

Parámetros de obtención de un aislado proteínico a partir de la semilla de anacahuita y evaluación de sus propiedades antioxidantes y antihipertensivas

Obtention parameters of anacahuita seed protein-isolate and evaluation of its antioxidant and antihypertensive properties

José Mayolo Simitrio Juárez-Goiz¹, Leopoldo González-Cruz¹, Diego Núñez-Camargo¹, Gerardo Teniente-Martínez¹, Humberto R. Medina¹, Aurea Bernardino-Nicanor*¹

¹Ingeniería Bioquímica/ Tecnológico Nacional de México/IT en Celaya. Antonio García Cubas Pte #600 esq. Av. Tecnológico. Celaya, Gto. México, C.P. 38010. A.P. 57. Tel. (461)-611-75-75, Fax (461)-611-75-75 aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx

*Autor de correspondencia

Resumen

La anacahuita es una especie subutilizada; ya que las semillas de su fruto contienen alta concentración de proteínas, las cuales al ser aisladas pueden generar péptidos que brindan propiedades nutracéuticas, por lo que es necesario analizar los aislados con base en sus características químicas y nutracéuticas. El objetivo del presente trabajo fue obtener un aislado proteínico a partir de las semillas de anacahuita, así como caracterizarlo con base en su punto isoelectrónico, masa molecular, digestibilidad *in vitro*, actividad antioxidante y actividad antihipertensiva. Los resultados indicaron un rendimiento y digestibilidad *in vitro* de 83.8% y 87%, respectivamente; el punto isoelectrónico se alcanzó a pH 4.0, con una actividad antihipertensiva de 64%; el IC₅₀ para la actividad antioxidante se alcanzó con 79.6 mg de aislado; y el perfil electroforético mostró la desnaturización de la proteína con la aparición de nuevas bandas. Las proteínas de la semilla de anacahuita muestran alto potencial para ser utilizadas como compuestos nutracéuticos o para desarrollar procesos de hidrólisis incrementando su potencial.

Palabras clave: Semilla; anacahuita; proteínas; aislado.

Abstract

Anacahuita is an underutilized species, because its seeds contain high concentration of protein, which during the isolation process may generate some peptides that could provide nutraceutical properties. For this reason, the evaluation of their chemical and nutraceutical characteristics is needed. The goal of this research was to obtain a protein isolate from anacahuita seeds, as well as to characterize it based on its isoelectric point, molecular weight, *in vitro* digestibility, and antioxidant and hypertensive activities. The results obtained showed a yield and an *in vitro* digestibility of 83.8% and 87%, respectively; the isoelectric point was reached at pH 4.0, and its antihypertensive activity was 64%; the IC₅₀ for the antioxidant activity was achieved with 79.6 mg of protein isolate; and a denaturalization process in the protein was observed due to effect of isolation. These results suggest that anacahuita seed proteins have potential to be used as nutraceutical compounds, and their modification could increase their nutraceutical capacity.

Keywords: Seed; anacahuita; protein; isolate.

Recibido: 24 de marzo de 2021

Aceptado: 21 de octubre de 2021

Publicado: 12 de enero de 2022

Cómo citar: Juárez-Goiz, J. M. S., González-Cruz, L., Núñez-Camargo, D., Teniente-Martínez, G., Medina, R. H., & Bernardino-Nicanor, A. (2022). Parámetros de obtención de un aislado proteínico a partir de la semilla de anacahuita y evaluación de sus propiedades antioxidantes y antihipertensivas. *Acta Universitaria* 32, e3160. doi. <http://doi.org/10.15174/au.2022.3160>

Introducción

Actualmente, se buscan fuentes alternativas de proteínas debido a que se ha demostrado que los aislados, hidrolizados, péptidos o fracciones, presentan características nutracéuticas importantes, por lo que han sido utilizados como agentes antioxidantes y antimicrobianos, así como para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer, la diabetes, la hipertensión, la dislipidemia y los trastornos metabólicos, entre otros (Esfandi *et al.*, 2019; León-Espinosa *et al.*, 2019; Mason *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2019; Teniente-Martínez *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2018).

La materia prima de mayor utilización para la obtención de proteínas es la pasta desengrasada de semillas de importancia comercial como son la soya, la quinoa, los lupinos y la avellana, entre otros (Guerra & Pozo, 2018; Lozano *et al.*, 2019; Sánchez-Reséndiz *et al.*, 2019; Villarroel *et al.*, 2012). Sin embargo, desde hace algunos años, se ha observado que las semillas de los frutos, que se consideran productos de deshecho, podrían representar una fuente importante de proteína y no son aprovechadas, tal es el caso de la semilla de guayaba, jitomate, mango y maracuya (Bernardino-Nicanor *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2011; Sarkar *et al.*, 2016; Torres-León *et al.*, 2016). Entre los frutos que se consumen de manera habitual en nuestro país se encuentra la anacahuita, la cual posee entre 2 a 3 semillas que representan más del 60% del volumen del total del fruto y podría representar una posible alternativa para la extracción de proteínas de importancia para la salud humana.

La anacahuita (*Cordia boissieri* A. DC) es un fruto común en las regiones del noroeste de México, es nativo de América del Norte; el árbol puede alcanzar hasta los 6 m de altura, sus hojas son de color verde de textura aterciopelad, flores blancas y frutos de color verde amarillento (Martínez-Adriano *et al.*, 2016). Las hojas, las flores y los frutos de la anacahuita han mostrado tener propiedades nutracéuticas, entre ellas; efecto citotóxico (Viveros-Valdez *et al.*, 2016), efecto sobre el síndrome metabólico (Owis *et al.*, 2016; Owis *et al.*, 2017), y contra enfermedades del sistema respiratorio (Domínguez, 2012; Salazar-Aranda *et al.*, 2011). Sin embargo, aún cuando las semillas representan aproximadamente el 14% del peso total del fruto, el 47.5% del ancho y el 82% de su longitud; no ha sido caracterizada química y nutracéuticamente, por lo que el objetivo del presente trabajo se enfocó en la obtención de un aislado proteínico por medio de precipitación isoeléctrica a partir de las semillas de anacahuita y caracterizarlo con base en su masa molecular, digestibilidad *in vitro*, actividad antioxidante y actividad antihipertensiva.

