péptidos tienen un potencial para la reducción del riesgo de enfermedades crónicas o aumentar la protección inmunológica natural ya que ofrecen un efecto biológico a nivel fisiológico, actuando en los sistemas cardiovascular, digestivo, endocrino, inmune y nervioso, presentando

actividad como: opioides, inmunomoduladores, antioxidantes, antitrombóticas, anticancerígenas, antidiabéticas, antihipertensivas, antimicrobianas, antiinflamatorias, entre otras [13, 30, 43, 58, 59]. Figura. 1 Sin embargo, estos péptidos se consideran menos potentes en sus efectos que los fármacos sintéticos, pero si más seguros debido a que es menos probable que se acumulen en los tejidos del cuerpo, gracias al mecanismo para su metabolismo y eliminación [5, 28]. Dentro de las diversas actividades que ofrecen los PB, esta investigación se centra en las actividades antidiabéticas, anti-neurodegenerativas, antioxidantes y antibacterianas.

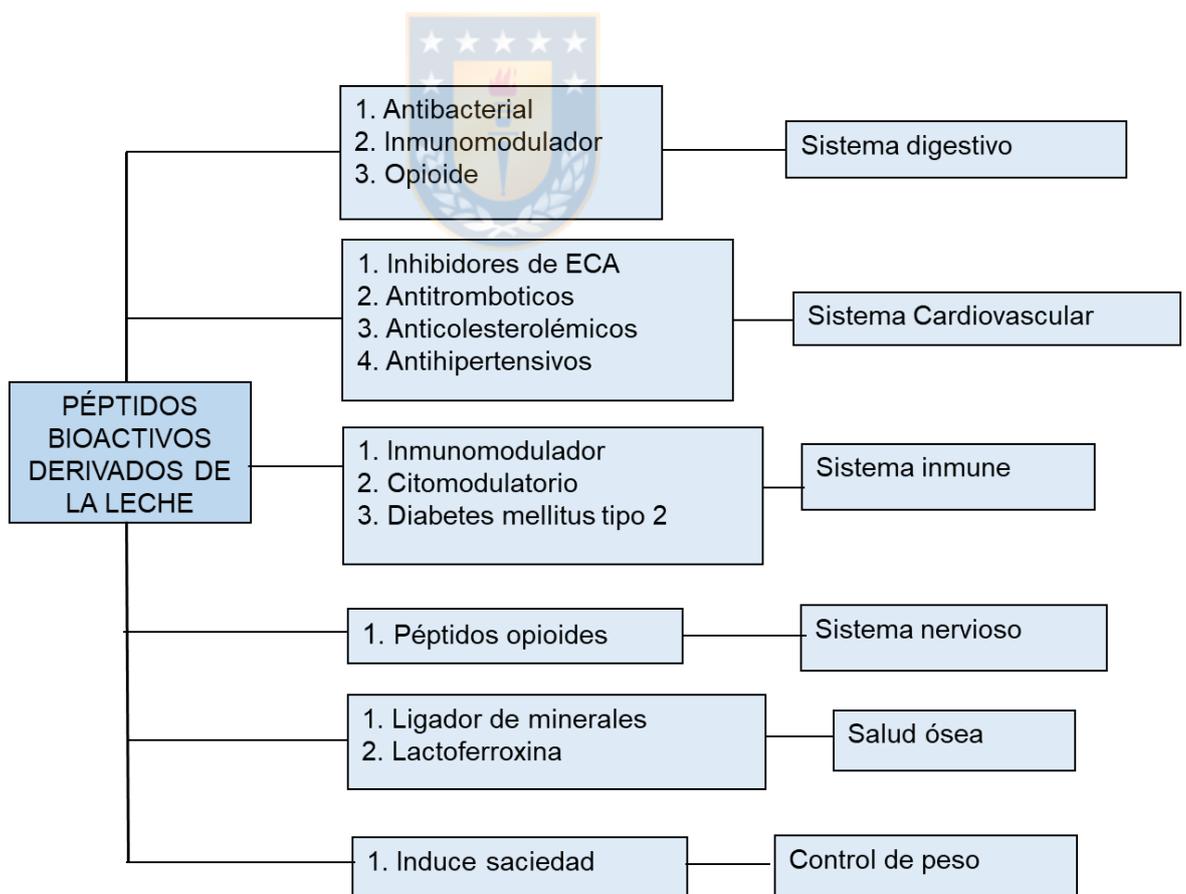


Figura 1. Funcionalidad de los péptidos bioactivos derivados de la leche en el sistema corporal. Adaptado de Mohanty et al. y Korhonen et al. [43, 55].

1.4.1 Actividad antidiabética de los péptidos

Dentro de las ECNT la diabetes es una de las de mayor incidencia, siendo la cuarta causa de muerte [60, 61]. El año 2019 la prevalencia de personas con diabetes mellitus fue de 415 millones y se estima que incremente a 642 millones de personas para el 2040 [61, 62]. Chile ocupa el octavo lugar dentro de los 45 países que forman parte de la OCDE con mayor porcentaje de personas adultas con diabetes (8.5%) [63].

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un aumento de glucosa en la sangre y representa el 90% de todos los casos de diabetes en todo el mundo [4, 60, 63]. La diabetes mellitus es un trastorno heterogéneo complejo caracterizado por tres alteraciones fisiopatológicas: secreción alterada de insulina, producción hepática excesiva de α -D-glucosa y resistencia a la insulina, un grupo de síndromes caracterizados por hiperglucemia [62, 64-66]. El principal enfoque terapéutico es retardar la absorción de la glucosa a través de la inhibición de las enzimas que hidrolizan carbohidratos como α -glucosidasa y α -amilasa [67, 68] Figura 2. La α -glucosidasa es una enzima unida a la membrana presente en la mucosa epitelial del intestino delgado que cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1,4 de disacáridos y oligosacáridos liberando moléculas de

glucosa [62, 69]. Los inhibidores de α -glucosidasa retrasan la descomposición de los carbohidratos durante la digestión de los alimentos, retrasando la absorción de glucosa, lo que disminuye efectivamente la hiperglucemia posprandial [62, 70]. Entre los fármacos antidiabéticos sintéticos disponibles actualmente están: las sulfonilúreas que estimulan la secreción de la insulina; las biguanidas y glitazonas que disminuyen la resistencia a la insulina y las glitazonas que se fijan de manera directa al receptor. Sin embargo, estos fármacos presentan efectos secundarios como trastornos gastrointestinales, flatulencia, aumento de peso entre otros, lo que ha limitado el uso [71]. Por lo que la comunidad científica se ha centrado en la búsqueda de nuevos inhibidores de la α -glucosidasa como los péptidos antidiabéticos derivados de alimentos [72-74]. Los péptidos bioactivos se consideran alternativas más seguras ya que provienen de fuentes alimenticias que no producen efectos secundarios [57]. Estudios clínicos han demostrado que los péptidos derivados de la caseína estimulan la secreción de la insulina y controlan el nivel de glucosa en la sangre convirtiéndose en una estrategia importante en el manejo de la diabetes mellitus al mejorar el control glucémico y a la vez contribuyen a reducir el riesgo de desarrollar complicaciones micro y macrovasculares y las enfermedades cardiovasculares [66, 75]. Así también, se ha confirmado que las proteínas de la dieta podrían ser una fuente natural de péptidos inhibitorios de la α -glucosidasa [62, 66, 76-79].

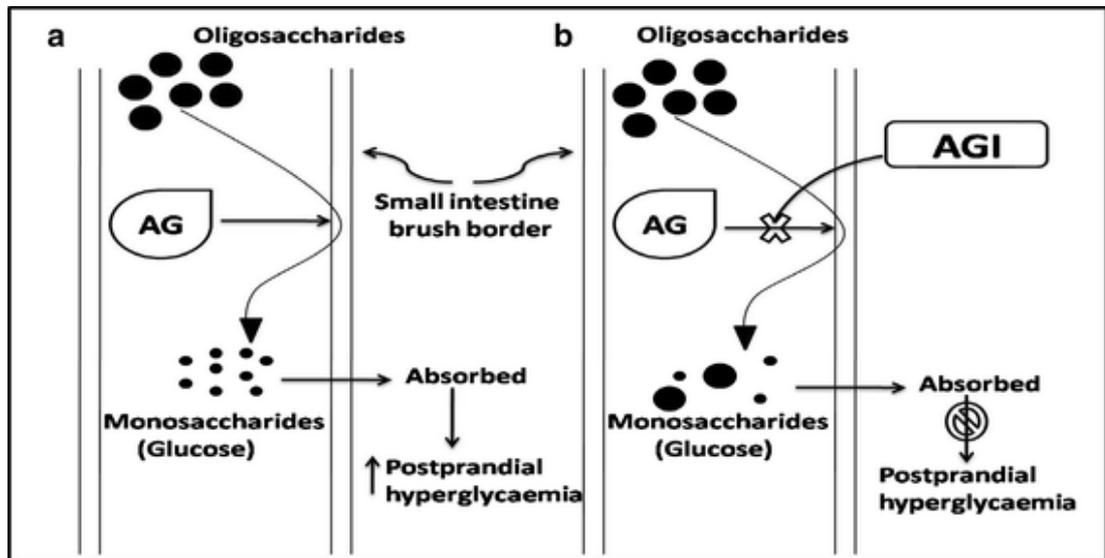


Figura 2. Mecanismo de acción de los inhibidores de la α -glucosidasa. Acción de la α -glucosidasa en hidratos de carbono (a) En ausencia de inhibidor (b) En presencia del inhibidor. AG: α -glucosidasa, inhibidor de la AGI α -glucosidasa. Adatado de Patil et al. [66].

1.4.2 Actividad antineurodegenerativa de los péptidos

La demencia se considera una enfermedad crónica no transmisible [80, 81]. Se estima que más de 50 millones de personas en el mundo tienen algún tipo de demencia y cada año hay 10 millones de casos nuevos, se prevé que la cifra de prevalencia de demencia aumente a 82 millones en 2030, generando implicaciones sociales y económicas [82]. La enfermedad del Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia que representa del 60 a 70% de los

casos [83]. Se estima que en Chile 200 mil personas viven con algún tipo de demencia, lo que equivale al 1.06% de la población total del país [80].

La EA es un trastorno progresivo que se caracteriza por la degeneración de la función neurológica, lo que resulta en la pérdida de la capacidad cognitiva e intelectual, relacionada con la pérdida de la memoria y la concentración [84, 85]. Uno de los hallazgos importantes asociado con el deterioro de las funciones cognitivas y las alteraciones del comportamiento que afectan a los pacientes con EA están asociadas con la reducción de la neurotransmisión colinérgica [86]. Se ha propuesto que la presencia de placas de beta amiloide ($A\beta$), los ovillos neurofibrilares y la degeneración/atrofia de las neuronas colinérgicas cerebro anterior provocan una disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh) [87]. La enzima acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza rápidamente toda la ACh en colina y acetato, terminado el efecto de la acetilcolina ACh en los receptores colinérgicos [88] [89-91]. Por lo tanto, el mecanismo de acción de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEi), es inhibir la acción de la enzima AChE disminuyendo la descomposición de la acetilcolina lo que resulta en un incremento de la concentración del neurotransmisor acetilcolina aumentando la eficacia de las neurotransmisiones colinérgicas [92, 93].

Una de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de la EA es contrarrestar el deterioro de la actividad colinérgica en el cerebro usando AChEi [94, 95]. Este tipo de molécula inhibidora se puede encontrar dentro de la amplia gama de productos naturales, la galantamina, un alcaloide indólico de amaryllidaceae, confirmado para el tratamiento de la EA [96]. A pesar del

potencial de estos compuestos bioactivos, todavía existe un gran interés en encontrar mejores inhibidores de la AChE de fuentes naturales para lograr una penetración cerebral más rápida, aplicando métodos de modelado farmacofórico basado en la estructura, a partir de los cuales se puede desarrollar análogos semisintéticos, por ejemplo, se aisló fisostigmina de las semillas de *physostigma venenosum* y su base molecular química proporcionó una plantilla para el desarrollo de rivastigmina mejorando los parámetros farmacocinéticos y la eficacia [87, 90]. Los medicamentos que se han aprobado como inhibidores de la AchE son la tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina y memantina. Sin embargo, son fármacos sintéticos presentan limitaciones como hepatotoxicidad, la corta duración de la acción biológica, la baja biodisponibilidad, los efectos secundarios colinérgicos adversos en la periferia, las ventanas colinérgicas estrechas, etc. [97]. Por lo cual, los pacientes abandonan el tratamiento y por eso existe la necesidad de buscar nuevos inhibidores de la AChE con menos efectos secundarios, enfocando la atención científica en el área de los péptidos bioactivos como fuentes naturales [88, 98, 99].

1.4.3 Actividad antioxidante de los péptidos.

El gran interés en la actividad antioxidante proviene de estudios epidemiológicos que muestran que una mayor ingesta de compuestos antioxidantes se asocia con un menor riesgo de mortalidad por enfermedades

CV y cánceres [100]. Estas enfermedades crónicas son actualmente unas de las principales causas de mortalidad en todo el mundo [60, 101-104] y se encuentran relacionadas con el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) [105], las que podrían causar daños al ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas conduciendo a la apoptosis celular. El principal enfoque terapéutico para la prevención son los antioxidantes, ya que protegen los órganos del daño oxidativo causado por las ROS, minimizando el estrés oxidativo y sus consecuencias para el cuerpo humano [106-109]. Por lo tanto, para prevenir enfermedades crónicas como CV y el cáncer por estrés oxidativo a partir de antioxidantes naturales con efectos beneficiosos en términos de implicaciones para la salud. La ingesta de productos naturales derivados de los alimentos puede retrasar la aparición de enfermedades al reducir el daño oxidativo por lo que se los péptidos bioactivos derivados de proteínas se prefieren como alternativas más seguras que sustituyen los antioxidantes sintéticos [44, 110-112]. Los mecanismos principales por los que actúan los péptidos es por eliminación de radicales libres y quelación de iones metálicos [106, 113, 114]. Los ensayos que habitualmente se utilizan para evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados de caseína son el método 1,1-difenil-2-picryl hidrazilo (DPPH), ABTS y FRAP [44, 115, 116]. Los péptidos bioactivos pueden ejercer actividades antioxidantes previniendo/retrasando enfermedades crónicas mejorando la salud humana al reducir el daño oxidativo y las respuestas proinflamatorias [105, 114, 117]. Por esto el creciente interés por ingesta de proteínas y sus péptidos bioactivos

constituyentes como posibles candidatos para actuar como antioxidantes [44, 104].

1.4.4 Actividad antimicrobiana de los péptidos.

La capacidad antimicrobiana es de particular interés en enfermedades crónicas que presentan complicaciones, por ejemplo, úlceras tróficas en pacientes con diabetes mellitus donde la terapia antimicrobiana es obligatoria [118, 119]. La era antibiótica promovida en la década de los cuarenta, ha sido crucial para la medicina moderna y la salud humana [120]. El surgimiento de los antibióticos ha permitido el control de enfermedades infecciosas y es de particular importancia en enfermedades crónicas complicadas como, la ulceración trófica en pacientes con diabetes mellitus representando un nuevo enfoque terapéutico para el tratamiento de infecciones producidas a largo plazo por microorganismos infecciosos [119, 121-123]. Desde entonces su producción y uso han sido excesivos, ocasionando el aumento de resistencia bacteriana (AMR) [124-126].

La resistencia a los antimicrobianos (AMR) o farmacorresistencia, es la capacidad que tienen los microorganismos de impedir que los antibióticos actúen contra ellos. Debido al fenómeno evolutivo natural que experimentan estas bacterias, desarrollando mecanismos que les permite sobrevivir en presencia de fármacos que habitualmente los dañaban [121, 127]. Por lo que es evidente la necesidad de desarrollar nuevos antimicrobianos, lo que ha

dirigido al descubrimiento de nuevos antibióticos de origen proteico. Diversos estudios muestran actividad antimicrobiana de péptidos derivados de la leche y se han identificado principalmente en fragmentos de caseína, β -lactoglobulina y α -lactalbúmina [57, 128]. Además, la caseína posee actividad sobre una amplia gama de bacterias como *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* entre otras [7, 52, 129, 130]. Siendo los péptidos una alternativa prometedora como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas [53, 57, 119, 122, 131-133].

1.5 Métodos de obtención de péptidos.

Los péptidos bioactivos pueden ser obtenidos de forma endógena durante la digestión gastrointestinal *in vivo* y también pueden producirse de manera *in vitro* mediante métodos como: hidrólisis enzimática, fermentación microbiana o una combinación de ambos, y mediante hidrólisis con enzimas digestivas; siendo la hidrólisis enzimática una de las principales formas de obtenerlos [52, 57, 134-136]. Lorenzen y Meisel (2005) demostraron que el tratamiento con tripsina de la leche y el yogur antes de la fermentación con cultivos dio como resultado la liberación de fracciones ricas en fosfopéptidos[137]. Figura 3.

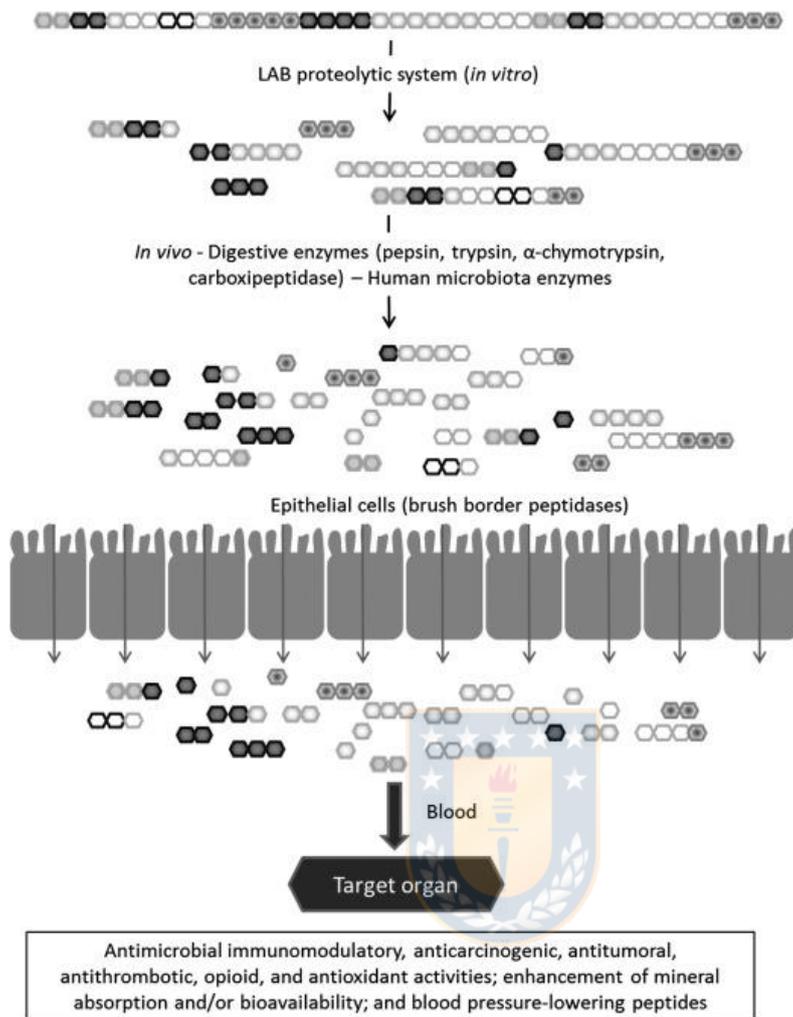


Figura 3. Hidrólisis de proteínas alimentarias por fermentación microbiana o por varias enzimas digestivas durante el proceso de digestión, lo que resulta en la liberación de péptidos bioactivos. Adaptado de Saavedra et al. [138].

I. Hidrólisis de caseína para generar péptidos bioactivos

1.5.1 Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis es una reacción química, que implica la escisión de las proteínas por ruptura del enlace peptídico [139]. En este método, al material proteico de interés se somete a un tratamiento enzimático a un pH, temperatura y tiempo específicos [57]. Es el método más eficiente y confiable para producir péptidos con funcionalidades específicas, debido a que es más fácil de escalar, tiene un tiempo de reacción corto y además es posible utilizar más de una enzima proteolítica y así obtener péptidos más pequeños [104, 140]. El método depende de la fuente de proteínas, el pretratamiento del sustrato de proteínas (precalentamiento y adición de solventes) de la enzima proteolítica, la relación enzima/proteína (E: P) y de las condiciones fisicoquímicas (temperatura, tiempo y pH) [52, 139, 141]. Tabla 3. Las tecnologías de hidrólisis enzimática que se han aplicado, son: presiones hidrostáticas, ultrasonido y microondas [114, 142, 143].

