

PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PROVENIENTES DE FUENTES ANIMALES Y VEGETALES

**Noemi Amellalli Sánchez-Mendoza, Gloria Dávila-Ortiz,
Cristian Jiménez-Martínez***

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
Ciudad de México, México.

amellallism@gmail.com, gdavilao@yahoo.com, crisjm_99@yahoo.com*

<https://doi.org/10.3926/oms.352>

Sánchez-Mendoza, N.A., Cruz-Castellanos, M., Dávila-Ortiz, G., & Jiménez-Martínez, C. (2016). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. En M.E. Ramírez Ortiz (Ed.). *Alimentos Funcionales de Hoy*. Barcelona, España: OmniaScience. 117-142.

Resumen

El daño oxidativo se encuentra relacionado con el desarrollo de diversos padecimientos. Los compuestos antioxidantes naturales han demostrado jugar un papel importante en la prevención de algunos de ellos como el cáncer y enfermedades de tipo cardiovascular. Entre los antioxidantes naturales se encuentran los polifenoles, algunas vitaminas, el β -caroteno y los péptidos.

Los péptidos antioxidantes pueden obtenerse a partir de fuentes proteicas de origen animal o vegetal mediante diversos métodos, destacando el uso de enzimas que emulan la digestión, así como de algunas enzimas comerciales.

Un aspecto importante de resaltar, es la posibilidad del uso de subproductos del procesamiento de alimentos que sirven de sustratos para la acción enzimática y microbiana.

De esta forma, los péptidos proporcionan mecanismos para reducir los radicales libres originados por el estrés oxidativo, protegiendo de la oxidación a las células del organismo cuando son ingeridos en la dieta.

Palabras clave

Péptidos bioactivos, capacidad antioxidante, proteínas vegetales, proteínas animales.

5.1. Introducción

Además del aporte de energía metabólica y aminoácidos esenciales, las proteínas pueden tener un efecto fisiológico o funcional al consumirse, por lo que la investigación de las propiedades biofuncionales tanto las proteínas de origen animal como de origen vegetal ha sido un área que ha tomado bastante fuerza actualmente.

Se afirma que una proteína o péptido posee funcionalidad biológica si se ha demostrado con éxito su efecto beneficioso sobre una o más funciones del cuerpo. Los péptidos pueden estar presentes como una secuencia independiente o en estado latente dentro de una proteína. Estas secuencias al ser liberadas por proteólisis, ya sea por la digestión enzimática, fermentación o autólisis, podrán ejercer efectos fisiológicos (García, Puchalska, Esteve & Marina, 2013; Jimsheena & Gowda, 2011; Korhonen & Pihlanto, 2006). Dentro de las actividades que se les han atribuido destacan: antioxidante, antihipertensiva, hipocolesterolémante, citomoduladora, opioide, antitrombótica, inmunomoduladora, anticarcinogénico e incluso capacidad antiobesidad (Haque & Chand, 2008; Hartmann & Meisel, 2007; Ortiz-Martinez, Winkler & García-Lara, 2014; Rutherford-Markwick & Moughan, 2005).

En los últimos años se ha generado de manera extensiva, evidencia científica sobre los efectos biológicos de diversas proteínas y péptidos, bajo un esquema de producción basado en la liberación de las secuencias de péptidos por distintos procesos de hidrólisis y la posterior caracterización de los fragmentos con mayor actividad biológica. De esta forma han sido obtenidos péptidos a partir de variadas fuentes de proteína. Además, han sido probados diversos métodos para su obtención, tales como la emulación de la digestión gastrointestinal, proteólisis *in vitro*, fermentación microbiana y síntesis química, por mencionar algunos (García, et al., 2013; Korhonen & Pihlanto, 2006; Vercruyse, Van Camp, Dewettinck & Smagghe, 2009).

Sin embargo, a pesar del evidente potencial de los péptidos bioactivos, existen todavía limitaciones para su empleo relacionadas con su efectividad *in vivo*, aspectos tecnológicos, económicos y de regulación. En torno al elevado costo de producción, se han propuesto alternativas para las limitaciones económicas y tecnológicas. Una de ellas, es el uso de subproductos del procesamiento de alimentos que sirven de sustratos para la acción enzimática

y microbiana, o el empleo de péptidos de producción natural como las bacteriocinas que no requieren manufactura sintética (Moughan, Rutherford, Montoya & Dave, 2014; Pihlanto-Leppälä, Koskinen, Piilola, Tupasela & Korhonen, 2000; Torruco-Uco et al., 2008). Por otro lado, existe poca evidencia científica en torno a la acción *in vivo* de los péptidos y la eficacia de los mismos para presentar un efecto fisiológico palpable. Como respuesta a esta limitante se ha propuesto el análisis de la relación estructura-función como un enfoque para el diseño de péptidos con bioactividad, capaces de satisfacer los criterios de actividad biológica y estabilidad *in vivo* conjuntamente (Agyei & Danquah, 2011; Gauthier, Pouliot & Saint-Sauveur, 2006). La información generada provee bases de datos que son la herramienta para la búsqueda y diseño de nuevos péptidos y proteínas con actividad biológica; permitiendo la identificación de estos, mediante la predicción de la relación estructura-función y la simulación de procesos proteolíticos; lográndose así la creación de estructuras optimizadas (Pripp, Sørensen, Stepaniak & Sørhaug, 2006; Saito et al., 2003).