Materiales y métodos

Material Vegetal

El fruto de anacahuita se obtuvo del Ejido de San Francisco en Ciudad Victoria, Tamaulipas, se limpiaron manualmente retirando la pulpa por completo, la semilla se midió, peso, seccionó y secó en un secador por convección de aire forzado (Binder, Modelo FD 115-UL, USA), se molvió, en un molino manual, la harina se tamizó a través de la malla No 40 y se almacenó a temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) en frascos ámbar sellados herméticamente hasta su análisis.

Determinación de la Composición química proximal

Todas las metodologías utilizadas fueron las que se indican en el AOAC International (1995). El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl utilizando un factor de conversión de 6.25 (Método 955.04), fibra cruda por el método de hidrólisis ácida/básica (Método 962.09), extracto etéreo con el método de soxhlet (Método 920.39C), humedad por el método de horno al vacío (Método 925.09), y cenizas por el método de calcinación (Método 923.03).

Determinación del punto isoeléctrico

La determinación del punto isoeléctrico de la proteína de la semilla de anacahuita se realizó utilizando la metodología reportada por Bernardino-Nicanor *et al.* (2007). La harina de la semilla de anacahuita fue sometida a un tratamiento de desengrasado utilizando éter de petróleo en un aparato de Soxhlet, la muestra de harina desengrasada se mezcló con agua en una relación 1:20 (p/v), se ajustó el pH con NaOH (0.1N) en el intervalo de 9 a 12, se mantuvo en un baño a 40°C durante 30 min, se centrifugó (Hermle Z200A, Germany) a 4°C durante 30 minutos a 3000 x g, el sobrenadante fue colectado y se determinó el contenido de proteína por el método de Kjeldahl, seleccionando el pH donde se encontró la mayor concentración de proteína, el sobrenadante seleccionado se ajustó a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 con HCl (0.1N). La proteína precipitada fue separada por medio de centrifugación a 3000 x g por 30 min a 4°C y liofilizada (Freezone Plus 6, Labconco, USA), el punto isoeléctrico es el pH donde se obtuvo la mayor concentración de proteína.

La obtención del aislado proteínico se basa en 2 procesos: solubilidad de la proteína por medio de una disolución alcalina, seguida de la precipitación de la proteína por medio de la disolución ácida; una vez precipitada la proteína, se separa por centrifugación y se liofiliza (aislado proteínico)

Determinación de la digestibilidad in vitro

La digestibilidad *in vitro* se determinó de acuerdo al método descrito por Hsu *et al.* (1977) con algunas modificaciones (Queiroz *et al.*, 2016). A 50 mL de una disolución de proteína (6.25 mg de proteína/mL) se le ajustó el pH a 8.0 con HCl 0.1N o NaOH 0.1N, se agitó en baño maría a 37 °C. Se agregaron 5 mL de una disolución multienzimática (1.6 mg de tripsina pancreática porcina, EC 3.4.21.4; 3.1 mg de quimiotripsina pancreática bovina, EC 3.4.21.1 y 1.3 mg, pancreatina, EC 3.1.3.8), se agitó por 10 min y se midió el pH. La digestión se detiene con un baño de agua en ebullición por 5 min. La digestibilidad *in vitro* se determinó por medio de la ecuación 1.

$$Y = 210.48 - 18.10X \quad (1)$$

Dónde:

Y= digestibilidad aparente *in vitro*

X= pH a los 10 min de iniciada la incubación

Determinación de la actividad antioxidant por el método de DPPH

Se determinó usando el método de DPPH, según lo establecido por Brand-Williams *et al.* (1995), donde se utiliza el radical estable 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), los antioxidantes transfieren electrones o átomos de hidrógeno a este compuesto y así neutralizan su propiedad de radical libre; esta técnica consiste en preparar una disolución del antioxidante (muestra), en metanol (0.1 mL), se adiciona 3.9 mL de DPPH en metanol (6×10^{-5} mol/L). La disminución de la absorbancia se determina a 515 nm desde el tiempo 0 y cada 10 minutos hasta completar la reacción.

La actividad antioxidant fue expresada como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol ET/g muestra}$). El IC_{50} denota la concentración del compuesto para inhibir el valor inicial del DPPH a 50% a una absorbancia de 515 nm.

Determinación de la Actividad Antihipertensiva:

La capacidad antihipertensiva se determinó mediante la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) de pulmón de conejo, ≥ 2.0 unidades/mg de proteína (EC 3.4.15.1) con el método de Cushman & Cheung (1971), modificado por Hernández-Ledesma *et al.* (2007). El método se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico formado por la reacción del sustrato hipurilhistidil-leucina (HHL) con la ECA, en presencia y ausencia del inhibidor (muestras). Se preparó una disolución de sustrato constituida por HHL (10 mM) disuelta en un tampón fosfato potásico 200 mM y cloruro sódico 300 mM, de pH 8.3. Añadiendo 25 μL de ECA, correspondientes a 4 mU de ECA disueltas en glicerol al 50%, a 110 μL de la disolución de sustrato y a 15 μL de cada una de las muestras, cuya actividad inhibitoria de la ECA se le determinó. La reacción se llevó a cabo durante 80 min a 37 °C. Posteriormente, se inactivó la enzima por descenso del pH, adicionando 110 μL de HCl 1 N. El ácido hipúrico formado durante la reacción se extrajo con 1000 μL de acetato de etilo. Tras agitación y posterior centrifugación a 3000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, se tomaron 750 μL de la fase orgánica. La eliminación del acetato de etilo se realizó por calentamiento a 95 °C durante 15 min. El residuo de ácido hipúrico se disolvió en 1000 μL de agua destilada y tras agitar, se midió la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro. El porcentaje de inhibición de la ACE se calculó con la ecuación 2.

