

## **Péptidos con Actividad Antimicrobiana obtenidos de Proteínas Lácteas con Extractos de *Salpichroa organifolia***

**Gabriela F. Rocha, Francisco Kise, Adriana M. Rosso y Mónica G. Parisi\***

Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas, C.C. 221, Ruta 5 y Avenida Constitución, (6700) Luján, Buenos Aires-Argentina (e-mail: monicaparisiunlu@gmail.com)

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia

*Recibido Sep. 04, 2012; Aceptado Oct. 09, 2012; Versión final recibida Dic. 09, 2012*

---

### **Resumen**

Se estudió la actividad hidrolítica del extracto de frutos maduros de *Salpichroa organifolia* sobre caseínas de origen bovino, ovino y caprino. La reacción enzimática se realizó a pH 6.2 y 37°C de temperatura durante veinte horas. Los péptidos provenientes de la hidrólisis se cuantificaron por espectrofotometría y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con Tricina en condiciones desnaturalizantes (tricine-SDS-PAGE) y densitometría. Los hidrolizados fueron separados por ultrafiltración obteniéndose dos fracciones de masa molecular superior e inferior a 3 kDa para cada caseína. El análisis estadístico de la hidrólisis de las caseínas resultó significativo para el tiempo de hidrólisis y el tipo de caseína ( $p < 0.05$ ), observándose una mayor degradación de la caseína caprina a las 20 horas de incubación. Se evaluó también la actividad antimicrobiana de los hidrolizados y se encontró que los péptidos de menor masa molecular provenientes de las caseínas bovina y ovina presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos estudiados.

*Palabras clave: péptidos bioactivos, hidrolizados, Salpichroa organifolia, actividad antimicrobiana, caseína*

## **Antimicrobial Peptides obtained from Milk Proteins with Extracts from *Salpichroa organifolia***

### **Abstract**

In this work the hydrolytic activity of the extract from *Salpichroa organifolia* ripe fruits on bovine, ovine and caprine caseins was studied. The enzymatic reaction was carried out at pH 6.2 and 37°C of temperature for twenty hours. Peptides obtained from the enzymatic hydrolysis of all caseins were quantified by spectrophotometry and analyzed by tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (tricine-SDS-PAGE) and densitometry. Casein hydrolysates were separated by ultrafiltration obtaining higher and lower fractions of 3 kDa molecular mass. Statistical analysis of the caseins hydrolysis was significant for the time of hydrolysis and the type of casein ( $p < 0.05$ ). A higher degree of hydrolysis of caprine casein was observed after 20 hours of incubation. Antimicrobial activity of the hydrolysates was assessed and it was found that less than 3 kDa molecular mass peptides from bovine and ovine caseins showed the highest inhibitory effect on the evaluated microorganisms.

*Keywords: bioactive peptides, hydrolysates, Salpichroa organifolia, antimicrobial activity, casein*

## INTRODUCCION

La leche es un alimento complejo que contiene elementos nutritivos, suministra sustancias con actividad biológica tanto a neonatos como a adultos y provee protección inmunológica. Las proteínas presentes en la leche son empleadas como ingredientes alimentarios ya que poseen importantes propiedades funcionales, nutricionales y biológicas. Las principales fracciones proteicas incluyen la  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA), la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), las caseínas (CN), las inmunoglobulinas (Ig), las lactoferrina (LF), las fosfoglicoproteínas (solubles en ácido), y otras proteínas séricas menores tales como la transferrina y la albúmina sérica. Estos compuestos otorgan determinadas características sensoriales y fisicoquímicas a los alimentos, son fuente de energía y de aminoácidos esenciales y potenciales ingredientes en alimentos funcionales.

La hidrólisis de las proteínas lácteas puede producir péptidos con importantes funciones fisiológicas (Szwajkowska et al., 2011; Benkerroum, 2010; López-Expósito et al., 2007; Oliva y Vega, 2004; Marshall, 2004; Meisel, 2004; Korhonen y Pihlanto, 2003; Ubalde y Cantera, 2002, Baró et al., 2001). Estos péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína intacta y pueden ser liberados por acción de enzimas proteolíticas nativas de la leche, enzimas de bacterias lácticas o de fuentes exógenas durante la digestión gastrointestinal o durante el procesamiento del alimento. Los péptidos derivados de las proteínas caseínicas y séricas han demostrado poseer propiedades biológicas como actividad opioide (Teschmacher, 2003), antihipertensiva (Correa et al., 2011), antimicrobiana (López-Expósito y Recio, 2008), antitrombótica (Rojas-Ronquillo et al., 2012), inmunomoduladora (Huang et al., 2010) y participar en el transporte de minerales (Sharma et al., 2011; Moreno et al., 2006).

