

Accepted Manuscript / Manuscrito Aceptado

Title Paper/Título del artículo:

Aplicación de ultrasonido de alta intensidad a proteínas de semillas de *Coccoloba uvifera* y su efecto sobre el perfil de aminoácidos, propiedades tecno-funcionales y capacidad antioxidante

Application of high-intensity ultrasound to *Coccoloba uvifera* seeds proteins and its effect on the amino acid profile, techno-functional properties, and antioxidant capacity

Authors/Autores: Ragazzo-Calderón, F. Z., Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M, Hernández-Molina, D. S., Martínez-Ramos, K. E., Ragazzo-Sánchez, J. A.

ID: e1787

DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1787>

Received/Fecha de recepción: October 17th 2024

Accepted /Fecha de aceptación: May 14th 2025

Available online/Fecha de publicación: May 21th 2025

Please cite this article as/Como citar este artículo: Ragazzo-Calderón, F. Z., Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M, Hernández-Molina, D. S., Martínez-Ramos, K. E., Ragazzo-Sánchez, J. A. .(2025). Application of high-intensity ultrasound to *Coccoloba uvifera* seeds proteins and its effect on the amino acid profile, techno-functional properties, and antioxidant capacity. *Revista Bio Ciencias*, 12, e1787. <https://doi.org/10.15741/revbio.12.e1787>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Este archivo PDF es un manuscrito no editado que ha sido aceptado para publicación. Esto es parte de un servicio de Revista Bio Ciencias para proveer a los autores de una versión rápida del manuscrito. Sin embargo, el manuscrito ingresará a proceso de edición y corrección de estilo antes de publicar la versión final. Por favor note que la versión actual puede contener errores de forma.

Artículo original

Aplicación de ultrasonido de alta intensidad a proteínas de semillas de *Coccoloba uvifera* y su efecto sobre el perfil de aminoácidos, propiedades tecno-funcionales y capacidad antioxidante

Application of high-intensity ultrasound to *Coccoloba uvifera* seeds proteins and its effect on the amino acid profile, techno-functional properties, and antioxidant capacity

Modificación de proteínas vegetales/

Modification of plant proteins

Ragazzo-Calderón, F. Z. (0009-0000-8168-8596^{id}), Calderón-Chiu, C. (0000-0002-4341-5658^{id}), Calderón-Santoyo, M. (0000-0002-8744-1815^{id}), Hernández-Molina, D.S. (0009-0000-2468-2120^{id}), Martínez-Ramos, K.E. (0009-0001-6304-2895^{id}) and Ragazzo-Sánchez, J. A.* (0000-0002-2298-3306^{id})

Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico #2595, Col. Lagos del Country, 63175, Tepic, Nayarit, México.

*Corresponding Author:

Juan Arturo Ragazzo-Sánchez. Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tepic, Av. Tecnológico #2595, Col. Lagos del Country, 63175, Tepic, Nayarit, México. E-mail: jragazzo@tepic.tecnm.mx

RESUMEN

La aplicación de ultrasonido de alta intensidad (HIU) a proteínas vegetales mejora la tecno-funcionalidad y actividad antioxidante. Por ello, esta investigación examinó el impacto del HIU a diferentes niveles de potencia (600, 840 y 1080 W) y duraciones (10, 15 y 20 min) sobre la composición de aminoácidos, hidrosolubilidad, formación de espuma, emulsificación y capacidad antioxidante de la proteína de la semilla de *Coccoloba uvifera* (CUSP). En comparación con el control (proteína no tratada), la CUSP sometida a HIU presentaron mayores niveles de ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, glicina y serina. La hidrosolubilidad de las muestras tratadas con HIU mejoró significativamente en un rango de 79.90 a 87.53 %. El tratamiento con HIU a 600 W durante 10 min mejoró las propiedades espumantes, mientras que la exposición a 600 y 1080 W durante 15 min mejoró las propiedades emulsionantes. En comparación con el control (52.12 ± 1.85 %), el tratamiento de 840 W durante 15 min mostró alta propiedad antioxidante (96.82 ± 0.16 %). La aplicación de HIU a la CUSP mejoró la funcionalidad. Sin embargo, el grado de mejora dependió del nivel de HIU y de la duración del tratamiento, demostrando la viabilidad de HIU para aumentar atributos funcionales de proteínas vegetales para posible utilización en productos alimenticios.

