

PROPIEDADES FUNCIONALES DE PÉPTIDOS DE SEMILLAS DE CHÍA COMERCIAL (*SALVIA HISPANICA*) Y SILVESTRE (*SALVIA TILIIFOLIA*)

Martínez Hernández, Cristina ⁽¹⁾, Orona Tamayo, Domancar ⁽²⁾, Valverde González, María Elena ⁽²⁾, Paredes López, Octavio ⁽²⁾

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | cristina.mtz.hdz@hotmail.com
2 [Depto. Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV-Irapuato] | mvalverd@ira.cinvestav.mx; oparedes@ira.cinvestav.mx

Resumen

La chía es una planta utilizada desde la época prehispánica; actualmente, ha vuelto a tomar fuerza gracias al contenido nutricional que presenta: ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6, aminoácidos esenciales, fibra dietética, vitaminas, minerales; además, proteínas de reserva con péptidos bioactivos, los cuales presentan propiedades nutraceuticas. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue caracterizar proteínas de reserva en semillas de chía negra comercial (*Salvia hispanica*) y silvestre (*Salvia tiliifolia*), y evaluar *in vitro* las propiedades antioxidantes y antihipertensivas de péptidos liberados. Para esto se extrajeron fracciones proteicas; la fracción globulinas en ambas líneas fue la mayoritaria, seguida de albuminas, glutelinas y prolaminas; estos resultados fueron sustentados por patrones electroforéticos en SDS-PAGE. Péptidos liberados de cada fracción fueron confrontados contra radicales ABTS y DPPH; péptidos de prolaminas y harinas fueron más efectivos contra ambos radicales en chía comercial y silvestre, respectivamente. También, los péptidos fueron confrontados con la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), enzima asociada con la hipertensión. Péptidos de globulinas fueron más eficientes en NP y para WT fueron de albuminas. Por esto se puede considerar a la chía como un alimento altamente nutraceutico, que con un consumo continuo podría ayudar a disminuir el riesgo de enfermedades degenerativas.

Abstract

Chia is a plant used from pre-Hispanic times. Nowadays, the seed has taken presence due to nutritional content such as: polyunsaturated fatty acids ω -3 and ω -6, dietary fiber, vitamins, minerals, essential amino acids, and, storage proteins that encrypted bioactive peptides with different nutraceutical properties. The objective of this project was to characterize storage proteins, and the antioxidant and antihypertensive properties *in vitro* of bioactive peptides released by peptidases from different chia seeds, a commercial seed (*Salvia hispanica*) and wild (*Salvia tiliifolia*) cultivar. Storage proteins were fractionated and globulin was the main fraction, followed by albumin, glutelin and prolamin protein fractions; this result was corroborated by electrophoretic protein profile in SDS-PAGE. Peptides obtained of each fraction were confronted to ABTS and DPPH radicals and peptides of prolamina (commercial seed) and globulin (wild seed) fraction showed the most effective antiradical activity against these oxidants. Peptides were confronted to inactivate the activity of Angiotensin Converting Enzyme (ACE), which is associated with hypertension, and peptides from globulin and albumin fraction were the most effective against ACE. Chia can be considered a nutraceutic food, that continuous intake could be reduce diverse diseases and cell oxidation.

Palabras Clave

Péptidos bioactivos; actividad antioxidante; actividad antihipertensiva; enzima convertidora de angiotensina (ACE); electroforesis (SDS-PAGE)

INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispanica*) es originaria de Mesoamérica. Para las culturas mesoamericanas, la chía constituía parte de su dieta y se considera que fue un alimento básico tan importante como el maíz [2] ya que la utilizaron como medicina e incluso en la preparación de ciertas ofrendas como tributo a los dioses y como un complemento alimenticio en la preparación de alimentos [3].