En estudios previos llevados a cabo en el Laboratorio de Química Biológica de la Universidad Nacional de Luján, se realizó un relevamiento de la flora autóctona empleada en medicina popular en busca de enzimas proteolíticas. Se encontró que los extractos de frutos de la especie *Salpichroa organifolia* (huevo de gallo) presentaban una elevada actividad caseinolítica y coagulante de la leche (Rocha et al., 2006).

*Salpichroa organifolia* es una hierba perenne originaria de Brasil, Uruguay y norte y centro de Argentina, empleada en medicina popular por sus propiedades farmacológicas como antiinflamatoria, antipirética, analgésica (Boeris et al., 2004) e insecticida (Bado et al., 2004; Mareggiani et al., 2000-2002). Los resultados de los ensayos preliminares con extractos de frutos de esta especie fueron el punto de partida para profundizar la investigación de una enzima no estudiada previamente, con el fin de caracterizarla e investigar su posible aplicación en la obtención de productos de alto valor, aprovechando desechos industriales y disminuyendo el impacto medioambiental de los mismos (Rocha et al., 2010).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la hidrólisis enzimática de caseínas de origen bovino, ovino y caprino con extractos de frutos maduros de *Salpichroa organifolia* y evaluar la actividad antimicrobiana de los péptidos obtenidos de la hidrólisis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal:** Como fuente de enzimas proteolíticas se emplearon los frutos maduros de la especie *Salpichroa organifolia* (Lam.) Baill. recolectados en la localidad de Luján, provincia de Buenos Aires, República Argentina. El fruto maduro es una baya ovoide, blanda, de color blanquecino y sabor dulce.

**Preparación del extracto enzimático:** Los frutos se trituraron con etanol a  $-8^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se resuspendió en 50 mM de buffer fosfato de pH 7.0 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se obtuvo un extracto al 15% (p/V). Esta preparación enzimática se denominó extracto crudo.

**Extracción de la caseína láctea:** Se separó la grasa por centrifugación (3500 rpm a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos). Luego, las caseínas se separaron por precipitación isoeléctrica empleando 3.3 M de buffer ácido acético/acetato de sodio de pH 4.6 y posterior centrifugación (1500 rpm durante 20 minutos). El precipitado obtenido se lavó tres veces con agua destilada (Trujillo et al., 2000). En los ensayos se utilizaron leche descremada bovina en polvo (Molico, Nestlé), leche entera de cabra en polvo (Abradacabra) y leche de oveja fluida provista por el tambo de la Facultad de Agronomía de la UBA.

**Hidrólisis de las caseínas bovina, ovina y caprina:** Se estudió la hidrólisis producida por el extracto crudo de *Salpichroa organifolia* sobre las caseínas bovina, ovina y caprina a pH 6.2 y  $37^{\circ}\text{C}$  (Rocha et al., 2010). En los ensayos se incubaron 3 mL del sustrato (1% p/V) con 120  $\mu\text{L}$  de la solución enzimática a  $37^{\circ}\text{C}$ . La actividad caseinolítica se evaluó cuantificando los péptidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) al 5 % p/V. Para ello, se tomaron alícuotas en distintos tiempos de incubación (0, 1, 2, 4, 8 y 20 horas) y se les adicionó TCA en una relación 1:2. La mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos y se estimó la

hidrólisis producida como la medida de la absorbancia a 280 nm producida por los péptidos solubles en TCA, presentes en el sobrenadante (Silva y Malcata, 2005). Los ensayos se realizaron por duplicado (tres lecturas en cada caso). Los datos se analizaron considerando un diseño de medidas repetidas en el tiempo y los factores analizados fueron tipo de caseína y tiempo de hidrólisis empleando el software Statistica (Statistica for Windows, Release 6.0 Copyright Stat Soft, Inc. 2001). Los datos debieron ser transformados por la inversa de la raíz cuadrada para eliminar la interacción en el modelo. Se realizó un ANOVA y se empleó el test de Tukey para el análisis post-hoc. Se verificó el supuesto de normalidad por el test de Kolmogorov-Smirnov y la homocedasticidad por el test de Levene, con un nivel de significancia del 5%.

*Separación y caracterización de los hidrolizados de las fracciones caseínicas:* Se realizó la hidrólisis de cada caseína de acuerdo al protocolo mencionado en el punto anterior. Luego de 20 horas de incubación, la reacción se detuvo calentando en baño de agua a 80°C durante 20 minutos para inactivar la enzima. Se centrifugaron los hidrolizados a 16000 rpm durante 15 minutos, se ajustó el pH del sobrenadante a 7.0 y se realizó un proceso de ultrafiltración utilizando membranas con valores de corte que permitieron retener los componentes de peso molecular superior a 3 kDa (AMICON® YM-3, Millipore, USA) (Pouliot et al., 2005).