$$\% \text{ de inhibición de ACE} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

Donde:

A: Absorbancia del control negativo (enzima + sustrato)

B: Absorbancia de la muestra (enzima + sustrato + muestra)

C : Absorbancia del control positivo (enzima + sustrato + farmaco)

Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición de la enzima tomando como referencia el losartan (farmaco comercial usado para el tratamiento de la hipertensión)

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó utilizando condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato de amonio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés), de acuerdo con la metodología de Laemmli (1970), en una celda vertical Mini Protean 3 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA 94547 USA). Los pesos moleculares se calcularon usando un estándar de proteínas (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA 94547 USA) que contiene fosforilasa b (94 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -lactoalbúmina (14.4 kDa). Las muestras fueron disueltas en regulador de muestra (0.1 mol/L de Tris-HCl a pH 6.8, 20 mL/100mL de glicerol, 2 g/100 mL de SDS y 0.005 g/100 mL de azul de bromofenol). La electroforesis fue realizada a 120 V durante 1.5 H. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomasie R-250 por 24 h, posteriormente se destiñeron con una disolución de alcohol: agua destilada: ácido acético en proporciones 30: 60:10.

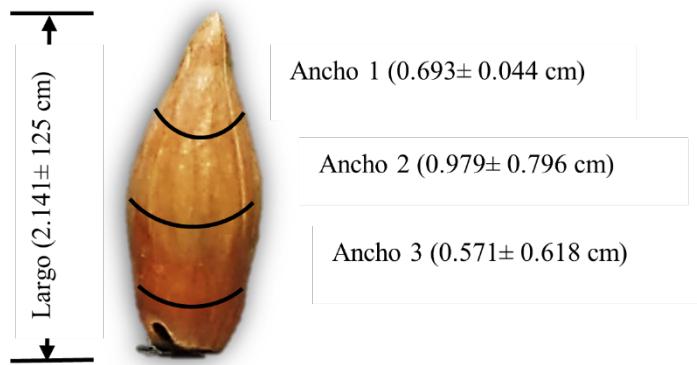
Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey para determinar la diferencia entre medias. Se utilizó el programa SAS v. 8.0 (Institute Inc., Cary, NC, USA), para el análisis estadístico de los resultados.

Resultados y discusión

Características físicas

Las semillas de los frutos de anacahuita utilizados en el presente trabajo presentaron un peso promedio de 0.8129 ± 0.15 g. Considerando la forma de la semilla, se dividió en 3 secciones, para determinar sus dimensiones, como se indica en la Figura 1.



Semilla de anacahuita y sus dimensiones.
Fuente: Elaboración propia.

Las semillas de anacahuita analizadas en el presente trabajo son más grandes y de mayor peso que las provenientes de Nuevo León, de acuerdo con Alvarado *et al.* (2004), quienes reportaron un peso de 0.71 ± 0.11 g, con dimensiones de 0.847 ± 0.76 de ancho y 1.73 ± 1.06 de largo. Estas diferencias podrían ser atribuidas a factores como la zona de procedencia, las condiciones climáticas, la época de florecimiento y la fructificación, así como su variabilidad genética, ya que, de acuerdo con López *et al.* (2017), estos factores pueden afectar las características morfométricas tanto de las semillas como de los frutos de donde proceden. Es importante mencionar, que la caracterización física de la semilla no ha sido reportada en artículos recientes.

Composición químico proximal

Los resultados indicaron que la semilla de anacahuita podría ser una fuente importante de fibra y proteína, principalmente, ya que entre ambos representan el 79.2% del total de los componentes de la semilla (Tabla 1).

Tabla 1. Composición químico proximal de la semilla de anacahuita (base seca).

| Componente | Contenido (%) |
|---------------------|----------------------|
| Humedad | 7.17 ± 0.542^a |
| Extracto Etéreo | 4.38 ± 0.340^a |
| Proteína | 21.80 ± 0.063^b |
| Cenizas | 1.57 ± 0.035^f |
| Fibra | 57.45 ± 0.123^a |
| Hidratos de Carbono | 14.7766 ^c |

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Los valores son la media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

Fuente: Elaboración propia.

La semilla de anacahuita analizada en el presente trabajo mostró mayor contenido de proteína que los reportados para las semillas de otros frutos de consumo común como son el aguacate papelillo (5.68%), la guanábana (14.77%), el maqui (9.24%), la calabaza (0.1%), el mango (6.3% -10%) y la naranja (3.6%), de acuerdo con Ceballos & Montoya (2013); Vit *et al.* (2014); Araneda *et al.* (2016); Rossel *et al.* (2018); Mwauah *et al.* (2020) y Mazloomi *et al.* (2020), respectivamente.

