

# Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina

Cian, R. E. <sup>(1,2)\*</sup>, Drago, S. R. <sup>(1,2)</sup>, González, R. J. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina - <sup>(2)</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

Contacto: rec\_704@yahoo.com.ar

Recibido: 29/03/2011 - Aprobado: 10/11/2011

## Resumen

El estrés oxidativo y la hipertensión arterial juegan un rol muy importante en las enfermedades crónicas. Una alternativa para obtener péptidos con propiedades antioxidantes y antihipertensivas naturales es la hidrólisis enzimática de proteínas. El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones de hidrolizados proteicos de concentrado de hemoglobina bovina (CHB) con propiedades antioxidantes y antihipertensivas concentradas. Se prepararon 4 hidrolizados a partir del CHB usando diferentes proteasas que fueron fraccionados por ultrafiltración (corte 5kDa). A las fracciones ultra-filtradas se les determinó la capacidad antioxidante (inhibición del radical ABTS<sup>+</sup>) y sus propiedades antihipertensivas (inhibición de ECA I). La hidrólisis enzimática incrementó la capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva del CHB. El proceso de ultrafiltración permitió concentrar la actividad antioxidante de los diferentes hidrolizados proteicos. Sin embargo, para el caso de la actividad antihipertensiva no hubo diferencias importantes que justifiquen el empleo de dicho proceso ( $p < 0,05$ ).

Palabras clave: actividad antioxidante, actividad antihipertensiva, hidrolizados, ultrafiltración, hemoglobina bovina.

## Abstract

Oxidative stress and hypertension play an important role in chronic diseases. Enzymatic hydrolysis of proteins is an alternative to obtain peptides with antihypertensive properties and natural antioxidants. The aim of this study was to obtain fractions from bovine hemoglobin concentrate (BHC) protein hydrolysates with concentrated antioxidant and antihypertensive properties. Four hydrolysates from BHC were prepared using different proteases and then were fractionated by ultrafiltration (MWCO: 5kDa). Antioxidant capacity (ABTS<sup>+</sup> radical inhibition) and antihypertensive activity (ACE I inhibition) were determined on the ultrafiltered fractions. Enzymatic hydrolysis increased the antioxidant capacity and antihypertensive activity respect to BHC. Ultrafiltration process allowed to concentrate the antioxidant activity from different protein hydrolysates. However, there were no significant differences in the antihypertensive activity to justify the use of this process ( $p < 0.05$ ).

Keywords: ultrafiltered fractions, antihypertensive activity, antioxidant capacity, bovine hemoglobin hydrolysates.

## Introducción

El metabolismo oxidativo es esencial para la supervivencia celular. Un efecto secundario de este proceso es la producción de radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno que causan daños en las células al oxidar lípidos de membrana, proteínas celulares, ADN y enzimas, lo que conlleva a la muerte celular (Pihlanto, 2006). Este estrés oxidativo juega un rol muy importante en enfermedades tales como arterioesclerosis, diabetes, artritis reumatoidea, cáncer, etcétera (Halliwell, 1997). Por otro lado, la oxidación de los lípidos deteriora la calidad de los alimentos y disminuye su tiempo de conservación, debido al desarrollo de olores y sabores desagradables, como consecuencia de la descomposición de los ácidos grasos insaturados mediada por radicales libres. Para inhibir la peroxidación de los lípidos y la formación de estos radicales libres, se puede recurrir a los antioxidantes naturales (Wang et al., 2007).

La hipertensión arterial es un proceso multifactorial, por lo que los inhibidores con acción antihipertensiva pueden actuar de formas muy diversas; la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina

(ECA) es el mecanismo de acción más estudiado. Como primeros inhibidores exógenos se estudiaron los extractos del veneno de la serpiente *Bothrops jararaca*. A partir de estos extractos se han aislado distintos péptidos que inhiben la ECA (Hernández Ledesma et al., 2002). Actualmente, derivados sintéticos como Captopril, Enalapril, Lisinopril y otros han sido desarrollados y son efectivos para la disminución de la presión arterial. Sin embargo, algunos efectos secundarios indeseables han sido reportados (Atkinson et al., 1979). Esto ha llevado a la búsqueda de péptidos naturales inhibidores de la ECA, tanto para el tratamiento como para la prevención de la hipertensión.