*Electroforesis Tricina SDS-PAGE:* Los productos de hidrólisis de las caseínas de distinto origen fueron caracterizados por electroforesis Tricina SDS-PAGE en un equipo Bio-Rad Miniprotean III (Schagger, 2006). Se utilizaron minigeles SDS-PAGE al 16.5 % en el gel separador con urea 6 M en buffer Tris/HCL (3M, pH 8.45) y 0.3% SDS, gel espaciador al 10% y gel de concentración al 4% en el mismo buffer. La corrida electroforética se desarrolló durante 120 min a 30 mA/gel, y las proteínas se colorearon con Coomassie Blue R-250 (Vairo Cavalli et al., 2008). Se emplearon marcadores de ultra bajo peso molecular (Sigma, Co): triosa fosfato isomerasa de músculo de conejo (26.6 kDa), mioglobina de corazón equino (17.0 kDa),  $\alpha$ -lactoalbúmina bovina (14.2 kDa), aprotinina de pulmón bovino (6.5 kDa), cadena B oxidada de insulina (3.496 kDa) y bradiquinina (1.060 kDa). Los geles fueron escaneados y las imágenes se analizaron para generar un perfil densitométrico de las bandas mediante el programa GelPro Analyzer para Windows (v.4.0.00.00.001, Media Cibernetic).

*Determinación in vitro de la actividad antimicrobiana:* Se evaluó la actividad antibacteriana de los hidrolizados caseínicos frente a microorganismos patógenos del hombre. En los ensayos microbiológicos se emplearon cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* pertenecientes al cepario de la Universidad Nacional de Luján. Los cultivos fueron incubados en caldo nutritivo durante 24 horas a 37°C, excepto los de *Serratia marcescens* y *Pseudomonas fluorescens* que fueron incubados a temperatura ambiente. Para cada cepa bacteriana se agregaron 100  $\mu$ L de cultivo bacteriano a 3 tubos de hemólisis conteniendo cada uno 2.5 mL de caldo tripteína soja y se incubaron por 30 minutos a 37°C (*Pseudomonas fluorescens* y *Serratia marcescens* se incubaron a temperatura ambiente). Luego del tiempo mencionado se agregó formol en el primer tubo, nada al segundo (testigo no inhibido) y 200  $\mu$ L de solución proveniente de la hidrólisis de las caseínas al tercero y se incubaron durante 20 horas. Los tubos fueron examinados en base a la evidencia macroscópica de crecimiento visualizada por la presencia de turbidez, velo o sedimento. (Araujo Díaz y Salas Ascencios, 2008). La densidad microbiana se determinó en forma indirecta por turbidimetría (Isenberg, 1984). Se midió la absorbancia de las soluciones a 650 nm antes y luego de la incubación de 20 horas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano por acción de los hidrolizados de acuerdo a la siguiente fórmula (Ballows, 1976):

$$I\% = 100 - (A_{m20} - A_0 / A_{m-ni20} - A_0 * 100)$$

Donde

$A_m$  = densidad óptica (650 nm) del cultivo bacteriano en presencia de los hidrolizados luego de 20 horas de incubación.

$A_{m-ni20}$  = densidad óptica (650 nm) del cultivo bacteriano no inhibido luego de 20 horas de incubación.

$A_0$  = densidad óptica (650 nm) antes de la incubación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Hidrólisis enzimática de las caseínas bovina, ovina y caprina:* En este trabajo se evaluó la hidrólisis de las caseínas de distinto origen producida por el extracto de frutos de *Salpichroa organifolia*. La hidrólisis obtenida en cada caso se expresó como la absorbancia a 280 nm producida por los péptidos solubles en TCA (Silva y Malcata, 2005). En la Figura 1 se muestra el ajuste polinómico de los resultados. En el análisis de los mismos, los datos fueron transformados para evitar las interacciones en el modelo. El ANOVA resultó significativo para el tiempo de hidrólisis y el tipo de caseína ( $p < 0.05$ ). Se verificaron los supuestos de

normalidad y homocedasticidad a un nivel del 5% con el test de Kosmogorov-Smirnow y Levene, respectivamente. Se encontró que durante las primeras 2 horas de incubación no existieron diferencias significativas en la hidrólisis de las distintas caseínas ( $p=0.1663$ ), en cambio si la hubo para los siguientes tiempos de reacción ( $p<0.01$ ). Se observó una mayor hidrólisis en el siguiente orden 20 hs > 8 hs > 4 hs (Punto crítico de Tukey=3.5638 para  $\alpha=0.05$ ). También existieron diferencias significativas para la degradación enzimática de las distintas caseínas ( $p<0.01$ ), resultando ordenadas de mayor a menor caprina>ovina>bovina (Punto crítico de Tukey=3.5638 para  $\alpha=0.05$ ). Por lo tanto, durante las 2 primeras horas de reacción, la hidrólisis producida es independiente del tipo de caseína. Sin embargo, en tiempos de hidrólisis más largos (superiores a 4 horas) la mayor hidrólisis se produce sobre la caseína caprina.