Las enzimas habitualmente utilizadas para liberar péptidos de proteínas lácteas son de origen animal, como la pepsina, tripsina y quimotripsina; de origen vegetal, como la papaína y la bromelaína; y las de origen microbiano, como la proteinasa K o la termolisina. Las enzimas se clasifican en función de su centro activo, del mecanismo de acción y de su estructura tridimensional. Las peptidasas y exopeptidasas hidrolizan los aminoácidos o dipéptidos de los extremos amino carboxílico terminales. Las proteinasas o endopeptidasas hidrolizan los enlaces peptídicos internos de la proteína [7]. La composición final de hidrolizado de proteínas depende casi en su totalidad de la especificidad de la proteasa que se utiliza. La especificidad de la proteasa se define como el tipo o tipos de AA junto a los cuales la enzima puede hidrolizar

el enlace peptídico que afecta la longitud del péptido, así como la composición y secuencia de aminoácidos, lo que a su vez influye en la actividad biológica de los hidrolizados [42, 59, 140, 144]. Se hidroliza una gran variedad de péptidos durante la digestión gastrointestinal, algunos de estos péptidos comparten características estructurales con los péptidos endógenos que actúan en el organismo como hormonas, neurotransmisores o péptidos reguladores [145]. Debido a las complejas reacciones que ocurren durante los procesos proteolíticos la identificación y caracterización de los péptidos endógenos se ha enfrentado a muchos retos y limitaciones en cuanto a su eficacia y acciones fisiológicas [146]. Por lo tanto, numerosos estudios han realizado el aislamiento y la caracterización de péptidos bioactivos principalmente de digeridos *in vitro* de proteínas lácteas. Para ello se ha empleado las enzimas responsables de la digestión gastrointestinal como la pepsina del estómago y la tripsina y quimotripsina pancreáticas, simulando las condiciones gastrointestinales en la liberación de péptidos con actividad biológica [7]. Siendo la tripsina bovina específica para los enlaces peptídicos en los cuales el grupo carbonilo es cedido por la Lys o la Arg [42], por ejemplo, del hidrolizado de caseína con tripsina se obtuvo el péptido con capacidad antioxidante cuya secuencia de aminoácidos fue Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu (YFYPEL) [147]. La pepsina rompe los enlaces peptídicos X-Y en los que X es un aminoácido hidrófobo (Phe o Leu, y menos específico Glu), tiene preferencia por escindirse después de aminoácidos aromáticos o carboxílicos [146], por ejemplo, Sornwatana et al. (2014) obtuvo el péptido (Asp-Glu-Asn-Ser-Lys-Phe) a partir de la proteína de fruta mediante la digestión con pepsina

[148]. La quimiotripsina por su lado hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas alimentarias, en el lado carboxilo de cadenas laterales aromáticas o hidrófobas grandes y principalmente da como resultado la liberación de péptidos con los aminoácidos His, Ala, Val, Leu, Tyr, Phe, Trp y Pro C-terminal[149]. Por ejemplo, se hidrolizó con quimotripsina la proteína de marco de lenguado de aleta amarilla, un desecho del proceso de fabricación del pescado, se obtuvieron hidrolizados YFP cuya secuencia de aminoácidos determinó como Met-Ile-Phe-Pro-Gly-Ala-Gly-Gly-Pro-Glu-Leu compuesta por aminoácidos de naturaleza hidrofóbica [150]. La especificidad de la papaína hacia los aminoácidos hidrófobos en la posición P2 proporcionaría a los péptidos un residuo de aminoácido hidrófobo en la penúltima posición C-terminal, que podría encajar bien en el subsitio S1 'de la ECA y promover así la actividad inhibidora [151]. Alcalase® muestra una baja especificidad, pero escinde preferentemente enlaces peptídicos en el extremo C-terminal de los residuos de aminoácidos hidrófobos[149]. Por ejemplo, se demostró que después de un tiempo de inducción de hidrólisis a 5 h de la proteína de suero con Alcalase®, se produjo el hidrolizado WPI con la actividad reductora de radicales libres [152] .Se realizó la hidrólisis con papaína, pepsina y tripsina en las condiciones óptimas para cada enzima, es decir a pH 6, pH 3 y pH 8 respectivamente, relación E:P de 1:200, temperatura de 37 °C y tiempo de 4 h [151]. Los procesos enzimáticos se prefieren a los métodos químicos debido a su capacidad para tener lugar en condiciones fisiológicas, no desnaturalizantes [7, 153].

Tabla 3. Condiciones empleadas para la hidrólisis enzimática

| Enzima | Buffer | pH/E:S (p/p) | Temperatura (°C) | Referencia |
|---------------|--------------------------|-----------------|---------------------|------------|
| Quimotripsina | 0.02 M | 8.0/1:100 | 25 | [59] |
| Tripsina | 0.05 M Tris HCl | 8.0/1:100 | 37 | [151] |
| Pepsina | 0.01 M Glicina- HCl | 2.0/1:200 | 37 | [151] |
| Pancreatina | 0,1 M NaHCO ₃ | 7.5/1:20 | 37 | [154] |
| Papaína | 0.2 M Fosfato | 6.0/1:200 | 37 | [151] |
| Proteinasa K | | 7.5/1:20 | 37 | [140] |
| Alcalasa | Caldo de cultivo | 8.5/2:100 | 65 | [152] |
| Aromazina | | 8.0/1:20 | 50 | [140] |
| Termolisina | Caldo de cultivo | 8.0/1:20 | 50 | [140] |



1.5.2 Fermentación microbiana

Esta fermentación es realizada principalmente por las bacterias ácido láctico de la leche. *Lactobacillus* spp. es uno de los géneros más utilizados para la fermentación de proteínas alimentarias para liberar péptidos bioactivos [58]. Estudios han demostrado que cepas de la especie *Lactobacillus helveticus* son capaces de liberar péptidos antihipertensivos [30] y tienen un efecto positivo en la liberación de péptidos, el proceso implica el cultivo de estos microorganismos en sustratos de proteína [104]. La bacteria debe estar en fase de crecimiento para secretar sus enzimas proteolíticas en el material proteico y liberar péptidos [155, 156]. El grado de hidrólisis en este proceso depende del tipo de la cepa bacteriana, el tiempo de fermentación y el tipo de proteína [57, 104].

II. Digestión de caseína para la generación de péptidos bioactivos

1.6 Digestión gastrointestinal

La digestión gastrointestinal es un proceso complejo esencial para la salud de los seres vivos, debido a la necesidad de extraer eficientemente la cantidad óptima de nutrientes y compuestos bioactivos de los alimentos, para el mantenimiento, crecimiento celular y como fuente de energía [157]. Los dos procesos principales que ocurren son: la rotura mecánica del alimento para producir partículas más pequeñas y la digestión enzimática donde las macromoléculas se degradan a moléculas más simples que pueden ser absorbidas por el organismo [25, 38].

Las proteínas representan una rica fuente de péptidos que es posible obtenerlos *in vivo* durante el proceso de digestión gastrointestinal mediante enzimas gastrointestinales, peptidasas de membrana del borde en cepillo [35] y proteasas bacterianas de la microbiota intestinal [106]. Sin embargo, algunas regiones específicas de proteínas han demostrado ser resistentes a los fenómenos digestivos [35]. Por lo que la determinación del contenido de péptidos bioactivos directamente de las proteínas alimenticias no es suficiente para predecir los posibles efectos *in vivo*, ya que los péptidos durante el paso al sistema sanguíneo pueden sufrir transformaciones fisiológicas, y por lo tanto las secuencias peptídicas originales liberadas de las proteínas alimentarias, pueden ser modificadas, pudiendo generar fragmentos inactivos o con una mayor actividad que su secuencia precursora [158]. El posible

efecto beneficioso depende de su capacidad de llegar intactos a los órganos donde llevaran a cabo su función debiendo cruzar una serie de barreras que deben evitar para no ser inactivados [15, 159, 160]. La eficacia nutricional de los productos alimentarios puede anticiparse mediante la simulación de lo que acontece en el tracto gastrointestinal. Siendo los estudios *in vitro* una alternativa acertada para evaluar la funcionalidad de los péptidos por estar basados en mecanismos biológicos. Sin embargo, sigue siendo difícil establecer una relación directa entre la actividad biológica *in vitro* y el efecto *in vivo* [159, 161]. Ver figura 4.

El mayor interés por las implicaciones en la salud de determinados alimentos, las recomendaciones nutricionales y la evidencia científica de presencia de compuestos bioactivos en los alimentos, todos motivados por ciertos componentes asociados con la prevención/tratamiento de enfermedades crónicas [8, 15, 162], ha despertado el interés en cómo se digieren estos alimentos, lo que ha conllevado al desarrollo de una amplia gama de métodos de digestión simulada, convirtiéndose en un desafío para las ciencias de la nutrición y las ciencias e industrias alimentarias [157].

En las últimas décadas se han desarrollado varios métodos de digestión *in vitro* que simulan las condiciones gastrointestinales fisiológicas de cada etapa, como: temperatura, tiempo de incubación, agitación, pH, composición enzimática y química de los fluidos gastrointestinales [40]. Los modelos de simulación gastrointestinal pueden clasificarse en estáticos y dinámicos, siendo los modelos estáticos técnicas simples y comprenden dos o tres etapas

de la digestión oral, gástrica e intestinal *in vivo* cuyos productos permanecen en gran medida inmóviles en un solo biorreactor que utiliza condiciones fijas al comienzo del experimento [163, 164]. Sin embargo, estos modelos son limitados ya que hay parámetros que quedarán fuera como el vaciado gástrico, absorción de nutrientes, movimientos peristálticos, cambios químicos entre otros factores que influyen en la biodisponibilidad de un compuesto activo [37, 40, 164].

La digestión gastrointestinal de las proteínas se inicia en el estómago por la pepsina, lipasa gástrica y el bajo pH. Luego, en el lumen intestinal la presencia de enzimas pancreáticas como tripsina, pancreatina, quimotripsina y lipasa intestinal, además de las peptidasas de membrana y proteasas bacterianas, son los responsables de la digestión de péptidos [15, 159, 165]. Los oligopéptidos producidos por acción de las enzimas gástricas y pancreáticas pueden absorberse en el tracto digestivo y ser transportados por el torrente circulatorio ejerciendo su actividad sin haber sido hidrolizados [17, 166]. Algunos péptidos después de ser absorbidos por los enterocitos pueden degradarse aún más por las peptidasas en la membrana intestinal de borde en cepillo generando dipéptidos y tripéptidos antes de ingresar al torrente sanguíneo o al sistema linfático pudiendo absorberse por portadores y ejercer su bioactividad en los órganos diana [15, 157, 167]. Posteriormente, los péptidos no digeridos y/o no absorbidos en el estómago ni en el intestino delgado entran al intestino grueso donde son metabolizados por numerosas enzimas microbianas, especialmente los géneros *Lactobacillus* y

Bifidobacterium, las cuales en su mayoría colonizan el intestino grueso o colon y pueden diferir según la dieta [168-171].

Para llevar a cabo el presente estudio, se utilizó el método armonizado de digestión *in vitro* estático, desarrollado por INFOGEST FA1005 descrito por Minekus et al. [37].

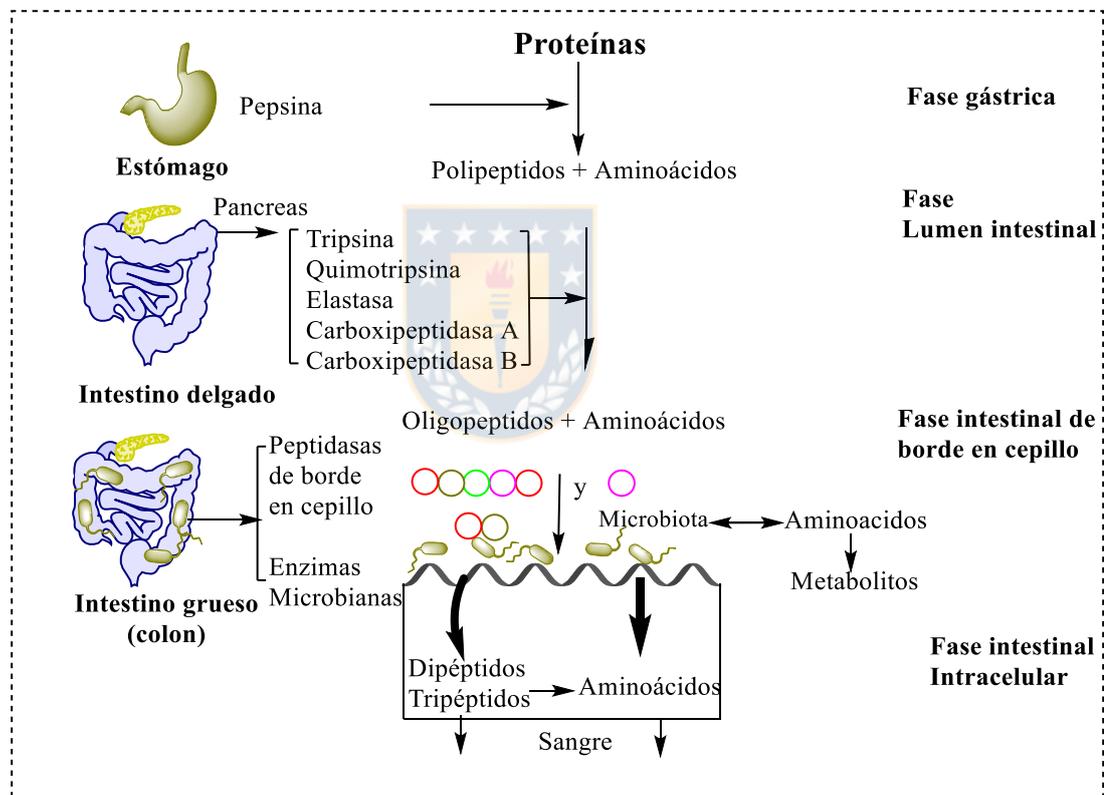


Figura 4. Barreras potenciales de activación o inactivación de las proteínas durante la digestión y absorción gastrointestinal. Adaptado de Dávila et al. (2013) y Segura et al. (2010) [159, 171]

1.7 Determinación analítica de péptidos.

Lo principal para el análisis de proteínas es la separación siendo el método de elección la electroforesis. Sin embargo, esta técnica no facilita la extracción de proteínas visualizadas en geles de poliacrilamida limitándose a parámetros como tamaño y carga [172]. Por otro lado, está la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) un enfoque que se usa típicamente para proteínas digeridas proteolíticamente: separación rápida de péptidos, alta sensibilidad y resolución, la técnica, sin embargo, es relativamente cara, no es adecuada para el análisis basado en cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) de mezclas a gran escala [173] y debido a una digestión previa algunas propiedades pueden variar y ya no pueden analizarse como la polaridad, la solubilidad y propiedades correspondientes [172]. Siendo la cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC) la herramienta que permite la separación de una amplia gama de analitos desde simples aminoácidos hasta péptidos y proteínas, pasando por moléculas de fármacos, alcaloides, fenoles, indoles, vitaminas y compuestos quirales [172, 174, 175]. Es especialmente adecuada para pruebas de detección en las que se puede evitar el pretratamiento de los analitos [176] y junto con otras técnicas como la espectrometría de masas (HPTLC-MS) hace que esta técnica sea el método de elección [174].

1.7.1 Separación de péptidos mediante HPTLC.

La HPTLC podría usarse como una alternativa o complemento al uso de la HPLC para las separaciones de péptidos pequeños e hidrófilos [177, 178]. Esta técnica ha tenido prioridad sobre otros métodos cromatográficos, como HPLC o cromatografía de gases (GC) debido al bajo costo, simplicidad, flexibilidad y accesibilidad [179]. Aunque la HPTLC tiene un poder de separación menor en comparación con el HPLC y la GC, ofrece varias opciones para la mejora poscromatográfica de la resolución como, las derivatizaciones selectivas o filtros electrónicos que compensan una limitada eficiencia de separación [180]. La HPTLC ha demostrado ser adecuada para la separación y el posterior análisis de efectos mediante la aplicación de bioensayos in situ (sobre la superficie de la placa), basándose en la retención de compuestos sobre la superficie de sílice [181]. La HPTLC tiene muchas ventajas que son cruciales para la biodetección, por ejemplo: es el único método cromatográfico que permite la presentación de resultados por medio de cromatogramas o (bio) autogramas; las muestras sembradas en una misma placa se pueden comparar una al lado de a otra; es posible cambiar muchos parámetros durante el proceso cromatográfico que influyen en la resolución; guardar/almacenar una separación en una placa de TLC. [182-184]. Esta metodología además de detectar compuestos activos sobre la placa permite analizar el cromatograma mediante varios procedimientos de detección post cromatográfica altamente dirigidos: (1) derivatización química, reactivos específicos; (2) uso de análisis guiados por bioactividad, dirigidos a

los efectos (EDA) de los compuestos activos; (3) registro de espectros de masas, identificación de estos compuestos por medio del acoplamiento en línea de la cromatografía con la espectrometría de masas (HPTLC-MS) [180, 185].

Esta técnica se considera un procedimiento de alto rendimiento ya que se requiere poca cantidad de muestra para el análisis; un alto número de muestras pueden separarse en paralelo en una misma placa; ofrece una mejor precisión y exactitud causada por el análisis simultáneo; se obtienen resultados rápidos, todas las muestras en la placa se analizan en el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones y baja sensibilidad a las impurezas [182, 186]. El análisis por HPTLC está influenciado por parámetros como, la fase estacionaria plana abierta, el disolvente y el uso de modificadores y la optimización implica la caracterización de la muestra, conocer las propiedades fisicoquímicas de los analitos, el tamaño de la molécula, así como la solubilidad en disolventes [100, 172].

1.7.2 Bioensayo.

Entre las numerosas aplicaciones de la HPTLC está, su empleo en el análisis de efecto directo (EDA) y el acoplamiento a cualquier sistema de cromatografía líquida/ espectrometría de masas (LC/MS) para la cuantificación [180]. EDA es el método de elección más rápido y menos costoso para el análisis de matrices complejas para detectar y descubrir

moléculas bioactivas con potencial farmacológico, considerado un paso necesario antes de realizar cualquier estudio farmacológico *in vivo* [182, 184, 185]. El acoplamiento de la HPTLC junto con la detección biológica proporciona información sobre sustancias con bioactividad y la selección rápida de un gran número de muestras para la bioactividad antibacteriana, antimicótica, antioxidante, inhibición de enzimas, etc. que pueden realizarse directamente *in situ* en la placa de HPTLC [100, 185, 187]. Los bioensayos utilizados para HPTLC-EDA han permitido el cribado rápido de un gran número de muestras para determinar la actividad biológica por ejemplo, antibacterianos, antioxidantes, antimicóticos e inhibidores enzimáticos y el aislamiento de compuestos activos nuevos [180, 184]. Esto es gracias a que HPTLC es un sistema abierto, plano que permite la eliminación completa de los solventes orgánicos antes de la detección biológica evitando la inactivación de las enzimas o la muerte de los organismos vivos, haciéndolo compatible con varios ensayos [74, 100, 109]. Las condiciones de la biodetección también pueden modificarse fácilmente, como es el tiempo, la temperatura y humedad [182].

Esta combinación de técnicas se ha convertido en una herramienta indispensable en el análisis enfocado a efectos arrojando un perfil químico característico de los compuestos separados por este método para su identificación, lo que ha aumentado su aplicación en la actualidad para el análisis de compuestos de baja masa molecular de muestras ambientales, farmacéuticas y alimentarias complejas [179, 182, 188-192].

Por todas las ventajas y características que propone esta metodología se eligió emplear la plataforma HPTLC-Bioensayo para la detección de péptidos inhibidores de las enzimas α -glucosidasa, acetilcolinesterasa, péptidos con capacidad antioxidante y actividad antibacteriana.



2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La hipótesis planteada en este proyecto es:

Durante la digestión gastrointestinal de caseína se generan péptidos con actividad biológica.



3 OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Determinar la liberación de péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* aplicando HPTLC-bioensayo.

3.2 Objetivos específicos.

- Aplicar y obtener péptidos bioactivos de caseína a partir del método de digestión gastrointestinal *in vitro* estático estandarizado
- Obtener y separar péptidos de caseína con enzimas digestivas mediante HPTLC.
- Evaluar la bioactividad de los péptidos generados durante la simulación gastrointestinal a través de ensayos de la capacidad antioxidante, antibacteriana e inhibición enzimática (α -glucosidasa y acetilcolinesterasa) utilizando la plataforma HPTLC-Bioensayo
- Evaluar el efecto de cada etapa de la simulación gastrointestinal *in vitro* en la formación y bioactividad de los péptidos formados.

4 MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Reactivos y sustancias químicas.

Muestras y estándares farmacéuticos: Caseína de leche bovina, acarbosa ($\geq 98.0\%$), clorhidrato de donepezilo ($\geq 98.0\%$) y clorhidrato de oxitetraciclina ($\geq 95.0\%$), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA).

Reactivos: Fosfato di-sódico (Na_2HPO_4), cloruro de potasio (KCl), fosfato dipotásico (K_2HPO_4), potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4), cloruro de sodio (NaCl) se obtuvieron en Scharlau (Barcelona, España). Bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de magnesio hexahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$), carbonato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$), carbonato de sodio (Na_2CO_3), bicarbonato de sodio (NaHCO_3), hidróxido de sodio (NaOH) se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania). Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), sal Fast Blue B, dithioerythritol (DTE), iodoacetamida (IAA), acetato de 1-naftilo y fluorescamina se adquirieron de Sigma-Aldrich. 2-nafil- α -D-glucopiranosido Gold Biotechnology® (St. Louis, USA). Agua ultra-pura (18.2 M Ω cm) fue producido por medio del sistema Simplicity de Millipore (Bedford, MA, USA).

