

# EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL ANTIHIPERTENSIVO DE HIDROLIZADOS DE ALBÚMINA Y GLOBULINA DEL GRANO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO* L. VAR. FORASTERO)

*IN VITRO* EVALUATION OF THE ANTI-HYPERTENSIVE POTENTIAL OF ALBUMIN AND GLOBULIN HYDROLYSATES FROM COCOA BEAN (*THEOBROMA CACAO* L. VAR. FORASTERO)

**Eugenia Lugo Cervantes<sup>1</sup>**  
**Erik Gustavo Tovar Pérez<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Querétaro, México.

\*egtovarpe@conacyt.mx

## Resumen

De acuerdo con informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la hipertensión se considera el factor de riesgo cardiovascular de mayor frecuencia, pues afecta del 25 al 30 % de la población mundial. Uno de los principales agentes causantes es la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA), la cual desempeña un papel fundamental en la regulación de la presión arterial mediante la modulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Debido a lo anterior, existen numerosos fármacos con capacidad de inhibición de la ECA; sin embargo, pueden ocasionar efectos secundarios adversos, como tos, dolor de cabeza, erupciones en la piel, alteración del gusto, angioedema, náuseas y reacciones alérgicas. Por esta razón, hay un creciente interés en la obtención de inhibidores de la ECA de fuentes naturales que permitan disminuir los efectos secundarios y la dependencia de los fármacos. Particularmente, los péptidos bioactivos presentes en hidrolizados enzimáticos de proteína han mostrado propiedades antihipertensivas debido a que inhiben la ECA, por lo que se consideran una alternativa prometedora en la prevención y tratamiento de la hipertensión. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad inhibidora in vitro de la ECA de los hidrolizados enzimáticos obtenidos de proteínas (albúmina y globulina) del grano de cacao; el propósito es demostrar su potencial como fuente natural de agentes antihipertensivos. Como resultado del tratamiento con alcalasa de albúmina y globulina del grano de cacao se obtuvieron hidrolizados con actividad inhibidora de la ECA. Particularmente, a partir de la globulina se generaron hidrolizados y fracciones de péptidos (< 3000 Da) eficaces en la inhibición de la ECA, por lo que podrían considerarse ingredientes bio-funcionales para el desarrollo de alimentos nutracéuticos.

**Palabras clave:** actividad antihipertensiva, grano de cacao, hidrólisis enzimática, péptidos bioactivos, proteínas.

# Abstract

According to reports from the World Health Organization (WHO), hypertension is considered the most common cardiovascular risk factor, affecting 25 to 30% of the world's population. One of the main causative agents is angiotensin-I converting enzyme (ACE), which plays a fundamental role in the regulation of blood pressure by modulating the renin-angiotensin-aldosterone system. Due to the above, there are numerous drugs with ACE inhibitory capacity; however, they can cause adverse side effects, such as cough, headache, skin rash, taste alteration, angioedema, nausea and allergic reactions. For this reason, there is a growing interest in obtaining ACE inhibitors from natural sources to reduce side effects and drug dependence. Particularly, bioactive peptides present in enzymatic protein hydrolysates have shown antihypertensive properties because they inhibit ACE, and are therefore considered a promising alternative in the prevention and treatment of hypertension. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates obtained from cocoa bean proteins (albumin and globulin); the purpose is to demonstrate their potential as a natural source of antihypertensive agents. As a result of alkalase treatment of albumin and globulin from cocoa beans, hydrolysates with ACE inhibitory activity were obtained. Particularly, hydrolysates and peptide fractions (< 3000 Da) effective in ACE inhibition were generated from globulin, so they could be considered bio-functional ingredients for the development of nutraceutical foods.

**Keywords:** Antihypertensive activity, cocoa bean, enzymatic hydrolysis, bioactive peptides, proteins.

---

## Introducción

La hipertensión (presión arterial sistólica y diastólica de 140/90 mmHg y/o superiores) afecta aproximadamente al 25–30 % de la población mundial y se considera una enfermedad crónica; se la relaciona con enfermedades cardiovasculares (infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular, enfermedad coronaria, arteriosclerosis, entre otras) y afecciones como la insuficiencia renal) [1].



La hipertensión se considera el factor de riesgo cardiovascular más común afectando del 25 al 30 % de la población. Uno de los principales causantes, es la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA). Sin embargo, es posible encontrar una amplia disponibilidad de fármacos con capacidad de inhibición de la ECA.