PALABRAS CLAVE:

Proteína vegetal, Modificación de proteínas, Distribución del tamaño de partículas, Emulsiones, Propiedades tecno-funcionales.

ABSTRACT

Applying high-intensity ultrasound (HIU) to plant proteins improves the techno-functionality and antioxidant activity. Then, this research examined the impact of HIU at different power levels (600, 840, and 1080 W) and durations (10, 15, and 20 min) on the amino acid composition, hydrosolubility, foaming, emulsification, and antioxidant capacity of *Coccoloba uvifera* seed protein (CUSP). Compared with the control (untreated protein), CUSP subjected to HIU presented increased levels of glutamic acid, aspartic acid, proline, glycine, and serine. The hydrosolubility of samples treated with HIU significantly improved, ranging from 79.90 to 87.53 %. Treatment with HIU at 600 W for 10 min enhanced the foaming properties, while exposing CUSP to HIU at 600 and 1080 W for 15 min improved the emulsifying properties. Compared with the control (52.12 ± 1.85 %), the 840 W treatment for 15 min enhanced the antioxidant properties (96.82 ± 0.16 %). The application of HIU in CUSP enhanced the functionality. However, the degree of improvement depends on the HIU level and the treatment duration. This study demonstrated the feasibility of employing HIU to increase the functional attributes of plant proteins for potential utilization in food products.

KEYWORDS:

Plant protein, Protein modification, Particle size distribution, Emulsions, Techno-functional properties.

Introducción

La industria alimentaria depende principalmente de proteínas de origen animal. Sin embargo, el aumento de la población mundial ha generado un aumento en la demanda de estas proteínas, lo que ha causado daños ambientales considerables, incluyendo emisiones de gases de efecto invernadero y pérdida de biodiversidad. Por lo tanto, es esencial explorar fuentes de proteínas alternativas, derivadas de semillas de frutos, ya que ofrecen opciones proteicas prometedoras (Yu *et al.*, 2021). *Coccoloba uvifera* L., comúnmente conocida como uva de playa, es un árbol originario de América tropical y el Caribe, que crece principalmente en zonas arbustivas a lo largo de las costas del Atlántico y el Pacífico de México (Collantes-Chávez-Costa *et al.*, 2019). Esta especie se ha utilizado en la medicina tradicional mexicana desde hace mucho tiempo. Recientemente, ha aumentado el interés por *C. uvifera*, ya que las investigaciones han demostrado que su fruto contiene compuestos con una importante actividad antioxidante. Las semillas de *C. uvifera* representan entre el 80–85 % del peso del fruto y contienen una cantidad significativa de carbohidratos y una fracción proteica viable para la extracción (Segura Campos *et al.*, 2015). El potencial de las semillas de *C. uvifera* como fuente de proteínas para aplicaciones en la industria alimentaria aún no se ha explorado, lo que resalta la necesidad de realizar más investigaciones.

Las proteínas vegetales extraídas mediante métodos convencionales presentan estructuras compactas y propiedades funcionales limitadas, lo que requiere una modificación estructural. El ultrasonido de alta intensidad (HIU, 10–1000 W/cm² o 20–100 kHz) se ha utilizado para la modificación de proteínas porque genera un mayor rendimiento de producción, mejora la calidad de los alimentos procesados, es fácil de usar y ambientalmente sostenible (Flores-Jiménez *et al.*, 2023). El ultrasonido altera las proteínas debido a la cavitación, que incluye ondas de choque, microcorrientes, microjets, turbulencia, fuerzas de cizallamiento y temperaturas y presiones elevadas. Estos efectos modifican los materiales alimentarios al romper interacciones intermoleculares como enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, puentes disulfuro, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Flores-Jiménez *et al.*, 2023; Xue *et al.*, 2018).