El objetivo de este trabajo es presentar información sobre las características estructurales que han sido asociadas al efecto antioxidante presentado por ciertos péptidos, la evidencia de los efectos de éstos sobre la salud, así como la información generada sobre los posibles mecanismos de acción asociados. En conjunto, esta información permite sustentar el diseño de péptidos bioactivos enfocado en una visualización temprana del posible éxito *in vivo* que permita la toma de decisiones acertadas para la explotación adecuada de una fuente de proteína.

5.2. Efecto antioxidante y relación estructura-mecanismos de los péptidos bioactivos

Si bien, la oxidación es un proceso esencial en el organismo para la supervivencia celular, produce especies reactivas capaces de romper el equilibrio de enzimas del sistema antioxidante endógeno como la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa, lo cual conduce a daño celular y a la muerte a través de la oxidación de lípidos de membrana, proteínas celulares, ADN, así como a la inactivación de enzimas. Este estrés oxidativo juega un papel importante en una serie de enfermedades llamadas crónico-degenerativas tales como la diabetes, el cáncer y la aterosclerosis (Davì, Falco & Patrono, 2005; Jacob,

Hooten, Trzeciak & Evans, 2013; Malins et al., 2001; Metcalfe & Alonso-Alvarez, 2010; Parthasarathy, Litvinov, Selvarajan & Garelnabi, 2008; Stocker & Keaney, 2004).

La hidrólisis enzimática de proteínas aisladas de variadas fuentes puede liberar secuencias de aminoácidos que actúen directamente sobre diversas especies reactivas (Gallegos-Tintoré et al., 2011; Sarmadi & Ismail, 2010), además se ha observado una asociación inversa entre la ingesta de antioxidantes y la incidencia de estos padecimientos (Arts & Hollman, 2005; Pandey & Rizvi, 2009; Scalbert, Manach, Morand, Rémésy & Jiménez, 2005), por lo que es cada vez mayor el interés en sustancias naturales con características antioxidantes, específicamente en las proteínas debido a su capacidad para inhibir la oxidación mediante la acción de distintos residuos de aminoácidos y secuencias de péptidos que participan de reacciones de oxidación en las que están involucradas diferentes especies oxidantes y ambientes moleculares (sistemas acuosos, lipídicos, emulsiones, condiciones de pH variado), convirtiéndose por ello en un componente importante de los sistemas alimentarios al representar un medio de defensa antioxidante en tejidos biológicos. El mecanismo detrás de la actividad antioxidante (AAO) presentada por péptidos no está completamente entendido aún, ya que el empleo de distintos ensayos para la evaluación de la AAO, así como las variaciones en los mismos, dificulta la comparación del potencial antioxidante y los mecanismos reportados para una secuencia (Saito, et al., 2003).

El potencial terapéutico de un péptido se atribuye a la presencia de grupos funcionales específicos en la secuencia; el mecanismo se relaciona con la composición, la posición en la secuencia del péptido, la estructura y la hidrofobicidad de cada grupo funcional. Los trabajos realizados hasta ahora, sugieren distintos mecanismos para las actividades fisiológicas exhibidas por los péptidos, sin embargo, pocos de ellos han sido confirmados (Korhonen & Pihlanto, 2006; Ver-cruyse, et al., 2009).

La mayor capacidad de los péptidos con respecto a proteínas de mayor tamaño para disminuir la reactividad de una especie se relaciona con una mayor exposición de los aminoácidos. En general los 20 aminoácidos presentes en las proteínas pueden interactuar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, los más reactivos incluyen a los azufrados Metionina y Cisteína, la Histidina por su grupo imidazol y los aromáticos Triptófano, Tirosina y

Fenilalanina, además de los que contienen anillo imidazol como la histidina (Elias, Kellerby & Decker, 2008; Loganayaki, Siddhuraju & Manian, 2011; Zhang et al., 2010); sin embargo, se ha encontrado que en su forma libre, generalmente los aminoácidos no son efectivos como antioxidantes, de hecho existe evidencia de que una hidrólisis extensiva de las proteínas resulta en un decremento de la AAO (Kong & Xiong, 2006; Salgado, Fernández, Drago & Mauri, 2011), lo cual se atribuye a las propiedades químicas y físicas que les confiere tanto la secuencia de aminoácidos, como la estabilidad del radical peptídico que se genera para no iniciar o propagar reacciones oxidativas posteriores (Elias, et al., 2008). Sin embargo, un estudio realizado con leche materna demostró que el Trp liberado a partir de la digestión gastrointestinal de está, es capaz de actuar como un potente secuestrante de radicales (Tsopmo et al., 2009).

La importancia de la presencia de residuos de aminoácidos específicos en las secuencias con acción antioxidante exitosa puede observarse a partir de los datos reportados donde mecanismos como la quelación de iones metálicos y metales de transición, la captación de radicales prooxidantes, la reducción de hidroxiperoxidos y eliminación enzimática de oxidantes específicos entre otros han sido propuestos para las propiedades antioxidantes de los péptidos (Elias, et al., 2008; Østdal, Andersen & Davies, 1999; Rival, Boeriu & Wichers, 2001; Zhou & Decker, 1999). La mayoría de los péptidos antioxidantes obtenidos a partir de alimentos presentan pesos moleculares entre 500 y 1800 Da y con frecuencia incluyen residuos de aminoácidos como Val y Leu en el extremo N-terminal, y Pro, His, Tyr, Trp, Met, y Cys en sus secuencias (Cheng, Uchida & Kawakishi, 1992; Wu, Wang, Ma & Ren, 2009). Residuos hidrofóbicos de amino ácidos como Val o Leu son capaces de incrementar la presencia de péptidos en la interfase agua-lípido y por lo tanto facilitar el acceso a radicales libres que se generan en la fase lipídica (Ranathunga, Rajapakse & Kim, 2006). Por ejemplo, el péptido Leu-Leu-Pro-His-His, obtenido por la digestión proteolítica de la β -conglucina de la soya presenta propiedades antioxidantes (Chen, Muramoto & Yamauchi, 1995). También se ha observado que mediante la adición de una leucina o prolina en el extremo N-terminal de un dipéptido His-His se mejora la AAO así como la interacción con moléculas antioxidantes (por ejemplo hidroxitolueno butilado) de péptidos sintéticos o derivados de alimentos (Kitts & Weiler, 2003; Sarmadi & Ismail, 2010).