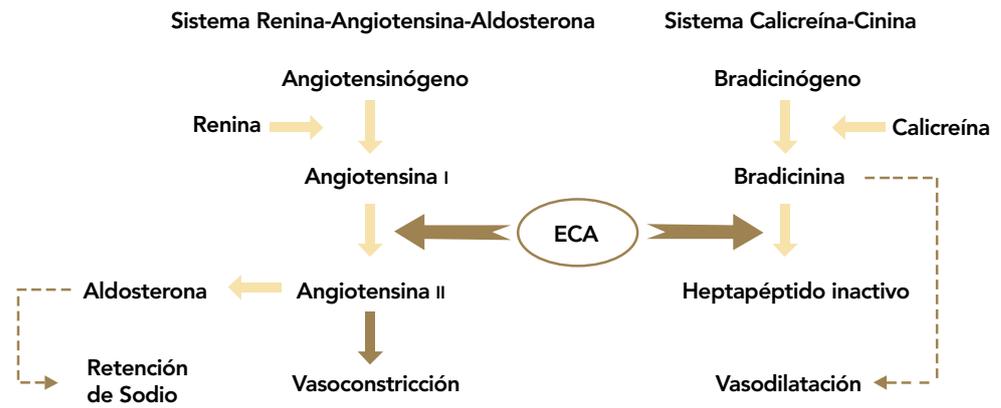
La enzima convertidora de angiotensina-I (ECA) es una dipeptidil carboxipeptidasa I (EC 3.4.15.1) que forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona, donde cataliza la formación de angiotensina II, un potente vasoconstrictor. También se estimula la secreción de aldosterona y se induce

la expresión de potasio y la retención de sodio y agua, incrementando el volumen extracelular y neutralizando la expresión de renina [1]. Además, la ECA actúa de manera simultánea en el sistema calicreína-cinina, catalizando la degradación de bradiginina, hormona peptídica de potente acción vasodilatadora [2], [3]. A causa de los procesos anteriores, la ECA favorece el aumento de la presión arterial (Figura 1); por tanto, existe una amplia disponibilidad de fármacos que la inhiben, entre los cuales se encuentran el captopril, enalapril, lisinopril y perindopril. Sin embargo, estos medicamentos pueden ocasionar efectos secundarios adversos, como tos, dolor de cabeza, sarpullido, alteración del gusto, angioedema, náuseas y alergias [4].

En las últimas dos décadas, se han atribuido beneficios en la salud (antioxidante, antihipertensivo, hipocolesterolémico, antitrombótico, entre otros) a fragmentos proteínicos específicos con capacidad moduladora de procesos fisiológicos, llamados péptidos bioactivos (PB) [5]. Particularmente, el efecto antihipertensivo de los PB se debe a que inhiben la actividad de la ECA; su mecanismo de acción es similar al de los fármacos, ya que son capaces de unirse al sitio activo de la ECA (inhibición competitiva). Sin embargo, hay excepciones, ya que algunos péptidos se unen a la ECA en sitios diferentes al activo (inhibición no competitiva) o combinarse con el complejo enzima-sustrato (inhibición acompetitiva), impidiendo que se lleve a cabo la reacción [2].



FIGURA 1. Modelo de regulación de la presión arterial mediante la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) en el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona y Sistema Caliceína-Cinina.



Dado que los PB se encuentran "inactivos" cuando forman parte de las proteínas, es necesario que se promueva su liberación. Por fortuna, los procesos biotecnológicos actuales gozan de un mayor potencial industrial y comercial para la síntesis de hidrolizados a partir de fuentes alimentarias de origen vegetal [4]. En este contexto, la hidrólisis enzimática de proteínas es el bioproceso preferido para la generación de péptidos: es fácil de controlar, no forma subproductos y permite aprovechar una gran variedad de enzimas proteolíticas de origen animal, vegetal y microbiano [5].

En el caso particular de las especies vegetales, las proteínas se obtienen principalmente de cereales, pseudocereales, leguminosas y oleaginosas [4]. No obstante, en los últimos años ha crecido el interés por nuevas fuentes con potencial terapéutico en beneficio de la salud. En este sentido destaca el grano de cacao, obtenido de la semilla fermentada y secada de los frutos del árbol tropical *Theobroma cacao* L. (familia *Sterculiaceae*). En América Central, Sudamérica, África Central y Asia se cultivan las subespecies criollo, forastero y trinitario [6], y en las tres el componente principal del grano de cacao es la grasa (47-55 %). Dicha materia se explota ampliamente en la industria de fabricación de chocolate, productos farmacéuticos y cosméticos [7]. Asimismo, el segundo componente por abundancia es la proteína (10-15 %), la cual se constituye por cuatro fracciones: albúmina, globulina, prolamina y glutelina [8].

Actualmente, la variedad forastero representa aproximadamente el 70 % de la producción mundial del cacao y se cultiva en los estados de Chiapas y Tabasco [9]; se caracteriza por su resistencia a enfermedades, baja demanda de nutrientes y alto rendimiento de frutos, a diferencia de la variedad criollo.



Los efectos bio-funcionales del cacao están relacionados con los compuestos fenólicos, aunque en años recientes las proteínas y los péptidos derivados de las mismas han cobrado importancia. Debido a sus propiedades antioxidantes [8], antitumorales [9], antiadipogénicas [10] y antihipertensivas [11], son aprovechables en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, cáncer, obesidad e hipertensión.