Investigaciones previas han demostrado que el tratamiento con HIU puede reducir el tamaño de partícula de las moléculas de proteína, alterar los perfiles de aminoácidos, las propiedades térmicas/reológicas, mejorar la hidrosolubilidad y la hidrofobicidad superficial de varias proteínas vegetales, como las de las habas (Adal, 2024), la papa (Zhao *et al.*, 2022) y el mijo (Nazari *et al.*, 2018). Estas modificaciones mejoran la retención de agua y aceite, la formación de espuma, la gelificación y la emulsificación al alterar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas. Sin embargo, hasta donde sabemos, ningún estudio se ha centrado en la extracción de proteínas de las semillas de *C. uvifera* para demostrar su uso potencial en la industria alimentaria. Por lo tanto, esta investigación tiene como objetivo extraer proteína de las semillas de *C. uvifera* (CUSP), seguido de la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad para evaluar sus efectos sobre el perfil de aminoácidos, las propiedades tecnofuncionales y la capacidad antioxidante. Esta investigación podría tener un impacto significativo, ya que puede producir CUSP con propiedades tecnológicas aceptables. La extracción de antioxidantes y proteínas de *C. uvifera* tiene el potencial de fomentar la expansión de las prácticas de cultivo y resaltar la importancia de la flora de dunas costeras para una variedad de aplicaciones en los sectores alimentario y farmacéutico. Esta iniciativa está destinada a promover el desarrollo agrícola, apoyando así el crecimiento económico de la región de donde es originaria la fruta.

Material y Métodos

Reactivos químicos

N-terc-butildimetilsilil-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA, >97 %), persulfato de potasio, acetonitrilo (grado HPLC, >99.8 %), ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS⁺), albúmina de suero bovino (BSA), dodecil sulfato de sodio (SDS), L-Norleucina y reactivo de Bradford, se adquirieron de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). El hidróxido de sodio (NaOH) y el ácido clorhídrico (HCl) se adquirieron de Jalmeq (Nuevo León, México).

Material vegetal

Los frutos de *C. uvifera* se recolectaron en la región costera de Tecolutla, Veracruz, México (20° 23'17" N 97° 01'31" O) durante los meses de septiembre a octubre de 2023. Las semillas se extrajeron del fruto y se sometieron a un proceso de secado de 24 h a 60 °C en un horno de convección (Novatech HS60-AID, Tlaquepaque, Jalisco, México). Las semillas se molieron para obtener harina de semilla de *C. uvifera* (CUSF). La CUSF se selló al vacío y se almacenó a temperatura ambiente para asegurar su conservación y calidad hasta su uso. La CUSF presentó un contenido de proteína de 11.54 ± 0.50 %.

Extracción de concentrado de proteína de semilla de *C. uvifera* (CUSP)

La CUSP se preparó mediante solubilización alcalina y precipitación isoeléctrica asistida por ultrasonido. Se colocó harina de hoja (30 g) en un vaso de precipitados de 1 L con 563 mL de agua destilada y 188 mL de una solución de NaOH 0.2 M. La mezcla se agitó en una placa de agitación magnética durante 10 min y se sometió a extracción asistida por ultrasonidos utilizando un baño ultrasónico digital (modelo CD-4820, Guangdong, CHN) operando a 42 kHz durante 20 min. La mezcla se centrifugó (Sorvall X Pro serial, Thermo Scientific™, Waltham, MA) a 4,000 rpm durante 20 min a 25 °C. A continuación, se recuperó el sobrenadante, se ajustó el pH a 4.0 (HCl 1 M) y se precipitó la mezcla durante 24 h. El precipitado resultante se obtuvo mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 min (25 °C) (Vera-Salgado *et al.*, 2022). La CUSP resultante se liofilizó y almacenó a 4 °C para su posterior análisis. El contenido proteico de la CUSP se determinó mediante el método 920.87 (AOAC, 1990).

Tratamiento de ultrasonidos de alta intensidad

Soluciones de CUSP al 5 % (p/v) en agua destilada se agitaron durante 10 min para su homogeneización. Se utilizó un homogeneizador ultrasónico (Hanchen Integrated Ultrasonic Homogeniser Sonicator) con una sonda de titanio de 0.636 cm de diámetro para sonicar 50 mL de las dispersiones de CUSP en vasos de precipitados de 100 mL, los cuales se colocaron en un baño de agua (22-25 °C). Las dispersiones de proteínas se trataron a 20 kHz a diferentes niveles de potencia (0, 600, 840 y 1080 W) durante 10, 15 y 20 min. Las muestras tratadas con HIU se centrifugaron a 4,000 rpm durante 20 min a 25 °C. El sobrenadante recuperado se liofilizó y se conservó para su posterior análisis.