Solventes: Metanol, 2-propanol, n-butanol, acetonitrilo, ninhidrina 0.2% p/v en etanol, ácido fórmico, ácido clorhídrico (HCl), amoníaco 35% v/v, trietilamina y piridina. Todos los solventes fueron grado HPLC adquiridos de Merck. La cromatografía se realizó en placas de HPTLC sílica gel 60 F₂₅₄ y ProteChrom.

Enzimas: Pepsina de la mucosa gástrica porcina (EC 3.4.23.1), pancreatina de páncreas porcino 4x USP (EC 232.468.9), tripsina del páncreas bovino 20000 E/g se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). La enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20), acetilcolinesterasa de *Electrophorus electricus* (EC 3.1.1.7) y bilis bovina (B3883-25G) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich.

Cepas bacterianas y medios de cultivo: Las cepas bacterianas utilizadas en los bioensayos fueron la bacteria probiótica *L. plantarum* J16 CECT 8944 [193] y la bacteria *Bacillus subtilis*, una cepa ambiental aislada del cepario del Laboratorio de Microbiología de la facultad de medicina de la Universidad de Concepción. El medio de cultivo de Mann Rogosa & Sharpe (M.R.S) se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) y el caldo Müller Hilton Difco y el agar se adquirieron de Becton (Sparks, EE. UU.).

4.2 Producción de péptidos de caseína mediante hidrólisis enzimática.

Se utilizaron dos métodos de hidrólisis enzimáticos para la obtención de péptidos a partir de la caseína, empleando tres enzimas digestivas, pepsina, pancreatina y tripsina. Las condiciones óptimas fisiológicas como buffer, pH, tiempo y temperatura se tienen en cuenta para cada una en particular. Tabla 4.

La hidrólisis de caseína con pepsina y pepsina-pancreatina se llevó a cabo con el protocolo descrito por [194]. La caseína fue solubilizada en 25 mL de

buffer bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 0.05 M a una concentración de 40 mg/mL. Para ello, cada enzima se disolvió por separado. Pepsina fue preparada a una concentración de 240 g/L en buffer IES (50 g/L NaCl, 6 g/L de KCl y 3 g/L de CaCl_2). La pancreatina se disolvió (40 g/L) en buffer GES (6.8 g/L NaCl, 2.2 g/L de KCl, 12 g/L NaHCO_3) y 2.2 g/L CaCl_2). Inicialmente, la hidrólisis se llevó a cabo con pepsina. El pH fue ajustando a 2 con HCl, 1 M. La reacción se inició con la adición de 312 μL de la enzima a la solución de caseína para alcanzar una relación enzima: proteína de 1:13 Las muestras fueron incubadas durante 2 horas a 37° C en la estufa y a 150 rpm de agitación con agitador Orbital (Boeco, Alemania). La enzima se inactivó por elevación del pH a 7 con NaOH 1 M [7, 35].

Posteriormente, para la hidrólisis consecutiva de pepsina-pancreatina se repitió el mismo procedimiento anterior. Se adicionó 575 μL de pancreatina para alcanzar una relación enzima: proteína de 1:43 y fue incubada con agitación 150 rpm durante 2 horas a 37° C. La reacción fue inactivada a 95°C por 10 minutos. Simultáneamente, se prepararon los blancos de cada hidrólisis que consistían en la mezcla de la enzima, sin proteína de sustrato para descartar la influencia de los reactivos en la digestión de caseína. Las muestras fueron centrifugadas a 1200 x g durante 10 minutos y almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis [7, 35]. Ver figura 5.

La hidrólisis de caseína con tripsina, se realizó de manera similar al procedimiento descrito por Deng et al. [144] con algunas modificaciones. Brevemente, la caseína fue disuelta en 1 mL de buffer NH_4HCO_3 , 0.05 M a una concentración de 0.1mg/mL, y se ajustó a pH 8. Luego, se añadió 12 μL

Dithioerythritol (DTE) (0.1 M en agua ultra pura), y se incubó durante 5 minutos a 95°C. Luego, que la solución llegue a temperatura ambiente se añadió 24 µL de iodoacetamida (IAA) (0.1 M en agua ultra pura) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La tripsina se preparó en buffer NH_4HCO_3 a una concentración de 0.5 mg/mL. La reacción se inició con la adición de 20 µL de tripsina a la solución de caseína para alcanzar una relación enzima: proteína de 1:10 [p/p], la mezcla fue incubada a 37°C por 7 horas. La reacción fue detenida adicionando 10 µL de ácido fórmico. La muestra hidrolizada fue almacenada a -20° C hasta su posterior análisis.



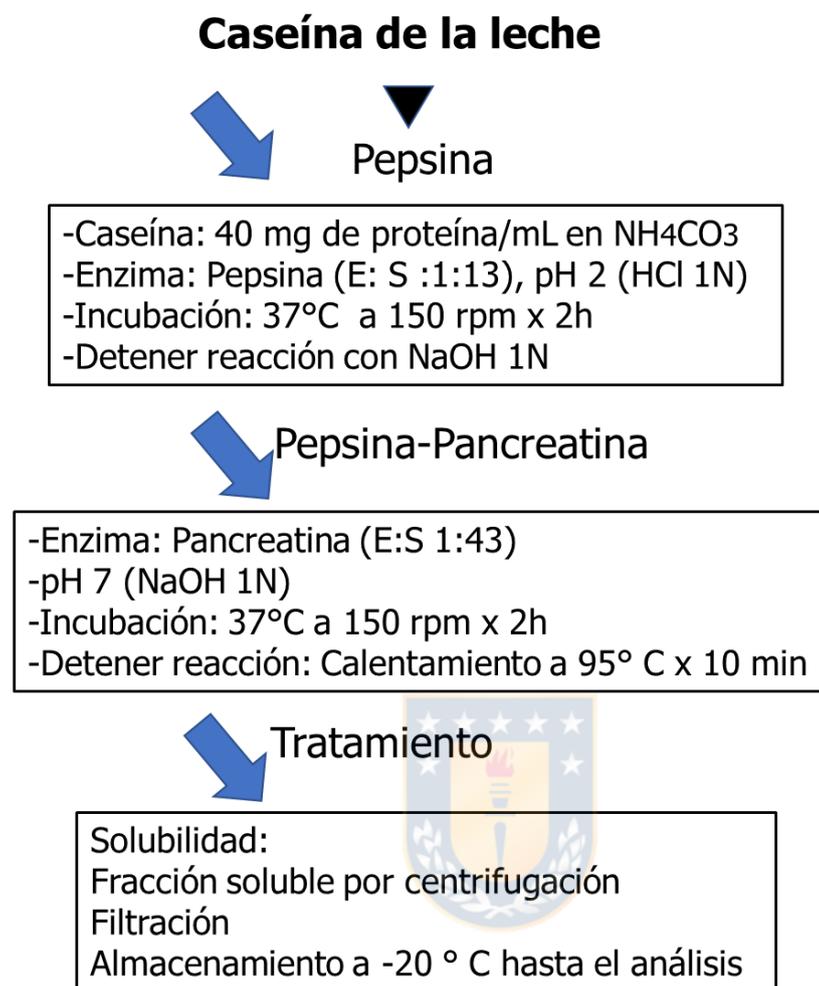


Figura 5. Procedimiento de hidrólisis enzimática de la caseína.

4.3 Optimización de la fase móvil.

Una vez obtenidos los péptidos, se procedió a la separación y detección de éstos. Para lo cual fue necesario establecer un sistema de separación cromatográfico, con un amplio rango de polaridad, teniendo en cuenta la posible variabilidad de los péptidos obtenidos. Se probaron distintas fases móviles descritas en bibliografía que permitan la separación de la mayor

cantidad de péptidos en la matriz de las digestiones y agentes derivatizantes para la detección [172, 178, 186, 195].

La optimización de la fase móvil se realizó de acuerdo al triángulo de selectividad de solvente de Snyder, que se trata de un esquema de cuatro niveles y la metodología seguida por Biller et al. [172] con algunas modificaciones. Este esquema de trabajo busca combinar diversos solventes, que aporten diferentes propiedades a la mezcla. En nivel uno, se propone la mezcla de solventes puros, estas fases móviles consisten en solventes 100% orgánicos, no hay separación, con factores de retardo (R_f) inferiores a 0.1; en el nivel dos, se propone agregar agua como componente polar; en el nivel tres, del esquema se debe agregar un modificador que pueden ser ácidos o bases, siendo el uso del modificador esencial para una buena separación, y finalmente en el nivel cuatro se hace el ajuste con combinaciones de la mezcla de solventes. La clasificación de solventes comunes para cromatografía TLC de Snyder está basado en interacciones intermoleculares específicas, capacidad de aceptación/donación de protones y el momento dipolar [196].

4.4 Análisis de péptidos de caseína mediante HPTLC

Las separaciones de los péptidos se realizan mediante la plataforma HPTLC utilizando el sistema CAMAG (Muttentz, Suiza), se emplearon placas HPTLC, sílica Gel 60 F₂₅₄. Para el tratamiento de las placas estas fueron prelavadas una vez con metanol y activadas durante 30 minutos a 100°C en una placa

calefactora (CAMAG TLC). Para la siembra de las muestras se utilizó una placa de 10x10 cm, sobre la cual se aplicaron las muestras por duplicado, dividiendo la placa en dos secciones: la primera sección se usó para derivatización y la segunda para bioensayo. Las placas se cortaron con el cortador de placas smartCUT (CAMAG, Muttenz, Suiza) de 5 cm de ancho y 10 cm de largo. Se sembró la muestra digerida a 7 mm desde el borde izquierdo y 7 mm desde el borde inferior. El volumen de sembrado de las muestras fue de 10-12 μ L como bandas de 6-7 mm (para obtener bandas definidas), a una distancia entre bandas de 5 mm (los espacios y el tamaño de la placa se ajustaron de acuerdo al número de muestras) y una velocidad de dosificación de 50 nL/s, bajo un flujo de nitrógeno utilizando un inyector de muestras automático de HPTLC (ATS4). La separación se llevó a cabo utilizando una cámara de desarrollo múltiple automatizado (ACD2). La fase móvil elegida se dejó migrar hasta una distancia de migración de 9 cm (esta pudo variar en algunas separaciones). Finalmente, las placas fueron secadas a 90° C por 30 minutos para evaporación completa de solventes.

Para la detección post-cromatográfico de los péptidos, se realizaron diferentes procedimientos de derivatización, usando un dispositivo de inmersión (Inmersión Device III CAMAG). Para la detección mediante el primer enfoque, las placas secas se sumergen en solución reactivo I, Fluorescamina (0.02% p/v en acetona), se dejaron secar durante 20 minutos a 90° C en una placa calefactora, después las placas fueron sumergidas en la solución reactivo II; trietilamina (10% v/v en acetona) y se dejaron secar a 90° C durante 20 minutos de acuerdo al procedimiento descrito por Panchagnula et al. [186] con

algunas modificaciones. Los péptidos se detectaron con longitudes de onda de 366 nm (bandas fluorescentes azules), utilizando un sistema de documentación fotográfica CAMAG Reprostar 3. En un segundo enfoque, la placa desarrollada fue derivatizada con una solución de ninhidrina (0.2% p/v en etanol), y luego secadas a 70° C durante 5 minutos (bandas violetas) y se realiza la detección en longitudes de onda visible. [178].

4.5 Bioensayo en placa HPTLC para evaluar bioactividad de péptidos.

4.5.1 Actividad inhibitoria sobre la enzima α -glucosidasa.

La actividad inhibidora sobre la α -glucosidasa fue determinada por el método de diazotización implementado por Galarce et al. [70]. Este ensayo se basa en la determinación de la escisión de 2-naftil- α -D-glucopiranosido por la enzima α -glucosidasa. El β -naftol formado reacciona con la sal Fast Blue, para dar un colorante púrpura en la placa HPTLC [197]. Los péptidos con actividad sobre la α -glucosidasa inhiben la acción de la enzima, bloqueando la formación de β -naftol, de esta manera evitarían la digestión de varios carbohidratos complejos [59]. (Ver reacción Figura 6).

Para la detección del efecto inhibitor sobre la enzima α -glucosidasa en la fracción de placa dispuesta para bioensayo. La placa una vez desarrollada y secada se neutralizó con buffer fosfato (0.1 M) ajustado a pH 7, y secada a 115° C por 5 minutos. Luego, la placa fue sumergida en solución de sustrato

2-naftil- α -D-glucopiranosido (4.1 mM en metanol), y fue secada durante 15 minutos a 60° C en placa calefactora. La reacción enzimática se inició, al sumergir la placa en solución de enzima α -glucosidasa (0.125 U/100 μ L en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4), y luego incubada durante 15 minutos a 37°C en cámara de incubación implementada en el laboratorio, la que contiene en el fondo papel humedecido con agua ultrapura para atmósfera de humedad, evitando el contacto de la placa con el fondo del recipiente. Finalmente, la placa fue atomizada con la solución reveladora Fast Blue (2.4 mM en agua ultra pura), mediante un pulverizador TLC (Merck) y posteriormente secadas a temperatura ambiente, hasta observar un color púrpura. Las bandas de inhibición sobre la placa se observaron decoloradas sobre el fondo purpura. La fotodocumentación de los péptidos inhibidores en la placa fue realizada bajo iluminación (reflectancia) con luz blanca. Como control positivo de inhibición de α -glucosidasa fue utilizado el inhibidor acarbosa (5 mg/mL en metanol), que se sembró un volumen de 5 μ L en paralelo.

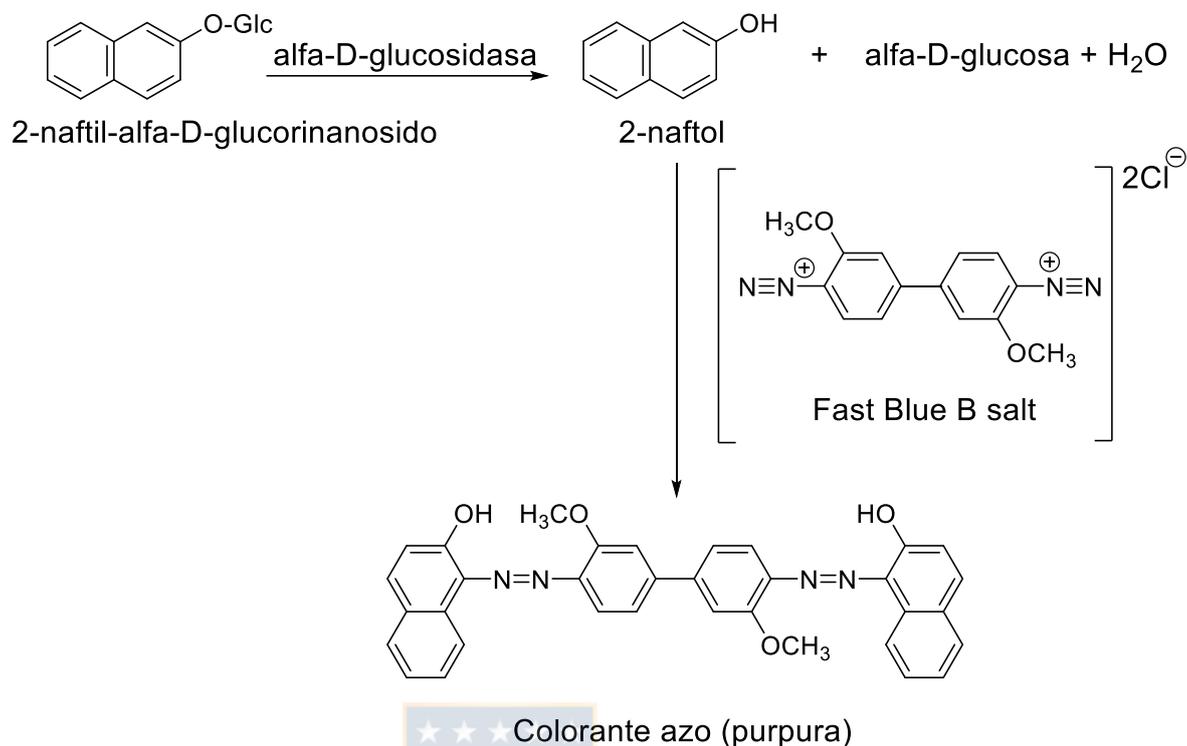
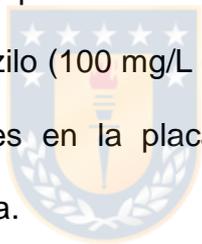


Figura 6. Reacción de diazotación para la detección de inhibición de α -glucosidasa. Adaptado de Marston (2011). [100].

4.5.2 Actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa a través de HPTLC-AchE.

La actividad inhibidora sobre la AchE fue determinada mediante el método de diazotización que utiliza 2-naftil- α -D-glucopiranosido como sustrato y sal Fast Blue B como reactivo de derivatización implementado por Galarce et al. [87] En este ensayo la enzima reacciona con acetato de 1-naftilo para producir 1-naftol. El 1-naftol que se forma reacciona con sal Fast Blue, para dar un colorante diazo de color púrpura (ver reacción Figura 7). Para el ensayo de la

enzima AchE, la placa fue neutralizada en buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 y por 5 minutos y secada a 115°C. Después la placa fue sumergida en solución de sustrato 1-naftil acetato (6.7 mM en etanol), y secada durante 20 minutos a 70°C en placa calefactora. La reacción enzimática se inició al sumergir la placa en la solución de enzima AchE (0.25 U/100 µL en buffer fosfato 0.1 M pH 7.4) y luego se incubó en la cámara de incubación implementada durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, se atomizó sobre la placa Fast Blue (1.58 mM en agua ultra pura), y fue secada a temperatura ambiente, hasta observar en la placa un color púrpura que contrasta con las zonas de inhibición decoloradas. Como control positivo de inhibición de acetilcolinesterasa fue sembrado 5 µL de donepezilo (100 mg/L en metanol) en paralelo. La imagen de los péptidos inhibidores en la placa se documentó bajo iluminación (reflectancia) con luz blanca.



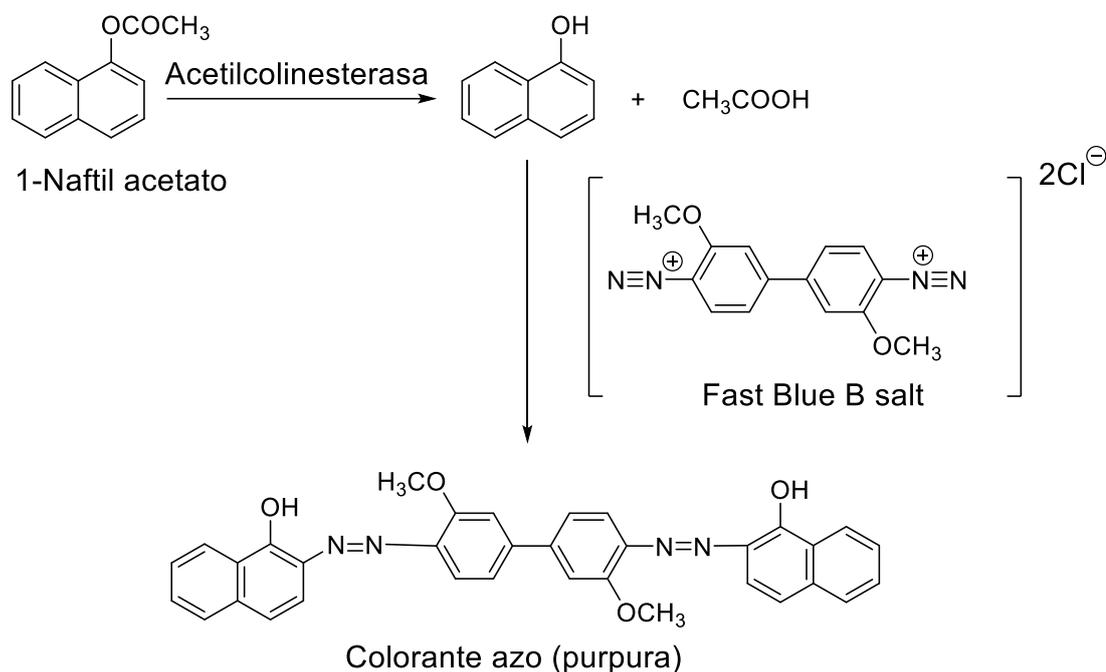


Figura 7. Reacción de diazotación para la detección de inhibición de acetilcolinesterasa con acetato de 1-naftilo. Adaptado de Dewanjee et al. [197].

4.5.3 Capacidad antioxidante.

La determinación de compuestos con capacidad antioxidante se realizó aplicando el método DPPH* *in situ*, usando la metodología propuesta por Móricz et al. [187] con algunas modificaciones. Para esto, se sembraron las muestras digeridas en placas HPTLC, para luego ser desarrolladas y secadas como se describió en el punto 5.4. La placa fue neutralizada con buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 y secada durante 5 minutos a 115°C. Posteriormente, las placas fueron sumergidas en la solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) al 0.2

% p/v en metanol, se dejó secar por 30 segundos a 60 °C en estufa y se incubó por 30 minutos en oscuridad. Este método de detección es guiado por la reducción-decoloración del radical DPPH sobre la placa (Ver reacción Figura 8). Zonas decoloradas sobre fondo púrpura indican estabilización del radical, por tanto, la presencia de analitos con capacidad antioxidante. La documentación se realizó con luz blanca (modo transmitancia).