Otros estudios han reportado que los péptidos antioxidantes mantienen a las células libres de daño debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de la inducción de genes, lo que ha podido observarse con el dipéptido Met-Tir obtenido de músculo de sardina que previene el estrés oxidativo estimulando la expresión de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO-1) y ferritina en células endoteliales (Erdmann, 2006).

Chen, Muramoto, Yamauchi & Nokihara (1996), midieron las actividades antioxidantes de 28 péptidos sintéticos diseñados en base a la secuencia LLPHH derivada de la digestión proteolítica de proteína de soya. Los resultados indicaron que la remoción del residuo de His del extremo C-terminal disminuyó la AAO, mientras que la remoción de Leu del extremo N-terminal no tuvo efecto. Dentro de la secuencia peptídica, los residuos de His y Pro desempeñan una función importante para la AAO. La secuencia Pro-His-His, presentó la mayor actividad. Otros péptidos con la secuencia Pro-His-His presentaron el mejor sinergismo con antioxidantes solubles en lípidos tales como el tocoferol y el hidroxibutil anisol (BHA).

Saito et al. (2003), también estudiaron la AAO de péptidos sintetizados a partir de dos bibliotecas de tripéptidos. De acuerdo a sus resultados los péptidos que contenían el residuo His o Tir, y tripéptidos con dos residuos de Tir mostraron mayor actividad en el sistema de peroxidación del ácido linoleico que aquellos que contenían dos residuos de His. El péptido Tyr-His-Tyr mostró un fuerte efecto sinérgico con antioxidantes fenólicos.

En general los tripéptidos que contienen residuos de Trp o Tir en el extremo C-terminal han mostrado fuerte actividad captadora de radicales pero débil actividad frente al radical peroxinitrito; por otro lado, los tripéptidos que contienen Cis han demostrado actividad secuestrante de este radical (Saito, et al., 2003). Además, se ha demostrado que existe una relación directa entre la presencia de enlaces disulfuro en los péptidos y la AAO que muestran (Cian, Vioque & Drago, 2015).

La relación entre la presencia de ciertos aminoácidos y su respectiva actividad antioxidante se muestra en la Tabla 26.

| Aminoácidos | Mecanismo de acción | Ejemplo | Referencia |
|---|---|---|---|
| Aminoácidos aromáticos (Tyr, His, Trp, Fen) | Estabilizan radicales mediante donación de electrones, manteniendo su propia estabilidad por resonancia de su estructura. | His en el extremo N-terminal es un efectivo quelante de iones metálicos. His en el extremo C-terminal es un efectivo secuestrador de varios radicales. Tripéptidos con Trp o Tir en el extremo C-terminal son fuertes secuestradores de radicales. | (Chen, Muramoto, Yamauchi, Fujimoto & Nokihara, 1998) |
| Aminoácidos hidrofóbicos | Incrementan la solubilidad de los péptidos en lípidos, facilitando el acceso a especies radicales hidrofóbicas y ácidos grasos poliinsaturados. | Pro, His o Tir dentro de las secuencias y Val o Leu en el extremo N-terminal en los péptidos con AAO. Alta reactividad de los grupos alifáticos de Ala, Val y Leu con ácidos grasos poliinsaturados. AAO relacionada con la presencia de aminoácidos terminales como Leu o Val y residuos de Gln y Pro en las secuencias de péptidos de gluten. | (Chen, et al., 1995; Qian, Jung & Kim, 2008; Suetsuna & Chen, 2002) |
| Aminoácidos básicos y ácidos | Los grupos carboxilo y amino de las cadenas laterales tienen función quelante de iones metálicos debido a su capacidad de disociarse y ser donadores de protones. | Residuos de Asp (aminoácido ácido) e His (aminoácido básico) en péptidos purificados de salsa de mejillón fermentada. | (Rajapakse, Mendis, Jung, Je & Kim, 2005) |
| Cisteína | Los grupos SH son captadores de radicales, protegen tejidos de estrés oxidativo y mejora actividad de la glutatión peroxidasa. | Tripéptidos con Cis son potentes secuestradores de radicales peroxinitrito. Actividad antioxidante del grupo SH de las proteínas de hojas de curry. | (Ningappa & Srinivas, 2008; Saito, et al., 2003) |

Tabla 26. Relación entre actividad antioxidante, presencia y ubicación de aminoácidos en péptidos bioactivos.

5.3. Evaluación de la actividad antioxidante

Los métodos de determinación de la AAO están basados en distintos sistemas generadores de radicales libres. Los radicales reaccionan con la muestra y de acuerdo a la capacidad antioxidante de ésta, se inhibiría la generación de los primeros. También existen ensayos que cuantifican los productos formados tras el proceso oxidativo.