Hasta la fecha, la actividad antihipertensiva del cacao se ha determinado específicamente en la variedad criollo (que debido a sus características organolépticas se destina principalmente a la elaboración de chocolates de alta calidad) [11]. Por lo anterior, este trabajo pretende evaluar in vitro la albúmina y globulina obtenidas del cacao forastero, sus hidrolizados enzimáticos y fracciones de péptidos en términos de la capacidad para inhibir la ECA. La finalidad es validar este recurso como una fuente natural de agentes peptídicos antihipertensivos.

## Metodología / Materiales y Métodos

### Material vegetal



Vainas de cacao (*Theobroma cacao* L., variedad forastero) cosechadas en mayo de 2017 por métodos tradicionales en plantaciones en el municipio de Comalcalco, Estado de Tabasco, México. Las semillas frescas se fermentaron a temperatura ambiente en cajas de madera (100 cm<sup>3</sup>) durante 6 días, se lavaron con agua para eliminar los restos de mucílago y se secaron a 40 °C durante 8 horas. Posteriormente, los granos de cacao se descascarillaron a mano y se trituraron con un mortero de pistilo.

### Desgrasado de grano de cacao

De 3-4 kg de granos triturados se desgrasaron por el método de Soxhlet durante 24 horas con éter de petróleo (7 ml/g) como solvente. Posteriormente, se colocaron en una campana de extracción durante 24 horas para permitir la evaporación del solvente. Finalmente, se almacenaron en refrigeración a 4 °C.





## Preparación del extracto seco acetónico

Los alcaloides se extrajeron parcialmente con cloroformo (2.5 ml/g) durante 8 horas en un aparato Soxhlet y posteriormente los granos triturados se colocaron en una campana de extracción durante 24 horas para permitir la evaporación del solvente. A continuación, para eliminar los polifenoles se siguió el método descrito por [12] con algunas modificaciones de [13]. A partir de los granos triturados, los polifenoles se extrajeron tres veces con acetona al 80 % (v/v) (que contiene ascorbato de sodio 5 mM) y posteriormente cinco veces con acetona al 70 % (v/v). Las suspensiones (20 ml/g) se agitaron durante 1 hora a 4 °C y se centrifugaron a 13 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Después del paso final de extracción, se comprobó la eficiencia mediante una prueba con ácido clorhídrico 5 M (un color rojo indica la presencia de polifenoles residuales) [13]. Tras la extracción completa de polifenoles, el agua residual se eliminó mediante extracción con acetona al 100 % y el extracto obtenido se evaporó a sequedad. Finalmente, el extracto seco acetónico (ACDP, por sus siglas en inglés) se molió con un molino IKA (IKA®A11 basic), se tamizó a través de una malla de 150 µm (tamiz no. 100) y se almacenó a 4 °C.

## Extracción de proteínas

La extracción de las proteínas se realizó siguiendo el método de [13] con algunas modificaciones. A partir del ACDP, las fracciones de albúmina (*Alb*) y globulina (*Glob*), se extrajeron sucesivamente con Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (que contiene EDTA 2 mM) y cloruro de sodio 0.5 M (que contiene EDTA 2 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7.5), respectivamente. Las suspensiones (1:10 p:v) se agitaron durante 4 horas a 4 °C y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Cada sobrenadante se dializó en membranas (peso molecular de corte de 14 kDa) con agua desionizada durante 48 horas a 4 °C, con un cambio de agua cada 24 horas. El contenido de los tubos de diálisis se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Los sobrenadantes obtenidos corresponden a cada una de las fracciones de proteína (*Alb* y *Glob*), las cuales se liofilizaron y almacenaron a -20 °C.

La concentración de proteína soluble en cada una de las fracciones se determinó espectrofotométricamente por el método de Bradford [14], previa elaboración de una curva patrón de albúmina de suero bovino (0-1 mg/ml).

El rendimiento de extracción se expresó en miligramos de proteína por gramo de ACDP.

## Preparación de hidrolizados de proteína

La hidrólisis enzimática *in vitro* de las fracciones de proteína (*Alb* y *Glob*) se realizó siguiendo el procedimiento de [8] y utilizando alcalasa (EC 3.4.21.62, proteasa de *Bacillus licheniformis*, actividad específica 2.4 U/g proteína, Sigma-Aldrich®) a una relación enzima:sustrato (E:S) de 1:10 (p:p), pH 7.5 y 50 °C. La hidrólisis se llevó a cabo durante 2, 6 y 8 horas (tiempo de hidrólisis establecido en un estudio previo para la obtención de hidrolizados antioxidantes de glutelinas de la variedad forastero) [8]. Al final de cada tiempo, la muestra se calentó a 90 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima alcalasa. Todas las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes, denominados hidrolizados de albúmina (H-*Alb*) y globulina (H-*Glob*), se almacenaron a -20 °C.

## Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó espectrofotométricamente por el método de [15] mediante la cuantificación de grupos amino libres que reaccionan con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS por sus siglas en inglés), previa elaboración de una curva patrón de L-Leucina (0 – 2.5 mM). Los valores de GH se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$GH (\%) = \left[ \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \right] \times 100$$

Donde  $L_t$  es la cantidad de grupos amino liberados tras la hidrólisis enzimática;  $L_0$  es la cantidad de grupos amino libres en las fracciones de proteína extraídas (*Alb* o *Glob*) y  $L_{max}$  es la cantidad total de grupos amino liberados tras la hidrólisis total (con HCl 6 N, 24 horas) de las fracciones de proteína (*Alb* o *Glob*).

## Ultrafiltración

Para la separación de péptidos en los hidrolizados enzimáticos (H-*Alb* y H-*Glob*) que presentaron el mayor GH, se utilizó una membrana de ultrafil-





tración con un tamaño de corte de peso molecular ( $P_M$ ) de 3000 Da (Millipore, Bedford, MA, USA), centrifugando a 5000 rpm durante 30 minutos. Para cada hidrolizado enzimático de *Alb* y *Glob* se obtuvieron fracciones de péptidos con  $P_M$  menores a 3000 Da, los cuales se denominaron *UF-Alb* y *UF-Glob*, respectivamente. El contenido de péptidos solubles se determinó espectrofotométricamente por el método de *TNBS* [15] descrito anteriormente.

## Ensayo de la actividad inhibidora de la ECA

La actividad inhibidora de la *ECA* se determinó espectrofotométricamente de acuerdo al método de [16] utilizando hipuril-L-histidil-L-leucina (*HHL*) como sustrato. El ensayo se llevó a cabo añadiendo 150  $\mu\text{L}$  de búfer de borato 0.2 M (pH 8.3) y 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 300  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, se agregó una alícuota (50  $\mu\text{L}$ ) de muestra (proteína, hidrolizado enzimático o ultrafiltrado) o de búfer de fosfatos de potasio 40  $\mu\text{M}$ , pH 8.3 (control), se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  de *ECA* (165 mU) y se incubó a 37°C por 5 minutos. Enseguida se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de *HHL* 20mM (a 37°C) y se continuó la incubación durante 30 minutos. La reacción se detuvo por inmersión de los tubos en baño de agua caliente (80 – 90 °C) durante 10 minutos, posteriormente se añadió 1 mL de búfer de fosfatos de potasio 0.2 M, pH 8.3 y 1.5 mL de 2,4,6 tricloro-s-triazina (3% p/v en dioxano). La mezcla se agitó en vortex (hasta que se mostró transparente) y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Finalmente, en el sobrenadante se realizó la medición de la absorbancia a 382 nm, previa elaboración de una curva patrón de ácido hipúrico (0 – 50  $\mu\text{g}$ ).

Una unidad (U) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima (*ECA*) que hidroliza 1  $\mu\text{mol}$  de *HHL* formando ácido hipúrico y liberando L-histidil-L-leucina en 1 minuto a 37°C.

## Análisis estadístico

Los resultados se muestran como medias  $\pm$  desviaciones estándar. Las diferencias significativas de los resultados se determinaron mediante análisis de varianza y prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $P < 0.05$ ) utilizando el software Statgraphics Centurion *xvi*.



## Resultados y discusión

**TABLA 1.** Contenido de albúmina (*Alb*) y globulina (*Glob*) extraídas del grano de cacao.

PROTEÍNA	PROPORCIÓN DE PROTEÍNA	
	(MG/G ACDP)	( % )*
ALBÚMINA (ALB)	6.43 ± 0.35	55.6 ± 1.2
GLOBULINA (GLOB)	5.13 ± 0.32	44.4 ± 1.2
RELACIÓN ALB/GLOB	1.25 ± 0.06	

(\*) Representa el % de la proteína total extraída.

El rendimiento de extracción de *Alb* y *Glob* concuerda con lo reportado previamente por [8], sin embargo resultó significativamente menor a lo mencionado por [13]. Diversos estudios realizados en grano de cacao han reportado distintos contenido y distribución porcentual de las fracciones *Alb* y *Glob*. Estas diferencias se han atribuido a diversos factores como la variedad del cacao, método de extracción y fraccionamiento utilizado, tamaño de lote, uso de agentes reductores, aplicación de pretratamientos, condiciones de fermentación y almacenamiento del grano [17]. En este sentido, se ha demostrado que durante el proceso de fermentación ocurre una degradación de las fracciones de *Alb* y *Glob* relacionada con la formación de compuestos precursores del aroma característico del cacao [13], [18].