Por otra parte, el contenido de extracto etéreo de la semilla de anacahuita analizada en este trabajo se encuentra dentro del intervalo reportado para semillas de parota (2.0%) y aguacate papelillo (3.31%), de acuerdo con lo reportado por Serratos *et al.* (2008) y Cevallos & Montoya (2013), respectivamente; sin embargo, se encuentra por debajo de lo reportado para semillas de tomate, xoconostle almendra de durazno, almendra de mango, guanábana, el maqui y calabaza con 17.1%, 19.2%, 54.4%, 9.7%, 25.7%, 11.9% y 28.3%, respectivamente (Araneda *et al.*, 2016; Belén-Camacho, 2004; Medina *et al.*, 2010; Prieto-García *et al.*, 2006; Rossel *et al.*, 2018; Vit *et al.*, 2014).

Determinación del punto isoeléctrico y obtención del aislado proteínico

Se ha demostrado que la mayoría de las proteínas de las semillas solubilizan en un intervalo de pH's de 9 a 12 (Pergande & Cologna, 2017), en el caso de la semilla de anacahuita la mayor cantidad de proteína solubilizada se logró a pH 12, valor semejante al reportado para las proteínas de semilla de maracuyá y guanábana (Chaparro *et al.*, 2014; Medina *et al.*, 2011); sin embargo, es un valor superior a los reportados para la proteína de la semilla de mango (pH 9), jitomate (pH 8), papaya (pH 10) y naranja (pH 10), de acuerdo con Chaparro-Acuña *et al.* (2015); Sarkar *et al.* (2016); Kadiri *et al.* (2017) y Mazloomi *et al.* (2020), respectivamente.

Por otra parte, de acuerdo con Pergande & Cologna (2017), el punto isoeléctrico de las proteínas obtenidas a partir de semillas, generalmente, se encuentra dentro del intervalo de pH's ácidos (entre 2 y 6), en el caso de la semilla de anacahuita el punto isoeléctrico se encontró a pH 4 (Figura 2), valor semejante al reportado para semillas de maracuyá, guanábana y papaya (Chaparro *et al.*, 2014; Kadiri *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 2011), pero inferior a los reportados para semillas de mango (pH 6), de acuerdo con Chaparro-Acuña *et al.* (2015) y superior al de la semilla de jitomate (pH 3.5) y naranja (pH 3), de acuerdo con Sarkar *et al.* (2016) y Mazloomi *et al.* (2020), respectivamente.

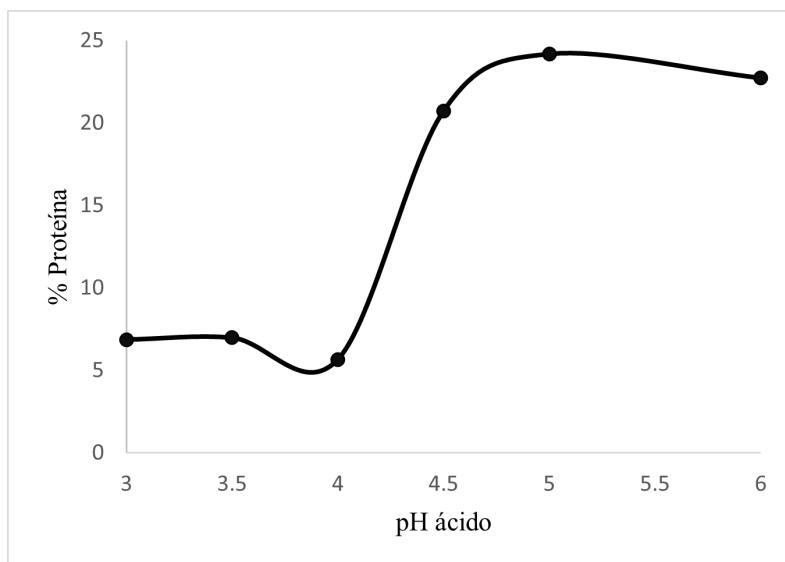


Figura 2. Punto isoeléctrico de la proteína de la semilla de anacahuita.

Fuente: Elaboración propia.

La cantidad de proteína presente en el aislado proteínico obtenido a partir de la semilla de anacahuita fue del 83.48%, valor superior al reportado en el aislado de semilla de guanábana (63%), de acuerdo con Chaparro *et al.* (2014), sin embargo, fue inferior al reportado para la semilla de maracuyá (95.6%) y jitomate (91.8%) de acuerdo con Medina *et al.* (2011) y Sarkar *et al.* (2016), respectivamente.

La diferencia existente entre el punto isoeléctrico de la proteína de la semilla de anacahuita y las semillas de otros frutos reportados en la literatura es un indicio de la diferencia existente en la composición de aminoácidos y la organización 3D de la estructura de la proteína de acuerdo con Pergande & Cologna (2017).

Determinación de la digestibilidad *in vitro*

Los resultados mostraron diferencia estadísticamente significativa entre la digestibilidad *in vitro* de la harina de la semilla de anacahuita con respecto al aislado proteínico, siendo este último el que mostró mayor digestibilidad (Tabla 2), lo cual podría ser debido a que el proceso de aislamiento provoca la desnaturalización de la proteína, incrementando la disponibilidad de esta macromolécula, según lo indicado por Pergande & Cologna (2017).

La harina y el aislado proteínico de semilla de anacahuita muestran valores de digestibilidad *in vitro* entre 12% y 17% menor que el de la caseína (99.08%), esta proteína es considerada como referencia en lo relativo a la calidad nutricional de una proteína (Msarah & Alsier, 2018), al encontrarse por arriba del 80% podría considerarse de buena calidad nutricional.

Por otra parte, la digestibilidad mostrada por la harina y el aislado fue superior al reportado para semillas de calabaza (77.91%) y mezquite (72.52%) (Atuonwu & Akobundu, 2010; Gallegos-Infante et al., 2013), sin embargo, el aislado presenta un valor de digestibilidad semejante al de las semillas de melón (88%), de acuerdo con Iakshmi & Kaul (2011).