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, el sustrato empleado, la medida del punto final, la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Además, los objetivos de los diferentes métodos son diversos, encontrándose entre ellos la medida de la resistencia de un alimento a la oxidación, la evaluación cuantitativa del aporte en sustancias antioxidantes o la evaluación de la AAO en plasma una vez ingerido el alimento (Dave, 2009; Pérez-Jiménez et al., 2008).

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por lo que lo más acertado es la comparación de diferentes métodos para facilitar la interpretación de resultados. Los ensayos para la determinación de capacidad antioxidante deben ser sencillos, con un mecanismo químico definido, reproducibles, adaptables a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas y con elevado rendimiento de análisis (Sánchez-Moreno, 2002). Por otro lado, debe considerarse que, como consecuencia de las transformaciones metabólicas que sufren los compuestos antioxidantes en el organismo, la AAO *in vitro* puede diferir del efecto antioxidante *in vivo*. Por ejemplo, se ha demostrado que ciertos compuestos fenólicos poliméricos que presentan baja AAO *in vitro* contribuyen a la capacidad antioxidante del plasma después de su transformación metabólica en compuestos más simples (Ghiselli et al., 2000).

Si bien, los resultados que ofrecen los métodos *in vitro* son limitados nutricionalmente hablando al no reproducir la situación fisiológica, resultan útiles para la comparación de la AAO entre diversas muestras. Para alcanzar una mayor aproximación algunos ensayos se han incluido radicales que son relevantes en los sistemas biológicos (O_2 , H_2O_2 , ROO, OH) (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald & Robards, 2002).

Las medidas *in vivo* pueden reflejar las posibles interacciones entre los distintos componentes de la dieta. Sin embargo, existen numerosos aspectos aún descono-

cidos, tales como el modo de acción de los radicales dentro de los compartimentos celulares y si los compuestos antioxidantes se transportan al interior de los mismos. Por ello es importante tener en consideración aspectos como el grado de absorción de los compuestos, los productos del metabolismo que generan y la actividad de los mismos (Antolovich, et al., 2002).

5.3.1. Evidencias del efecto antioxidante de péptidos en ensayos in vitro

Son diversas las fuentes a partir de las cuales se han obtenido aislados proteicos que posteriormente son procesados para obtener péptidos bioactivos.

Tang et al. (2009), reportaron la capacidad secuestrante de radicales libres de hidrolizado de zeína obtenido con alcalasa, la cual fue dependiente de la especie radical y estuvo además relacionada al peso molecular y la hidrofobicidad de los constituyentes del péptido. Las distintas fracciones del hidrolizado de zeína obtenidas por ultrafiltración se analizaron para determinar la capacidad de captación de radicales. La capacidad secuestrante del radical ABTS no fue dependiente del peso molecular del péptido, en cambio, la capacidad para captar los radicales DPPH y $O_2^{\cdot-}$ si lo fue. Las fracciones con mayor hidrofobicidad mostraron mayor capacidad secuestrante de los radicales DPPH y $O_2^{\cdot-}$, mientras que aquellos con hidrofobicidad intermedia mostraron la máxima actividad secuestrante de radical ABTS.

En el estudio hecho a partir de albúminas de semilla de *Ginkgo biloba* se aisló una proteína antioxidante con un PM de 29.25 kDa (denominada G4b), la cual presentó la mayor capacidad secuestrante de radicales libres comparada con las otras fracciones obtenidas. Estaba formada de dos péptidos con pesos moleculares similares unidos por un enlace disulfuro y no contenía ácido nucleico ni polifenoles; por lo que se demostró que la presencia de aminoácidos aromáticos y azufrados contribuyó a la capacidad antioxidante que exhibió la proteína frente a radicales hidroxilo y DPPH (Huang et al., 2010).

Al investigarse péptidos obtenidos de plasma bovino, los resultados sugieren que su capacidad antioxidante depende de su peso molecular. Los péptidos con peso molecular menor a 3 kDa exhibieron actividad FRAP y de captación de radicales ABTS. La AAO incrementó junto con el grado de hidrólisis (Gó-

mez, Figueroa & Zapata, 2013), lo cual puede atribuirse a la exposición de los residuos de aminoácidos capaces de reaccionar con oxidantes, promovida por los cambios estructurales en las proteínas como consecuencia de la hidrólisis (Kong & Xiong, 2006), este mismo comportamiento ha sido reportado en investigaciones realizadas con plasma de porcino (Q. Liu, Kong, Jiang, Cui & Liu, 2009).

Para aprovechar las proteínas provenientes de la pasta residual de almendra de palma, se obtuvieron hidrolizados empleando siete diferentes proteasas: alcalasa, quimotripsina, papaína, tripsina, flavourzima, y bromelaína. La AAO se evaluó mediante el ensayo de captación de radical DPPH, siendo el hidrolizado generado a partir de papaína el que mostró la actividad más elevada, la cual estuvo relacionada con la presencia de más residuos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, revelando la importancia de este tipo de residuos de aminoácidos en las secuencias peptídicas para que presentaran dicha actividad (Zarei et al., 2014). Por otro lado, este trabajo permitió observar la importancia de la posición de los aminoácidos en la cadena peptídica con respecto a la AAO: se aislaron 2 péptidos cuya secuencia fue AWFS y WAFS, el cambio en la posición de los residuos de aminoácidos tuvo un efecto significativo en la AAO (71% contra 47.3% respectivamente). Además, comparativamente con otro péptido que también fue aislado cuya secuencia fue WAF contra el de secuencia WAFS, la AAO que se presentó fue de 47.3% contra 55.7% respectivamente, es decir el residuo de serina en el extremo Carbono terminal tuvo un efecto significativo en la AAO cuando se realizó el ensayo de captación de radical DPPH. Los péptidos obtenidos mostraron una correlación positiva con el contenido de residuos hidrofóbicos, punto isoelectrico y carga neta a pH 7 y una correlación negativa con el peso molecular (Zarei et al., 2014).