Perfil de aminoácidos de la CUSP tratada y no tratada con HIU

El método descrito por Brion-Espinoza *et al.* (2021) se utilizó para la hidrólisis ácida de las muestras y su posteriormente análisis por GC-MS. En resumen, se realizó la hidrólisis ácida en las muestras de CUSP (tratada y no tratada con HIU) utilizando HCl 6 M a 110 °C (24 h). Los hidrolizados se filtraron y centrifugaron a 15,000 rpm durante 15 min (Hettich MIKRO 200/200R, DEU). Posteriormente, se mezclaron 100 µL de hidrolizado y 10 µL de L-Norleucina (estándar interno a 0.2 mg/mL) en un vial. La mezcla resultante se sometió a evaporación bajo flujo de N₂ hasta obtener un residuo seco. A continuación, se añadieron 200 µL de acetonitrilo y 200 µL de MTBSTFA al precipitado en el vial. El vial se incubó a 100 °C durante 2.5 h en un baño de glicerol. La muestra derivatizada (1 µL) se introdujo en modo split (20:1) a 260 °C utilizando helio (2 mL/min) en un equipo GC 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) 240 Ion Trap. Los aminoácidos se identificaron mediante estándares de aminoácidos y el software NIST (v. 2.3). La cuantificación se realizó ajustando la respuesta del estándar interno para cada aminoácido. El perfil de aminoácidos se expresó en g de aminoácidos/100 g de material seco.

Propiedades tecno-funcionales

Hidrosolubilidad de CUSP tratada y no tratada con HIU

La hidrosolubilidad de las muestras se determinó siguiendo el método descrito por by Klompong *et al.* (2012). Las muestras con y sin tratamiento de HIU (10 mg) se disolvieron en agua destilada (1 mL) a pH 7.0. Las dispersiones se agitaron (100 rpm) durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 15,000 rpm (15 min) (centrífuga MIKRO 220 R, Hettich, Tuttlingen, DEU). Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente, se midió el contenido total de proteínas de cada muestra, para ello se solubilizaron 10 mg de la muestra en 1 mL de NaOH 0.5 N. La hidrosolubilidad (%) se calculó mediante la Ecuación 1.

$$\text{Hidrosolubilidad (\%)} = \frac{\text{Contenido de proteína en el sobrenadante}}{\text{Contenido de proteína total de cada muestra}} \times 100 \quad (1)$$

Propiedades espumantes de CUSP tratada y no tratada con HIU

La capacidad de formación de espuma (FC) y la estabilidad de la formación de espuma (FS) de la CUSP tratada y no tratada con HIU se determinaron mediante la metodología de Calderón-Chiu *et al.* (2021) con modificaciones. Se prepararon soluciones de proteína al 5% (p/v) en agua destilada. Posteriormente, se colocaron alícuotas de 10 mL de la muestra en tubos graduados. Las dispersiones se homogeneizaron a 16,000 rpm durante 1 min con un homogeneizador IKA T10 basic ultra-Turrax (IKA, Staufen, DEU) a 25 °C para incorporar aire. El volumen total de la muestra se midió inmediatamente después de la homogeneización (0 min) y después de 30 min para calcular la FC (Ecuación 2) y la FS (Ecuación 3), respectivamente.

$$\text{FC (\%)} = \frac{B-A}{A} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{FS (\%)} = \frac{C-A}{A} \times 100 \quad (3)$$

donde A es el volumen inicial (mL) antes de la homogeneización, B es el volumen de espuma (mL) después de la homogeneización (0 min) y C es el volumen de espuma (mL) después de 30 min de homogeneización.

Propiedades emulsionantes de la CUSP tratada y no tratada con HIU

Se determinó el índice de actividad de la emulsión (EAI) y el índice de estabilidad de la emulsión (ESI) (Yu *et al.*, 2021). Para ello, se preparó una emulsión utilizando 2 mL de aceite de oliva y 6 mL de solución de proteína al 0.5 %. Ambas fases se homogeneizaron a 20,000 rpm durante 1 min con un IKA T10 basic Ultra-Turrax (IKA, Staufen, DEU). Después de eso, se tomaron 50 μ L de la emulsión a los 0 min y después de 10 min, los cuales se diluyeron en 5 mL de solución de SDS al 0.1 %. Las soluciones diluidas se analizaron para la absorbancia a 500 nm a través de un espectrofotómetro (Cary 50 Bio UV–Visible, Varian, Mulgrave, AUS). Las absorbancias de las muestras diluidas medidas a los 0 min (A_0) y 10 min (A_{10}) se utilizaron para calcular el EAI (Ecuación 4) y el ESI (Ecuación 5).