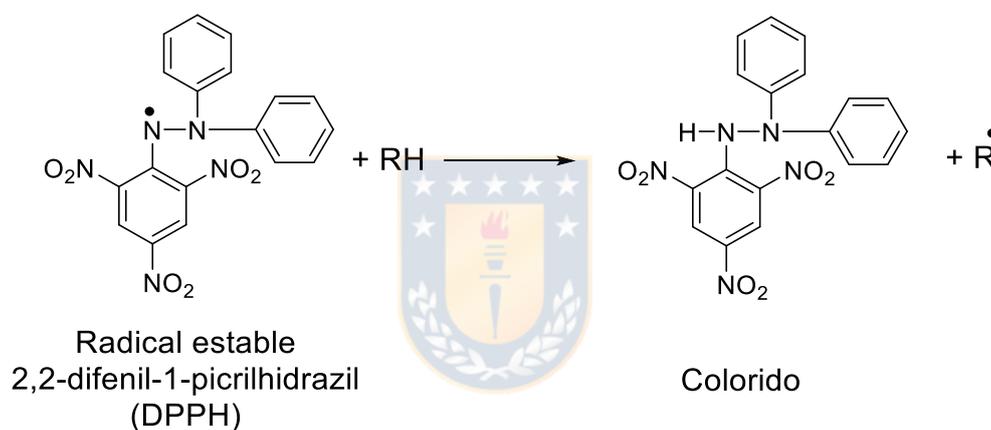


Figura 8. Reacción del radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) con eliminadores de radicales. Adatado de Marston (2011) [100].

4.6 Bioautografía directa para detectar actividad antibacteriana de los péptidos de caseína.

4.6.1 Actividad inhibitoria contra la bacteria *L. plantarum* J16 y *B. subtilis* mediante HPTLC-Bioautografía.

La actividad inhibitoria contra bacterias se utilizó siguiendo el método descrito por Jamshidi-Aidji y Morlock [198] con algunas modificaciones. Para la sepa *B. subtilis* la suspensión celular se preparó a partir de una colonia inoculada en caldo de Müller Hilton, e incubado por 48 h a 37°C. De la suspensión bacteriana 10^6 UFC/mL se realizó un inóculo para llegar a una concentración de OD₆₀₀ 0.05-1.0 en caldo Müller Hilton las cuales fueron incubadas a 37° C por 7 horas, para alcanzar la fase exponencial. Las UFC/mL se monitorizó durante la incubación midiendo la densidad óptica (OD) a 600 nm, en un espectrómetro (Tecan NanoQuant Infinite M200-PRO). Los rangos utilizados fueron $10^6 - 10^8$ UFC/mL y $1.0 \times 10^6 - 1.0 \times 10^7$ respectivamente. Para la sepa *L. plantarum* J16 se utilizó un inóculo de 10^9 UFC/mL de la cepa *L. plantarum* J16 y se inoculó en caldo de cultivo M.R.S, luego se dejó incubar durante 24 horas a 37° C (preincubación para cultivo inicial). De la suspensión bacteriana 10^9 UFC/mL, se realizó un inóculo para llegar a una concentración de (OD₆₀₀ 0.013-0.075), las cuales fueron incubadas a 37° C durante 8 horas, para alcanzar la fase exponencial (incubación para activar formas vegetativas). Para la detección de compuestos con efecto antibacteriano las placas fueron sumergidas en buffer fosfato (0.1 M) pH 7.4, y luego secadas por 5 minutos a 115° C. Una vez seca la placa se sumergió automáticamente en cada suspensión bacteriana utilizando el dispositivo de inmersión a una velocidad

de inmersión de 3.5 cm/s y un tiempo de inmersión de 6 s. Luego, las placas con *B. subtilis* y *L. plantarum* J16 se incubaron durante 7 h y 3 h respectivamente a 37°C en cámara húmeda, transcurrido este tiempo se dejó secar a temperatura ambiente y se atomizó con solución de bromuro de tetrazolio y azul de tiazolilo, (MTT) taponada con PBS al 0.2% p/v para su visualización. Las placas se incubaron a 37°C por 30 minutos en cámara implementada, y posteriormente secadas en placa calefactora durante 20 minutos a 50°C. Los bioautogramas se documentaron bajo iluminación de luz blanca en el modo de reflectancia. Las células metabólicamente activas redujeron las sales de tetrazolio MTT amarillo a un formazán azulado. Las bandas decoloradas contra un fondo púrpura señalaron las sustancias antimicrobianas en la placa (Ver reacción Figura 9). Como control positivo para la actividad de inhibición se utilizó la oxitetraciclina a una concentración de 1 mg/mL y con un volumen de siembra en paralelo de 6 µL.

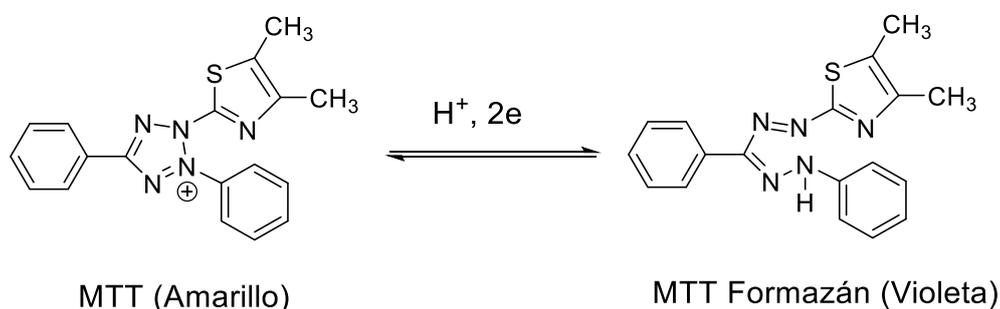


Figura 9. Detección de la actividad deshidrogenasa de microorganismos por reducción de sales de tetrazolio. Adatado de Dewanjee et al. [197].

4.7 Digestión gastrointestinal *in vitro* simulada (DGIS).

La proteína caseína en polvo de leche se digirió según el método armonizado *in vitro* descrito por Minekus et al. [37] con algunas modificaciones. Ver figura 10. Para imitar la digestión gastrointestinal *in vivo*, el modelo consistió en dos etapas secuenciales: el proceso digestivo en el estómago (fase gástrica, FG) y la digestión del intestino delgado (fase intestinal, FI). Los fluidos simulados preparados se llevaron a 37°C en baño térmico antes de cada uso. La fase oral con amilasa no fue realizada debido a la ausencia de almidón en las muestras de caseína [37]. Las muestras de caseína en polvo se disolvieron y mezclaron por 2 minutos en buffer NH_4HCO_3 , 0.05 M a una concentración de 80 mg de proteína/mL. Luego, se mezclaron 20 mL de la muestra líquida o bolo oral con 15 mL de fluido gástrico simulado (FGS) para obtener una proporción final de alimento a FGS de 50:50 (v: v). Se ajustó a pH 3 con HCl 1 M y se agregaron 10 μL CaCl_2 (0.3 M), para lograr 0.075 mM en la mezcla de la digestión final, 3.2 mL de pepsina (25000 U/mL en la solución FGS), para lograr 2000 U/mL en la mezcla de digestión final y 1.39 μL de agua a la mezcla. La fase gástrica simulada fue incubada por 2 horas a 37° C con agitación de 150 rpm. Luego, la digestión gástrica simulada fue detenida ajustando el pH a 7 con NaOH 1M. Posteriormente, se extraen 20 mL de los digeridos de fase gástrica y se almacenan a -20°C para posterior análisis. La fase intestinal se realizó mezclando 20 mL de la muestra gástrica-quimo con 11 mL de fluido intestinal simulado (FIS) para obtener una relación final de quimo gástrico a FIS de 50:50 (v/v). Se ajustó a pH 7 con NaOH 1M y se

adicionó 40 μL CaCl_2 0.3 M para lograr 0.3 mM en la digestión final. Luego se agregó 5 mL de pancreatina disuelta en FIS basada en la actividad de la USP (100 U/mL en la mezcla final) y 2.5 mL de extracto de bilis (1 mg/mL en FIS) para obtener una concentración final de 0.0625 mg/mL. Finalmente, se agregó 1.31 mL de agua a la mezcla para diluir la solución madre de FIS. La mezcla final obtenida para la digestión intestinal de caseína se incubó durante 2 horas a 37° C con agitación de 150 rpm. La digestión se detuvo con ácido fórmico pH 2 y las muestras se almacenaron a -20° C hasta el análisis. El muestreo al final de cada etapa digestiva FG y FGI, permitió la detectar los péptidos obtenidos y la evaluación de su actividad en cada paso digestivo. Simultáneamente, se preparó y analizó los dos blancos de digestión tanto de la FG como de la FI que consistía en la mezcla de enzimas usadas en digestiones a la misma concentración sin proteína de sustrato para descartar la influencia de los reactivos en la digestión. Tanto los digeridos gastrointestinales como los blancos se centrifugaron a 1200 x g durante 10 min antes de ser almacenados a -20° C.

En este método la FI se llevó a cabo con pancreatina en lugar de enzimas individuales como tripsina, lipasa, etc. Debido a que el extracto de pancreatina contiene componentes enzimáticos que incluyen tripsina, amilasa, lipasa y otras enzimas producidas por las células exocrinas. El método ha sido establecido en base a concentraciones de enzimas y sales *in vivo* [199].

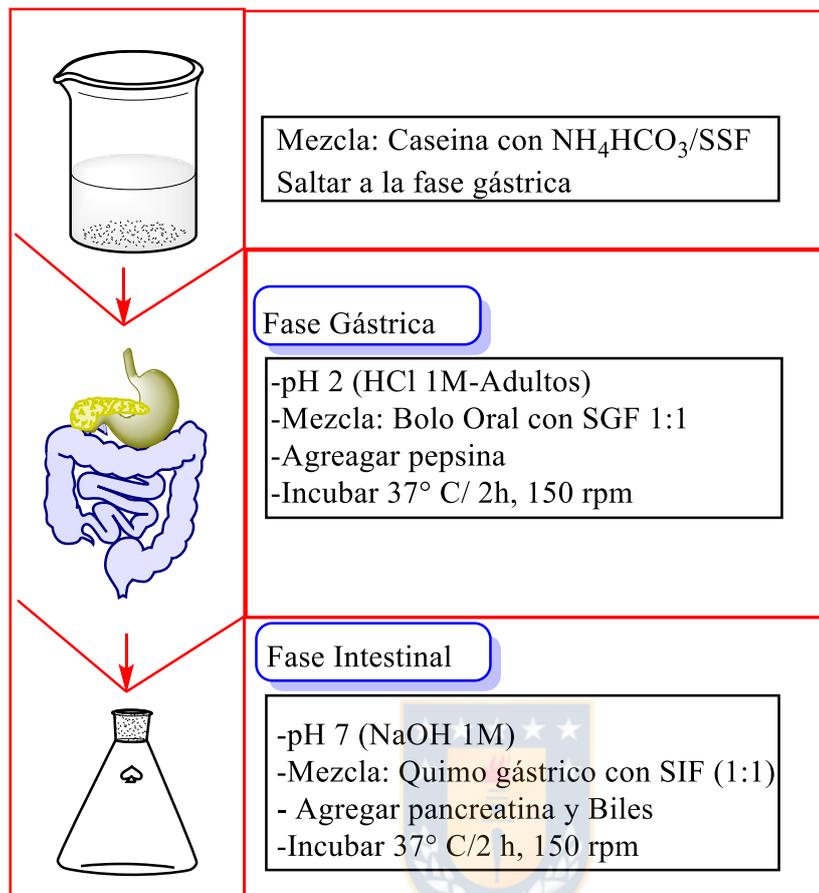


Figura 10. Procedimiento que describe las condiciones del método simulado de digestión *in vitro* estático. Que involucra fluido salival simulado (SSF), fluido gástrico simulado (SGF) y fluido intestinal simulado (SIF).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Optimización de parámetros cromatográficos

Los péptidos presentes en las muestras de caseína hidrolizadas representan una matriz compleja que requieren una separación y detección sensible por lo cual es evidente la necesidad de seleccionar y optimizar los parámetros analíticos de la separación por HPTLC exclusivo para péptidos. Se estableció un nuevo método de HPTLC para la separación y detección de péptidos de amplio rango de polaridad. La separación de péptidos generalmente se ha realizado con fases móviles desarrolladas para proteínas, donde el uso de piridina ha sido fundamental [172, 178, 195]. Sin embargo, aunque estos sistemas se han adaptado para la separación de péptidos, no se logró una buena separación cromatográfica, además, numerosos artículos continúan utilizando piridina, a pesar de la alta toxicidad que presenta.

Por lo tanto, se utilizó el sistema de clasificación de solventes propuesto por Snyder [196], logrando encontrar una fase móvil adecuada utilizando el esquema sistemático de optimización de cuatro niveles mostrado en la Figura 11. Para optimizar la separación de péptidos muchos factores son importantes, siendo crucial la presencia de agua y la elección de un modificador adecuado. En el primer nivel, se seleccionó como solventes puros n-butanol y 2-propanol de los ocho grupos de selectividad diferentes de Snyder. La elección de 2-propanol por piridina, se basó en la similitud de las propiedades fisicoquímicas como son las interacciones intermoleculares

específicas y se fue descartando los solventes que no tienen una cromatografía exitosa (Ver tabla 4). En el segundo nivel, se agregó agua para diluir los solventes orgánicos y aumentar la polaridad. En el tercer nivel, se probó el modificador, se seleccionó amoniaco por ácido acético ya que permitió una mejor separación. Se analizó los solventes seleccionados de acuerdo a la separación del mayor número de bandas. El último nivel (nivel cuatro) se usó para realizar los ajustes de la mezcla con la mejor composición de la separación encontrada. Para esto se fue probando la mezcla de los tres componentes (solvente orgánico-agua-modificador). Para un enfoque sistemático, se fue probando la mezcla de los dos mejores solventes, en relaciones (9: 1 y viceversa 1: 9) o en cantidades iguales de los dos solventes (5: 5) de acuerdo con Morlock et al. [200].

Finalmente, se encontró una fase móvil que permitió una mejor separación de péptidos y con buena resolución, esta consistió en 2-propanol / n-butanol / amoniaco / agua (57/20/20/3, v/v/v/v). El desarrollo lleva aproximadamente 40 minutos. Después de la separación, los péptidos fueron detectados mediante derivatización con fluorescamina (0,02 % p/v en acetona) y trietilamina (10% v/v en acetona) respectivamente. Figura 12. La fluorescamina se usa típicamente para detectar grupos amino primarios. Las aminas primarias reaccionan con el fenol que aporta la fluorescamina para formar un complejo, la adición del fenol puede conllevar a un cambio químico dentro de los grupos amino primarios formando productos fluorescentes. Las aminas secundarias producen derivados no fluorescentes que pueden ser transformados en productos fluorescentes mediante una reacción posterior

con las aminas primarias. Las zonas de cromatograma azul-verde fluorescente aparecen sobre un fondo oscuro en la luz UV de longitud de onda larga ($\lambda = 365 \text{ nm}$) [195, 201]. El tratamiento previo y posterior de los cromatogramas con la solución básica de trietilamina, sirve para estabilizar la fluorescencia de los aminoácidos, esta solución permite que los aminoácidos sean convertidos en el complejo estable, dándoles propiedad de absorber luz UV pudiendo ser detectados a una longitud de onda de 366 nm y también sirve para para optimizar el pH de la reacción, es decir, proporciona un pH básico para que se lleve a cabo la derivatización. Debido a que la intensidad de la fluorescencia de las zonas en las capas de gel de sílice se reduce después de unos minutos [201-204]. La optimización cromatográfica, permitió la separación de péptidos. El método presentado es adecuado tanto para la detección como para el EDA.

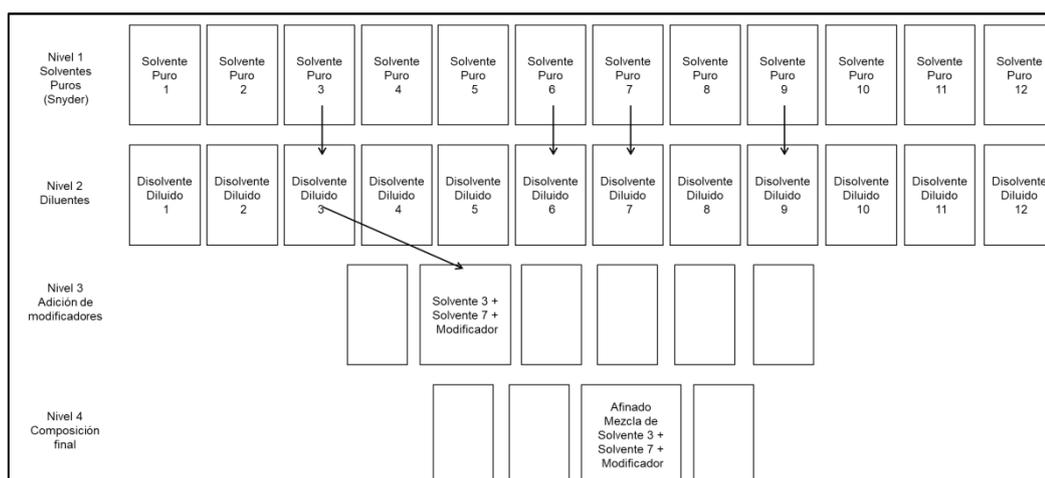


Figura 11. Estrategia de optimización de solventes - 'Esquema de cuatro niveles' Adaptado de Biller et al. [172].

Tabla 4. Propiedades Físicas y químicas. Adaptado de Masschelein et al. [205].

| Solvente | P. F | Piridina | 2-propanol |
|------------------------|------|----------|------------|
| Punto de ebullición | | 115 °C | 117 °C |
| Presión de Vapor mm Hg | | 20 | 20 |
| 20° C | | | |
| Índice de polaridad | | 5.3 | 4.3 |
| Constante dialéctrica | | 12.3 | 20.1 |
| 25°C | | | |
| Momentos dipolares | | 2.2 | 1.7 |
| debyes | | | |
| n ²⁰ D | | 1.5092 | 1.3853 |

(* P. F) Propiedades fisicoquímicas



Figura 12. Separación de péptidos digeridos mediante hidrólisis enzimática. Separación cromatográfica en placa HPTLC sílice 60 con fase móvil: 2-propanol/n-butanol/amoniaco/agua (57/20/20/3, v/v/v/v). Los carriles 1 y 2, corresponden al blanco de tripsina y de caseína sin tratamiento. Los carriles 3 y 4 corresponden a hidrólisis con tripsina 10 mg/mL (10 y 15 μ L/banda aplicada) respectivamente. Documentado a UV 366 nm después de la derivatización con fluorescamina y trietilamina, respectivamente.

5.2 Obtención de péptidos de caseína a partir de la hidrólisis con enzimas digestivas.

La caseína se hidrolizó mediante tripsina, pepsina y la combinación de pepsina-pancreatina, al encontrar las condiciones de digestión óptimas de acuerdo a la estabilidad de la enzima empleada, las cuales han sido anteriormente informadas [144, 194, 206, 207] (Tabla 5). Las muestras hidrolizadas se analizaron mediante HPTLC, para observar la hidrólisis de caseína y la presencia de péptidos. Las separaciones de los hidrolizados de caseína en placas de gel de sílice se muestran en la Figura 13. La formación de péptidos se evaluó comparando los diferentes perfiles peptídicos obtenidos de la hidrólisis de caseína con tripsina, pepsina y pepsina-pancreatina, además se incluyó como control la caseína sin hidrolizar.