5.3.2. Evidencias del efecto antioxidante de péptidos en modelos celulares y animales

Los estudios para el establecimiento del potencial antioxidante de hidrolizados, aislados y péptidos en cultivos celulares, modelos animales o pruebas clínicas en humanos son escasos en comparación con los ensayos *in vitro*; sin embargo, los resultados que han sido obtenidos de estos estudios muestran que los péptidos antioxidantes pueden tener impacto en la reducción del estrés oxidativo y con esto disminuir el riesgo de padecer algunas enfermedades degenerativas asocia-

das a esta condición (Mulero Cánovas, Zafrilla Rentero, Martínez-Cachá Martínez, Leal Hernández & Abellán Alemán, 2011).

Rajapakse et al. (Rajapakse, et al., 2005) reportaron el péptido HFGDPFH derivado de la salsa fermentada de mejillón, el cual posee actividad secuestrante de radicales libres y tuvo la capacidad de incrementar la viabilidad en un 76% de un cultivo de fibroblastos humanos de pulmón cultivados en condiciones de oxidación. El efecto se presentó en dosis mayores a 75 µg/ml; sin embargo, no se encontró mayor protección en la supervivencia de las células cuando la concentración del péptido se incrementó.

Fitzgerald et al. (2005), estudiaron la AAO de un producto comercial llamado Seacure obtenido por fermentación controlada de merluza del pacífico con levadura. Los modelos empleados fueron células epiteliales de colon humano y de rata cultivadas en condiciones de oxidación. Se demostró que debido a la acción de di y tripéptidos que eran solubles en etanol con presencia de residuos de glutamina, promovía un incremento significativo en la proliferación del cultivo celular. Por otro lado, la prueba piloto con humanos a los que se les administró Seacure mostró que este alimento fue capaz de reducir el nivel de daño en el intestino delgado causado por indometacina. La presencia del residuo de glutamina presente en el péptido FPH podría contribuir a la AAO vía estimulación de la producción de glutatión (Marchbank, Limdi, Mahmood, Elia & Playford, 2008).

Además de fuentes animales y vegetales, se ha reportado también la obtención de péptidos bioactivos a partir de hongos. Sun, He & Xie (2004), obtuvieron péptidos aislados del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*, los cuales presentaron AAO en sistemas de peroxidación a nivel membrana; además bloquearon la auto-hemólisis de glóbulos rojos de ratas de manera dosis-dependiente. En un estudio de intervención en humanos la ingestión de un suplemento de *G. lucidum* causó un incremento en la AAO en plasma de sujetos saludables. A pesar de estas evidencias no se encontró ningún cambio significativo en biomarcadores del estado antioxidante (Wachtel-Galor, Choi & Benzie, 2005; Wachtel-galor, Szeto, Tomlinson & Benzie, 2004).

Una recopilación de péptidos antioxidantes de diversas fuentes, así como algunas de sus principales características se presentan en el Tabla 27.

| Fuente | Características | Obtención e identificación | Actividad | Referencia |
|--------------------|--|--|--|-------------------------------|
| Músculo de bacalao | Fracciones PM <1 kDa | Pepsina y tripsina/ quimotripsina HPLC fase reversa | Captación de radicales de oxígeno y DPPH. Actividad secuestradora de superóxido e hidroxilo. Actividad quelante de Fe. | (Girgih et al., 2015) |
| | | | | |
| Pelo bovino | Cis-Glu-Arg-Pro-Thr-Cis-Cis-Glu-His-Ser 1325.4 Da | Alcalasa Cromatografía de filtración en gel Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución | Actividad secuestradora de radicales ABTS e hidroxilo. Inhibición de la hemólisis de eritrocitos y de la peroxidación lipídica. Protección de ADN y células PC12 contra daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno. | (Zeng, Zhang, He & Shi, 2015) |
| | | | | |
| Calamar | Trp-Cis-Thr-Ser-Val-Ser 682.5 Da | α-quimotripsina Cromatografía de intercambio iónico Cromatografía de filtración en gel | Actividad secuestradora de radicales libres (DPPH, hidroxilo, superóxido). Quelación de metales (Fe). Evita el daño del ADN. Inhibe peroxidación de lípidos (ácido linoleico). | (Sudhakar & Nazeer, 2015) |

Continúa

(Cont.)