Los hidrolizados de proteína se pueden producir principalmente por hidrólisis química, enzimática o fermentación. El método de hidrólisis enzimáti-





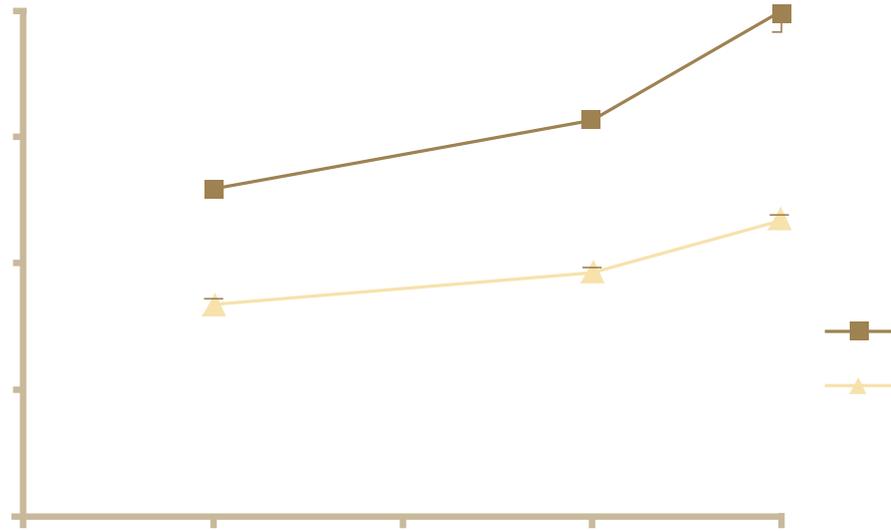
ca presenta varias ventajas como condiciones moderadas de temperatura y pH durante el proceso, facilidad para controlar la reacción, no hay formación de subproductos, se conserva el valor nutritivo y se dispone de una gran variedad de enzimas proteolíticas (de origen vegetal, animal y microbiano) [19]. Particularmente, en este trabajo, la hidrólisis de *Alb* y *Glob* se llevó a cabo con la enzima alcalasa, la cual es utilizada ampliamente para la producción de hidrolizados de proteína y PB, ya que es una proteasa de origen microbiano (de bajo costo) que presenta amplia especificidad.

El grado de hidrólisis (GH) se utiliza como un parámetro para el seguimiento de la proteólisis enzimática y es el indicador más empleado para la comparación entre hidrolizados enzimáticos de proteína. En la Figura 2 se muestran los valores obtenidos de GH para las combinaciones de tiempo y relación E:S ensayadas para la hidrólisis de *Alb* y *Glob* con alcalasa. Los valores de GH se encontraron entre 8.3-11.7 % y 12.9-19.8 % para *Alb* y *Glob*, respectivamente. Los porcentajes superiores en *Alb* podrían deberse a que esta fracción se considera una proteína constitutiva; por otro lado, la *Glob* es una proteína de almacenamiento, menos accesible a la acción de la alcalasa. Además, la fracción de *Glob* se compone principalmente por unidades de mayor PM que las contenidas en la fracción de *Alb* [11], [13].

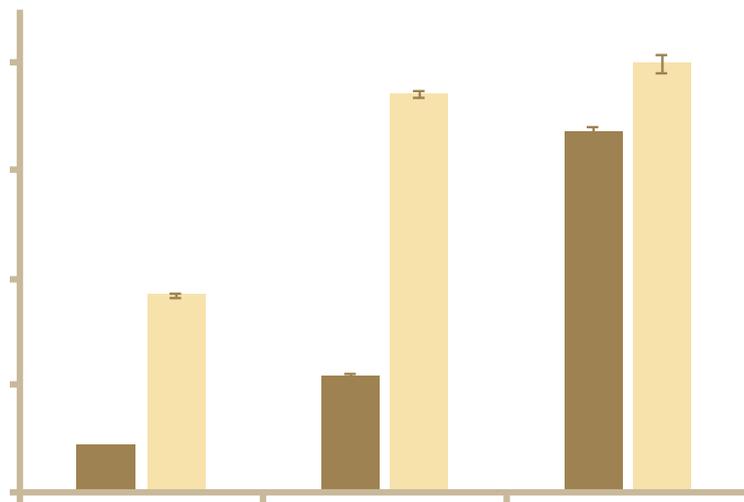
Como se mencionó anteriormente, el GH es una propiedad fundamental que puede determinar en gran medida el posible uso de los hidrolizados de proteína. Con respecto a este parámetro, los hidrolizados con GH superior al 10 % se aprovechan principalmente en la formulación de suplementos alimenticios, liberación de PB y como fuente de nitrógeno en dietas de individuos que presentan alergenicidad o errores metabólicos específicos [20]. En el presente estudio, 4 de 6 hidrolizados mostraron un GH mayor al 10 %, por lo que los hidrolizados de *Alb* y *Glob* podrían ser utilizados para estos propósitos. Adicionalmente, debido a que los PB se consideran como secuencias de cadena corta (2 a 20 aminoácidos) con PM de 250-3000 Da, la separación de péptidos en los hidrolizados de *Alb* y *Glob* se llevó a cabo por ultrafiltración con membranas, ya que es un proceso adecuado para el fraccionamiento de cadenas peptídicas con un rango de PM específico.