Tabla 2. Digestibilidad *in vitro* y actividad antihipertensiva de la harina y aislado proteínico de la semilla de anacahuita.

| Muestra | Digestibilidad <i>in vitro</i> (%) | IC ₅₀ *1 (mg/ml) | Actividad antioxidante (μmol ET/g muestra) | % inhibición de ECA*2 |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------|
| Harina | 82.29 ± 0.31 ^b | 302.4 ± 0.29 ^a | 3.037 ± 0.017 ^b | 57.11 ± 0.04 ^a |
| Aislado | 87.36 ± 0.57 ^a | 79.6 ± 0.24 ^b | 11.265 ± 0.073 ^a | 64.10 ± 0.01 ^b |

Nota: Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).
 Los valores son la media ± desviación estándar de tres repeticiones.

*1 Actividad antioxidante.

*2 Actividad antihipertensiva, usando como control el losartan.

Fuente: Elaboración propia.

Actividad antioxidante

Los resultados indican que la actividad antioxidante es una propiedad que no se ve alterada por efecto del aislamiento (Tabla 2), toda vez que para alcanzar el IC₅₀ (cantidad de compuesto antioxidante que se requiere para inhibir el 50% del DPPH) se requiere la misma cantidad de muestra en ambos casos, si se considera la proporción de proteína en cada muestra.

De acuerdo con la clasificación propuesta por Kuete & Efferth (2010), tanto la harina como el aislado son compuestos con baja actividad antioxidante, ya que el IC₅₀ > 0.1 mg/mL; considerando que se trata de un subproducto, la capacidad antioxidante mostrada por ambas muestras podría ser aprovechada para la elaboración de alimentos funcionales.

La actividad antioxidante mostrada por el aislado y la harina podría ser atribuida a la capacidad que presentan las proteínas para inactivar especies reactivas de oxígeno, eliminar radicales libres, quelar metales prooxidantes, reducir hidroperóxidos y eliminar oxidantes específicos, además de dar un indicio de la posible presencia de histidina, tirosina y triptófano, aminoácidos que se ha demostrado presentan actividad antioxidante (Elias, 2008).

La actividad antioxidante de la harina y aislado de la semilla de anacahuita es inferior a la reportada para harina de semilla de calabaza (3.4 – 0.94 mg/mL), semilla de guanábana (5.44 mg/mL), semilla de yaca (0.78 mg/mL), y aislado proteínico de semilla de papaya (2.5 mg/mL), de acuerdo con lo reportado por Dash & Ghosh (2016); Adefgha *et al.* (2015); Gupta *et al.* (2011) y Kadiri *et al.* (2017), respectivamente.

La semilla de nacahuita presenta mayor actividad antioxidante que la semilla de mandarina (1.41 a 1.87 mmol Equivalentes de Trolox/Kg), naranja (1.49-1.72 mmol Equivalentes de Trolox/Kg) y limón (mmol Equivalentes de Trolox/Kg) de acuerdo a lo reportado por İnan *et al.* (2018).

Determinación de la Actividad Antihipertensiva

Los resultados (Tabla 2) mostraron que el aislado proteínico de la semilla de anacahuita no mantuvo la actividad antihipertensiva con respecto a la presentada por la harina, considerando la proporción de proteína que contiene cada muestra, lo cual podría indicar que esta propiedad está determinada, no solo por la proteína, si no por otros componentes presentes en la harina, que se pierden durante el proceso de aislamiento.

La capacidad antihipertensiva mostrada por el aislado en particular podría ser debida a que el proceso de aislamiento desarrolla la estructura proteínica dejando disponibles aminoácidos aromáticos, que han demostrado favorecer la interacción con el sitio activo de la ECA (Cheung *et al.*, 1980). Mientras que, en el caso de la harina, además de la presencia de los aminoácidos aromáticos, también podría contener compuestos fenólicos, que han demostrado tener actividad antihipertensiva según lo indicado por Vargas-León *et al.* (2018).

Son escasos los estudios enfocados a la actividad antihipertensiva de semillas y en el caso de subproductos como las semillas de frutos difícilmente es analizada esta propiedad, en el caso de la semilla de anacahuita se observó que tanto la harina como el aislado mostraron tener buena capacidad antihipertensiva, ya que los valores obtenidos en ambos casos están por arriba del IC₅₀ y comparados con el control (losartan) mostraron valores menores a este en un 28.47% y 36.47% para aislado y harina respectivamente (Tabla 2). Nuevamente, se considera que es un valor adecuado, toda vez que se trata de un subproducto de la agroindustria.

Comparado con valores de otros productos, la semilla de anacahuita se encuentra dentro del intervalo reportado para la flor de jamaica (Vargas-León *et al.*, 2018), sin embargo, se requiere mayor concentración tanto de semilla como de aislado (100 mg/mL) para alcanzar el IC₅₀, en comparación con las semillas de semilla de mezquite (1 mg/mL), guanábana (0.20 mg/mL) y maracuyá (0.017 mg/mL) (Adefgha *et al.*, 2015; Gallegos-Infante *et al.*, 2013; González *et al.*, 2019).

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

El perfil electroforético de la harina y del aislado (Figura 3) presenta subunidades similares ubicadas en 12 kDa, 52kDa, y 220 kDa, lo cual es un indicio de la estabilidad de la estructura proteínica sobre los cambios de pH (Sorgentini *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha reportado que un tratamiento de extracción alcalina genera residuos proteínicos derivado de la ruptura de algunos aminoácidos modificando la estructura de la proteína (Zhang *et al.*, 2018), lo cual se reflejó en la aparición de nuevas bandas ubicadas en 32 kDa, 45 kDa, 160 kDa y 200 kDa (Figura 3).