Estos resultados fueron similares a los obtenidos con un extracto de flores del cardo *Cynara cardunculus* (Sousa y Malcata, 1998). Estos autores han informado que la susceptibilidad diferencial frente a la hidrólisis está relacionada a la similitud en las secuencias aminoacídicas de las caseínas ovina y bovina y con las preferencias de clivaje de la enzima por ciertos enlaces peptídicos.

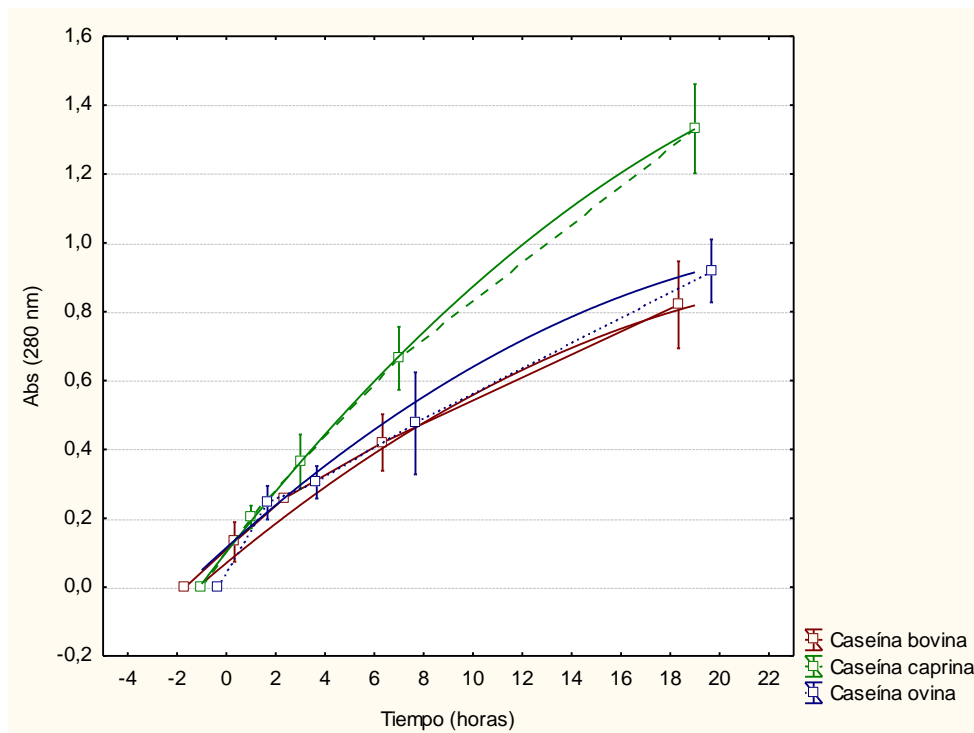


Fig. 1: Variación de la absorbancia 280 nm en función del tiempo de incubación de las caseínas bovina, caprina y ovina, incubadas a 37°C y pH 6.2. Las barras de error indican la desviación estándar del ajuste matemático.

La sensibilidad a la hidrólisis enzimática de las fracciones caseínicas de distinto origen ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína) se analizó también por Tricina SDS PAGE y densitometría. En la Figuras 2, 3 y 4 se muestran los perfiles electroforéticos de las caseínas bovina, ovina y caprina respectivamente (calle 1) y de los hidrolizados enzimáticos obtenidos en los distintos tiempos de incubación (calles 2 a 5). La hidrólisis producida en los tres tipos de caseínas durante las primeras 2 horas fue similar, sin embargo, la fracción  $\alpha$ -caseína fue hidrolizada en mayor medida que las demás fracciones. La banda correspondiente a la  $\alpha$ -caseína ovina es degradada completamente a las 2 horas, en cambio las bandas de origen bovino y caprino desaparecen a las 4 horas de incubación. Con respecto a las fracciones  $\beta$ - y  $\kappa$ - de las caseínas bovina, ovina y caprina no se observan cambios significativos en los perfiles de degradación hasta las 8 horas, permaneciendo una banda tenue aún a las 20 horas. Sousa y Malcata (1998) han informado que el extracto enzimático de *Cynara cardunculus* hidroliza más rápidamente la fracción  $\alpha$ - de las caseínas en forma coincidente con los resultados indicados en este trabajo. El mismo perfil de degradación fue presentado por Vairo Cavalli (2008) con una peptidasa aspártica de extractos de flores de *Silybum marianum*. Por otro lado se observó que las proteasas serínicas de semillas de *Solanum dubium* (Ahmed et al., 2011) y la quimosina, componente principal del cuajo animal, tienen un comportamiento catalítico diferente pues hidrolizan preferentemente las fracciones  $\beta$ - y  $\kappa$ - de las caseínas.