| Fuente | Características | Obtención e identificación | Actividad | Referencia |
|--------------------------|---|--|--|-----------------------------------|
| Origen animal | | | | |
| Carpa herbívora (piel) | Pro-Tyr-Ser-Phe-Lys (640.74 Da) Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Leu (618.89 Da) Val-Gly-Gly-Arg-Pro (484.56 Da) | Alcalasa Cromatografía de filtración en gel HPLC fase reversa | Actividad secuestradora de radicales DPPH, ABTS e hidroxilo. Inhibición de la peroxidación de ácido linoleico. AAO relacionada con el menor tamaño y la presencia de aminoácidos hidrofóbicos. | (Cai et al., 2015) |
| Huevo de gallina (clara) | Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro Asp-Glu-Asp-Thr-Gln-Ala-Met-Pro | Proteasa P «Amano» 6 (de <i>Aspergillus melleus</i>) Ultrafiltración Cromatografía de intercambio iónico HPLC fase reversa | Capacidad de absorción de radicales oxígeno y ABTS. | (Nimalaratne, Bandara & Wu, 2015) |
| Huevo de pato (clara) | 202.1 294.1 382.1 426.3 514.4 Da | Hidrólisis secuencial (alcalasa e hidrolasa específica para proteína de huevo (SEEP)) Cromatografía de intercambio iónico Cromatografía de filtración en gel | Capacidad de absorción de radicales oxígeno e hidroxilo. | (Ren, Wu, Li, Lai & Xiao, 2014) |

| | | | | |
|------------------------------------|---|--|--|--|
| Clara de huevo en polvo | Asp-His-Thr-Lis-Glu 628.64 Da Phe-Phe-Glu-Phe-His 630.71 Da Met-Pro-Asp-Ala-His-Leu 684.1 Da | Alcalasa Ultrafiltración Cromatografía de filtración en gel | 628.64 Da, mejor capacidad de absorción de radicales oxígeno. 630.71 Da y 684.1 Da. Actividad secuestradora de radicales DPPH. Péptidos ácidos, hidrofóbicos y con bajo peso molecular presentaron mayor AAO. | (J. Liu, Jin, Lin, Jones & Chen, 2015) |
| Leche de cabra | Suero: 883.47-1697.82 Da Caseína: 794.44-1956.95 Da Presencia de residuos de Pro e His | Pepsina Cromatografía líquida HPLC fase reversa | Actividad secuestradora de radicales DPPH y superóxido. | (Ahmed, El-Bassiony, Elmalt & Ibrahim, 2015) |
| Queso mozzarella de búfala Campana | 1326.5 Da Cis-Lis-Tir-Val-Cis-Thr-Cis-Lis-Met-Ser | Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> Cromatografía de filtración en gel HPLC | Protección intestinal contra el estrés oxidativo inducido (células CaCo2). | (Tenore et al., 2015) |
| Plasma bovino | | Alcalasa Ultrafiltración Cromatografía de intercambio iónico HPLC fase reversa | Capacidad de captación de radicales libres. Alto poder de reducción. | (Gómez, et al., 2013) |

Continúa

(Cont.)

| Fuente | Características | Obtención e identificación | Actividad | Referencia |
|--|---|---|---|--|
| Origen Vegetal | | | | |
| Frijol terciopelo (<i>Mucuna pruriens</i>) | <1 kDa, 1-3 kDa | Hidrólisis secuencial Alcalasa-Flavourzima/Pepsina-Pancreatina Ultrafiltración | Actividad secuestradora de radical DPPH. Poder reductor de hierro. | (Herrera Chalé, Ruiz Ruiz, Acevedo Fernández, Betancur Ancona & Segura Campos, 2014) |
| Semilla de cacahuete | Thr-Pro-Ala (286 kDa) Ile/Leu-Pro-Ser (315 kDa) Ser-Pro (202 kDa) | Alcalasa Ultrafiltración Cromatografía de filtración en gel HPLC preparativo | Péptidos con PM < 3kDa mostraron mayor poder reductor que los de PM > 3kDa. | (Ji, Sun, Zhao, Xiong & Sun, 2014) |
| Semillas de <i>Juglans sigillata</i> | Péptidos de 2 a 4 residuos de aa, ricos en Tir, Cis | Pancreatina Cromatografía de filtración en gel HPLC fase reversa | Actividad secuestradora de radicales DPPH, ABTS, oxígeno. Quelación de hierro. Actividad protectora en células PC12 contra citotoxicidad inducida por H2O2. | (Gu et al., 2015) |

| | | | | |
|---|----------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| Almendra de palma | <3 kDa | Pepsina, pancreatina | Actividad secuestradora de radicales | (Chang, Ismail, Yanagita, Mohd Esa & Baharuldin, 2015) |
| | Val-Val-Gly-Gly-Asp-Gly-Asp-Val | Ultrafiltración | ABTS. | |
| | Val-Pro-Val-Thr-Ser-Thr | HPLC fase reversa | Poder de reducción de hierro. | |
| | Leu-Thr-Thr-Leu-Asp-Ser-Glu | | | |
| Residuo de extracción del aceite de palma | AWFS | Papaína | Actividad secuestradora de radical | (Zarei, et al., 2014) |
| | 509.56 Da | HPLC fase reversa | DPPH. | |
| | WAF | Fraccionamiento basado en punto isoeléctrico | Quelación de hierro. | |
| | 422.48 Da | | | |
| Batata | LPWRPATNVF | | | |
| | 1200.41 Da | | | |
| | Tyr-Iyr-Ile-Val-Ser 643.2 Da | Alcalasa | Actividad secuestradora de radicales | (M. Zhang, Mu & Sun, 2014) |
| | Thr-Iyr-Gln-Thr-Phe 659.4 Da | Ultrafiltración | hidroxilo. | |
| | Ser-Gly-Gln-Iyr-Phe-Leu 713.2 Da | HPLC fase reversa | | |
| | Tyr-Iyr-Asp-Pro-Leu 669.3 Da | | | |
| | | | | |

Tabla 27. Fracciones peptídicas con actividad antioxidante obtenidas de fuentes vegetales y animales.