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = \frac{(2)(2.303)(A_0)(\text{DF})}{(\text{g proteína})(0.25)(1000)} \quad (4)$$

$$\text{ESI (min)} = \frac{A_{10}}{A_0 - A_{10}} * t \quad (5)$$

DF es un factor de dilución (100), 0.25 es la fracción de aceite de oliva utilizada para formular la emulsión y t es el tiempo.

Distribución del tamaño de partículas de las emulsiones

Las emulsiones obtenidas en la sección anterior se procesaron con una unidad Digital Sonifier® (modelo S-150D, Branson Corporation, Danbury, CT, USA) a 24 kHz durante 5 min. Posteriormente, se determinó la distribución del tamaño de partícula con un Mastersizer 3000 Hydro EV (Malvern, Worcestershire, UK). La evaluación se realizó a 25 °C, con el índice de refracción establecido en 1.46 para la fase dispersa (aceite de oliva) y 1.33 para el dispersante (agua). Inicialmente, se introdujeron 400 mL de agua destilada en la unidad Hydro EV. La emulsión se añadió cuidadosamente gota a gota hasta que se alcanzó un oscurecimiento del láser entre el 8 y 12 %. Las emulsiones resultantes se analizaron mediante un difractorómetro cinco veces, lo que produjo una curva completa de distribución de tamaño. Los parámetros de distribución del tamaño de partícula, incluidos el PDI, $d_{[3,2]}$ y $d_{[4,3]}$, se obtuvieron mediante el software Mastersizer 3000 (Worcestershire, UK).

Actividad de eliminación de radicales ABTS⁺

La actividad de eliminación de radicales ABTS⁺ se evaluó según lo descrito por Re *et al.* (1999) con modificaciones. La solución ABTS⁺ se preparó a una concentración final de 7 mM ABTS⁺ en 2.45 mM de persulfato de potasio. La mezcla se dejó en oscuridad total y temperatura ambiente durante 16 h antes de su uso. La solución madre se diluyó (agua destilada) para obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Posteriormente, se mezclaron 50 μ L de soluciones de CUSP tratada y no tratada con HIU (4 mg/mL) con 950 μ L de radical ABTS⁺ y se agitaron en vórtex durante 10 s. La absorbancia de la mezcla se leyó (734 nm) en un espectrofotómetro (Cary 50 Bio UV–Visible Varian, Mulgrave, AUS) después de 7 min para calcular la actividad de eliminación de radicales ABTS⁺ (Ecuación 6).

$$\text{Actividad de eliminación de radicales ABTS}^+ (\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad \text{Eq. 6}$$

A_{control} representa el valor de absorbancia de la solución ABTS⁺ diluida y la A_{muestra} representa la absorbancia de la reacción ABTS⁺ y la muestra.

Análisis estadístico

El conjunto de datos se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Posteriormente, se realizó la prueba de comparación de medias LSD ($p < 0.05$) con Statistica v.12.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

Resultados y Discusión

Contenido de proteínas y perfil de aminoácidos de la CUSP

El contenido proteico de la CUSP fue de 66.49 ± 2.10 g/100 g b.s., este contenido fue significativamente diferente al de los aislados proteicos de semilla de ciruela, con un 19.4 % (Xue *et al.*, 2018), y al del concentrado proteico de semilla de quinoa, con un 57.3 % (González-Muñoz *et al.*, 2022). La variación en el contenido proteico se puede atribuir a la composición del material vegetal y al método o las condiciones empleadas para la extracción proteica. El contenido proteico de la CUSP supera el 50 %, lo cual mayor al de los concentrados proteicos de semillas de ciruela y quinoa. Esta observación sugiere que, en comparación con fuentes mencionadas, la CUSP podría tener un mayor potencial para aplicaciones en la industria alimentaria. En el análisis de aminoácidos fueron identificados leucina, valina, isoleucina y fenilalanina en la CUSP tratada y no tratada con HIU (Tabla 1). Sin embargo, las concentraciones de estos aminoácidos fueron menores en la CUSP tratada con HIU en comparación con la muestra no tratada. Un aumento considerable de los niveles de ciertos aminoácidos, como ácido glutámico, ácido aspártico, prolina, glicina y serina fue evidente en la CUSP tratada con HIU. Este comportamiento se debe a que el tratamiento con HIU descompone la matriz proteica, principalmente las fuerzas de van der Waals y los enlaces de hidrógeno a nivel molecular. Este proceso puede alterar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas, favoreciendo la formación de estructuras más flexibles que favorecen un reordenamiento interno (Jadhav *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2023). Estos cambios tienen el potencial de afectar las propiedades funcionales.