La chía es una planta herbácea anual que crece en climas áridos y semiáridos, además es considerada un pseudocereal [4]. La semilla se considera oleaginosa, ya que está constituida principalmente por lípidos (40%), de los cuales 60% son omega-3 y 19 % omega-6 [4, 5]. Los ácidos grasos previenen enfermedades como la hipertensión y enfermedades cardiovasculares e inflamatorias [6]. También, contiene fibra dietética (33.5 %) que ayuda a disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades del corazón, hipertensión, diabetes, obesidad y algunas enfermedades gastrointestinales [4, 7]; antioxidantes naturales (principalmente fenoles), los cuales previenen la oxidación celular y las enfermedades que esta conlleva como la enfermedad coronaria y el cáncer [5]; vitaminas (A, B, C y E) y minerales [5]. Además, son una excelente fuente de proteínas de reserva (19-23%), las cuales presentan péptidos bioactivos con actividad antioxidante y antihipertensiva [4, 8]. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las proteínas de reserva en semillas de dos líneas de chía, una comercial denominada cultivar Negra de Puebla (*Salvia hispanica*) (NP) y una silvestre (*Salvia tiliifolia*) (WT); así como evaluar *in vitro* las propiedades antioxidantes y antihipertensivas de sus péptidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Las semillas de chía comercial (*Salvia hispanica*) (NP) son provenientes del estado de Puebla y las de chía silvestre (*Salvia tiliifolia*) (WT) provienen de Valle de Santiago, Gto. Las semillas se hidrataron en una relación 1:10 (g:ml) para permitir la formación de mucilago, posteriormente se

congelaron durante toda la noche a -80 °C y se liofilizaron [8]. El mucilago se retiró mecánicamente tamizándolo en una malla metálica con apertura de 500 µm. Las semillas libres de mucilago se molieron y la harina resultante se desgrasó con hexano en una relación 1:10 (g:ml). La harina desgrasada se dejó bajo una campana de extracción durante la noche y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Extracción de fracciones proteínicas

La extracción de las diferentes fracciones de proteína se llevó a cabo de acuerdo a la clasificación de Osborne y por el método reportado por Orón-Tamayo *et al.* [8]. La harina se resuspendió en agua destilada en una relación 1:10 (g:ml), la suspensión se dejó agitando por 1 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4 °C, colectando el sobrenadante y designando éste como la fracción de albumina (Alb). Después, el sedimento se resuspendió en una mezcla de Tris-HCl 0.05 M (pH 8.8) y NaCl 0.5 M y se procesó como anteriormente; el sobrenadante se colectó y designó como globulina (Glob). En la tercera extracción, el sedimento se resuspendió en isopropanol al 70% y se obtuvo la fracción de prolaminas (Prol). Las glutelinas (Glut) se obtuvieron resuspendiendo el sedimento en Na₂B₄O₇·10(H₂O) 0.1 M (pH 10) y realizando el procedimiento mencionado. Posteriormente, todas las fracciones se dializaron, congelaron (-80 °C), liofilizaron y almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para estimar la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford utilizando una curva estándar de albumina de suero bovino.

Separación de proteínas por medio de geles de poliacrilamida

La separación de proteínas de reserva se realizó en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 14% a 140 V y 45 µA. Los geles fueron teñidos con Flamingo 1X (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU.) utilizando el protocolo del fabricante.

Digestión *in vitro* de fracciones proteínicas

La digestión de las proteínas se basó en el método reportado por Orón-Tamayo *et al.* [8]. Se pesaron 50 mg de cada fracción y harina, se resuspendieron en 1.8 ml de NaCl 0.03 M, y se incubaron a 80 °C por 5 min. Después se dejaron enfriar y se ajustó el

pH a 2.0. La digestión peptídica inició con pepsina porcina (EC 3.4.23.1) en una relación 1:40 (g:g; enzima:fracción proteínica o enzima:harina), en NaCl 0.03 M (pH 2.0) y se dejó agitando por 3 h a 37 °C. Después de este tiempo se ajustó el pH de todas las muestras a 7.5; se disolvió una mezcla de tripsina (EC 3.4.21.4) y pancreatina (relación 1:1; g:g) en NaHCO₃ 0.1 N y se añadió a las muestras en una relación de 1:40 (g:g; enzima:fracción proteínica o enzima:harina), se dejó agitando a 37 °C por 3 h. La digestión se detuvo calentando las muestras por 10 min a 100 °C; después, se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se centrifugó dos veces utilizando filtros de 10 kDa a 4000 rpm a 4 °C por 10 min. Los péptidos obtenidos fueron almacenados a -70 °C hasta su uso.