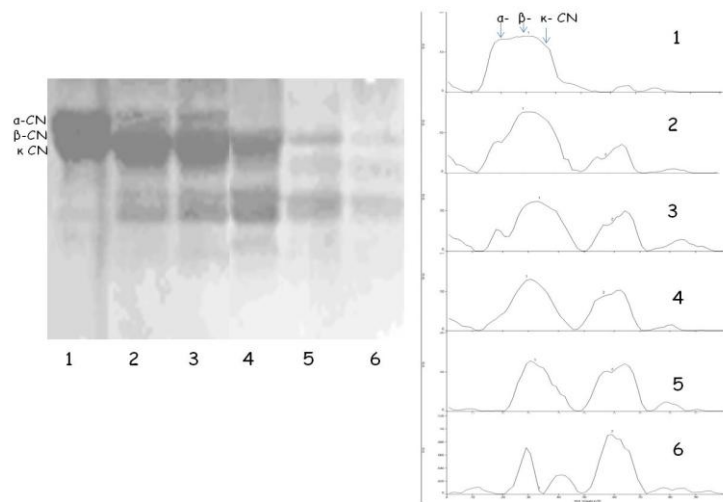


Fig. 2: Electroforesis Tricina-SDS-PAGE y densitograma de los hidrolizados de caseína bovina. Calles 1 a 5: hidrólisis en tiempo de incubación 0, 1, 2, 4, 8 y 20 horas respectivamente.

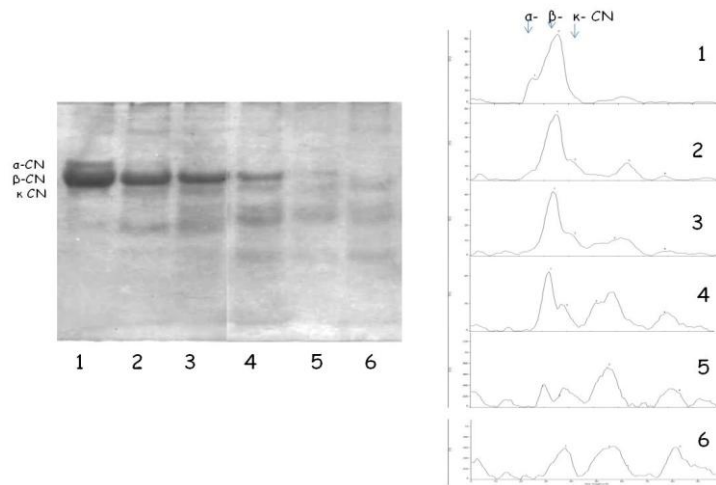


Fig. 3: Electroforesis Tricina-SDS-PAGE v densitograma de los hidrolizados de caseína ovina. Calles 1 a 5: hidrólisis en tiempo de incubación 0, 1, 2, 4, 8 y 20 horas respectivamente.

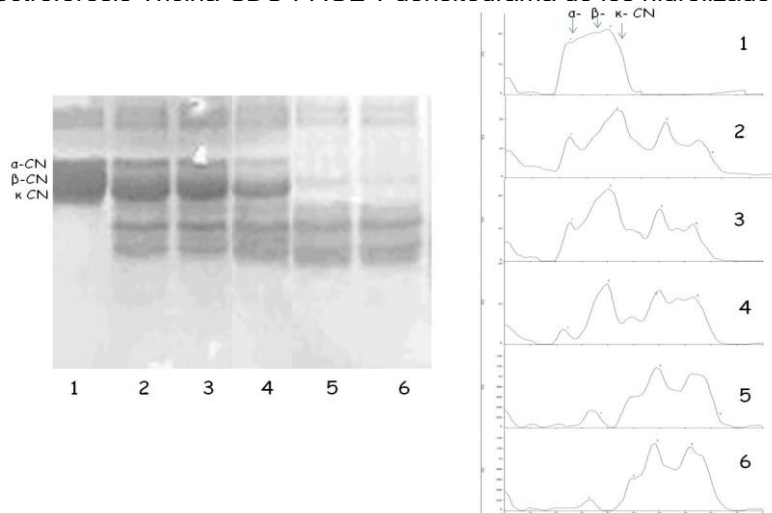


Fig. 4: Electroforesis Tricina-SDS-PAGE y densitograma de los hidrolizados de caseína caprina. Calles 1 a 5: hidrólisis en tiempo de incubación 0, 2, 4, 8 y 20 horas respectivamente.