La hidrólisis enzimática de caseína se realizó con enzimas individuales para hacer la comparación con el perfil peptídico obtenido en la digestión gastrointestinal y evaluar cómo afecta las diferentes condiciones de hidrólisis en la obtención de péptidos. En la hidrólisis con tripsina se usó DTE e IAA, para asegurar una mayor hidrólisis enzimática como resultado de un mayor contacto entre la enzima y el sustrato. El DTE permite el despliegue de la estructura secundaria de la proteína, al reducir los puentes disulfuro, aumentando la accesibilidad del sustrato [141]. Así también, se aplicó un tratamiento térmico a 95° C en la hidrólisis enzimática, las altas temperaturas pueden ayudar al despliegue de la estructura de la proteína al alterar su conformación haciéndolas más susceptibles a la proteólisis al permitir a las enzimas el acceso a regiones hidrófobas [139]. Al parecer el perfil peptídico obtenido de la hidrolisis con tripsina se modificó al aplicar el tratamiento de precalentamiento y adición de reactivos y químicos con secuencias peptídicas

nuevas, la composición del hidrolizado también pudo verse afectada bajo estas condiciones (Fig. 13 A). En las separaciones se puede distinguir diferentes bandas para la hidrólisis con tripsina que concuerda con el patrón peptídico obtenido en la separación de Merck para la digestión de caseína con tripsina [208]. También se evidenció varias bandas tanto para la hidrólisis con pepsina como para la hidrólisis de pepsina-pancreatina. El cromatograma mostró que no había bandas visibles de caseína después de la hidrólisis con tripsina (punto de siembra), por tanto, la caseína se había hidrolizado liberando péptidos. (Figura 13, placa B, carril 1)

Los blancos de digestión preparados para cada enzima y en la misma composición sin adición de sustrato, no produjo péptidos, por lo tanto, no se observó migración de péptidos. Esto indicó que la autólisis de las enzimas no se produjo durante la hidrólisis en estas condiciones, resultados similares también se obtuvieron en estudios anteriores donde estos controles dan evidencia de que efectivamente los péptidos obtenidos se deben a la hidrólisis de la caseína y no a la presencia de algún compuesto en la mezcla [47]. De igual forma sucedió con la muestra de caseína, sin adición de enzimas, no se obtuvo péptidos, por lo tanto, no se observó migración de péptidos. Esto indicó que la caseína sin tratamiento enzimático no puede liberar péptidos nuevamente conforme se ha obtenido en otros trabajos [35] (Fig. 13 (A y B)). Por otro lado, al comparar los cromatogramas de la hidrólisis con tripsina con los de la hidrólisis con pepsina y pepsina pancreatina se observó que los perfiles peptídicos obtenidos son comparables pero se observó un perfil de bandas más complejo que aparecían exclusivamente en la hidrólisis con

pepsina y pepsina pancreatina, que pudieron deberse a la compleja matriz y podrían corresponder a las enzimas como pepsina, presente en la FG, la tripsina, amilasa, lipasa, ribonucleasa y proteasa contenida en el extracto pancreático. Después de analizar la hidrólisis de caseína bajo diferentes condiciones dependiente de la enzima se estudió algunas bioactividades de los péptidos resultantes después de la hidrólisis (ver sección de actividad).

Tanto la diferencia en cantidad de péptidos obtenidos como el diferente perfil peptídico mostrado de cada hidrólisis, sugiere que el perfil de producción de los hidrolizados es dependiente de la especificidad de la proteasa utilizada, lo que está de acuerdo con los resultados reportados en la literatura, cada enzima corta en el enlace peptídico dependiente del tipo de aminoácido, por lo que la composición final de hidrolizado de la caseína depende casi en su totalidad del sitio específico de acción de la enzima digestiva [42, 59, 140, 144]. Los péptidos se detectaron sumergiendo la placa en una solución de fluorescamina y trietilamina respectivamente y posterior detección en longitudes de onda UV (366 nm). Así también se realizó en otros trabajos con fluorescamina y ninhidrina para observar los cambios en el color y revelar propiedades específicas de los péptidos [178, 195]. Se logró realizar la detección del perfil peptídico completo de los hidrolizados. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que haya superposición de péptidos en las bandas resultantes de la separación. También puede darse el caso que se formen péptidos pequeños o en concentraciones menores, que no son detectables con esta técnica.

Tabla 5. Enzimas aplicadas con hidrólisis enzimática, y las condiciones operativas. Modificado de Bove et al. (2013) y Deng et al. (2018) [144, 194].

| Enzima | Fuentes | Actividad proteolítica | Condiciones óptimas | Relación (E: A) |
|-------------|---------------------------|------------------------|---------------------|-----------------|
| Tripsina | Páncreas bovino | 30 U/g | pH 8; 37° C; 7 h | 1:10 |
| Pepsina | Mucosa gástrica bovina | 250 U/mg | pH 2; 37° C; 2 h | 1:13,3 |
| Pancreatina | Páncreas porcino | 100 U/g | pH 7; 37° C; 2 h | 1:40 |



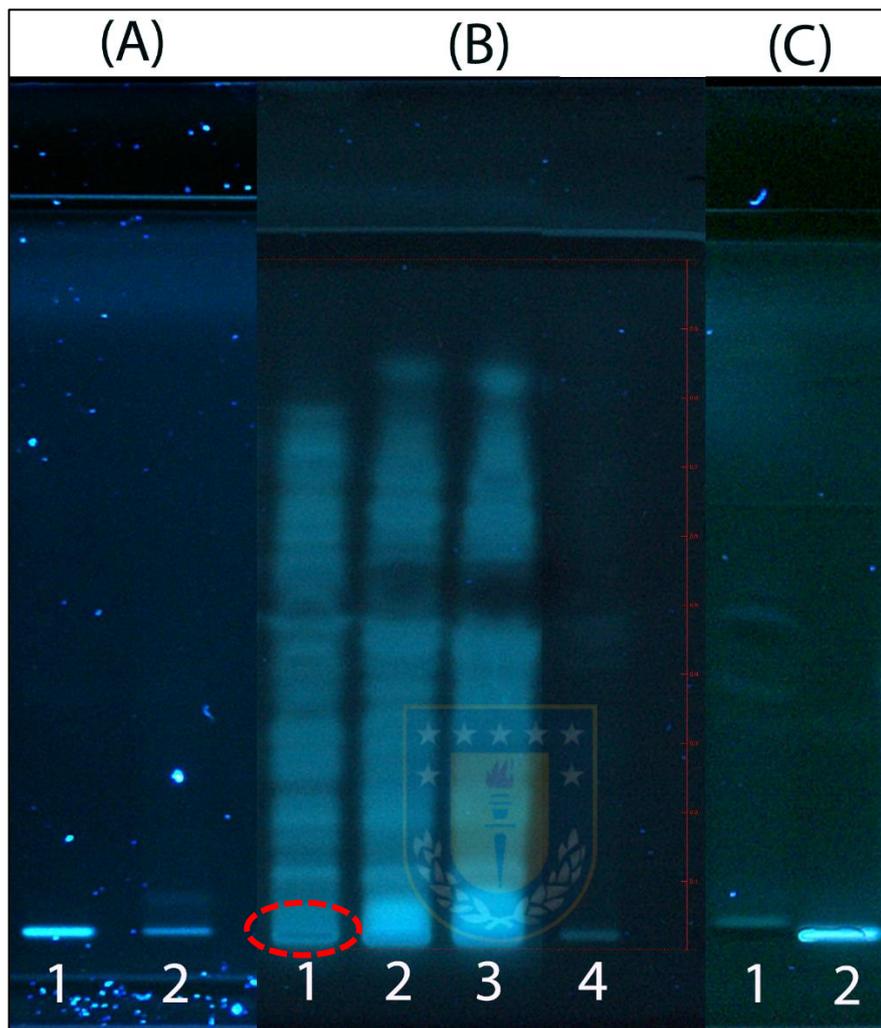


Figura 13. Péptidos digeridos mediante hidrólisis enzimática. Placa (A) los carriles 1 y 2 corresponden a los blancos de hidrólisis de pepsina y pepsina-pancreatina respectivamente. Placa (B) el carril 1 corresponde a hidrólisis con tripsina 10 mg/mL (15 μ L/banda aplicada); 2 hidrólisis con pepsina; 3 pepsina-pancreatina y 4 caseína sin tratamiento 40mg/mL. Placa (C) los carriles 1 y 2 corresponden al blanco de tripsina y de caseína sin tratamiento 10mg/mL respectivamente (10 μ L/banda aplicada). Documentado a UV 366 nm después de la derivatización con fluorescamina y trietilamina, respectivamente.

5.3 Determinación de péptidos inhibidores de la enzima α -glucosidasa.

Se evaluó la actividad de los péptidos de caseína generados durante el método armonizado de digestión *in vitro* estática sobre la enzima α -glucosidasa. En la figura 14, se observa una banda decolorada en la fase gástrica FG (carril 2) con un R_f de 0.4, la cual persiste luego de la digestión gastrointestinal, observando en la FI (carril 3) la banda con igual intensidad de decoloración. Estudios han reportado que los péptidos bioactivos también son resistentes a la acción de las peptidasas pancreáticas (tripsina, elastasa y quimiotripsina) de la digestión, pudiendo después de la administración oral retener la suficiente actividad biológica para efectuar su efecto terapéutico [159, 209, 210]. La actividad inhibidora de la α -glucosidasa detectada al simular la digestión gastrointestinal *in vitro*, se relaciona más con la actividad inhibidora de esta enzima el organismo por lo que las pruebas *in vitro* podrían ser útiles para predecir el efecto más certero. Para ejercer un efecto antidiabético, los péptidos inhibidores de la α -glucosidasa tienen que llegar al lumen intestinal en forma intacta y resistir la digestión proteolítica para unirse a la enzima α -glucosidasa en la mucosa del intestino delgado [62].

Aunque en este estudio se observa una banda decolorada lo que indica posible inhibición de los péptidos de caseína sobre la enzima α -glucosidasa se requiere optimizar las condiciones del bioensayo para obtener una mayor nitidez en zonas decoloradas. Así también, se requiere identificar los péptidos

con actividad y estudios *in vivo* para explicar los mecanismos de unión entre los péptidos y el sitio activo de la enzima.

Estudios realizados por Nehir et al. (2015) demostraron que la leche fermentada y la leche digeridos muestran un efecto inhibitor de la enzima α -glucosidasa en comparación con las muestras no digeridas, debido a la actividad proteolítica de las enzimas digestivas durante la digestión simulada *in vitro* que podrían dado lugar a la liberación de péptidos bioactivos [46]. Aunque, las revisiones disponibles sobre los péptidos de caseína con actividad antidiabética se han enfocado principalmente a la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) [62]. La enzima DPP-IV es una serina dipeptidil peptidasa que hidroliza e inactiva las hormonas incretinas, como el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), y el polipéptido similar al glucagón-1 (GLP-1). Esas incretinas pueden mejorar la secreción de insulina de las células beta pancreáticas en presencia de nutrientes *in vivo*. La inhibición de DPP-IV puede prevenir la degradación de incretinas permitiendo la acción de la insulina durante la fase posprandial, por lo que se ha propuesto como uno de los principales objetivos para el tratamiento de la diabetes mellitus [211, 212]. Lacroix et al. (2017) investigaron la estabilidad de cinco péptidos derivados de la leche (LKPTPEGDL, LPYPY, IPIQY, IPI y WR) con actividad inhibitora de DPP-IV [213]. También se ha demostrado *in silico* que la β -caseína encripta un péptidos inhibitor de la DDP-IV debido a la gran cantidad de fragmentos que coinciden con las secuencias inhibitoras de DDP-IV [214]. El efecto *in vivo* en plasma de ratas, se ha demostrado para el péptido LPQNIPPL, un fragmento derivado de caseína descrito como inhibitor

de la DPP-IV [215]. El fragmento Ile-Pro-Ile producido por fermentación es el péptido inhibidor más potente de la DPP-IV [216, 217]. Recientemente se ha demostrado que los hidrolizados de leche bovina con la proteasa (neutrasa) pueden usarse como ingredientes dietéticos con actividad inhibidora de la DPP-IV [212]. Al comparar la digestión gastrointestinal *in vitro* de leche desnatada de vaca, camello, cabra y oveja, se evidencio que la leche de vaca tenía mejor fuente de péptidos con actividad inhibitoria de DPP-IV [218]. Otras observaciones sugieren que los aminoácidos alanina o metionina podrían ser necesarios en el C terminal de péptidos inhibidores de la α -glucosidasa altamente activos [62].

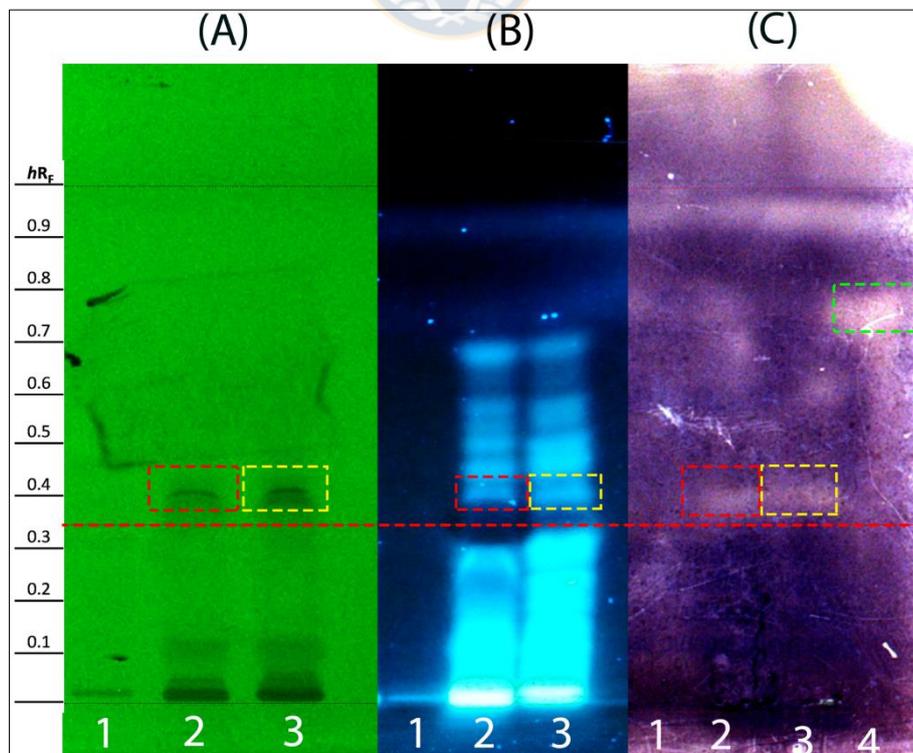


Figura 14. Cromatogramas de HPTLC de péptidos inhibidores de la α -glucosidasa obtenidos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de caseína. Los carriles 1 corresponde a caseína sin digerir; 2 digestión en FG; 3 digestión en la FI; 4 control positivo de acarbosa 5mg/mL en metanol (5 μ L/banda aplicada). Documentado A) UV 254 nm, B) 366 nm, C) bajo iluminación de luz blanca después de realizar el bioensayo. Volumen de siembra 10 μ L.

5.4 Determinación de péptidos bioactivos inhibidores de la enzima AchE.



En este ensayo se evaluó la generación de péptidos bioactivos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre la enzima acetilcolinesterasa. En la figura 15, se observa una zona decolorada en el carril 1 que corresponde a la FG con un R_F de 0.6, esta misma banda parece estar presente en el carril 2 que corresponde a la FI con un R_F de 0.6. Las zonas activas de ambas fases (FG y FI) poseen el mismo R_F , esto podría indicar que el péptido encontrado en la FG resiste las condiciones de la FI.

De acuerdo a la bibliografía para dar una aproximación de la posible estructura de los péptidos con actividad antineurodegenerativa se sugiere que estas secuencias peptídicas pueden poseer residuos ricos en prolina en su estructura, residuos de ácido aspártico, glutámico o residuos cargados negativamente ya que se ha demostrado que los péptidos con estos residuos

son resistentes a la DGI [35]. Los resultados obtenidos muestran que la digestión de la caseína podría liberar péptidos inhibidores de la AchE.

Aunque en foto se observa posibles zonas de decoloración se requieren de más bioensayos que los respalden, dado que no fue posible optimizar todos los parámetros como el volumen de sembrado y temperatura de secado, además es importante identificar el péptido y el tipo de inhibición en la enzima. Sin embargo, los resultados preliminares nos dan una aproximación de la inhibición de los péptidos derivados de la caseína frente a AchE.

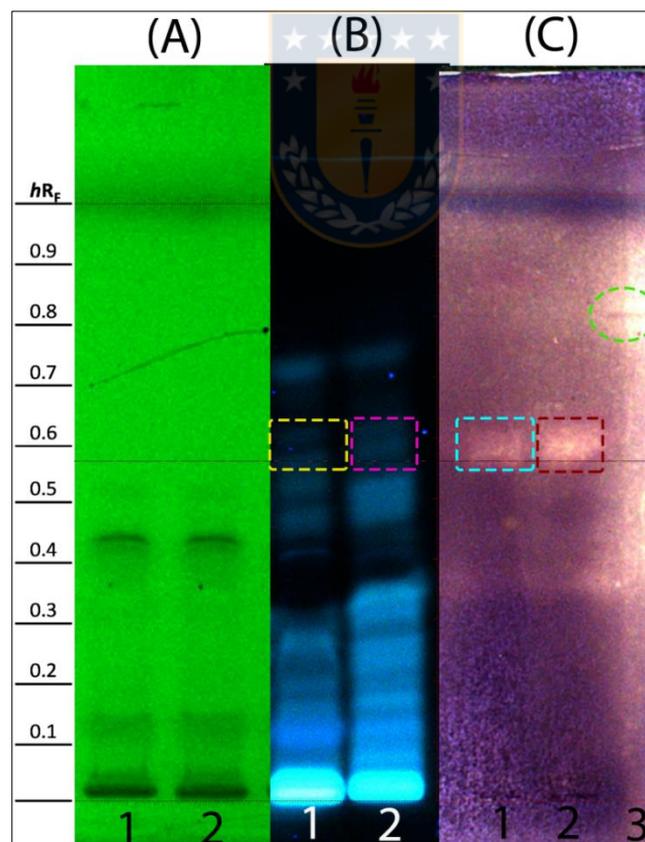


Figura 15. Cromatograma de HPTLC de péptidos inhibidores de la AchE obtenidos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de caseína. Carril 1,

corresponden a digestión FG; 2 digestión FI; 3 control positivo donepezilo (5 μ L/banda aplicada). La placa documentada A) 254 nm a B) 366 nm después de la derivatización; C) Bajo iluminación de luz blanca después de realizar el bioensayo. Volumen de siembra 10 μ L.

5.5 Determinación de los péptidos con capacidad antioxidante

La actividad de eliminación de radicales se evaluó de acuerdo con el método descrito anteriormente (sección de metodología). Los hidrolizados de caseína se investigaron por HPTLC *in situ* combinado con el ensayo DPPH. En el análisis de derivatización de DPPH péptidos que probablemente exhiben propiedades de captación de radicales libres (zonas decoloradas sobre un fondo púrpura) presentaron un RF de 0.1, 0.2, 0.25, 0.32, 0.4, 0.5 y 0.75 en la hidrólisis con tripsina, para la hidrólisis con pepsina y pancreatina se presentaron valores RF de 0.1 y 0.4 y RF de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.48 respectivamente. La hidrólisis con tripsina exhibió una actividad antioxidante más fuerte, mayor cantidad de péptidos captadores de radicales (14 zonas activas). Ver Figura 16. También se evidenció un fuerte potencial de eliminación de radicales con varias zonas dominantes después de la digestión simulada, siete zonas activas en total. Tras la digestión se obtuvo zonas con RF de 0.1 y 0.45 y RF de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.48 distinguiendo la FG y la FI respectivamente. Se logró evidenciar el impacto a lo largo de la digestión gastrointestinal sobre la presencia de péptidos antioxidantes. Después de la

digestión gástrica, solo dos bandas presentaron actividad antioxidante mientras que después de la digestión intestinal se detectaron 5 bandas. Este aumento podría haber resultado de la liberación de péptidos bioactivos de la matriz alimentaria debido a la incisión posterior por parte por enzimas proteolíticas presentes en el estrato pancreático, que tienen una actividad antioxidante potencial. Esta observación se respalda de un estudio reciente que resalta que una digestión pancreática adicional puede dar como resultado una actividad inhibitoria mucho más alta [219]. Otros estudios también han demostrado que las capacidades antioxidantes de la caseína pueden incrementar mediante la hidrólisis adicional de enzimas digestivas [48, 220]. Un estudio reciente también demostró que la actividad antioxidante aumentó después de la digestión *in vitro* debido a la hidrólisis de las enzimas proteolíticas [46]. Estas observaciones parecen demostrar que los compuestos o secuencias peptídicas con capacidad antioxidante presentes en las muestras de la FG son resistentes a la hidrólisis de la pepsina y que las enzimas pancreáticas parecen producir nuevos péptidos que posiblemente pueden ser los que aparecen en la FI exhibiendo propiedades antioxidantes adicionales.

También se observó que las bandas de la FG no eran tan intensas en comparación con las de la FI, esto pudo deberse a los componentes presentes en el extracto de pancreatina, al FIS y bilis en la fase intestinal de la digestión simulada. Como resultado, la caseína liberó una cantidad más pequeña de péptidos antioxidantes en la FG (cuatro zonas activas) que durante la FI (seis

zonas activas). Las zonas activas de la FG persisten hasta la digestión gastrointestinal.

Por otro lado, al comparar la actividad antioxidante del protocolo de la hidrólisis enzimática [194] y la digestión *in vitro* [37] se obtuvo resultados similares dado que la pepsina y la pancreatina son las enzimas claves utilizadas tanto para la hidrólisis como durante el paso gástrico y gastrointestinal.

El mecanismo antioxidante está relacionado con la presencia de grupos fosfato que se originan a partir de los residuos de fosfoserina en las proximidades de la cadena peptídica [139]. Estudios previos han demostrado que los digeridos trípticos de caseína que producen fosfopéptidos de caseína (CPP) exhiben actividad antioxidante tanto hidrofílica como lipofílica debido al secuestro y apagado de iones metálicos de ROS, con el dominio funcional, SerP–SerP–SerP–Glu–Glu [209]. Así también, las propiedades antioxidantes de los péptidos derivados de las proteínas de la leche se han relacionado con la presencia de residuos de aminoácidos específicos tales como metionina, tirosina, arginina y prolina.