Resulta de gran interés la búsqueda de péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes e inhibidores de la ECA para ser utilizados como ingredientes naturales de los alimentos funcionales. Una alternativa de obtención de éstos es la hidrólisis enzimática seguida de un proceso de fraccionamiento.

La sangre bovina producida en los frigoríficos es una fuente proteica de alta calidad que se ha utilizado como ingrediente alimenticio, tanto por sus propiedades funcionales como por su valor nutritivo (Cian et al., 2011). Cabe acotar que la hemoglobina constituye más de la mitad

de dicha fracción proteica (Liu et al., 1996) y sus hidrolizados son una fuente de péptidos bioactivos, tales como péptidos opioides (Zhao et al., 1997), péptidos que estimulan el crecimiento bacteriano (Zhao et al., 1996), péptidos que transmiten fotosensibilidad (In et al., 2002) y péptidos que exhiben actividad antioxidante (Chang et al., 2007).

El objetivo de este trabajo fue obtener fracciones proteicas de hidrolizados de concentrado de hemoglobina bovina (CHB) con propiedades antioxidantes y antihipertensivas concentradas.

## Materiales y Métodos

### Materias primas y reactivos

Para la preparación de los hidrolizados se trabajó con hemoglobina bovina provista por YERUVÁ SA (Esperanza-Argentina) y las siguientes enzimas comerciales: P (Protex 6L), FC (Fungal Protease Concentrate), provistas por Genencor SA, y F, provista por Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. El orto-ftaldehído (OPA), ditioneitol (DTT), dodecilsulfato de sodio (SDS), ABTS (Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)), Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), 2,4,6-trichloro-s-triazine (TT), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), albúmina sérica bovina y L-Serina fueron provistos por Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) fue provisto por Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

### Composición centesimal y elaboración de los hidrolizados

La composición del Concentrado de Hemoglobina Bovina (CHB), fue determinada usando los procedimientos de la AOAC (1995). Los hidrolizados fueron obtenidos empleando un reactor termostático del tipo batch de 800 ml. El pH de reacción fue medido de manera continua utilizando un pHmetro IQ Scientific Instruments. El ajuste de pH se realizó mediante el agregado de base (NaOH, 2 N) o ácido (HCl, 2 N). La concentración de sustrato fue en todos los casos de 8 % (P/P). Las condiciones de trabajo utilizadas para las distintas enzimas fueron: P: E/S: 0,1 %, T: 60 °C, pH: 9,5; para FC: E/S: 0,5%, T: 55°C, pH: 4,3 y para F: E/S: 0,1%, T: 55 °C, pH: 7. Se prepararon cuatro hidrolizados del CHB, basándose en experiencias previas: *Hidrólisis 1*: Enzima P durante 2 horas; *Hidrólisis 2*: Enzima FC durante 2 horas; *Hidrólisis 3*: Enzima P durante 2 horas + Enzima F durante 4 horas; *Hidrólisis 4*: Enzima FC durante 2 horas + Enzima F durante 4 horas. Una vez finalizadas las hidrólisis, la/s enzima/s fue/ron inactivada/s por tratamiento térmico de acuerdo a las condiciones descriptas por el fabricante y los hidrolizados fueron congelados a -20 °C y liofilizados.

Para el seguimiento de la reacción de hidrólisis se determinó el grado de hidrólisis (GH) por medio de la medición de aminos libres por orto-ftaldehído (OPA), según Nielsen et al. (2001) y como se describe a continuación:

$$GH = [(h - h_0) / h_t] \times 100\%$$

Donde:  $h_t$  es el número total de uniones peptídicas hidrolizables en la proteína (8,23 mEq/g proteína),  $h$  es el número de uniones peptídicas hidrolizadas y  $h_0$  es el contenido de aminos libres en la proteína de partida.

El GH obtenido para cada sistema fue el siguiente:  $8,33 \pm 1,02$ ;  $8,43 \pm 0,69$ ;  $19,84 \pm 0,21$  y  $16,67 \pm 0,11$  para P, FC, P+F y FC+F, respectivamente.