**Actividad antimicrobiana de los hidrolizados:** Se ha informado que los fragmentos de las proteínas lácteas producen la inhibición *in vitro* del crecimiento de cepas patógenas. El efecto bactericida de los péptidos derivados de estas proteínas parece estar correlacionado con la carga neta positiva de los mismos. El

mecanismo se basa en la formación de un bucle en forma de  $\alpha$ -hélice en el extremo carboxilo terminal que provoca la formación de canales iónicos en la membrana celular, alterando su permeabilidad y provocando la muerte de los microorganismos susceptibles (Correa et al., 2011; Benkerroum, 2010; Agawa et al., 1991) Se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de las caseínas de distinto origen y se encontró que los hidrolizados producían inhibición del desarrollo de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomona fluorescens*. El hidrolizado de caseína caprina no tuvo efecto inhibitorio sobre las enterobacterias (*Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*) como tampoco sobre *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* y *gallinarum*. *Escherichia coli* sólo fue inhibida por los hidrolizados de caseína ovina y *Salmonella enteritidis* y *gallinarum* fueron inhibidas únicamente por los hidrolizados de caseína bovina (Tabla 1).

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de los hidrolizados de caseína bovina, ovina y caprina

Microorganismo patógeno	Origen de la caseína		
	Caseína bovina	Caseína ovina	Caseína caprina
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	-	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	+	-	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+	-
<i>Pseudomona fluorescens</i>	+	+	+

Como se ha mencionado anteriormente, estos hidrolizados fueron separados por ultrafiltración obteniéndose fracciones de peso molecular superior e inferior a 3 kDa, y en estas fracciones se determinó la actividad antimicrobiana (Fig. 5 y 6). Se encontró que los péptidos de peso molecular inferior a 3 kDa provenientes de la hidrólisis de las caseínas bovina y ovina presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias ensayadas. *Staphylococcus aureus* sólo fue inhibida por las fracciones de bajo peso molecular. López-Expósito y Recio (2008) han informado que la acción inhibitoria sobre este microorganismo puede atribuirse a la isracidina, péptido de bajo peso molecular proveniente del extremo aminoterminal de la  $\alpha$ -caseína (f1-23). El efecto antibacteriano de péptidos de bajo peso molecular provenientes de  $\alpha$ - y  $\beta$ - caseína sobre bacterias del género *Staphylococcus* también fue mencionado por Szwajkowska (2011). Por otra parte, solo los ultrafiltrados de peso molecular superior e inferior a 3 kDa de caseína ovina mostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. En este sentido, Atanasova e Ivanova (2011) afirmaron en un estudio preliminar, que un hidrolizado de  $\beta$ -caseína ovina había inhibido la producción de *Escherichia coli* JM103, sin identificar aún el péptido responsable de esta actividad.

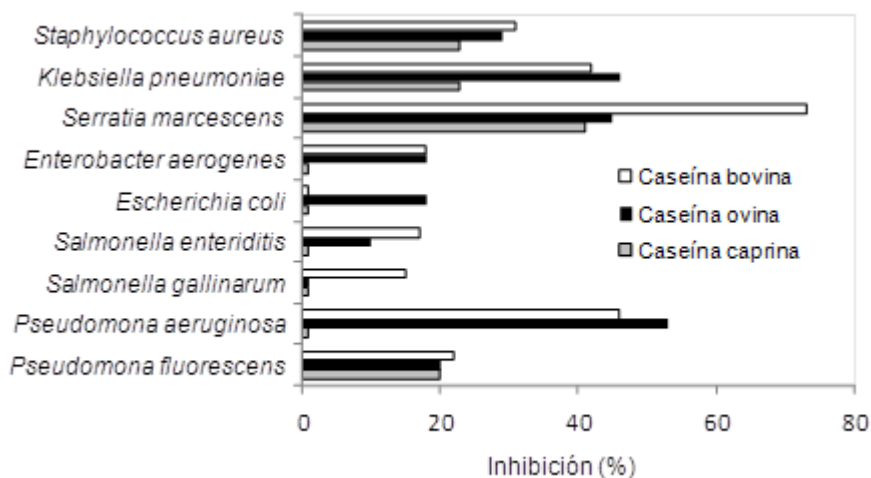


Fig. 5: Actividad antimicrobiana de la fracción de peso molecular inferior a 3 kDa de los hidrolizados ultrafiltrados de las caseínas bovina, ovina y caprina.