Finalmente, el ensayo DPPH *in situ*, fue apropiado para la detección de la actividad antioxidante de las muestras de caseína debido a que disolvente orgánico (metanol) en el cual esta disuelto el DPPH es evaporado rápidamente de la placa por lo cual no hay riesgo de que las proteínas precipiten [221].

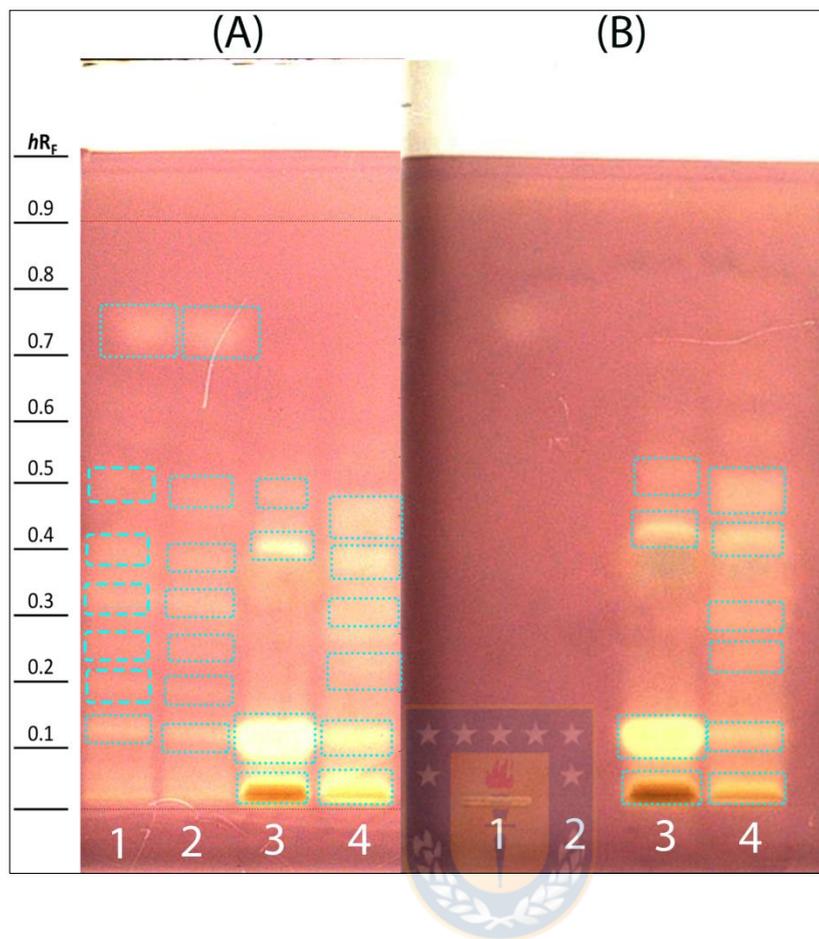


Figura 16. Cromatograma de HPTLC de péptidos antioxidantes. Placa A Hidrólisis enzimática. Carriles 1 y 2 tripsina (10 y 12 μL /banda aplicada), 3 pepsina; 4 pancreatina respectivamente (10 μL /banda aplicada). Placa B Digestión gastrointestinal *in vitro*. Carril 1 blanco FG; 2 blanco FI; 3 gástrica; 4 intestinal respectivamente (10 μL /banda aplicada). Documentado bajo iluminación de luz blanca.

5.6 Determinación de péptidos antimicrobianos frente a *L. plantarum* y *B. subtilis*

Los péptidos con propiedades antimicrobianas frente a *L. plantarum* J16 y *B. subtilis* se observan en la Figura 17. Los péptidos digeridos fueron separados por HPTLC, y posteriormente analizadas *in situ* mediante bioensayo. Se requirió una neutralización previa de la placa HPTLC con buffer fosfato para descartar residuos de ácido en la placa y así evitar la muerte bacteriana debido a su sensibilidad al pH [222]. Las condiciones utilizadas para cada bioensayo se muestran en la Tabla 6.

En el bioensayo de *L. plantarum* J16, existen zonas decoloradas, sin embargo, frente a *L. plantarum* no fue posible evidenciar claramente las bandas de inhibición.

Para *B. subtilis* se observan 2 zonas de decoloradas, sin embargo, es necesario optimizar parámetros para obtener una definición en las bandas. En la figura 17-A durante la FG se observan 2 zonas decoloradas con valor R_F de 0.18 y 0.35, sin embargo, estas bandas son muy anchas y no existe claridad si existe más de un péptido por zona decolorada. En la FI es posible observar 2 bandas mejor definidas con una R_F de 0.3 y 0.34. Se sugiere, que el efecto significativo pudo deberse a que varios péptidos pueden actuar sinérgicamente, como ya ha sido demostrado anteriormente, produciendo un efecto fisiológicamente significativo [223].

Estudios realizados por Clare y colaboradores encontraron que la isracidina, un péptido derivado de la α_1 -caseína ha protegido a ratones contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a concentraciones similares a la de los antibióticos conocidos [224]. Así también, otros estudios indican que la hidrólisis de α_1 -caseína genera dos péptidos: la caseicina A y B las cuales

tienen actividad contra *Staphylococcus spp*, *Sarcina*, *B. subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* [52, 225]. Además, se ha identificado en los fermentados de caseína al nanopéptido caseicina A I(KHQGLPQE) y B (VLNENLLR), los cuales redujeron el número de bacterias patógenas como *Cronobacter sakazakii* en fórmulas infantiles [226]. Lahov y colaboradores identificaron la caseicina un péptido derivado de la caseína, el cual posee actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus*, *Sarcina*, *B. subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* [225]. Además, la digestión de κ -caseína humana con pepsina, genera un péptido con actividad contra *Staphylococcus carnosus* y *E. coli* [52, 227]. En otro estudio se encontró que el péptido SSSEESII de α_{s2} -caseína inhibe el crecimiento de *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enteritidis* y *E. coli* [43, 57]. La actividad antimicrobiana observada en este estudio también podría deberse al alto nivel de lactoferrina que se genera durante la digestión gastrointestinal de la caseína como se ha informado en estudios previos [48]. La posible estructura de los péptidos derivados de las proteínas de la leche con actividad antimicrobiana parece estar relacionado con la carga catiónica, la presencia de aminoácidos con extremos hidrófilos e hidrófobos que les permiten adherirse e insertarse en las bicapas de la membrana [7, 228]. El mecanismo antibacteriano por el cual actúan es alterando la permeabilidad y provocando la muerte celular [229].

Aunque los efectos inhibitorios de los péptidos derivados de la caseína, parecen demostrarse en este estudio de digestión *in vitro* se requiere de más bioensayos que respalden los posibles resultados encontrados en este trabajo

dado que no fue posible optimizar los parámetros del ensayo en su totalidad como, tiempo y la temperatura de incubación, cantidad muestra sembrada, concentración de sustrato, reactivos enzimáticos y de derivatización para confirmar estos resultados debido a que tiempos de incubación largos pueden causar una disfunción de los compuestos ya separados dando como resultado la ampliación de señales como se mencionó en otro estudio [230]. Se sugieren más estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar su alcance y asegurar su actividad.

Tabla 6. Condiciones de crecimiento para *L. plantarum* J16 y *B. subtilis* utilizadas en bioautografía HPTLC-Bioautografía directa.

| Bacteria | Condiciones | <i>L. plantarum</i> J16 | <i>B. subtilis</i> |
|--|-------------|---|------------------------|
| Preincubación | | 24 h a 37°C | 48 h a 37° C |
| | | 10 ⁹ UFC/mL | 10 ⁶ UFC/mL |
| Incubación para activar formas vegetativas | | 8 h a 37° C | 7 h a 37 °C |
| | | 10 ⁶ –10 ⁸ UFC/mL | 10 ⁵ UFC/mL |
| Incubación en placas HPTLC | | 3 h a 37 °C | 7 h a 37 °C |

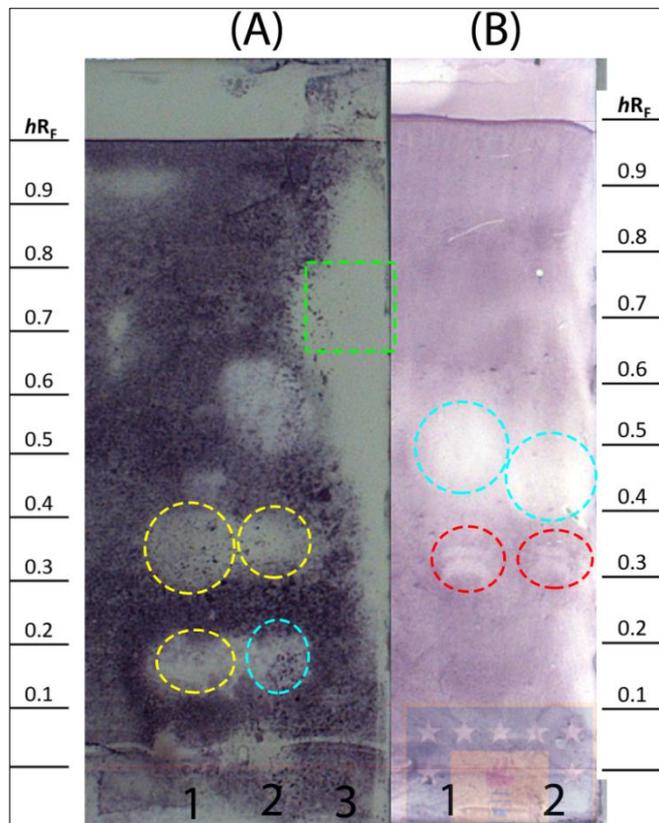


Figura 17. Bioautografía de péptidos antibacterianos sobre *B. subtilis* obtenidos durante la digestión gastrointestinal *in vitro* de caseína. Placa A) Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a la digestión en la FG (10 y 12 μ L/ banda aplicada) y al control positivo oxitetraciclina 1mg/mL (5 μ L/banda aplicada) respectivamente. Placa B) Los carriles 1 y 2 corresponden a la digestión en la FI (10 Y 12 μ L/banda aplicada). Documentados bajo iluminación de luz blanca después de realizar el bioensayo *B. subtilis*.

6 Formación de péptidos de caseína mediante la simulación de la digestión gastrointestinal.

6.1.1 Impacto de las etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la formación de péptidos y su efecto en las propiedades bioactivas.

Se aplicó un método de digestión *in vitro* estático estandarizado, como consenso internacional, recomendado por la acción COST INFOGEST que simula el sistema gastrointestinal humano descrito por Minekus et al. [37] en la caseína para estudiar el efecto del proceso de digestión y evaluar las propiedades bioactivas de los péptidos resultantes después de las fases de la digestión gástrica e intestinal. La digestión gastrointestinal es de gran importancia especialmente para evaluar la interacción que hay entre las proteínas y el tracto digestivo pudiendo determinar el impacto a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la generación de péptidos. Por lo tanto, para imitar la digestión de caseína, la proteína se sometió a una digestión gastrointestinal *in vitro* simulada (DGIS).

La muestra de caseína sin tratamiento y las digeridas se analizaron por HPTLC para obtener un perfil de péptidos de la caseína que se muestra en la Figura 18. Hasta donde sabemos, no hay reporte de separaciones por HPTLC de una digestión gastrointestinal *in vitro* y sólo se han analizado por SDS-PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida con patrones de proteínas por Aspri et al. y Sanchón et al. [35, 48].

Las comparaciones de las digestiones de la FG y FI y de caseína sin digerir (Figura 18 (carriles 1, 2 y 3)) se realizó según la diferencia de bandas obtenidas de acuerdo con Pasilis et al. [178]. El perfil peptídico de la caseína digerida es diferente a los de caseína sin digerir y al de los blancos de la DGIS. De acuerdo con Egger et al. y Aspri et al. [47, 48] la comparación de la muestra no digerida y las digeridas de caseína mostró que no había bandas visibles de caseína, la caseína al parecer se hidrolizó durante la SGID, liberando péptidos. Se observó un alto grado de hidrólisis proteica por parte de las enzimas gastrointestinales. Obteniéndose desde la digestión con pepsina una gran cantidad de bandas, esto es en el tiempo de digestión de la FG, lo que es consistente con un estudio reciente donde no se detecta caseína intacta sino que observaron una degradación gradual de la fracción de caseína en el tiempo en forma de péptidos [47]. De igual forma otro estudio también obtuvo que la caseína se degrada durante la digestión gástrica *in vitro*, no se detectan bandas de caseína al final de la FG [231]. Aunque la digestión de la caseína no fue completa se obtuvo un alto grado de hidrólisis como bandas correspondientes a los péptidos después de la digestión *in vitro*.

Se recuperaron varios péptidos diferentes como bandas detectadas en la placa, siendo al parecer recuperados un mayor número de bandas en la fase gástrica que en la en la fase intestinal con un perfil similar. Sin embargo, parece observarse una disminución en las bandas superiores de los carriles pertenecientes a la FG (Figura 18), esto pudo deberse a las diferentes condiciones de digestión en cada fase como la presencia de enzimas adicionales en la FI mostrando el impacto a lo largo de la digestión

gastrointestinal sobre el contenido de péptidos, lo que está en concordancia con un estudio reciente donde el número de péptidos observados podría disminuir de la FG a la FI debido a la progresión esperada durante el proceso de digestión [47]. También parece observarse que otras bandas aparecen en los digeridos de la FI, indicando la presencia de péptidos más cortos como se evidenció en otros trabajos donde se forman péptidos más pequeños a lo largo del tiempo de digestión [53]. Los estudios de actividad reportados parecen ser una prueba de que los péptidos resultantes de la FG son diferentes a los de la FI, lo que está de acuerdo con la literatura [57, 232].

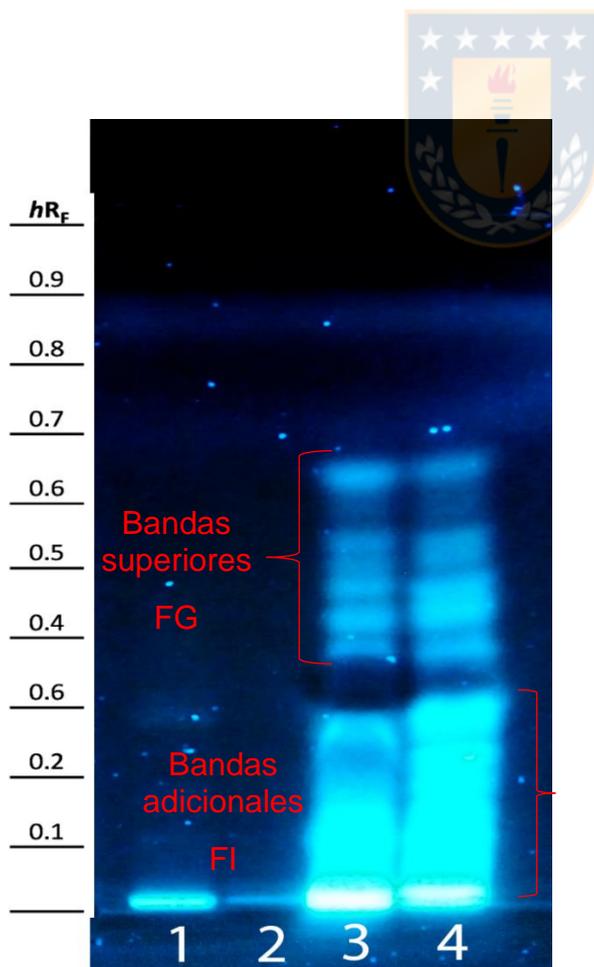


Figura 18. Péptidos de caseína generados durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. Placa A) Los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden al blanco de digestión de la FG y FI y a la digestión en la FG y FI respectivamente. Documentados a 366 nm después de la derivatización con fluorescamina y trietilamina respectivamente. Se aplicó un volumen de 10 μ L de cada muestra.

6.1.2 Efecto de la digestión gastrointestinal simulada en la bioactividad de los péptidos a lo largo de la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Para ejercer su actividad, los péptidos deben tener suficiente estabilidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal y alcanzar su sitio objetivo intacto [139] por ejemplo, se demostró que el péptido inhibidor de la ECA derivado de β -lactoalbumina se degrada *in vitro* por las proteinasas gastrointestinales y séricas destruyendo sus potenciales propiedades bioactivas [233]. Para estudiar la bioactividad de los péptidos de caseína generados durante el proceso digestivo se evaluó las propiedades funcionales como actividades inhibitorias de la α -glucosidasa y acetilcolinesterasa, antioxidantes y antimicrobianas de los péptidos resultantes en cada etapa del proceso simulado. Posiblemente se obtuvo una banda en cada fase de la digestión tanto en la inhibición sobre la enzima α -glucosidasa como en la inhibición sobre la enzima AchE, siete bandas con actividad antioxidante dos de la FG y cinco de la FI, cinco bandas con capacidad antibacteriana dos presentes en la FG y tres en la FI. Las figuras 14, 15, 16, 17 y 18 muestran los resultados

obtenidos. Las probables bandas con actividad antioxidante y antibacteriana adicionales que aparecen en la FI pueden deberse a la hidrólisis de las enzimas presentes en la digestión intestinal, esto podría significar que los péptidos generados en el estómago por la pepsina en condiciones de pH ácido no son los mismos que los que se obtienen en la fase gastrointestinal ya que estos últimos pueden tener secuencias más cortas, debido a la digestión posterior con cortes adicionales específicos por enzimas pancreáticas lo que está en relación con una investigación donde se encontró que algunas secuencias peptídicas presentan resistencia a la digestión gástrica siendo encontradas en la fase gastrointestinal [15]. Este posible resultado se respalda además de un estudio reciente que manifiesta que los péptidos digeridos con pepsina fueron excelentes sustratos para las enzimas pancreáticas, debido a la especificidad de escisión de las enzimas pancreáticas [231].

No obstante, al parecer la mayoría de las bandas persistieron después de la FG haciéndose evidentes en la FI, lo que indica que esas secuencias eran resistentes a la hidrólisis, posiblemente debido a los rasgos estructurales específicos que les confieren resistencia a ciertos fragmentos peptídicos. Parece observarse perfiles peptídicos de los digeridos de la FG similares a los de la FI con gran número de bandas comunes. Debido a la complejidad real del proceso digestivo cualquier método *in vitro* no lograría igualar la digestión *in vivo*, por lo que es probable que la mayoría de los péptidos bioactivos no sobrevivan intactos a las condiciones gastrointestinal [47, 159], lo que sugiere que pueden necesitar protección contra la degradación enzimática gástrica o intestinal como se sugiere en otros trabajos para ejercer sus efectos

funcionales [234, 235]. Sin embargo, los modelos de digestión *in vitro* estáticos, se han considerado como alternativa temprana para evaluar la funcionalidad de los péptidos [161]. Los resultados observados en el presente estudio muestran los péptidos de caseína generados durante la digestión gastrointestinal *in vitro*, sin embargo, sé que requiere de la optimización de los bioensayos para obtener zonas de inhibición más claras que permitan identificar la actividad biológica de los péptidos de caseína.



7 CONCLUSIONES.

1. Se aplicó un método de digestión *in vitro* estático estandarizado, como consenso internacional, recomendado por la acción COST INFOGEST. La caseína se hidrolizó principalmente durante la digestión gástrica, liberando una gran gama de péptidos y tuvo una hidrólisis adicional durante la digestión intestinal.
2. La fase móvil se seleccionó mediante la herramienta de optimización práctico y sistemático “Esquema cuatro niveles” basado en el sistema de clasificación de solventes según Snyder y el modelo PRISMA y consistió en 2-propanol/n-butanol/amoniaco/agua (57/20/20/3, v/v/v/v). La aplicación de la HPTLC resultó una herramienta útil para la separación de péptidos con actividad biológica presentes en la matriz alimentaria.
3. Las actividades inhibitorias enzimáticas (α -glucosidasa y AchE), antioxidante y antibacteriana de los péptidos derivados de la caseína se han demostrado al aplicar este sistema de digestión *in vitro*.
4. Se demostró las propiedades de inhibición que ejercen los péptidos bioactivos formados durante la FG, así como la resistencia y/o la formación de nuevos péptidos en la FI. Las actividades exhibidas en la FG persistieron en la FI mostrando un incremento de la actividad antioxidante y antibacteriana. Sin embargo, se requieren más estudios *in vivo*, para poder asegurar si alguna de estas propiedades bioactivas puede tener un papel fisiológico positivo en el organismo.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis, que durante la digestión gastrointestinal simulada de la caseína sí se pudo obtener péptidos con actividad biológica.

En conclusión, debido a sus beneficios nutricionales existe una tendencia creciente a consumir leche de vaca, además de tener bioactividades positivas atribuidas a los péptidos bioactivos, dado a su capacidad inhibitoria relacionada con el tratamiento y la prevención de enfermedades como la diabetes, Alzheimer y cardiovasculares. No obstante, es importante tener en cuenta las reacciones de hipersensibilidad e intolerancia a la proteína de la leche de vaca y la posible alergenicidad de los péptidos bioactivos en diferentes concentraciones para su uso previsto en la industria alimentaria debido a que algunos péptidos pueden desamidarse en condiciones fisiológicas constituyendo péptidos alergénicos indeseables por lo que los beneficios terapéuticos varían con el grado de gravedad de la alergia [236].