### Fraccionamiento por ultrafiltración

Se realizó una dispersión de los hidrolizados liofilizados al 2.6 % en PBS (pH 7,4) que se centrifugó a 3000xg durante 10 min. El sobrenadante fue ultrafiltrado, usando una membrana Molecular/Por® Cellulose Ester, cuyo cut-off fue de 5kDa. El proceso se llevó a cabo durante 150 min, recolectándose aproximadamente 20 ml de filtrado. Tanto a las fracciones obtenidas por UF (Retenido: R y Permeado: P), como a la fracción soluble total (ST) se les determinó el contenido de proteínas utilizando el método de Lowry et al. (1951). El tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) de las fracciones fue determinado de acuerdo a Adler-Nissen (1986) y como se describe a continuación:

$$PCL = (\text{Proteínas solubles} / h)$$

Donde:  $h$  es el número de uniones peptídicas hidrolizadas.

### Determinación de la actividad antioxidante y antihipertensiva de las diferentes fracciones ultrafiltradas

En todos los casos, para estimar la capacidad antioxidante se utilizó el método de inhibición del radical catión ABTS<sup>+</sup> propuesto por Pukalskas et al. (2002). Para estimar la Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) se utilizó como estándar al Trolox y se construyó una curva de Inhibición vs. Concentración de Trolox (0-2,5 mM).

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se determinó de acuerdo con Hayakari et al. (1978) con modificaciones. Además, se construyó una curva de concentración proteica (mg/ml) vs. inhibición de ECA y se obtuvo la concentración proteica que inhibe en un 50 % (IC50).

Las muestras (ST, R y P) se evaluaron a una concentración de proteínas de 5 y 2,3 mg/ml para el ensayo de actividad antioxidante y antihipertensiva, respectivamente.

### Análisis estadísticos

Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus 3.0 para realizar análisis de ANOVA.

## Resultados y Discusión

### Actividad antioxidante de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración

En la Figura 1 se muestran los valores de TEAC de las diferentes fracciones: la fracción soluble total (FST) y aquellas obtenidas por ultrafiltración, tanto para el CHB como para sus hidrolizados. Exceptuando el caso del hidrolizado P, la fracción con mayor TEAC fue la de PM < 5kDa (*Permeado*), lo que demuestra que las fracciones con bajo PM son las que tienen mayor actividad antioxidante.

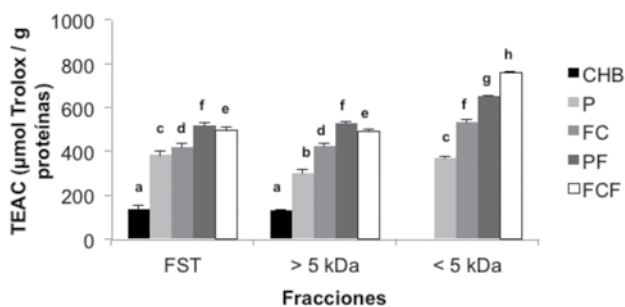


Figura 1. Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) medida a los 6 minutos de las diferentes fracciones del concentrado de hemoglobina bovina (CHB) y sus hidrolizados, obtenidas por ultrafiltración. FST: fracción soluble total.

También se puede ver que la muestra antes de ser fraccionada y la fracción >5kDa presentan actividad antioxidante que no difiere significativamente entre sí (excepto para P). Estos resultados coinciden con los reportados por Wang et al. (2007) para la capacidad antioxidante (inhibición del radical DPPH) para hidrolizados de gluten de trigo ultrafiltrados con una membrana de cuyo corte fu 5kDa. En este sentido, Peng et al. (2009) y Qian et al. (2008) reportaron que la actividad antioxidante es dependiente de la distribución de tamaños moleculares.

En la Figura 2 se observa la capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) y el valor de PCL de la fracción <5kDa del CHB y sus hidrolizados. Cabe mencionar que para el permeado del CHB no fue posible detectar actividad antioxidante bajo la concentración proteica obtenida ( $\approx 0,8\text{mg/ml}$  de proteínas) y que la enzima FC posee una leve actividad exoproteasa además de la acción endopeptidasa. La mayor TEAC se obtuvo para el hidrolizado FC+F, y en orden significativo le siguió la del hidrolizado P+F, lo cual indica que cuanto mayor es la actividad *endo-exopeptidasa* mayor es la TEAC obtenida. Esto se debe básicamente a la acción conjunta de estas enzimas sobre el sustrato, ya que las exopeptidasas van hidrolizando los enlaces peptídicos no sustituidos próximos al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas lo hacen en regiones internas de las cadenas peptídicas (Guadix et al., 2000). De esta manera el proceso de hidrólisis se torna más efectivo, permitiendo una degradación más completa de la proteína (Chang et al., 2007), que conduce a la generación de péptidos de diversos tamaños, con los de bajo PM como los principales componentes (Li et al., 2007).