**FIGURA 2.** Grado de hidrólisis (%) obtenido en los hidrolizados de albúmina (H-*Alb*) y globulina (H-*Glob*) a diferente tiempo de hidrólisis con alcalasa. Los resultados se representan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 3). Letras distintas indican diferencia significativa (P < 0.05).



**FIGURA 3.** Inhibición de la ECA (%) de albúmina (*Alb*) y globulina (*Glob*), hidrolizados enzimáticos y fracciones de péptidos < 3000 Da (ultrafiltrados). La concentración final de las muestras en los ensayos fue de 100  $\mu$ g/mL. Los resultados se representan como media  $\pm$  desviación estándar (n = 3). Letras distintas indican diferencia significativa (P < 0.05).



La actividad antihipertensiva (*in vitro*) de *Alb* y *Glob*, hidrolizados enzimáticos y ultrafiltrados obtenidos del cacao se evaluó mediante la inhibición de la ECA (Figura 3). Inicialmente, ambas fracciones proteínicas (sin hidrolizar) presentaron actividad inhibidora de la ECA, mostrando valores de 4.4 % y 18.3 % para *Alb* y *Glob*, respectivamente. Así mismo, la hidrólisis de *Alb* y *Glob* con alcalasa, como la separación por ultrafiltración de fracciones de péptidos, resultó en un incremento de la inhibición de la ECA. Las tasas más altas de inhibición de la ECA fueron de 36.9 % y 39.8 % obtenidas en los hidrolizados y ultrafiltrados de *Glob*.

De igual manera, se observó que las muestras (proteína, hidrolizado y ultrafiltrado) provenientes de *Glob* tienen mayor capacidad de inhibición



de la *ECA* con respecto a las muestras provenientes de *Alb*. Estos resultados indican que la *Glob* representa una fuente más propicia de péptidos inhibidores de la *ECA*. En este sentido, los hidrolizados de *Alb* y *Glob* pueden estar compuestos de péptidos que presentan en su estructura aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o ramificados) e hidrofílicos, ya que la alcalasa hidroliza enlaces peptídicos con una amplia especificidad. Sin embargo, los péptidos con mayor actividad inhibidora de la *ECA* contienen principalmente aminoácidos hidrofóbicos en su C-terminal [21], [22]. Por lo anterior, la mayor actividad inhibidora de la *ECA* mostrada por la *Glob* (y sus hidrolizados o ultrafiltrados) puede deberse a una mayor presencia de aminoácidos hidrofóbicos (principalmente alanina, leucina, isoleucina, prolina y valina) en comparación con la fracción de *Alb* [23], [24].

Diversos trabajos han reportado que la actividad antihipertensiva *in vitro* se debe a la liberación de péptidos con *PM* entre 1500 y 3000 Da, ya que estos son capaces de unirse al sitio activo de la *ECA* (inhibición competitiva) [21], [22]. Por otro lado, estudios de acoplamiento molecular han demostrado que moléculas peptídicas de alto *PM* son incompatibles con el sitio activo de la *ECA*, por lo que su mecanismo se debe a que interactúan con la *ECA* en sitios diferentes al sitio activo y logran acoplarse al complejo enzima-sustrato (inhibición no competitiva y/o acompetitiva) [2], [22]. Por lo anterior, en este trabajo las fracciones de péptidos ultrafiltradas (*PM* < 3000 Da) mostraron mayor inhibición de la *ECA* que las proteínas e hidrolizados enzimáticos.

Los porcentajes de inhibición de la *ECA* que se obtuvieron en los hidrolizados de *Alb* y *Glob* se encuentran en el rango reportado (10-60 %) para hidrolizados enzimáticos de otras fuentes vegetales como cereales [25], pseudocereales [16] y leguminosas [26]. Cabe mencionar que el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial antihipertensivo de hidrolizados enzimáticos y de fracciones de péptidos parcialmente purificados (en base a su *PM*) mediante el proceso de *UF*, más no la caracterización ni purificación de los péptidos, ya que desde el punto de vista de producción y comercialización, un hidrolizado sería un producto más factible y rentable de aplicar a nivel industrial.

De tal manera, los resultados de este trabajo pueden servir como base en la realización de futuros estudios del potencial antihipertensivo de estos compuestos. En este sentido, posteriormente sería necesario optimizar el proceso de producción de los hidrolizados, así como efectuar estudios utilizando métodos *in vivo* y determinar el valor *IC50* (concentración de pép-



tido que se requiere para inhibir el 50% de la actividad de la ECA [20]. Por otro lado, si lo que interesa es la aplicación en la industria farmacéutica, también sería necesario llevar a cabo una purificación más extensa y la secuenciación de las cadenas peptídicas.