Los posibles beneficios para la salud de los péptidos derivados de las proteínas de la leche han sido un tema de creciente interés comercial en el contexto de los alimentos funcionales como valiosos ingredientes para combatir las enfermedades crónicas no transmisibles. Por lo tanto, se sugiere como proyección de este trabajo, determinar la identidad de estas moléculas bioactivas mediante el acoplamiento de HPTLC-MS ya que cada péptido necesita una caracterización precisa de su farmacocinética y farmacodinámica con el fin de establecer la relación dosis respuesta, posología y reconocer los efectos secundario. La biodisponibilidad y la actividad de los péptidos alimentarios también es crucial para estos estudios

como productos nutracéuticos, suplementos o alimentos funcionales. Así también, debido al número ilimitado de péptidos producidos a partir de una proteína con funcionalidades específicas se sugiere aplicar tecnologías alternativas para mejorar los bioprocesos para fabricación industrial de manera que se pueda reducir los costos y el tiempo de bioproceso.



8 GLOSARIO.

Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)

Cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC)

Digestión gastrointestinal (DGI)

Fase gástrica (FG)

Fase intestinal (FI)

R_f (Factor de retardo)

Acetilcolinesterasa (AChE)

DPPH

Organización mundial de la salud (OMS)

Alimentos de uso específico para la salud (FOSHU)

El sistema elige vivir sano (SEVS)

Péptidos bioactivos (PB)

Aminoácidos (AA)

Federación internacional de diabetes (FID)

Organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE)

Alzheimer (EA)

Acetilcolina (ACh)

Enzima acetilcolinesterasa (AChE)

Colina (CH)

Inhibidores de la acetilcolinesterasa (IACHE)

Actividad antioxidante (AC)

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Desoxirribonucleico (ADN)

Enfermedad de alzheimer (EA)

Enfermedades cardiovasculares (CV)

Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Infecciones bacterianas resistentes a los tratamientos antibióticos (AMR)

La Organización Mundial de la Salud (ONG)

Producto interno bruto (PIB)

Sistema global de vigilancia de la resistencia a los antibióticos (GLASS)

Ministerio de salud (Minsal)

Péptidos antimicrobianos (AMP)

Caseína (CN)

Prolina (Pro)

Cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC)

Análisis de efecto directo (EDA)

Bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3)

Cloruro de sodio (NaCl)

Cloruro de potasio (KCl)

Cloruro de calcio (CaCl_2)

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Cloruro de magnesio hexahidrato ($\text{MgCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$)

Carbonato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$)

Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)

Dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4)

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)



Fosfato di-sódico (Na_2HPO_4)

Hidróxido de litio (LiOH)

Hidróxido de bario $\text{Ba}(\text{OH})_2$

Dithioerythritol (DTE)

Bromuro de tetrazolio y azul de tiazolilo (MTT)

Iodoacetamida, (IAA)

2,2-difenil-1- (2, 4, 6-trinitrofenil) hidrazilo (DPPH)

Hidróxido de sodio (NaOH)

Ácido clorhídrico (HCl)

Fluido intestinal simulado (FIS)

Fluido gástrico simulado (FGS)

UV/Vis/FLD

Unidad formadora de colonia (UFC)

Densidad óptica (OD)

Fosfopéptidos de caseína (CPP)

Gástrico simulado (FGS) fosfopéptidos de caseína (CPP)



9 REFERENCIAS.

1. World Health, O., *Enfermedades no transmisibles Datos y cifras 2018*.
2. World Health, O., *Noncommunicable diseases country profiles 2018*. 2018, Geneva: World Health Organization.
3. Ala, A., et al., *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. 2010.
4. World Health, O., *La OMS publica una nueva edición del informe sobre el seguimiento de los progresos en relación con las enfermedades no transmisibles*. 2017.
5. Li-Chan, E.C.Y., *Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients*. *Current Opinion in Food Science*, 2015. **1**: p. 28-37.
6. OMS, W.H.O., *Global Status Report on noncommunicable diseases 2014*, in *Genva, Switzerland*. 2014, World Health Organization 2014.
7. Ledezma, B.H., *Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos*, in *Departamento de Nutrición y Bromatología II 2002*, Universidad Complutense de Madrid: Madrid, España. p. 230.
8. Hobbs, J.E., S. Malla, and E.K. Sogah, *Regulatory Frameworks for Functional Food and Supplements*. *Canadian Journal of Agricultural Economics-Revue Canadienne D Agroéconomie*, 2014. **62**(4): p. 569-594.
9. Ashwell, M., *Conceptos sobre alimentos funcionales ILSI*. 2004, ILSI Europe Concise Monograph Series.
10. Juárez, M., A. Olano, and F. Morais, *Alimentos Funcionales*. 2007, Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, FECYT: Madrid. p. 313.
11. Durán, R. and A. Valenzuela, *La experiencia japonesa con los alimentos Foshu: ¿los verdaderos alimentos funcionales?* *Revista chilena de nutrición*, 2010. **37**: p. 224-233.

12. Minsal., M.d.S., *Política nacional de alimentación y nutrición*. 2017, Santiago de Chile: Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 81.
13. Hernández-Ledesma, B., et al., *Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits*. International Dairy Journal, 2014. **38**(2): p. 82-100.
14. Udenigwe, C. and R.E. Aluko, *Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits*. Journal of Food Science, 2012. **77**(1): p. R11-R24.
15. Wada, Y. and B. Lönnerdal, *Bioactive peptides derived from human milk proteins — mechanisms of action*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2014. **25**(5): p. 503-514.
16. Muehlhoff, E., A. Bennett, and D. McMahon, *Milk and Dairy Products in Human Nutrition* International Journal of Dairy Technology, 2013. **67**(2): p. 303-304.
17. Cerezo, R.M., *Péptidos bioactivos en la leche de consumo*, in *Nutrición y Bromatología II*



2005, Universidad Complutense de Madrid

18. Restrepo, L.F., C. Peña, and N. Zapata, *Disponibilidad de Leche de los Países Sudamericanos en las Últimas Cinco Décadas: Elementos para Análisis y Perspectivas Futuras*. Información tecnológica, 2019. **30**: p. 77-84.
19. Pereira, P.C., *Milk nutritional composition and its role in human health*. Nutrition, 2014. **30**(6): p. 619-627.
20. Lopez-Huertas, E., *Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies*. Pharmacological Research, 2010. **61**(3): p. 200-207.
21. Elwood, P.C., et al., *The survival advantage of milk and dairy consumption: an overview of evidence from cohort studies of vascular diseases, diabetes and cancer*. J Am Coll Nutr, 2008. **27**(6): p. 723s-34s.

22. Léonil, J., et al., *Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of food proteins and derived peptides*. Journal of Chromatography A, 2000. **881**(1): p. 1-21.
23. Wang, J., et al., *Determination of Major Bovine Milk Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009. **37**(11): p. 1667-1670.
24. Hernández, G.R., *Actividad inhibitoria in vitro de la enzima convertidora de angiotensina de una bebida probiótica a base de suero*, in *Tecnología de productos de origen animal*. 2015, Universidad Autónoma de Chihuahua.
25. Huerta, E.C., *Obtención de péptidos alimentarios mediante hidrólisis enzimática con efectos sobre la salud intestinal*, in *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II 2016*, Universidad Complutense de Madrid: Madrid. p. 228.
26. Vásquez, J.A.K., *Composición Proteica y su Relación con las Variantes Genéticas A y B de κ -caseína y β -lactoglobulina en Leche de Vacas Frisón Negro* 2003, UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE Valdivia Chile.
27. Yamamoto, N., M. Maeno, and T. Takano, *Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by Lactobacillus helveticus CPN4*. Journal of Dairy Science, 1999. **82**(7): p. 1388-1393.
28. Tu, et al., *Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms*. Food Chem, 2018. **256**: p. 98-104.
29. Tu, M., et al., *Bioactive hydrolysates from casein: generation, identification, and in silico toxicity and allergenicity prediction of peptides*. J Sci Food Agric, 2018. **98**(9): p. 3416-3426.
30. Korhonen, *Milk-derived bioactive peptides: From science to applications*. 2009. **1**(2): p. 177-187.
31. Mizuno, R. and J.A. Lucey, *Effects of Emulsifying Salts on the Turbidity and Calcium-Phosphate-Protein Interactions in Casein Micelles*. Journal of Dairy Science, 2005. **88**(9): p. 3070-3078.

32. Giromini, C., et al., *Short-Communication: A Comparison of the In Vitro Angiotensin-1-Converting Enzyme Inhibitory Capacity of Dairy and Plant Protein Supplements*. *Nutrients*, 2017. **9**(12): p. 1352.
33. Séverin, S. and X. Wenshui, *Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005. **45**(7-8): p. 645-656.
34. Ronquillo, M.R.R., *Perfil de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por Lactobacillus casei y Streptococcus thermophilus*. 2009, Universidad Autonoma Metropolitana: Mexico D. F.
35. Sanchón, J., et al., *Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation*. *Food Chemistry*, 2018. **239**: p. 486-494.
36. Shimizu, M., *Food-derived peptides and intestinal functions*. *BioFactors*, 2004. **21**: p. 43-47.
37. Minekus, M., et al., *A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus*. *Food & Function*, 2014. **5**(6): p. 1113-1124.
38. Guerra, A., et al., *Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion*. *Trends in Biotechnology*, 2012. **30**(11): p. 591-600.
39. Giromini, C., et al., *Invited review: Dairy proteins and bioactive peptides: Modeling digestion and the intestinal barrier*. *Journal of Dairy Science*, 2019. **102**(2): p. 929-942.
40. Lingua, M.S., D.A. Wunderlin, and M.V. Baroni, *Effect of simulated digestion on the phenolic components of red grapes and their corresponding wines*. *Journal of Functional Foods*, 2018. **44**: p. 86-94.
41. Aleixandre, A., M. Miguel, and B. Muguera, *Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo*. *Nutrición Hospitalaria*, 2008. **23**: p. 313-318.
42. Deng, Y., C.I. Butré, and P.A. Wierenga, *Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis*. *International Dairy Journal*, 2018. **86**: p. 39-48.

43. Korhonen and A. Pihlanto, *Bioactive peptides: Production and functionality*. International Dairy Journal, 2006. **16**(9): p. 945-960.
44. Phelan, M., et al., *Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status*. International Dairy Journal, 2009. **19**(11): p. 643-654.
45. Torruco-Uco, J.G., et al., *Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review* Ciencia y Tecnología Alimentaria, 2008. **6**(2): p. 158-168.
46. Nehir, et al., *In vitro digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides*. Food & Function, 2015. **6**(7): p. 2322-2330.
47. Egger, L., et al., *The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action*. Food Research International, 2016. **88**: p. 217-225.
48. Aspri, M., et al., *Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after in vitro simulated gastrointestinal digestion*. Food Chemistry, 2018. **268**: p. 476-484.
49. Schanbacher, F.L., R.S. Talhouk, and F.A. Murray, *Biology and origin of bioactive peptides in milk*. Livestock Production Science, 1997. **50**(1): p. 105-123.
50. Chakrabarti, S., S. Guha, and K. Majumder, *Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities*. Nutrients, 2018. **10**(11).
51. Muro, C., et al., *Review: Production and functionality of active peptides from milk*. Food Sci Technol Int, 2011. **17**(4): p. 293-317.
52. Sánchez, A. and A. Vázquez, *Bioactive peptides: A review*. Food Quality and Safety, 2017. **1**(1): p. 29-46.
53. Ronquillo, M.R.R., *Perfil de péptidos bioactivos durante la fermentación de leche por Lactobacillus casei y Streptococcus thermophilus*, in *Unidad Iztapalapa*. 2009, Universidad Autónoma Metropolitana.

54. Park, Y.W. and M.S. Nam, *Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review*. Korean journal for food science of animal resources, 2015. **35**(6): p. 831-840.
55. Mohanty, D.P., et al., *Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review*. Saudi journal of biological sciences, 2016. **23**(5): p. 577-583.
56. Lafarga, T. and M. Hayes, *Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients*. Meat Science, 2014. **98**(2): p. 227-239.
57. Daliri, E.B.-M., D.H. Oh, and B.H. Lee, *Bioactive Peptides*. Foods, 2017. **6**(5): p. 32.
58. Domínguez, K.N., et al., *El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas*. Revista Argentina de Microbiología, 2014. **46**(1): p. 58-65.
59. Jan, F., S. Kumar, and R. Jha, *Effect of boiling on the antidiabetic property of enzyme treated sheep milk casein*. Veterinary World, 2016. **9**(10): p. 1152-1156.
60. *Noncommunicable Diseases-Country Profiles 2018*, (OMS) Organización Mundial de la Salud.
61. Rahati, S., et al., *Food pattern, lifestyle and diabetes mellitus*. International journal of high risk behaviors & addiction, 2014. **3**(1): p. e8725-e8725.
62. Ibrahim, et al., *Structural properties of bioactive peptides with α -glucosidase inhibitory activity*. Chemical Biology & Drug Design, 2018. **91**(2): p. 370-379.
63. OECD, *Health at a Glance 2019*. 2019.
64. Olokoba, A.B., O.A. Obateru, and L.B. Olokoba, *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*. Oman medical journal, 2012. **27**(4): p. 269-273.
65. FAUCI, A., *Índice de Principios de Medicina Interna, Harrison*. 17^a ed.

(Versión on line de la Universitat de València). 2012.

66. Patil, P., et al., *Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes*. European Journal of Nutrition, 2015. **54**(6): p. 863-880.
67. Kawamura-Konishi, Y., et al., *Isolation of a New Phlorotannin, a Potent Inhibitor of Carbohydrate-Hydrolyzing Enzymes, from the Brown Alga Sargassum patens*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(22): p. 5565-5570.
68. Ortiz, M.E.R., *Propiedades funcionales de hoy*. 2017, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.
69. Konrad, B., et al., *The Evaluation of Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV, α -Glucosidase and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activities of Whey Proteins Hydrolyzed with Serine Protease Isolated from Asian Pumpkin (Cucurbita ficifolia)*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2014. **20**(4): p. 483-491.
70. Galarce, O., et al., *An improved method for a fast screening of α -glucosidase inhibitors in cherimoya fruit (Annona cherimola Mill.) applying effect-directed analysis via high-performance thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2019. **1608**: p. 460415.
71. Fujisawa, T., et al., *Effect of two α -glucosidase inhibitors, voglibose and acarbose, on postprandial hyperglycemia correlates with subjective abdominal symptoms*. Metabolism, 2005. **54**(3): p. 387-390.
72. Ibrahim, Koorbanally, and Islam, *Anti-oxidative, alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitory activity of vitex doniana: possible exploitation in the management of type 2 diabetes*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2016. **73**(5): p. 1235-1247.
73. Ibrahim, Koorbanally, and Islam, *Antioxidative activity and inhibition of key enzymes linked to type-2 diabetes (α -glucosidase and α -amylase) by Khaya senegalensis*. Acta Pharm, 2014. **64**(3): p. 311-24.
74. Simões-Pires, C.A., et al., *A TLC bioautographic method for the detection of α - and β -glucosidase inhibitors in plant extracts*. Phytochemical Analysis, 2009. **20**(6): p. 511-515.

75. Manders, R.J.F., et al., *Protein Hydrolysate/Leucine Co-Ingestion Reduces the Prevalence of Hyperglycemia in Type 2 Diabetic Patients*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(12): p. 2721-2722.
76. Yu, et al., *Anti-diabetic activity peptides from albumin against alpha-glucosidase and alpha-amylase*. *Food Chemistry*, 2012. **135**(3): p. 2078-2085.
77. Mojica, L., et al., *Evaluation of the hypoglycemic potential of a black bean hydrolyzed protein isolate and its pure peptides using in silico, in vitro and in vivo approaches*. *Journal of Functional Foods*, 2017. **31**: p. 274-286.
78. Roblet, C., et al., *Enhancement of glucose uptake in muscular cell by peptide fractions separated by electro dialysis with filtration membrane from salmon frame protein hydrolysate*. *Journal of Functional Foods*, 2016. **22**: p. 337-346.
79. Nongonierma, A.B. and R.J. FitzGerald, *Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates*. *Peptides*, 2013. **39**: p. 157-163.
80. Ministerio de Salud, M., Gobierno de Chile, *Plan Nacional de Demencia 2017*. 2017.
81. World Health, O., *Dementia: a public health priority*. 2012, Geneva: World Health Organization.
82. Bhatt, J., et al., *The World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*. 2019.
83. Organización Mundial de la Salud, O., *Demencia*. 2019.
84. Adewusi, E.A., N. Moodley, and V. Steenkamp, *Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants*. *South African Journal of Botany*, 2011. **77**(3): p. 638-644.
85. Felder, C.C., et al., *Therapeutic Opportunities for Muscarinic Receptors in the Central Nervous System*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000. **43**(23): p. 4333-4353.

86. Dayrin, O., A. Valdez, and C. Armando, *Actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa por extractos de 18 especies vegetales nativas de Guatemala usadas en el tratamiento de afecciones nerviosas*. REVISTA CIENTÍFICA, 2013. **23**(1).
87. Galarce, O., et al., *Detection and identification of acetylcholinesterase inhibitors in Annona cherimola Mill. by effect-directed analysis using thin-layer chromatography-bioassay-mass spectrometry*. Phytochemical Analysis, 2019. **30**(6): p. 679-686.
88. Prasasty, V., M. Radifar, and E. Istyastono, *Natural Peptides in Drug Discovery Targeting Acetylcholinesterase*. Molecules (Basel, Switzerland), 2018. **23**(9): p. 2344.
89. Di Giovanni, S., et al., *In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008. **33**(2): p. 109-119.
90. Rollinger, J.M., et al., *Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Scopolin and Scopoletin Discovered by Virtual Screening of Natural Products*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(25): p. 6248-6254.
91. Alpízar-Quesada, C.L. and C. Morales-Alpízar, *La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa*. Acta Médica Costarricense, 2003. **45**: p. 50-56.
92. Enz A., F.P., *Cholinesterase Inhibitors: An Overview of their Mechanisms of Action*, in *Advances in Alzheimer Disease Therapy*., G.E. In: Becker R.E., Barton J.M., Brown M. (eds) Alzheimer Disease, Editor. 1997: Birkhäuser Boston.
93. Tulane University, S.O.M., *Cholinesterase Inhibitors (Medical Use & WMD)*. Medical Pharmacology I TMedWeb, 2018.
94. Roberson, M.R. and L.E. Harrell, *Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism*. Brain Research Reviews, 1997. **25**(1): p. 50-69.
95. Szwajgier, D. and K. Borowiec, *Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors*. Journal of the Institute of Brewing, 2012. **118**(1): p. 40-48.

96. Mehta, M., A. Adem, and M. Sabbagh, *New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease*. International journal of Alzheimer's disease, 2012. **2012**: p. 728983-728983.
97. Sancheti, S., et al., *1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose: A cholinesterase inhibitor from Terminalia chebula*. South African Journal of Botany, 2010. **76**(2): p. 285-288.
98. Hojati, S., A. Ghahghaei, and M. Lagzian, *The potential inhibitory effect of β -casein on the aggregation and deposition of A β 1-42 fibrils in Alzheimer's disease: insight from in-vitro and in-silico studies*. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2018. **36**(8): p. 2118-2130.
99. Yeon, S.-W., et al., *Fermented milk of Lactobacillus helveticus IDCC3801 reduces beta-amyloid and attenuates memory deficit*. Journal of Functional Foods, 2010. **2**(2): p. 143-152.
100. Marston, A., *Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(19): p. 2676-2683.
101. Zou, T.-B., et al., *The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins*. Molecules, 2016. **21**(1): p. 72.
102. Montoya-Rodríguez, A. and E.G. de Mejía, *Pure peptides from amaranth (Amaranthus hypochondriacus) proteins inhibit LOX-1 receptor and cellular markers associated with atherosclerosis development in vitro*. Food Research International, 2015. **77**: p. 204-214.
103. Lopez, A.D. and C.D. Mathers, *Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002–2030*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 2006. **100**(5-6): p. 481-499.
104. Chakrabarti, S., F. Jahandideh, and J. Wu, *Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress*. BioMed research international, 2014. **2014**: p. 608979-608979.
105. Chen, et al., *Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion*. Industrial Crops and Products, 2014. **57**: p. 150-157.