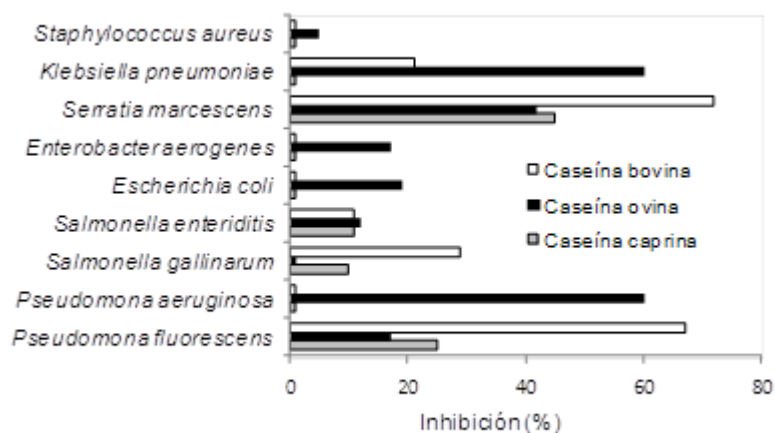


Fig. 6: Actividad antimicrobiana de la fracción de peso molecular superior a 3 kDa de los hidrolizados ultrafiltrados de las caseínas bovina, ovina y caprina.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió la actividad hidrolítica de los extractos de frutos de *Salpichroa origanifolia* sobre caseínas de origen bovino, ovino y caprino y se encontró que todas las caseínas presentaban un perfil de hidrólisis similar durante las primeras 2 horas, sin embargo la hidrólisis de la caseína caprina se incrementó notablemente desde las 4 y hasta las 20 horas de incubación respecto de las otras caseínas.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los hidrolizados de las caseínas de distinto origen y se encontró que los hidrolizados producían algún efecto inhibitorio de la multiplicación celular en las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomona fluorescens*. Además se analizó la inhibición producida por las fracciones separadas por ultrafiltración y se encontró que los péptidos de peso molecular inferior a 3 kDa provenientes de la hidrólisis de las caseínas bovina y ovina presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias ensayadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que los extractos crudos de frutos de *Salpichroa origanifolia* hidrolizan las fracciones caseínicas de las leches bovina, caprina y ovina produciendo compuestos antimicrobianos sobre microorganismos patógenos del hombre. En futuros estudios se aislarán e identificarán los péptidos responsables de esta actividad biológica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con fondos del Programa de Proyectos de Investigación de la Finalidad 3.5 del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Nacional de Luján. Agradecemos especialmente la participación de la Mg. María Eugenia Díaz y de las estudiantes María Eugenia Blotta y Débora Rodríguez en las actividades experimentales del trabajo.

## REFERENCIAS

- Agawa, Y. y otros siete autores, *Interaction with phospholipid bilayers: ion channel formation and antimicrobial activity of basic amphipathic  $\alpha$ -helical model peptides of various chain lengths*, J. Biol. Chem.: 296, 20218-20222 (1991).
- Ahmed, A.B.F. y otros tres autores, *Hydrolysis of Ovine and Caprine Caseins by Enzymatic Extract from Solanum dubium Seeds*. Aust. J. Basic and Appl. Sci.: 5(3), 331-336 (2011).
- Araujo D., J. y R. Salas A.; *Actividad antimicrobiana de plantas*, Revista Científica del Sur: 6(2), 6-18 (2008).
- Atanasova, J. y I. Ivanova; *Antibacterial peptides from goat and sheep milk proteins*, Biotechnol. & Biotechnol. Eq.: 24(2), 1799-1803 (2010).
- Bado, S. y otros cuatro autores; *Lethal and sublethal effects of withanolides from Salpichroa origanifolia and analogues on Ceratitis capitata*, J. Agric. Food Chem.: 52(10), 2875-2878 (2004).
- Ballows, A.; *Automatización de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*, In Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos. Técnicas actualizadas by Ed. Médica Panamericana, pp 125-135, Buenos Aires, Argentina (1976).
- Baró, L. y otros tres autores.; *Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*, Ars. Pharm.: 42(3-4), 135-145 (2001).