---

## Conclusiones

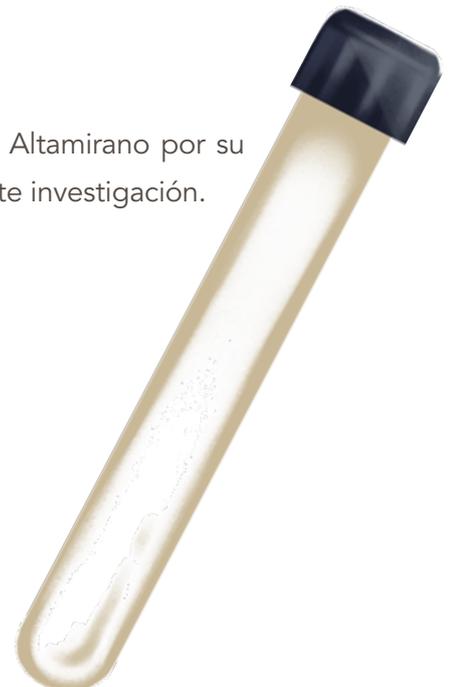
Hasta el momento, y según nuestras investigaciones, este es el primer estudio que realiza la producción de hidrolizados enzimáticos de albúmina y globulina del grano de cacao variedad forastero con actividad inhibidora de la ECA. La obtención de los hidrolizados proporciona valor agregado al cultivo de cacao de la variedad forastero mediante el aprovechamiento de sus proteínas (específicamente albúmina y globulina). Debido a que los hidrolizados de proteína poseen la denominación de sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), los hidrolizados de proteína (principalmente de globulina) del grano de cacao con propiedades antihipertensivas *in vitro* representarían una alternativa para prevenir la hipertensión arterial.

El presente trabajo puede ser utilizado como referencia para futuras investigaciones enfocadas en la caracterización y secuenciación de los péptidos presentes en los hidrolizados, así como en la elucidación de los mecanismos de acción sobre la ECA y la optimización del proceso de hidrólisis enzimática. Adicionalmente, se requieren estudios *in vivo* con ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés) y estudios clínicos para determinar la estabilidad de la actividad biológica de estos compuestos.

---

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la I.B. Blanca Cristóbal Altamirano por su apoyo técnico durante la realización de la presente investigación.





## Referencias

- [1] I.U. Okagu, T.P.C. Ezeorba, E.C. Aham, R.N. Aguchem, and R.N. Nechi, "Recent findings on the cellular and molecular mechanisms of action of novel food-derived antihypertensive peptides," *Food chemistry: molecular sciences*, vol. 4, p. 100078, 2022.
- [2] N. Shobako, "Hypotensive peptides derived from plant proteins," *Peptides*, vol. 142, p. 170573, 2021.
- [3] A.V. Quiroga, P. Aphalo, A.E. Nardo, and M.C. Añón, "In Vitro Modulation of Renin–Angiotensin System Enzymes by Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein-Derived Peptides: Alternative Mechanisms Different from ACE Inhibition," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 65, pp. 7415-7423, 2017.
- [4] M. Manzoor, J. Singh, and A. Gani, "Exploration of bioactive peptides from various origin as promising nutraceutical treasures: *In vitro*, *in silico* and *in vivo* studies," *Food Chemistry*, vol. 373, p. 131395, 2022.
- [5] A. Dullius, M.I. Goettert, and C.F. Volken de Souza, "Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods – biotechnological facilitation of industrial scale-up," *Journal of Functional Foods*, vol. 42, pp. 58-74, 2018.
- [6] A. Bertazzo, S. Comai, I. Brunato, M. Zancato, and C.V.L. Costa, "The content of protein and non-protein (free and protein-bound) tryptophan in *Theobroma cacao* beans," *Food Chemistry*, vol. 124, pp. 93-96, 2011.
- [7] M. Rusconi, and A. Conti, "*Theobroma cacao* L. the food of the gods: a scientific approach beyond myths and claims," *Pharmacological Research*, vol. 61, no. 1, pp. 5-13, 2010.
- [8] E.G. Tovar-Pérez, L. Guerrero-Becerra, and E. Lugo-Cervantes, "Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of glutelin from cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed," *CyTA - Journal of Food*, vol. 15, no. 4, pp. 489-496, 2017.
- [9] A.M. Preza, M.E. Jaramillo, A.M. Puebla, J.C. Mateos, R. Hernández, and E. Lugo, "Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cacao (*Theobroma cacao* L.) seeds in relation with *in vitro* antioxidant activity," *BMC-Complementary and Alternative Medicine*, vol. 10, no. 61, pp. 1-12, 2010.