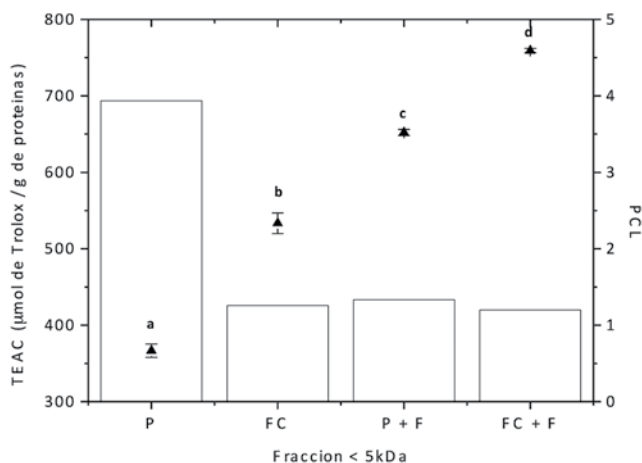


Figura 2. Capacidad antioxidante Trolox equivalente (TEAC) de la fracción <5kDa de los hidrolizados del CHB, obtenidas por ultrafiltración para 6 min de reacción ( $\blacktriangle$ , ordenada izquierda). PCL de la fracción <5kDa (barras, ordenada derecha). Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, si bien la TEAC es mayor cuanto mayor es la acción *endo-exopeptidasa*, el valor de PCL es prácticamente el mismo para las tres fracciones (exceptuando P). Esto indica que no sólo influye sobre la actividad antioxidante el tamaño molecular de los productos, sino también la secuencia aminoacídica (posición de los aminoácidos en la estructura peptídica) de los péptidos generados (Xie et al., 2008). Este hallazgo concuerda con lo reportado por Yang et al. (2008) para hidrolizados de gelatina obtenida a partir de piel de *Rachycentron canadum* (Cobia).

## Actividad antihipertensiva de las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración

En la Figura 3 se muestran los resultados de la actividad antihipertensiva (AH) de la fracción FST y de las fracciones obtenidas por UF (retenidos y permeados) del CHB y de los diferentes hidrolizados proteicos (FC, FC+F, P y P+F).

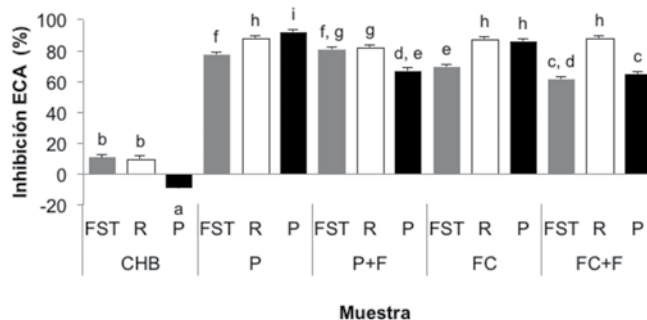


Figura 3. Actividad antihipertensiva de las diferentes fracciones del CHB y sus hidrolizados, obtenidas por ultrafiltración. Letras diferentes implican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

Los hidrolizados presentaron muy buena actividad AH (mayor al 60 % de inhibición de la ECA), mientras que la actividad de las fracciones del CHB fue baja (9 %). La fracción soluble (ST) de los hidrolizados obtenidos con P exhibió mayor actividad AH que los obtenidos con FC y, a su vez, el empleo de la exopeptidasa (F) disminuyó la actividad AH en el caso de FC+F respecto de FC.

Para evaluar el efecto de la ultrafiltración (UF) y de los distintos sistemas enzimáticos utilizados en la hidrólisis de la proteína en el porcentaje de inhibición de la ECA se realizó un ANOVA multifactor (Tabla 1).