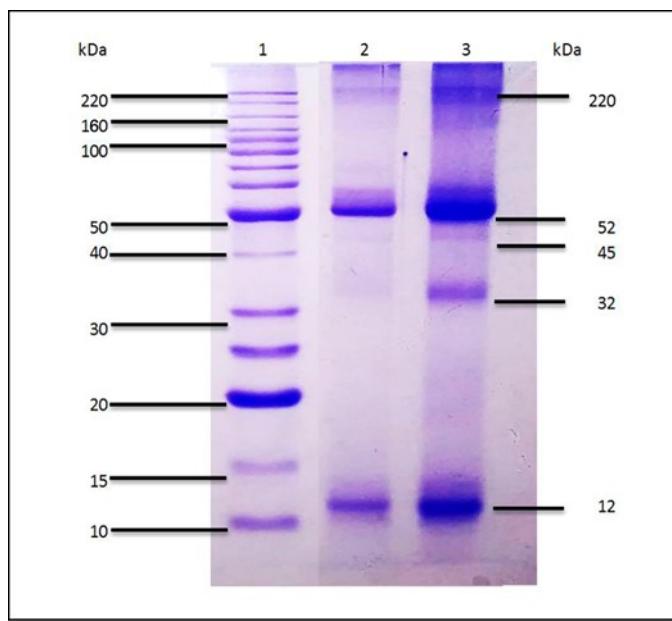


Figura 3. SDS-PAGE. Carril: 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Harina de semilla de anacahuita, 3) Aislado proteínico.
 Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

La desnaturización de la proteína provocada por el proceso de aislamiento fue observada en el patrón electroforético con la aparición de nuevas bandas, lo cual fue debido a que el pH al que se encuentra su punto isoeléctrico fue 4.0. Estas condiciones incrementaron la digestibilidad *in vitro* del aislado proteínico en aproximadamente 5% con respecto a la harina, la actividad antioxidante se mantuvo considerando la proporción de la proteína contenida en cada muestra, sin embargo, la capacidad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina del aislado fue 3.8 veces menor a la esperada, considerando la proporción de proteína contenida en la muestra, lo que indica que esta propiedad está determinada por otros componentes que están presentes en la harina y se pierden durante el aislamiento.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Tecnológico Nacional de México por el apoyo económico para la realización del presente proyecto, Clave: 5543.19-P.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflicto de intereses.

Referencias

- Adefegha, S. A., Oyeleye, S. I., & Oboh, G. (2015). Distribution of phenolic contents, antidiabetic potentials, antihypertensive properties, and antioxidative effects of soursop (*Annona muricata* L.) fruit parts *in vitro*. *Biochemistry Research International*, 2015, 1-8. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/347673>
- Alvarado, V., Marco, A., Rahim Foroughbakhch, P., Enrique Jurado, Y., & Alejandra Rocha, E. (2004). Caracterización morfológica y nutricional del fruto de anacahuita (*Cordia boissieri* A. DC.) en dos localidades del Noreste de México:(con 3 cuadros). *Phyton* (Buenos Aires), 73, 85-90. <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v73/v73a09.pdf>
- Araneda, X., Pacheco, A., Martínez, M. I., & Morales, D. (2016). Evaluación bromatológica de la semilla de maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina), Stuntz). *Idesia* (Arica), 34(4), 5-11. doi: <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000012>
- AOAC International. (1995). *Official methods of analysis* (15th ed.). Arlington, Virgilia E.U.A. Ed. The William Byrd.
- Atuonwu, A. C., & Akobundu, E. N. T. (2010). Nutritional and sensory quality of cookies supplemented with defatted pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed flour. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(7), 672-677. <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjn/2010/672-677.pdf>
- Belén-Camacho, D. R., Sánchez, E. D., García, D., Moreno-Álvarez, M. J., & Linares, O. (2004). Características fisicoquímicas y composición en ácidos grasos del aceite extraído de semillas de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) variedades roja y amarilla. *Grasas y Aceites*, 55(4), 428-433. <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/211/211>
- Bernardino-Nicanor, A., Ortiz, A., Martinez, A. L., & Dávila, G. (2007). Guava seed protein isolate: Functional and nutritional characterization. *Journal of Food Biochemistry*, 25(1), 77-90. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00725.x>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Ceballos, A. M., & Montoya, S. (2013). Evaluación química de la fibra en semilla, pulpa y cáscara de tres variedades de aguacate. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 103-112. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/270>
- Chaparro-Acuña, S. P., Lara-Sandoval, A. E., Sandoval-Amador, A., Sosa-Suarique, S. J., Martínez-Zambrano, J. J., & Gil-González, J. H. (2015). Caracterización funcional de la almendra de las semillas de mango (*Mangifera indica* L.). *Ciencia en Desarrollo*, 6(1), 67-75. doi: <https://doi.org/10.19053/01217488.3651>
- Chaparro, S., Tavera, M., Martínez, J., & Gil, J. (2014). Propiedades funcionales de la harina y de los aislados proteicos de la semilla de guanábana (*Annona muricata*). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1), 151-159. doi: <https://doi.org/10.31910/rudca.v17.n1.2014.950>
- Cheung, H., Wang, F., Ondetti, M., Sabo, E., & Cushman, D. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)86187-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)86187-2)
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637-1648. doi: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- Dash, P., & Ghosh, G. (2016). Proteolytic and antioxidant activity of protein fractions of seeds of *Cucurbita moschata*. *Food Bioscience*, 18(4), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.12.004>
- Domínguez, T. G., Ramírez, R. G., Estrada, A. E., Scott, L. M., González, H., & Alvarado, M. S. (2012). Importancia nutrimental en plantas forrajeras del matorral espinoso tamaulipeco. *Ciencia UANL*, 15(59), 77-93. <https://core.ac.uk/download/pdf/76586792.pdf>