- Benkerroum, N.; *Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review*, Int. J. Dairy Technol.: 63(3), 320-338 (2010).
- Boeris, M., R.E. Toso y M. Skliar; *Actividad antiinflamatoria de Salpichroa origanifolia*, Acta Farm. Bonaerense: 23(2), 138-141 (2004).
- Correa, A.P.F. y otros siete autores; *Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease*. J Sci Food Agric: 91 (12), 2247–2254 (2011).
- Huang, S.M. y otros cuatro autores, *Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis*. Int. J. Food Sc. & Technol.: 45, 1061–1067 (2010).
- Isenberg, H.D., *Automated Methods of Bacterial Testing*. Ann. N.Y. Acad. Sci.: 428(1), 236-242 (1984).
- Korhonen, H. y A. Pihlanto, *Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods*, Curr. Pharm. Des.: 9, 1297-1308 (2003).
- López-Expósito, I. y otros tres autores, *Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxydant and antihypertensive peptides*. Lait: 87, 241–249 (2007).
- López-Expósito, I. y Recio, I. *Protective effect of milk peptides: Antibacterial and antitumor properties*. In Advances in experimental medicine and biology: Bioactive components of milk by Z. Bösze (Ed.), Vol. 606, pp. 271–294. New York, USA: Springer (2008).
- Mareggiani, G. y otros seis autores; *Antifeedant activity of withanolides from Salpichroa origanifolia on Musca domestica*, J. Nat. Prod.: 63, 1113-1116 (2000).
- Mareggiani, G. y otros seis autores, *Response of Tribolium castaneum (Coleoptera, Tenebrionidae) to Salpichroa origanifolia withanolides*, J. Agric. Food Chem.: 50, 104-107 (2002).
- Marshal, K.; *Therapeutic applications of whey protein*, Altern. Med. Rev.: 9,136-156 (2004).
- Meisel, H.; *Multifunctional peptides encrypted in milk proteins*, Biofactors: 21, 55-61 (2004).
- Moreno Y.F. y otros cuatro autores, *Features of Whey Protein Concentrate Supplementation in Children with Rapidly Progressive HIV Infection*, J. Trop. Pediatr.: 52, 34-38 (2006).
- Oliva, Y. y S. Vega; *Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales*, Rev. Salud Anim.: 26 (3), 151-162 (2004).
- Pouliot, Y.; Gauthier, S.F. y Groleau, P.E.; *Fractionation strategies for bioactive peptides* In Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease, 1st edition: pp. 639-659, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA (2005).
- Rocha, G.; López, O. y Fernández, G.; *Elaboración de queso de pasta blanda con enzima vegetal de Salpichroa origanifolia (Huevo de gallo)*. Ciencia Actual: 1(3),851-857 (2006).
- Rocha, G.F., G. Fernández y M. Parisi; *Estudios de caracterización cinética y fisicoquímica de una proteinasa aspártica aislada de frutos maduros de Salpichroa origanifolia*, Información Tecnológica: 21(2), 21-28 (2010).
- Rojas R., R. y otros siete autores, *Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by Lactobacillus casei Shirota*. Int. Dairy J.: 26 (2), 147–154 (2012).
- Schägger, H., *Protocol: Tricine-SDS-PAGE*, Nat. Protoc.: 1(1), 16 - 22 (2006).
- Sharma, S.; Singh, R. y Rana, S., *Bioactive Peptides: A Review*. Int.J. Bioautomation: 15(4), 223-250 (2011).
- Szwajkowska, M. y otros cuatro autores, *Bovine milk proteins as te source of bioactive peptides influencing the consumer's immune system - a review*. Anim. Sci. Pap. Rep.: 29(4), 269-280 (2011).
- Trujillo, A.J. y otros tres autores; *Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein*, Food Chem.: 71, 449-457 (2000).
- Ubalde, M.C. y A.M. Cantera; *Utilización de una mezcla de proteasas para la obtención de hidrolizados de lactosueros de bajo grado de hidrólisis*, Información Tecnológica: 13(5), 77-84 (2002).
- Silva, S. y Malcata, X.; *Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from Cynara cardunculus*, Food Chem.: 89(1), 19-26 (2005).
- Sousa, M.J. y Malcata, F.X. *Proteolysis of ovine and caprine caseins in solution by enzymatic extracts from flowers of Cynara cardunculus*. Enzyme and Microbial Technol.: 22 (5), 305-314 (1998).
- Teschemacher, H., *Opioid receptor ligands derived from food proteins*. Curr. Pharm. Des.: 9, 1331-1344 (2003).
- Vairo C., S. y otros cuatro autores; *Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins brought about by aspartic peptidases from Silybum marianum flowers*, Food Chem.: 106, 997-1003 (2008).