Actividad de captación de radicales ABTS y DPPH

La actividad de captación antirradical de los péptidos obtenidos de las fracciones proteínicas y las harinas de ambas líneas de chíá contra los radicales 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS) y 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) se evaluó por el método descrito por Orona-Tamayo *et al.* [8]. Se utilizaron diferentes concentraciones de péptidos (1, 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/µl) contra ambos radicales y placas de 96 pozos.

Para la inactivación de radicales de DPPH, se utilizaron los péptidos mezclados con una solución de DPPH 180 µM disuelto en metanol al 80% y un control con 10 µl de agua y 210 µl de solución. Se incubó la placa en oscuridad por 30 min a 37°C, posteriormente, la lectura se llevó a cabo en el espectrofotómetro a 517 nm.

Con respecto a la inactivación de radicales de ABTS. Se preparó una solución madre (ABTS 7 mM con persulfato de amonio 2.45 mM), la cual se dejó en oscuridad por 16 h antes de su uso, posteriormente, se ajustó la absorbancia con metanol a 0.700 ± 0.02 leyendo a 734 nm. Se utilizaron los péptidos mezclados con la solución de radicales ABTS y un control con 10 µl de agua y 210 µl de solución. La placa fue incubada en oscuridad por 6 min a temperatura ambiente y se leyó a 734 nm en el espectrofotómetro.

Para obtener la concentración de péptidos efectiva para la captación del 50% de radicales DPPH o ABTS (EC₅₀) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración efectiva (\% de inhibición)} = 100 - 100(\text{Absorbancia}_{\text{muestra}} / \text{Absorbancia}_{\text{control}})$$

Actividad inhibitoria contra la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

El efecto de inhibición de los péptidos de chíá, fueron evaluados de acuerdo al método reportado por Orona-Tamayo *et al.* [8] con algunas modificaciones. Las muestras se concentraron liofilizándolas y resuspendiéndolas hasta un volumen de 50 µL. La reacción se inició añadiendo 200 µL de una solución tampón de borato de sodio 0.1 M [pH 8.3; 0.3 M NaCl; 0.005 M HHL (hipuril-histidil-leucina)] para después mezclar cada muestra con 20 µL (5 mU) de solución de ECA e incubar por 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 200 µL de HCl 1 M. El ácido hipúrico que se formó, se extrajo añadiendo 1 ml de acetato de etilo y evaporándolo por 10 min a 90 °C, esto se redisolvió en 1 ml de agua ultrapura y se leyó en el espectrofotómetro a 228 nm. El blanco se prepara sin la adición de la enzima y el control se prepara sin la adición de péptidos. La inhibición de ECA se calculó como la concentración de péptidos efectiva para la inhibición del 50 % de la actividad original de ECA (EC₅₀) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración efectiva (\% de inhibición)} = \frac{[(\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{muestra}}) - (\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})]}{(\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{blanco}})} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la proporción de cada una de las fracciones proteínicas provenientes de la harina desgrasada de las diferentes semillas de chíá. Se puede observar que la concentración de la fracción mayoritaria en ambas líneas son las globulinas (NP de 39.2 g y para WT de 45.3 g) seguido de albuminas y glutelinas (NP de 27.6 y 25.8 g y para WT de 28.9 y 17.6 g, respectivamente). Prolaminas fue la fracción de menor proporción (NP fue de 7.3 g y para WT de 8.2 g). Estos resultados son similares a los reportados por Orona-Tamayo *et al.* [8].