106. Samaranyaka, A.G.P. and E.C.Y. Li-Chan, *Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications*. Journal of Functional Foods, 2011. **3**(4): p. 229-254.
107. Brito, A., et al., *HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile*. Molecules, 2014. **19**(11).
108. Dias, M.I., et al., *Systematic comparison of nutraceuticals and antioxidant potential of cultivated, in vitro cultured and commercial Melissa officinalis samples*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(6): p. 1866-1873.
109. Krüger, S., et al., *Effect-directed fingerprints of 77 botanical extracts via a generic high-performance thin-layer chromatography method combined with assays and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2017. **1529**: p. 93-106.
110. Möller, N.P., et al., *Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects*. European Journal of Nutrition, 2008. **47**(4): p. 171-182.
111. Sakai, A., N. Miyata, and A. Takahashi, *Promoting activity of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) in BALB/3T3 cell transformation*. Cancer Letters, 1997. **115**(2): p. 213-220.
112. Tian, M., et al., *Structure-activity relationship of a series of antioxidant tripeptides derived from β -Lactoglobulin using QSAR modeling*. Dairy Science & Technology, 2015. **95**(4): p. 451-463.
113. Chen, H.-M., et al., *Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. **44**(9): p. 2619-2623.
114. Bamdad, F., et al., *Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Casein Hydrolysate Produced Using High Hydrostatic Pressure Combined with Proteolytic Enzymes*. Molecules, 2017. **22**(4): p. 609.
115. Díaz, M. and E.A. Decker, *Antioxidant Mechanisms of Caseinophosphopeptides and Casein Hydrolysates and Their Application in Ground Beef*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(26): p. 8208-8213.

116. Chiu, S.C.K. and D.D. Kitts, *Antioxidant Characterization of Caseinophosphopeptides from Bovine Milk*, in *Nutraceutical Beverages*. 2003, American Chemical Society. p. 279-289.
117. Wolfe, K., X. Wu, and R.H. Liu, *Antioxidant Activity of Apple Peels*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. **51**(3): p. 609-614.
118. Zhou, Y. and Y. Peng, *Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2013. **6**(4): p. 1000-1004.
119. Lebedeva, A.A., et al., *Bactericide, Immunomodulating, and Wound Healing Properties of Transgenic Kalanchoe pinnata Synergize with Antimicrobial Peptide Cecropin P1 In Vivo*. *Journal of immunology research*, 2017. **2017**: p. 4645701-4645701.
120. Quiñones Pérez, D., *Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud"*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2017. **69**: p. 1-17.
121. Marcoleta, U.d.C.-A., *Bacterias multirresistentes y carencia de nuevos antibióticos: una mirada desde Chile a un problema de salud pública global*, in *Bacterias multirresistentes y carencia de nuevos antibióticos: una mirada desde Chile a un problema de salud pública global*
2019: Santiago de Chile.
122. Brogden, K.A., *Marcoleta, 2019*. *Nature Reviews Microbiology*, 2005. **3**(3): p. 238-250.
123. Finlay, B.B. and R.E.W. Hancock, *Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?* *Nature Reviews Microbiology*, 2004. **2**(6): p. 497-504.
124. Richwagen, N., et al., *Antibacterial Activity of Kalanchoe mortagei and K. fedtschenkoi Against ESKAPE Pathogens*. *Frontiers in Pharmacology*, 2019. **10**(67).
125. Irenji, N., S.K.G. Pillai, and J.S. West-Jones, *Serious life-threatening multifocal infection in a child, caused by Panton-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus* (PVL-MSSA)*. *BMJ Case Reports*, 2018. **2018**: p. bcr-2017-222138.

126. Choma and Grzelak, *Bioautography detection in thin-layer chromatography*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(19): p. 2684-2691.
127. World Health Organization, W.H.O., *Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018*. . 2018, World Health Organization; 2018: Geneva.
128. Zhang, F., et al., *Antimicrobial activity and mechanism of the human milk-sourced peptide Casein201*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017. **485**(3): p. 698-704.
129. Zucht, H.-D., et al., *Casocidin-I: a casein-as2 derived peptide exhibits antibacterial activity*. FEBS Letters, 1995. **372**(2): p. 185-188.
130. Chabance, B., et al., *Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt*. Biochimie, 1998. **80**(2): p. 155-165.
131. Bellamy, W., et al., *Killing of Candida albicans by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin*. Medical Microbiology and Immunology, 1993. **182**(2): p. 97-105.
132. Choi, J., et al., *Bioactive peptides in dairy products*. International Journal of Dairy Technology, 2012. **65**(1): p. 1-12.
133. Piotto, S.P., et al., *YADAMP: yet another database of antimicrobial peptides*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2012. **39**(4): p. 346-351.
134. Domínguez González, K.N., et al., *El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas*. Revista Argentina de Microbiología, 2014. **46**(1): p. 58-65.
135. Korhonen, H. and A. Pihlanto, *Food-derived bioactive peptides - Opportunities for designing future foods*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**(16): p. 1297-1308.
136. Sánchez-Rivera, L., et al., *Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides*. Food Research International, 2014. **63**: p. 170-181.

137. Lorenzen, P.C. and H.J.I.j.o.d.t. Meisel, *Influence of trypsin action in yoghurt milk on the release of caseinophosphopeptide-rich fractions and physical properties of the fermented products*. 2005. **58**(2): p. 119-124.
138. Saavedra, L., et al., *An overview of “omic” analytical methods applied in bioactive peptide studies*. Food Research International, 2013. **54**(1): p. 925-934.
139. Power, O., P. Jakeman, and R.J. FitzGerald, *Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides*. Amino Acids, 2013. **44**(3): p. 797-820.
140. Mojica, L. and E.G. de Mejía, *Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential*. Food & Function, 2016. **7**(2): p. 713-727.
141. Butré, C.I., et al., *Introducing enzyme selectivity: a quantitative parameter to describe enzymatic protein hydrolysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(24): p. 5827-5841.
142. Iskandar, M.M., et al., *High Hydrostatic Pressure Pretreatment of Whey Protein Isolates Improves Their Digestibility and Antioxidant Capacity*. Foods, 2015. **4**(2): p. 184-207.
143. Kadam, S.U., et al., *Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides*. Trends in Food Science & Technology, 2015. **46**(1): p. 60-67.
144. Deng, Y., et al., *Towards predicting protein hydrolysis by bovine trypsin*. Process Biochemistry, 2018. **65**: p. 81-92.
145. Saadi, S., et al., *Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications*. Biotechnology Advances, 2015. **33**(1): p. 80-116.
146. Abdelhedi, O. and M. Nasri, *Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: Production, structure-activity relationship and bioavailability*. Trends in Food Science & Technology, 2019. **88**: p. 543-557.

147. Suetsuna, K., H. Ukeda, and H. Ochi, *Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000. **11**(3): p. 128-131.
148. Sornwatana, T., et al., *Chebulin: Terminalia chebula Retz. fruit-derived peptide with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015. **62**(6): p. 746-753.
149. Nasri, M., *Chapter Four - Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, F. Toldrá, Editor. 2017, Academic Press. p. 109-159.
150. Jung, W.-K., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats*. Food Chemistry, 2006. **94**(1): p. 26-32.
151. Abdel-Hamid, M., et al., *Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins*. International Dairy Journal, 2017. **66**: p. 91-98.
152. Peng, X., et al., *Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase*. International Dairy Journal, 2010. **20**(5): p. 360-365.
153. Otte, J., et al., *Hydrolysis of bovine β -Lactoglobulin by various proteases and identification of selected peptides*. International Dairy Journal, 1997. **7**(12): p. 835-848.
154. Tsopmo, A., et al., *Tryptophan Released From Mother's Milk Has Antioxidant Properties*. Pediatric Research, 2009. **66**(6): p. 614-618.
155. Aguilar-Toalá, J.E., et al., *Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains*. Journal of Dairy Science, 2017. **100**(1): p. 65-75.
156. Rizzello, C.G., et al., *Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2017. **241**: p. 252-261.

157. Verhoeckx, et al., *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. 2015.
158. Carbonell-Capella, J.M., et al., *Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014. **13**(2): p. 155-171.
159. Segura-Campos, M., L. Chel-Guerrero, and D. Betancur-Ancona, *Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica*. *Revista chilena de nutrición*, 2010. **37**: p. 386-391.
160. Roufik, S., S.F. Gauthier, and S.L. Turgeon, *In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine β -lactoglobulin*. *International Dairy Journal*, 2006. **16**(4): p. 294-302.
161. Mackie, A., et al., *Approaches to Static Digestion Models*. 2015: p. 23-31.
162. Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérida, and A. Pérez-Gálvez, *In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency*. *Nutrition Research*, 2009. **29**(11): p. 751-760.
163. Ekmekcioglu, C., *A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems*. *Food Chemistry*, 2002. **76**(2): p. 225-230.
164. Alegría, A., G. Garcia-Llatas, and A. Cilla, *Static Digestion Models: General Introduction*. 2015: p. 3-12.
165. Picariello, G., et al., *Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015. **59**(5): p. 948-956.
166. Saito, H. and K. Inui, *Dipeptide transporters in apical and basolateral membranes of the human intestinal cell line Caco-2*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1993. **265**(2): p. G289-G294.
167. Whitney, E.N. and S.R. Rolfes, *Understanding nutrition*. 2011, Australia; Belmont, CA: Wadsworth, Cengage Learning.

168. Arhewoh, M., E. Ahonkhai, and A. Okhamafe, *Optimising oral systems for the delivery of therapeutic proteins and peptides*. African Journal of Biotechnology, 2006. **4**: p. 1591-1597.
169. Jandhyala, S.M., et al., *Role of the normal gut microbiota*. World journal of gastroenterology, 2015. **21**(29): p. 8787-8803.
170. Vamanu, E. and F. Gatea, *Correlations between Microbiota Bioactivity and Bioavailability of Functional Compounds: A Mini-Review*. Biomedicines, 2020. **8**(2): p. 39.
171. Davila, A.-M., et al., *Re-print of "Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host"*. Pharmacological Research, 2013. **69**(1): p. 114-126.
172. Biller, J., et al., *Development of optimized mobile phases for protein separation by high performance thin layer chromatography*. Journal of Chromatography A, 2015. **1415**: p. 146-154.
173. Gu, L.H., et al., *A thin-layer chromatography-bioautographic method for detecting dipeptidyl peptidase IV inhibitors in plants*. Journal of Chromatography A, 2015. **1411**: p. 116-122.
174. Šegan, S., D. Opsenica, and D. Milojković-Opsenica, *Thin-layer chromatography in medicinal chemistry*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2019. **42**(9-10): p. 238-248.
175. Takáts, Z., et al., *Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization*. Science, 2004. **306**(5695): p. 471-473.
176. Tomasz, T. and S. Joseph, *Thin-Layer Chromatography*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2019. p. 1-26.
177. Pasilis, S.P., et al., *Using HPTLC/DESI-MS for peptide identification in 1D separations of tryptic protein digests*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(1): p. 317-324.
178. Pasilis, S.P., et al., *HPTLC/DESI-MS imaging of tryptic protein digests separated in two dimensions*. Journal of Mass Spectrometry, 2008. **43**(12): p. 1627-1635.

179. Báez, E., et al., *Sistema de análisis de imágenes de placas de HPTLC*. Revista Cubana de Ciencias Informáticas, 2017. **11**: p. 92-104.
180. Morlock, G. and W. Schwack, *Hyphenations in planar chromatography*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(43): p. 6600-6609.
181. Weiss, S.C., N. Egetenmeyer, and W. Schulz, *Coupling of In Vitro Bioassays with Planar Chromatography in Effect-Directed Analysis*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2017. **157**: p. 187-224.
182. Cieśla, Ł.M., et al., *Thin-layer chromatography coupled with biological detection to screen natural mixtures for potential drug leads*. Phytochemistry Letters, 2015. **11**: p. 445-454.
183. Poole, C.F., *Thin-layer chromatography: challenges and opportunities*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1): p. 963-984.
184. Jesionek, W., et al., *TLC-Direct Bioautography as a Bioassay Guided Method for Investigation of Antibacterial Compounds in Hypericum perforatum L.* Journal of AOAC International, 2015. **98**: p. 1013-20.
185. Móricz, Á.M., P.G. Ott, and G.E. Morlock, *Discovered acetylcholinesterase inhibition and antibacterial activity of polyacetylenes in tansy root extract via effect-directed chromatographic fingerprints*. Journal of Chromatography A, 2018. **1543**: p. 73-80.
186. Panchagnula, V., et al., *Phosphopeptide analysis by directly coupling two-dimensional planar electrochromatography/thin-layer chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2007. **1155**(1): p. 112-123.
187. Móricz, Á.M., et al., *Effect-Directed Discovery of Bioactive Compounds Followed by Highly Targeted Characterization, Isolation and Identification, Exemplarily Shown for Solidago virgaurea*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(16): p. 8202-8209.
188. Sharma, P., M. Bharath, and P. Murthy, *Qualitative high performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in urine samples of Cannabis abusers*. Indian Journal of Medical Research, 2010. **132**(2): p. 201-208.

189. Milojković-Opsenica, D., et al., *Planar Chromatographic Systems in Pattern Recognition and Fingerprint Analysis*. Chromatographia, 2013. **76**(19): p. 1239-1247.
190. Ristivojević, et al., *Comparative study of different approaches for multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of natural products such as plant resin*. Talanta, 2017. **162**: p. 72-79.
191. Luftmann, H., M. Aranda, and G.E. Morlock, *Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(23): p. 3772-3776.
192. Tuzimski, T., *Application of different modes of thin-layer chromatography and mass spectrometry for the separation and detection of large and small biomolecules*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(49): p. 8799-8812.
193. Lamontanara, A., et al., *Draft Genome Sequence of Lactobacillus plantarum Lp90 Isolated from Wine*. Genome announcements, 2015. **3**(2): p. e00097-15.
194. Bove, P., et al., *Lactobacillus plantarum passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis*. Microbiological Research, 2013. **168**(6): p. 351-359.
195. Tscherch, K., et al., *One- and Two-dimensional High-performance Thin-layer Chromatography as an Alternative Analytical Tool for Investigating Polyphenol-Protein Interactions*. Phytochemical Analysis, 2013. **24**(5): p. 436-445.
196. Snyder, L.R., *Classification of the solvent properties of common liquids*. Journal of Chromatography A, 1974. **92**(2): p. 223-230.
197. Dewanjee, S., et al., *Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry*. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015. **5**(2): p. 75-84.
198. Jamshidi-Aidji, M. and G.E. Morlock, *Bioprofiling of unknown antibiotics in herbal extracts: Development of a streamlined direct bioautography using Bacillus subtilis linked to mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2015. **1420**: p. 110-118.

199. Brodkorb, A., et al., *INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion*. Nature Protocols, 2019. **14**(4): p. 991-1014.
200. Morlock, G., *New HPTLC method, with systematic mobile-phase optimization, for determination of six apolar heterocyclic aromatic amines*. Jpc-journal of Planar Chromatography-modern Tlc - JPC-J PLANAR CHROMAT-MOD TLC, 2004. **17**: p. 431-434.
201. Jork, H., et al., *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*. Vol. Physical and Chemical Detection Methods:

Fundamentals, Reagents I. 1990, Federal Republic of Germany.

202. Francisco, P. and T. Pamela, *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*. S.f.
203. Aranda, J., *Desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en la alimentación animal in Facultad de Agronomía*. 2002, Universidad Autónoma de Nuevo León.
204. Prieto, M., *Análisis de compuestos residuales en tensioactivos catiónicos por cromatografía de líquidos de alta eficacia y electroforesis*, in *Departamento de Química Analítica*. 2002, Universidad de Coruña: España.
205. Masschelein-Kleiner, I., *LOS SOLVENTES*. 2004, Santiago de Chile: Publicaciones Centro Nacional de Conservación y Restauración (DIBAN).
206. Pavón-Pérez, J., K. Henriquez-Aedo, and M. Aranda, *Mass Spectrometry Determination of Fining-Related Allergen Proteins in Chilean Wines*. Food Analytical Methods, 2019. **12**(4): p. 827-837.
207. Wattanasiritham, L., et al., *Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein*. Food Chemistry, 2016. **192**: p. 156-162.
208. Merck Merck ProteoChrom®HPTLC Silica gel 60 F254s plates, 20x10 cm

209. Kitts, D.D. and K. Weiler, *Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery*. Current Pharmaceutical Design, 2003. **9**(16): p. 1309-1323.
210. Shaji, J. and V. Patole, *Protein and Peptide drug delivery: oral approaches*. Indian journal of pharmaceutical sciences, 2008. **70**(3): p. 269-277.
211. Nongonierma, A.B. and R.J. FitzGerald, *Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis*. Food Chemistry, 2014. **145**: p. 845-852.
212. Nongonierma, A.B., et al., *Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides*. Food Chemistry, 2017. **231**: p. 202-211.
213. Lacroix, et al., *Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers*. Food Funct, 2017. **8**(2): p. 701-709.
214. Lacroix and Li-Chan, *Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach*. Journal of Functional Foods, 2012. **4**(2): p. 403-422.
215. Uenishi, H., et al., *Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats*. International Dairy Journal, 2012. **22**(1): p. 24-30.
216. Umezawa, H., et al., *Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria*. The Journal of antibiotics, 1984. **37**(4): p. 422-425.
217. Caron, J., et al., *Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors*. Food Research International, 2017. **92**: p. 113-118.
218. Tagliazucchi, D., et al., *Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk*. International Dairy Journal, 2018. **81**: p. 19-27.
219. Marcone, S., O. Belton, and D.J. Fitzgerald, *Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in*

- atherosclerosis*. British journal of clinical pharmacology, 2017. **83**(1): p. 152-162.
220. Hernández-Ledesma, B., et al., *Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(6): p. 1041-1048.
221. Tang, X., et al., *Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(1): p. 587-593.
222. Ristivojević and G.E. Morlock, *Effect-directed classification of biological, biochemical and chemical profiles of 50 German beers*. Food Chemistry, 2018. **260**: p. 344-353.
223. Rutherfurd-Markwick, K.J., *Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions*. British Journal of Nutrition, 2012. **108**(S2): p. S149-S157.
224. Clare, D.A. and H.E. Swaisgood, *Bioactive Milk Peptides: A Prospectus1*. Journal of Dairy Science, 2000. **83**(6): p. 1187-1195.
225. Lahov, E. and W. Regelson, *Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Caseicidin, isracidin peptides*. Food and Chemical Toxicology, 1996. **34**(1): p. 131-145.
226. Kent, R.M., et al., *Production of the antimicrobial peptides Caseicin A and B by Bacillus isolates growing on sodium caseinate*. 2012. **55**(2): p. 141-148.
227. Liepke, C., et al., *Purification of novel peptide antibiotics from human milk*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **752**(2): p. 369-377.
228. Mandal, S.M., et al., *Identification of multifunctional peptides from human milk*. Peptides, 2014. **56**: p. 84-93.
229. Bellamy, W., et al., *Identification of the bactericidal domain of lactoferrin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1992. **1121**(1): p. 130-136.
230. Weiss, S.C., N. Egetenmeyer, and W. Schulz, *Coupling of In Vitro Bioassays with Planar Chromatography in Effect-Directed Analysis*, in

In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment, G. Reifferscheid and S. Buchinger, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 187-224.

231. Picariello, G., et al., *Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(3): p. 295-308.
232. Agyei, D., et al., *Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides*. Food and Bioprocess Processing, 2016. **98**: p. 244-256.
233. Walsh, D.J., et al., *In Vitro Generation and Stability of the Lactokinin β -Lactoglobulin Fragment (142–148)*. Journal of Dairy Science, 2004. **87**(11): p. 3845-3857.
234. Nongonierma, A.B. and R.J. FitzGerald, *Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **50**: p. 26-43.
235. Sah, B.N.P., et al., *Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018. **58**(5): p. 726-740.
236. Mati, A., et al., *Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities – A review*. International Dairy Journal, 2017. **73**: p. 25-37.

10 ANEXOS.

| Solución salina añadida | SSF (pH 7) | | | SGF (pH 3) | | SIF (pH 7) | |
|---|---------------------|--|----------------------------|--|----------------------------|--|----------------------------|
| | conc. stock | mL de stock agregado para preparar 0.4 L | conc. de sal final En jugo | mL de stock agregado para preparar 0.4 L | conc. final de sal en jugo | mL de stock agregado para preparar 0.4 L | conc. de sal final en jugo |
| | mol L ⁻¹ | mL | mmol L ⁻¹ | mL | mmol L ⁻¹ | mL | mmol L ⁻¹ |
| KCl | 0.5 | 15.1 | 15.1 | 6.9 | 6.9 | 6.8 | 6.8 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.5 | 3.7 | 1.35 | 0.9 | 0.9 | 0.8 | 0.8 |
| NaHCO ₃ | 1 | 6.8 | 13.68 | 12.5 | 12.5 | 42.5 | 85 |
| NaCl | 2 | - | - | 11.8 | 11.8 | 9.6 | 38.4 |
| MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ | 0.15 | 0.5 | 0.15 | 0.4 | 0.4 | 1.1 | 0.33 |
| NH ₄ (CO ₃) ₂ | 0.5 | 0.06 | 0.06 | 0.5 | 0.5 | - | - |
| CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ | 0.3 | - | - | - | - | - | 0.6 |

^aSSF, fluido salival simulado; SGF, fluido gástrico simulado; SIF, fluido intestinal simulado.

^bLas concentraciones corresponden a 400 ml y el volumen final fue de hasta 500 ml después de la adición de enzimas, bilis y CaCl₂(H₂O)₂ durante la digestión in vitro.

^cEl volumen necesario de CaCl₂(H₂O)₂ se añadió a la mezcla final del medio de digestión para evitar la precipitación.

Tabla 1. Composición de soluciones madre de fluidos de digestión simulada.