Los hallazgos indican que el uso de niveles bajos (600 W) y altos (1080 W) de ultrasonido durante 15 min resultaron en mayores niveles de aminoácidos hidrofóbicos (HAA), aromáticos (AAA) y esenciales (EAA) en comparación con otros tratamientos. Sin embargo, la extensión a 20 min correspondió a una disminución de los mismos. Esta disminución de aminoácidos durante el procesamiento prolongado puede deberse a una mayor generación de radicales libres por HIU, los cuales pueden potencialmente desencadenar la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos dentro de las estructuras proteicas e impactar su calidad. Cabe destacar que las cadenas laterales aromáticas en los residuos aminoácidos de fenilalanina, tirosina y triptófano son especialmente vulnerables a este fenómeno (Rahman *et al.*, 2020). Este comportamiento podría explicar los bajos niveles de fenilalanina observados en muestras tratadas durante 20 min a 600 W y 1080 W. Inesperadamente, un nivel medio de ultrasonificación (840 W) a los 10–15 min resultó en la menor recuperación de aminoácidos.

La CUSP no tratada y los tratamientos obtenidos a 600 y 1080 W (15 min) presentaron aproximadamente entre 80.02 % y 83.59 % de HAA. Este contenido de HAA superó el reportado para la proteína de semilla de quinoa (González-Muñoz *et al.*, 2022) y *Stauntonia brachyanthera* (Yu *et al.*, 2021). Este un alto contenido de grupos funcionales hidrofóbicos en las proteínas mejora la hidrosolubilidad lipídica, incrementando la actividad emulsionante y la capacidad antioxidante (Aderinola *et al.*, 2018). Los altos niveles de HAA en los tratamientos con HIU podrían deberse a la turbulencia creada por la cavitación ultrasónica y el cizallamiento físico. Estas fuerzas provocan el desdoblamiento de las moléculas de proteína, revelando los residuos de aminoácidos hidrofóbicos que contienen, como se observó en aislados de proteína de semilla de calabaza tratados con HIU (Du *et al.*, 2022). En tanto, no se detectaron cisteína, triptófano, lisina ni tirosina en la CUSP tratada con HIU ni en la muestra no tratada. Por el contrario, la glicina y la serina estuvieron no se detectaron en condiciones específicas de HIU, posiblemente debido a la degradación de estos aminoácidos durante la exposición prolongada con el ácido caliente. La CUSP tratada y no tratada con HIU, mostraron la presencia de valina, leucina, isoleucina, metionina, treonina y fenilalanina. Cabe destacar que la metionina es el único aminoácido esencial que no cumple con los requerimientos para adultos establecidos por la WHO/FAO (2007). Por tanto, todos los tratamientos son opciones viables para complementar dietas con deficiencia de aminoácidos esenciales específicos.