- 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. doi: <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Esfandi, R., Walters, M. E., & Tsopmo, A. (2019). Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon*, 5(4), e01538. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01538>
- Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., Gonzalez-Laredo, R. F., & Garcia-Casas, M. A. (2013). Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *CyTA - Journal of Food*, 11(2), 162-170. doi: <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.712057>
- González, L., Álvarez, A., Murillo, E., Guerra, C., & Méndez, J. (2019). Potential uses of the peel and seed of *Passiflora edulis sims* F. Edulis (Gulupa) from its chemical characterization, antioxidant and antihypertensive functionalities. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(10), 1-9. doi: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i10.33828>
- Guerra, D., & Pozo, P. (2018). Análisis proximal y perfil de aminoácidos del aislado proteico del chocho andino ecuatoriano (Fabaceae: *Lupinus mutabilis*). *infoANALÍTICA*, 6(1), 55-66. doi: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7113389>
- Gupta, D., Mann, S., Sood, A., & Gupta, R. K. (2011). Phytochemical, nutritional and antioxidant activity evaluation of seeds of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 336-345. doi: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.641.3771&rep=rep1&type=pdf>
- Hernández-Ledesma, B., Amigo L., Recio I., & Bartolomé, B. (2007). ACE-Inhibitory and radical-scavenging activity of peptides derived from β -lactoglobulin f (19-25). Interactions with Ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3392-3397. doi: <https://doi.org/10.1021/jf063427j>
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, 42(5), 1269-1273. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x>
- Iakshmi, A. J., & Kaul, P. (2011). Nutritional potential, bioaccessibility of minerals and functionality of watermelon (*Citrullus vulgaris*) seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), 1821-1826. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.001>
- İnan, Ö., Özcan, M. M., & Aljuhaimi, F. (2018). Effect of location and *Citrus* species on total phenolic, antioxidant, and radical scavenging activities of some *Citrus* seed and oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13555>
- Kadiri, O., Akanbi, C. T., Olawoye, B. T., & Gbadamosi, S. O. (2017). Characterization and antioxidant evaluation of phenolic compounds extracted from the protein concentrate and protein isolate produced from pawpaw (*Carica papaya* Linn.) seeds. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2423-2436. doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1230874>
- Kuete, V., & Efferth, T. (2010). Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. *Frontiers in Pharmacology Ethnopharmacology*, 1(123), 1-19. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00123>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. doi: <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- León-Espinosa, E. B., Cruz, R. G., Díaz, M., Jiménez, J., García, M., Miranda, G. C., Hernández, A., Mena, M. E., & Rayas, A. A. (2019). *Leucaena leucocephala* (Lam) of Wit and *Moringa oleifera* Lam: Species with high protein value for the release of bioactive peptides. *Agro Productividad*, 12(11), 75-80. doi: <https://doi.org/10.32854/agrop.vi.01503>
- Lozano, R., Tapia, I. L., & Taco, V. J. (2019). Evaluación de las propiedades funcionales del aislado proteico de quinua (*Chenopodium qui-noa* Willd) variedad INIAP-TUNKAHUAN con potencial uso en la nutrición humana. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 44(1), 48-56. doi: https://doi.org/10.29166/ciencias_medicas.v44i1.1969
- López, S. E., Mendoza, C., López, A., Caicedo, M. A., Gil, A. E., & Pazos, A. (2017). Caracterización morfométrica de frutos y semillas de charalina, *Casimiroa edulis* (Rutaceae). *Rebiol*, 37(1), 30-35. doi: <https://core.ac.uk/reader/267888200>