FRACCIÓN	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
FST	$58 \pm 2$	a
P	$60 \pm 2$	a
R	$70 \pm 2$	b

Tabla 1. Contraste Múltiple de Rango para la actividad AH según UF. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las fracciones proteicas retenidas mostraron mayor actividad AH que las fracciones proteicas del permeado (70 vs. 60, respectivamente). Por otro lado, al considerar los sistemas enzimáticos, las fracciones solubles (FST) correspondientes a hidrolizados obtenidos con endopeptidasas (P y FC) presentaron mayor actividad que aquellas muestras a las que se le adicionó una exopeptidasa (F) para la hidrólisis (Tabla 2).

MUESTRA	MEDIA	GRUPOS HOMOGÉNEOS
CHB	3 ± 4	a
FC+F	71 ± 3	b
P+F	77 ± 3	b
FC	81 ± 3	c
P	86 ± 3	c

Tabla 2. Contraste Múltiple de Rango considerando todas las muestras (FST, R y P) para la actividad AH según sistema enzimático. Distintas letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El valor de inhibición de la ECA hallado para la fracción FST correspondiente al hidrolizado obtenido con P (grado de hidrólisis 8,33 %) evaluada a una concentración de proteínas de 2,3 mg/ml es semejante al resultado informado por Yang et al. (2007) para un hidrolizado de gluten de maíz obtenido con Alcalasa (grado de hidrólisis 16,96 %) y determinado a una concentración de proteínas de 10 mg/ml (85 % de inhibición de la ECA). Vale subrayar que el valor de IC50 hallado para FST de P fue de 1,08 ± 0,05 mg/ml de proteínas.

En la Tabla 3 se muestran los valores de PCL de las fracciones del permeado y el retenido.

MUESTRAS	P	R
P	3,93	6,09
FC	1,26	5,12
P+F	1,33	2,47
FC+F	1,20	3,52

Tabla 3. Tamaño promedio de la cadena polipeptídica (PCL) de las fracciones del permeado (P) y del retenido (R).

Si bien la muestra que presentó mayor actividad fue la fracción permeada del hidrolizado P, cuyo tamaño medio de cadena polipeptídica fue de 3,93, esta fracción no presentó un valor mucho mayor respecto a los obtenidos en las fracciones retenidas de los sistemas enzimáticos evaluados (92 vs 82-88 %, respectivamente), cuyos PCL estuvieron comprendidos entre 2,5 y 6 (en promedio ≈ 500 Da). Esto coincide con lo reportado en la bibliografía en cuanto al tamaño de los péptidos con actividad AH (Torruco-Uco et al., 2008). La razón por la cual especies tan pequeñas permanecerían en la fracción R podría deberse a algún tipo de interacción entre las moléculas de mayor tamaño retenidas y los péptidos activos de bajo PM. Si bien para llevar a cabo la UF se parte de la fracción soluble de los hidrolizados (FST), libre de moléculas sin hidrolizar insolubles o agregados de péptidos insolubles, algunas fracciones proteicas de PM mayor a 5 kDa retendrían a los péptidos inhibidores de ACE, con lo cual se verían imposibilitados para pasar a la fracción permeada (P), concentrándose la actividad en el retenido (R). Además, es importante destacar que el PCL es una medida media del tamaño y que enmascara la verdadera distribución de tamaños peptídicos. Por otra parte, la adición de exopeptidasas que produce aminoácidos libres está asociada con la importante reducción en el PCL y, en general, con la disminución de la actividad AH.

Otro dato interesante es que en el caso de los sistemas enzimáticos P, FC y FC+F la actividad AH fue mayor en las fracciones de UF respecto a la fracción FST (valores entre 5 % y 43 %), pero en general no hubo diferencias significativas que justifiquen el uso de UF, salvo para el caso de FC+F en el que la fracción retenida presentó una diferencia de 43 % respecto de la muestra FST.

## Conclusiones

La hidrólisis enzimática incrementó la capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva del concentrado de hemoglobina bovina.

Se logró establecer que el fraccionamiento por ultrafiltración permitió concentrar la actividad antioxidante de los diferentes hidrolizados proteicos y puso de manifiesto que las especies responsables de dicha actividad son componentes de bajo PM (<5kDa), siendo un procedimiento recomendable para obtener péptidos con dicha bioactividad. Sin embargo, para el caso de la actividad antihipertensiva no hubo diferencias importantes que justifiquen el empleo de este proceso, a excepción del hidrolizado FC+F cuya fracción R presentó una diferencia del 43 % respecto de la muestra FST.