Propiedades tecno-funcionales

Contenido de proteína soluble e hidrosolubilidad

El contenido de proteína soluble aumentó significativamente ($p < 0.05$) después de la aplicación de ultrasonido (Tabla 2). La CUSP tratada a 600 W exhibió el contenido de proteína más bajo que otros tratamientos de HIU, independientemente del tiempo de procesamiento. Las muestras tratadas a 840 W y 1080 W durante 20 y 15 min exhibieron los contenidos de proteína más altos, respectivamente. La extensión del tiempo de tratamiento a 20 min para muestras tratadas a 1080 W no afectó significativamente el contenido de proteína. La hidrosolubilidad (pérdida de hidrofobicidad) también mejoró significativamente después del tratamiento con HIU (Tabla 2). Sin embargo, el incremento del nivel de HIU de 600 W a 1080 W o del tiempo de procesamiento no aumentaron significativamente la hidrosolubilidad. Los valores de hidrosolubilidad variaron de 79.90% en el nivel de HIU y tiempos más bajos a 87.53% a 1080 W y 15 min. Un patrón similar fue observado para el concentrado de proteína de mijo después de 12.5 min de HIU, dado que la extensión del tiempo de procesamiento a 20 min no mejoró aún más este parámetro (Nazari *et al.*, 2018). Notablemente, el contenido de proteína soluble y la hidrosolubilidad de las muestras expuestas a HIU fueron dos veces más altas que la muestra de control. Esto resalta el potencial del ultrasonido para modificar las proteínas vegetales y mejorar sus propiedades funcionales.

Table 1. Amino acid profile (g of amino acids/100 g dry material) of HIU-treated and untreated CUSPs.

Aminoácido/Tratamiento HIU	0 W (Control)	600 W			840 W			1080 W			WHO /FAO *
	CUSP	10 min	15 min	20 min	10 min	15 min	20 min	10 min	15 min	20 min	
Alanina	3.06±0.32 ^A	8.57 ± 0.26 ^B	9.71 ± 1.04 ^B	7.22 ± 0.66 ^{BC}	10.38 ± 1.02 ^B	9.93 ± 0.17 ^B	8.49 ± 3.35 ^B	10.17 ± 0.97 ^B	7.65 ± 0.97 ^{BC}	9.28 ± 2.23 ^{BC}	
Glicina	nd ^A	1.74 ± 0.08 ^B	3.97 ± 0.57 ^C	3.83 ± 0.66 ^C	4.46 ± 0.95 ^C	4.94 ± 0.32 ^C	4.11 ± 2.73 ^{BC}	5.62 ± 2.21 ^C	nd	4.78 ± 2.9 ^C	
Valina*	20.26 ± 0.59 ^A	14.33 ± 0.67 ^B	18.86 ± 4.12 ^{AB}	14.67 ± 1.52 ^B	9.83 ± 0.56 ^C	14.6 ± 1.13 ^B	13.88 ± 1.56 ^B	14.29 ± 1.01 ^B	20.06 ± 0.38 ^A	12 ± 1.1 ^D	3.9
Leucina*	23.71±0.37 ^A	20.82 ± 0.1 ^B	21.27 ± 3.2 ^B	17.43 ± 1.22 ^B	10.96 ± 0.94 ^C	16.27 ± 0.92 ^B	18.21 ± 0 ^B	16.96 ± 0.41 ^B	24 ± 0.21 ^{AB}	15.75 ± 1.89 ^A	5.9
Isoleucina*	13.31±0.09 ^A	12.7 ± 0.01 ^B	12.84 ± 2.36 ^{AB}	10.55 ± 0.84 ^C	7.11 ± 0.3 ^D	9.58 ± 0.43 ^C	10.63 ± 1.14 ^{BC}	9.88 ± 0.58 ^C	15.42 ± 0.31 ^{AB}	8.48 ± 1.32 ^C	3.0
Prolina	4.87±0.27 ^A	4.27 ± 0.08 ^B	5.57 ± 0.87 ^A	6.2 ± 0.07 ^A	5.64 ± 0.04 ^A	8.55 ± 0.21 ^C	5.35 ± 1.68 ^{AB}	4.46 ± 1.11 ^{AB}	4.05 ± 0.01 ^B	5.64 ± 1.92 ^{AB}	
Metionina*	1.55±0.06 ^A	0.98 ± 0.16 ^B	1.27 ± 0.02 ^C	1.27 ± 0.35 ^{ABC}	1.21 ± 0.06 ^C	nd	1.9 ± 0.08 ^D	1.51 ± 0.08 ^A	1.7 ± 0.06 ^E	1.54 ± 0.32 ^{AC}	2.2***
Serina	Nd ^A	3.79 ± 0.28 ^B	2.56 ± 0.33 ^C	2.35 ± 0.44 ^C	5.01 ± 0.09 ^D	1.67 ± 0.15 ^E	3.61 ± 1.73 ^B	4.22 ± 0.59 ^F	1.9 ± 0.02 ^C	4.65 ± 0.76 ^D	
Treonina*	1.82±0.50 ^A	6.14 ± 0.36 ^B	4.19 ± 1.09 ^C	3.86 ± 1.62 ^{AC}	7.32 ± 0.46 ^D	3.32 ± 0.04 ^C	4.04 ± 1.29 ^C	5.17 ± 0.18 ^C	3.05 ± 0.01 ^C	5.51 ± 1.16 ^{BC}	2.3
Fenilalanina	19.19±0.09 ^A	10.05 ± 0.92 ^B	12.1 ± 1.99 ^B	10.23 ± 1 ^B	7.28 ± 0.7 ^C	7.29 ± 0.21 ^C	10.78 ± 0.84 ^B	8.76 ± 0.63 ^D	14.76 ± 0.38 ^E	8.43 ± 1.25 ^{CD}	3.8**
Ácido aspártico	8.87±0.15 ^A	10.22 ± 1.4 ^A	6.21 ± 1.8 ^B	17.17 ± 0.58 ^C	18.23 ± 0.68 ^C	11.46 ± 0.97 ^A	11.33 ± 3.51 ^A	12.37 ± 1.8 ^A	4.72 ± 0.02 ^B	14.2 ± 2.99 ^A	
Ácido glutámico	3.36±0.32 ^A	6.39 ± 1.3 ^B	1.45 ± 0.25 ^C	5.21 ± 3.41 ^{AB}	12.57 ± 1.12 ^D	12.38 ± 1.04 ^D	7.68 ± 2.7 ^B	6.58 ± 0.2 ^B	2.68 ± 0.65 ^A	9.73 ± 2.77 ^{BD}	
HAA	81.08	69.19	80.02	65.20	51.23	62.61	68.00	67.19	83.59	60.26	
AAA	19.19	10.05	12.10	10.23	7.28	7.29	10.78	8.76	14.76	8.43	
EAA*	79.84	65.02	70.53	58.01	43.71	51.06	59.44	56.57	78.99	51.71	