- Mason, E., L'Hocine, L., Achouri, A., Pitre, M., & Karboune, S. (2020). Health promoting bioactive properties of novel hairless canary seed flour after *in vitro* gastrointestinal digestion. *Foods*, 9(7), 932.
 doi: <https://doi.org/10.3390/foods9070932>
- Martínez-Adriano, C. A., Jurado, E., Flores J., González-Rodríguez, H., & Cuéllar-Rodríguez, G. (2016). Flower, fruit phenology and flower traits in *Cordia boissieri* (Boraginaceae) from northeastern Mexico. *PeerJ*, 4, e2033.
 doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.2033>
- Mazloomi, S., Mora, L., Aristoy, M., Mahoonak, A., Ghorbani, M., Houshmand, G., & Toldrá, F. (2020). Impact of simulated gastrointestinal digestion on the biological activity of an alcalase hydrolysate of orange seed (*Siavaraze, Citrus sinensis*) by-products. *Foods*, 9(9), 1217. doi: <https://doi.org/10.3390/foods9091217>
- Medina, C., Paredes, A., Rodríguez, M. E., Moreno, M., Belén-Camacho, D., García, D., & Ojeda, C. (2010). Evaluación de dos métodos de extracción de almidón a partir de cotiledones de mango. *Bioagro*, 22(1), 67-74.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612010000100009&lng=es&nrm=iso
- Medina, O. J., Martínez, J. J., & Zambrano, R. (2011). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuya (*Passiflora edulis* F.). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 9(1), 70-76.
 doi: https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/BISTUA/article/viewFile/32/32
- Msarah, M., & Alsier, A. (2018). Protein digestibility and amino acid content of Malaysian local egg protein prepared by different methods. *Environment & Ecosystem Science (EES)*, 2(1), 07-09.
 doi: <https://doi.org/10.26480/ees.01.2018.07.09>
- Mwaurah, P. W., Kumar, S., Kumar, N., Panghal, A., Attkan, A. K., Singh, V. K., & Garg, M. K. (2020). Physicochemical characteristics, bioactive compounds and industrial applications of mango kernel and its products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(5), 2421-2446. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12598>
- Owais, A. I., Abo-Youssef, A. M., & Osman, A. H. (2017). Leaves of *Cordia boissieri* A. DC. as a potential source of bioactive secondary metabolites for protection against metabolic syndrome-induced in rats. *Zeitschrift für Naturforsch*, 72(3), 107-718. doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2016-0073>
- Owais, A. I., Abo-Youssef, A. M., & Osman, A. H. (2016). Protective effect of *Cordia boissieri* A. DC. (Boraginaceae) on metabolic syndrome. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8), 083-089.
 doi: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60813>
- Pergande, M. R., & Cologna, S. M. (2017). Isoelectric point separations of peptides and proteins. *Proteomes*, 5(1), 4.
 doi: <https://doi.org/10.3390/proteomes5010004>
- Prieto-García, F., Filardo-Kerstup, S., Pérez-Cruz, E., Beltrán-Hernández, R., Román-Gutiérrez, A., & Méndez-Marzo, M. (2006). Caracterización física y química de semillas de opuntias (*Opuntia spp.*) cultivadas en el Estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, 18(3), 163-169.
<http://revencyt.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/bioag/v18n3/articulo5.pdf>
- Queiroz, F., de Almeida, M.G., Brunoro, N. M., Vieira, C., & Passos, F. R. (2016). Capability of *in vitro* digestibility methods to predict *in vivo* digestibility of vegetal and animal proteins. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(1), 5-16. <https://www.alanrevista.org/ediciones/2016/1/art-1/>
- Rossel, E. D., Ortiz, H., Amante, A., Durán, H. M., & López, L. A. (2018). Características físicas y químicas de la semilla de calabaza para mecanización y procesamiento. *Nova scientia*, 10(21), 61-77.
 doi: <https://doi.org/10.21640/ns.v10i21.1467>
- Salazar-Aranda, R., Pérez-Lopez, L. A., López-Arroyo, J., Alanís-Garza, B. A., & Waksman, N. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1-6. doi: <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>
- Sánchez-Reséndiz, A.I., Escalante-Aburto, A., Andía-Ayme, V., & Chuck-Hernández, C. (2019). Propiedades estructurales, evaluación funcional y digestibilidad proteica *in-vitro* de aislados de quinoa negra y amarilla (*Chenopodium petiolare*). *CyTA: Journal of food*, 17(1), 864-872.
 doi: <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1669714>
- Sarkar, A., Kamaruddin, H., Bentley, A., & Wang, S. (2016). Emulsion stabilization by tomato seed protein isolate: Influence of pH, ionic strength and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 57, 160-168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.014>
- Serratos, J. C., Carreón, J., Castañeda, H., Garzón, P., & García, J. C. (2008). Composición químico-nutricional y de factores antinutricionales en semillas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Interciencia*, 33(11), 850-854. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33913612.pdf>

- Shi, C., Li, T., Huang, J., Khan, I. A., Huang, M., & Zhou, G. (2019). Efecto de las condiciones de procesamiento y la digestión gastrointestinal simulada en la actividad del péptido inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) derivado del hidrolizado de carne de pato. *CyTA - Journal of food*, 17(1), 393-399. doi: <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1575909>
- Sorgentini, D. A., Wagner, J. R., & Anon, M. C. N. (15-18 de September de 1996). *Modification of structure and functional properties of soy protein isolates by heat and acid treatments*. Ibero-American Symposium on Proteins for Food CYTED. Buenos Aires, Argentina.
- Teniente-Martínez, G., Bernardino-Nicanor, A., Cariño-Cortés, R., Valadez-Vega, M., Montañez-Soto, J. L., Acosta-García, G., & González-Cruz, L. (2019). Cytotoxic and genotoxic activity of protein isolate of ayocote beans and anticancer activity of their protein fractions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13, 1040-1048. doi: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-0019-7>
- Torres-León, C., Rojas, R., Contreras-Esquível, J. C., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R. E., & Aguilar, C. N. (2016). Mango seed: Functional and nutritional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 109-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.06.009>
- Vargas-León, E. A., Díaz-Batalla, L., González-Cruz, L., Bernardino-Nicanor, A., Castro-Rosas, J., Reynoso-Camacho, R., & Gómez-Aldapa, C. A. (2018). Effects of acid hydrolysis on the free radical scavenging capacity and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme of phenolic compounds of two varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 116, 201-208. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.044>
- Villarroel, M., Zapata, C., Pino, P., & Rubilar, M. (2012). Establecimiento de condiciones óptimas para obtener un aislado proteico de avellana chilena (*Gevuina avellana*, Mol). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 62(1), 79-86. <http://ve.scielo.org/pdf/alan/v62n1/art12.pdf>
- Vit, P., Santiago, B., & Pérez-Pérez, E. M. (2014). Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, 39(5), 350-353. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33930879008.pdf>
- Viveros-Valdez, E., Jaramillo-Mora, C., Orandy-Cárdenas, A., Morán-Martínez, J., & Carranza-Rosales, P. (2016). Antioxidant, cytotoxic and alpha-glucosidase inhibition activities from the Mexican berry "Anacahuita" (*Cordia boissieri*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 211-218. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/11/838447/art-7.pdf>
- Zhang, Z., Wang, Y., Dai, C., He, R., & Ma, H. (2018). Alkali extraction of rice residue protein isolates: Effects of alkali treatment conditions on lysinoalanine formation and structural characterization of lysinoalanine-containing protein. *Food chemistry*, 261. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.027>
- Zhu, Y., Shuai, S., & FitzGerald, R. (2018). Mung bean proteins and peptides: Nutritional, functional and bioactive properties. *Food & nutrition research*, 62. doi: <https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1290>