5.4. Perspectivas

Los diversos estudios realizados sobre la capacidad antioxidante de péptidos obtenidos de fuentes animales y vegetales proporcionan resultados promisorios en cuanto a impacto en la reducción del estrés oxidativo, así como el riesgo de diversas enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias, etc. asociados con estrés oxidativo. Pese a esto, son pocos los productos comerciales disponibles hasta la fecha, lo que puede atribuirse a una variedad de razones, incluyendo falta de ensayos clínicos que confirmen la bioactividad, eficacia y seguridad, el elevado costo de producción, problemas en la fabricación de un producto reproducible, amargura, color, u otros problemas sensoriales (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

Además de los daños a sistemas biológicos, el daño oxidativo es también importante en los sistemas alimentarios. Para evitar los efectos negativos a las propiedades sensoriales de los alimentos se emplean antioxidantes, principalmente sintéticos, tales como el Butilhidroxitolueno (BHT) y Butilhidroxianisol (BHA); sin embargo, actualmente se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de fuentes naturales, destacando compuestos fenólicos, como tocoferol o vitamina E, carotenoides y catequinas, los cuales presentan algunas desventajas; como capacidad antioxidante e insolubilidad en agua (Gallegos Tintoré, Chel Guerrero & Martínez Ayala, 2013). En este sentido, los hidrolizados proteicos y fracciones peptídicas pueden emplearse como ingredientes funcionales en sistemas alimentarios, pues se ha demostrado su capacidad para prevenir la modificación oxidativa (Wang & Xiong, 2008).

Un uso poco convencional de los péptidos antioxidantes es en formulaciones cosméticas en la prevención del envejecimiento y como protección frente al daño en la piel ocasionado por las radiaciones UV (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

5.5. Conclusión

Generalmente, los péptidos con actividad antioxidante poseen en común algunas características como cadena corta, presencia de aminoácidos hidrofóbicos en su estructura y la resistencia a la proteólisis. Si bien, los péptidos bioactivos representan una buena opción con excelente perspectiva para su empleo como coadyuvantes en la promoción de la salud, como ingredientes

en la industria alimentaria, aspectos como la eficacia *in vivo* de los mismos, requieren todavía de investigación más profunda a fin de que estos puedan ser óptimamente explotados.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) para el apoyo financiero a través de becas para estudios de doctorado.

Referencias

- Agyei, D., & Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29(3), 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>
- Ahmed, A.S., El-Bassiony, T., Elmalt, L.M., & Ibrahim, H.R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.032>
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- Arts, I.C., & Hollman, P.C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 317S-325S.
- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S., & Li, J. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of functional foods*, 16, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.042>
- Cian, R.E., Vioque, J., & Drago, S.R. (2015). Structure–mechanism relationship of antioxidant and ACE I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractionated by pH. *Food Research International*, 69, 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.036>

- Chang, S.K., Ismail, A., Yanagita, T., Mohd Esa, N., & Baharuldin, M.T.H. (2015). Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) kernel protein hydrolysate. *Journal of functional foods*, 14, 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.011>
- Chen, H.-M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of anti-oxidative peptides from Soybean. beta.-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 574-578. <https://doi.org/10.1021/jf00051a004>
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53. <https://doi.org/10.1021/jf970649w>
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619-2623. <https://doi.org/10.1021/jf950833m>
- Cheng, R.Z., Uchida, K., & Kawakishi, S. (1992). Selective oxidation of histidine residues in proteins or peptides through the copper(II)-catalysed autoxidation of glucose. *Biochemical Journal*, 285(2), 667-671. <https://doi.org/10.1042/bj2850667>
- Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3(13), 981-996.
- Davì, G., Falco, A., & Patrono, C. (2005). Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxidants & redox signaling*, 7(1-2), 256-268. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.256>
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., & Decker, E.A. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Erdmann K,G.N., Schipporeit K, & Schröder H. (2006). The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *Journal of Nutrition*, 136(8), 2148-2152.

- Fitzgerald, A.J., Rai, P.S., Marchbank, T., Taylor, G.W., Ghosh, S., Ritz, B.W. et al. (2005). Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut*, 54(6), 775-781. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.060608>
- Gallegos-Tintoré, S., Torres-Fuentes, C., Martínez-Ayala, A. L., Solorza-Feria, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J. et al. (2011). Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9), 1618-1624. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4357>
- Gallegos-Tintoré, S.M., Chel-Guerrero, L., & Martínez-Ayala, A.L. (2013). Péptidos con actividad antioxidante de proteínas vegetales. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* (pp. 111-122). Barcelona: OmniaScience. <https://doi.org/10.3926/oms.94>
- García, M.C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M.L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106, 328-349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.041>
- Gauthier, S.F., Pouliot, Y., & Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1315-1323. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.014>
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., & Scaccini, C. (2000). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(2), 76-80. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00077-7)
- Girgih, A.T., He, R., Hasan, F.M., Udenigwe, C.C., Gill, T.A., & Aluko, R.E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chemistry*, 173, 652-659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.079>
- Gómez, L.J., Figueroa, O.A., & Zapata, J.E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Información tecnológica*, 24(1), 33-42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>