- [10] L.J. Coronado-Cáceres, G. Rabadán-Chavez, L. Quevedo-Corona, B. Hernández-Ledesma, A. Miliar-García, L. Mojica, and E. Lugo-Cervantes, "Anti-obesity effect of cocoa proteins (*Theobroma cacao* L.) variety "Criollo" and the expression of genes related to the dysfunction of white adipose tissue in high-fat diet-induced obese rats," *Journal of Functional Foods*, vol. 62, p. 103519, 2019.
- [11] L.J. Coronado-Cáceres, B. Hernández-Ledesma, L. Mojica, L. Quevedo-Corona, G. Rabadán-Chavez, G.A. Castillo-Herrera, and E. Lugo-Cervantes, "Cocoa (*Theobroma cacao* L.) seed-derived peptides reduce blood pressure by interacting with the catalytic site of the angiotensin-converting enzyme," *Foods*, vol. 10, no. 10, p. 2340, 2021.
- [12] P.M. Kirchoff, B. Biehl, and G. Crone, G, "Peculiarity of the accumulation of free amino acids during cocoa fermentation," *Food Chemistry*, vol. 31, no. 4, pp. 295-311, 1989.
- [13] J. Voigt, B. Biehl and S. K. Syed Wazir, "The major seed proteins of *Theobroma cacao* L.," *Food Chemistry*, vol. 47, no. 2, pp. 145-151, 1993.
- [14] M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [15] J. Adler-Nissen, "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 27, no. 6, pp. 1256-1262, 1979.
- [16] E.G. Tovar-Pérez, I. Guerrero-Legarreta, A. Farrés-González, and J. Soriano-Santos, "Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain," *Food Chemistry*, vol. 116, no. 2, pp. 437-444, 2009.
- [17] T.P. Castro-Jácome, L.E. Alcántara-Quintana, E. Lugo-Cervantes, E. Montalvo- González, R.I. Ortiz-Basurto, and E.G. Tovar-Pérez, "Anti-elastase, anti-tyrosinase and antioxidant properties of a peptide fraction obtained from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain," *International Food Research Journal*, vol. 26, no. 6, pp. 1813-1822, 2019.
- [18] T. Romero-Cortes, M.A. Salgado-Cervantes, P. García-Alamillo, M.A. García-Alvarado, G.C. Rodríguez-Jimenes, M. Hidalgo-Morales, and V. Robles-Olvera, "Relationship between



fermentation index and other biochemical changes evaluated during the fermentation of Mexican cocoa (*Theobroma cacao*) beans," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, no. 10, pp. 2596-2604, 2013.

- [19] Y. Chen, H. Li, Y. Shen, C. Zhang, X. Kong, X. Li, and Y. Hua, "Endopeptidases, exopeptidases, and glutamate decarboxylase in soybean water extract and their *in vitro* activity," *Food Chemistry*, vol. 360, p. 130026, 2021.
- [20] E.G. Tovar-Pérez, A. Lugo-Radillo, and S. Aguilera-Aguirre, "Amaranth grain as a potential source of biologically active peptides: a review of their identification, production, bioactivity, and characterization," *Food Reviews International*, vol.35, no. 3, pp. 221-245, 2019.
- [21] D. Xie, L. Du, H. Lin, E. Su, Y. Shen, J. Xie, and D. Wei, "In vitro-in silico screening strategy and mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from  $\alpha$ -lactalbumin," *LWT*, vol 156, p. 112984, 2022.
- [22] I.U. Okagu, T.P.C. Ezeorba, E.C. Aham, R.N. Aguchem, and R.N. Nechi, "Recent findings on the cellular and molecular mechanisms of action of novel food-derived antihypertensive peptides," *Food Chemistry: Molecular Sciences*, vol. 4, p. 100078, 2022.
- [23] L. Abecia-Soria, N.H. Pezoa-García, and J. Amaya-Farfa, "Soluble Albumin and Biological Value of Protein in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Beans as a Function of Roasting Time," *Journal of Food Science*, vol. 70, no. 4, pp. S294-S298, 2005.
- [24] D.L. Zak, and P.G. Keeney, "Extraction and Fractionation of Cocoa Proteins as Applied to Several Varieties of Cocoa Beans," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 24, no. 3, pp. 479-482, 1976.
- [25] X. Gong, Q. An, L. Le, F. Geng, L. Jiang, J. Yan, D. Xiang, L. Peng, L. Zou, G. Zhao, and Y. Wan, "Prospects of cereal protein-derived bioactive peptides: Sources, bioactivities diversity, and production," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, no. 11, pp. 2855-2871, 2022.
- [26] X. Rui, J.I. Boye, B.K. Simpson, and S.O. Prasher, "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of *Phaseolus vulgaris* bean hydrolysates: Effects of different thermal and enzymatic digestion treatments," *Food Research International*, vol. 49, pp. 739-746, 2012.