## Reconocimientos

Los autores agradecen al Proyecto CAI + D 2009-PI-54-258 de la Universidad Nacional del Litoral por el apoyo en esta investigación.

## Referencias

- ADLER-NISSEN, Jens. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16a ed., 2da. rev. Gaithersburg: AOAC, 1995. Official Method 948.12
- ATKINSON, A. B.; ROBERTSON, J. I. S. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. En: *Lancet*. 1979, 2:836-839.
- CHANG, Y.; WU, K.; CHIANG, S. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. En: *Food Chemistry*. 2007, 100:1537-1543.
- CIAN, R.; LUGGREN, P.; DRAGO, S. Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. En: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011, 62(7):774-780.
- GUADIX, A.; GUADIX, E.M.; PÁEZ-DUEÑAS, M.P.; GONZÁLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F. Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. En: *Ars Pharmaceutica*. 2000, 41(1):79-89.
- HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: a general introduction. En: *Nutrition reviews*. 1997, 55:49-52.
- HAYAKARI, M.; KONDO, Y.; IZUMI, H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. En: *Analytical Biochemistry*. 1978, 84:361-369.
- HERNÁNDEZ LEDESMA, B.; AMIGO GARRIDO, L.; RECIO SÁNCHEZ, M.I. *Caracterización y bioactividad de péptidos obtenidos a partir de proteínas lácteas mediante hidrólisis enzimática y procesos fermentativos*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 2002. ISBN: 84-669-2033-1.
- IN, M.; CHAE, H.; OH, N. *Process development for heme-enriched by enzymatic hydrolysis of hemoglobin*. En: *Bioresource technology*. 2002, 84:63-68.
- LI, B.; CHEN, F.; WANG, X.; JI, B.; WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. En: *Food Chemistry*. 2007, 102:1135-1143.
- LIU, X.; YONEKURA, M.; TSUTSUMI, M.; SANO, Y. *Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates*. En: *Journal Agriculture Food Chemistry*. 1996, 44:2957-2961.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, L.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193-265.

- NIELSEN, P.; PETERSEN, D.; DAMBMANN, C. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. En: *Journal of Food Science*. 2001, 66:642-646.
- PENG, X.; XIONG, Y.; KONG, B. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. En: *Food Chemistry*. 2009, 113:196-201.
- PIHLANTO, A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. En: *International Dairy Journal*. 2006, 16:1306-1314.
- PUKALSKAS, A.; VAN BEEK, T.; VENSKUTONIS, R.; LINSSEN, J.; VAN VELDHUIZEN, A.; DE GROOT, Æ. Identification of Radical Scavengers in Sweet Grass (*Hierochloa odorata*). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50:2914-2919.
- QIAN, Z.; JUNG, W.; BYUN, H.; KIM, S. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. En: *Bioresource Technology*. 2008, 99:3365-3371.
- STATPOINT TECHNOLOGIES, INC. Statgraphics Plus [Software]. 3.0. Warrenton: Statpoint Technologies, INC., [s.d.].
- TORRUCO-UCO, J.; DOMÍNGUEZ-MAGAÑA, M.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; MARTÍNEZ-AYALA, A.; CHEL-GUERRERO, L.; BETANCUR-ANCONA, D. Antihypertensive peptides for treatment of natural origin: A review. En: *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2008, 6:158-168.
- WANG, J.; ZHAO, M.; ZHAO, Q.; JIANG, Y. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. En: *Food Chemistry*. 2007, 101:1658-1663.
- XIE, Z.; HUANG, J.; XU, X.; JIN, Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. En: *Food Chemistry*. 2008, 111:370-376.
- YANG, Y.; TAO, G.; LIU, P.; LIU, J. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten Meal. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55:7891-7895.
- YANG, J.; HO, H.; CHU, Y.; CHOW, C. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. En: *Food Chemistry*. 2008, 110:128-136.
- ZHAO, Q.; GARREAU, I.; SANNIER, F.; PITOT, J. *Opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins*. En: *Biopolymers*. 1997, 43:75-98.
- ZHAO, Q.; PITOT, J.; GAUTIER, V.; GOTTENCEAU, G. Isolation and characterization of bacterial growth – stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Appl. Microbiol.* En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996, 45:778-784.