- Gu, M., Chen, H.-P., Zhao, M.-M., Wang, X., Yang, B., Ren, J.-Y. et al. (2015). Identification of antioxidant peptides released from defatted walnut (*Juglans Sigillata* Dode) meal proteins with pancreatin. *LWT – Food Science and Technology*, 60(1), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.052>
- Haque, E., & Chand, R. (2008). Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. [journal article]. *European Food Research and Technology*, 227(1), 7-15. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0689-6>
- Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Herrera-Chalé, F.G., Ruiz-Ruiz, J.C., Acevedo-Fernández, J.J., Betancur-Ancona, D.A., & Segura-Campos, M.R. (2014). ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins. *Process Biochemistry*, 49(10), 1691-1698. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.021>
- Huang, W., Deng, Q., Xie, B., Shi, J., Huang, F., Tian, B. et al. (2010). Purification and characterization of an antioxidant protein from Ginkgo biloba seeds. *Food Research International*, 43(1), 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.015>
- Jacob, K.D., Hooten, N.N., Trzeciak, A.R., & Evans, M.K. (2013). Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mechanisms of ageing and development*, 134(3), 139-157. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.02.008>
- Ji, N., Sun, C., Zhao, Y., Xiong, L., & Sun, Q. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. *Food Chemistry*, 161, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.010>
- Jimsheena, V.K., & Gowda, L.R. (2011). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. *Food Chemistry*, 125(2), 561-569. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.048>
- Kitts, D.D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*, 9(16), 1309-1323. <https://doi.org/10.2174/1381612033454883>

- Kong, B., & Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 6059-6068. <https://doi.org/10.1021/jf060632q>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G.S., & Chen, F. (2015). Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 175, 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.142>
- Liu, Q., Kong, B., Jiang, L., Cui, X., & Liu, J. (2009). Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *LWT – Food Science and Technology*, 42(5), 956-962. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.007>
- Loganayaki, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2011). A comparative study on in vitro antioxidant activity of the legumes *Acacia auriculiformis* and *Acacia ferruginea* with a conventional legume *Cajanus cajan*. Estudio comparativo de la actividad antioxidante in vitro de las legumbres *Acacia auriculiformis* y *Acacia ferruginea* con la legumbre convencional *Cajanus cajan*. *CYTA-Journal of Food*, 9(1), 8-16. <https://doi.org/10.1080/19476330903484216>
- Malins, D.C., Johnson, P.M., Wheeler, T.M., Barker, E.A., Polissar, N.L., & Vinson, M.A. (2001). Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer. *Cancer research*, 61(16), 6025-6028.
- Marchbank, T., Limdi, J., Mahmood, A., Elia, G., & Playford, R. (2008). Clinical trial: protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (NSAID)-induced small intestinal injury. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 28(6), 799-804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2008.03783.x>
- Metcalf, N.B., & Alonso-Alvarez, C. (2010). Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology*, 24(5), 984-996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01750.x>

- Moughan, P.J., Rutherford, S.M., Montoya, C.A., & Dave, L.A. (2014). Food-derived bioactive peptides—a new paradigm. [Review]. *Nutr Res Rev*, 27(1), 16-20. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000206>
- Mulero-Cánovas, J., Zafrilla-Rentero, P., Martínez-Cachá-Martínez, A., Leal-Hernández, M., & Abellán-Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23(5), 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Nimalaratne, C., Bandara, N., & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188, 467-472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.014>
- Ningappa, M.B., & Srinivas, L. (2008). Purification and characterization of ~35 kDa antioxidant protein from curry leaves (*Murraya koenigii* L.). *Toxicology in Vitro*, 22(3), 699-709. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.11.009>
- Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., & García-Lara, S. (2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of proteomics*, 111, 165-183. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.044>
- Østdal, H., Andersen, H.J., & Davies, M.J. (1999). Formation of long-lived radicals on proteins by radical transfer from heme enzymes – a common process? *Archives of biochemistry and biophysics*, 362(1), 105-112. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0988>
- Pandey, K.B., & Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Parthasarathy, S., Litvinov, D., Selvarajan, K., & Garelnabi, M. (2008). Lipid peroxidation and decomposition – Conflicting roles in plaque vulnerability and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1781(5), 221-231. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.03.002>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I. et al. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>

- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(01), 53-64. <https://doi.org/10.1017/S0022029999003982>
- Pripp, A.H., Sørensen, R., Stepaniak, L., & Sørhaug, T. (2006). Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *LWT – Food Science and Technology*, 39(6), 677-683. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.03.018>
- Qian, Z.-J., Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99(6), 1690-1698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.005>
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.-K., Je, J.-Y., & Kim, S.-K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38(2), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.10.002>
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., & Kim, S.-K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). [journal article]. *European Food Research and Technology*, 222(3), 310-315. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0079-x>
- Ren, Y., Wu, H., Li, X., Lai, F., & Xiao, X. (2014). Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(4), 888-894. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.116>
- Rival, S.G., Boeriu, C.G., & Wichers, H.J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 295-302. <https://doi.org/10.1021/jf0003911>
- Rutherford-Markwick, K.J., & Moughan, P.J. (2005). Bioactive peptides derived from food. *Journal of AOAC International*, 88(3), 955-966.

- Saito, K., Jin, D.-H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. et al. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668-3674. <https://doi.org/10.1021/jf021191n>
- Salgado, P.R., Fernández, G.B., Drago, S.R., & Mauri, A.N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433-1440. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>
- Samaranayaka, A.G., & Li-Chan, E.C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3(4), 229-254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>
- Sarmadi, B.H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Stocker, R., & Keaney, J.F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*, 84(4), 1381-1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>
- Sudhakar, S., & Nazeer, R.A. (2015). Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species. *Journal of functional foods*, 14, 502-512. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.028>