Tabla 1: Concentración de fracciones proteínicas de semillas de chíá

Fracción	Línea (g/100 g de semilla)	
	NP	WT
Albuminas	27.6 ± 7.7 ^{c,d}	28.9 ± 4.6 ^{c,d}
Globulinas	39.2 ± 6.8 ^{d,e}	45.3 ± 9.8 ^e
Prolaminas	7.3 ± 2.5 ^{a,b}	8.2 ± 3.9 ^{a,b}
Glutelinas	25.8 ± 11.3 ^c	17.6 ± 7.9 ^{b,c}

Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$; ANOVA y Tukey Test). CM: chíá comercial (*S. hispanica*); WT: chíá silvestre (*S. tillifolia*)

En el patrón electroforético (Figura 1) se puede observar que globulinas presentan las bandas más intensas mientras que albuminas, glutelinas y prolaminas presentaron perfiles proteínicos menores. Estos resultados son similares a los reportados por Sandoval-Oliveros y Paredes-López [4], así como los presentados por Orona-Tamayo *et al.* [8]. Albuminas presentó bandas de baja intensidad de entre 15-220 kDa, mientras que en globulinas se presentaron bandas de mayor intensidad entre 18-35 kDa. Prolaminas exhiben bandas más intensas entre 15-19 kDa y glutelinas presentan bandas similares a globulinas pero con una menor intensidad.

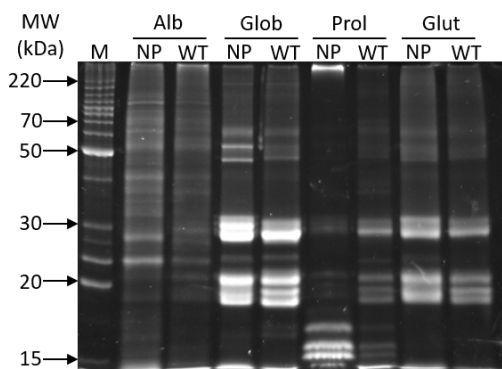


Figura 1. Patrón electroforético de fracciones proteínicas de semillas de chíá. MW: marcador de peso molecular; Alb: albuminas; Glob: globulinas; Prol: prolaminas; Glut: glutelinas; NP: chíá comercial (*S. hispanica*); WT: chíá silvestre (*S. tillifolia*).

Con respecto a la actividad antioxidante, en el caso del radical ABTS (Figura 2A), los péptidos de prolaminas mostraron ser más efectivos en semillas NP con un EC_{50} de 58.3 $\mu\text{g/ml}$ seguido por albuminas, harinas, glutelinas y globulinas; estos resultados son similares a los reportados por Durak *et al.* [9] en frijoles rojos donde los péptidos de

prolaminas fueron los más efectivos. Para WT péptidos de harinas mostraron un EC_{50} menor (79.2 $\mu\text{g/ml}$) seguidos por globulinas, glutelinas, prolaminas y albuminas. Estos resultados son similares con los reportados por Orona-Tamayo *et al.* [8] donde en una línea diferente de chíá, péptidos de albuminas y globulinas fueron los que necesitaron una menor concentración para inhibir el radical ABTS. Contra el radical DPPH (Figura 2B), péptidos de harinas en ambas semillas fueron los más efectivos con un EC_{50} de 21.0 y 20.9 $\mu\text{g/ml}$ para NP y WT, respectivamente, seguidos por globulinas, albuminas, prolaminas y glutelinas.

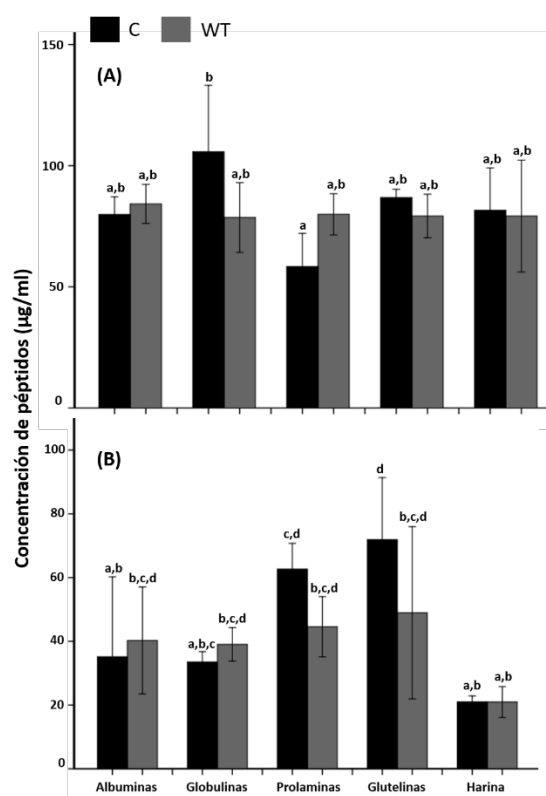


Figura 2. Actividad de captación de radicales DPPH y ABTS. La concentración efectiva de péptidos para inhibir el 50% (EC_{50}) de la actividad de los radicales de ABTS (A) y DPPH (B). Mismas letras en las barras no muestran diferencia significativa ($P < 0.05$; ANOVA y Tukey Test)).

En el caso de la actividad inhibitoria contra ECA, péptidos provenientes de la fracción de globulinas del cultivar NP fueron los más efectivos en inhibir la actividad de la ECA, mostrando un EC_{50} de 148.23 $\mu\text{g/ml}$, mucho menor que péptidos de globulinas de otras semillas como los de amaranto [10] y de

alpiste [11]; en cambio péptidos de las subsecuentes fracciones de albuminas, harinas, glutelinas y prolaminas mostraron menor inhibición. Con respecto a péptidos de albuminas la semilla WT, demostraron ser los más efectivos, similar a lo reportado por Orona-Tamayo [8].

CONCLUSIONES

La proporción de las fracciones proteínicas en ambas líneas presentaron como fracción mayoritaria a globulinas seguido de albuminas, glutelinas y prolaminas. Péptidos provenientes de prolaminas y harinas de semillas de la línea NP son los más efectivos contra radicales ABTS y DPPH, respectivamente. En cambio en semillas WT péptidos de harinas son los más efectivos contra ambos radicales. Los péptidos de la fracción de globulinas y albuminas del cultivar NP y WT, respectivamente, mostraron ser los más efectivos para inhibir la actividad de ECA. El consumo de semillas de chíá podría representar un beneficio para la salud por el contenido de sus péptidos con capacidad antioxidante y antihipertensiva, ya que podrían ser adicionados a diferentes alimentos y elevar su poder nutricional y nutracéutico.

REFERENCIAS

[1]. Hernández, J. A., & Miranda, S. (2008). Caracterización morfológica de chíá (*Salvia hispanica*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(2), 105–113.

[2]. Cahill, J. P. (2003). Ethnobotany of chia, *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Economic Botany*, 57(4), 604–618.

[3]. Jamboonsri, W., Phillips, T. D., Geneve, R. L., Cahill, J. P., & Hildebrand, D. F. (2012). Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L.-a new ω 3 source. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(2), 171–178. <http://doi.org/10.1007/s10722-011-9673-x>

[4]. Sandoval-Oliveros, M. R., & Paredes-López, O. (2013). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 193–201. <http://doi.org/10.1021/jf3034978>

[5]. Muñoz, L. (2012). *Mucilage from chia seeds (Salvia hispanica): Microestructure, physico-chemical characterization and applications in food industry*. Tesis doctoral no publicada. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

[6]. Da Silva, R., Aguiar, E., Alves, S., Teixeira, A., Nogueira, M., & Maróstica, M. R. (2014). Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 59(2014), 1304–1310. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.014>

[7]. Anderson, J. W., Baird, P., Davis, R. H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., Williams, C. L. (2009). Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67(4), 188–205. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>

[8]. Orona-Tamayo, D., Valverde, M. E., Nieto-Rendón, B., & Paredes-López, O. (2015). Inhibitory activity of chia (*Salvia hispanica* L.) protein fractions against angiotensin I-converting enzyme and antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 236–242. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.033>

[9]. Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., & wieca, M. (2013). Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry*, 141(3), 2177e2183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.012>

[10]. Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, a., & Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 116(2), 437–444. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.062>

[11]. Estrada-Salas, P. A., Montero-Morán, G. M., Martínez-Cuevas, P. P., González, C., & Barba de la Rosa, A. P. (2014). Characterization of antidiabetic and antihypertensive properties of canary seed (*Phalaris canariensis* L.) peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(2), 427–433. <http://doi.org/10.1021/jf404539y>