*Aminoácidos esenciales según la OMS/FAO (2007) para adultos: **Tirosina + fenilalanina. ***Metionina + cisteína. ** nd: no detectado. Letras mayúsculas diferentes en la fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos control y HIU para un aminoácido. Aminoácidos hidrofóbicos (HAA), aminoácidos aromáticos (AAA) y aminoácidos esenciales (EAA). Fuente: Elaboración propia con base a resultados.

Table 2. Contenido de proteína soluble e hidrosolubilidad de la CUSP tratada y no tratada con HIU.

Tratamiento o HIU (W)	Contenido de proteína soluble (mg/mL)			Hidrosolubilidad (%)		
	10 min	15 min	20 min	10 min	15 min	20 min
0 (Control)	1.1057 ±0.029 ^a	1.1057 ±0.029 ^a	1.1057 ±0.029 ^a	44.23 ±1.15 ^a	44.23 ±1.15 ^a	44.23 ±1.15 ^a
600	1.998 ±0.070 ^{b,A}	2.118 ±0.050 ^{b,A}	2.105 ±0.065 ^{b,A}	79.90 ±4.55 ^{b,A}	84.73 ±5.60 ^{b,A}	84.18 ±2.10 ^{b,A}
840	2.044 ±0.060 ^{b,A}	2.088 ±0.080 ^{b,A}	2.158 ±0.092 ^{b,B}	81.75 ±3.98 ^{b,A}	83.51 ±5.08 ^{b,A}	86.33 ±4.70 ^{b,A}
1080	2.068 ±0.060 ^{b,A}	2.188 ±0.020 ^{c,B}	2.138 ±0.072 ^{b,AB}	82.71 ±3.21 ^{b,A}	87.53 ±6.81 ^{b,A}	85.53 ±4.55 ^{b,A}

Letras minúsculas diferentes en una columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos a un tiempo específico. Letras mayúsculas diferentes en las filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tiempos de tratamiento a un nivel específico de HIU. Fuente: Elaboración propia con base a resultados.

El contenido de proteína soluble y la hidrosolubilidad mostraron patrones similares, obteniendo consistentemente los resultados más favorables en los mismos niveles de potencia y duración de HIU (1080 W durante 15 min). Esto debido a que el ultrasonido reveló regiones de aminoácidos hidrofílicas y grupos cargados (NH_4^+ , COO^-) en la superficie de la proteína, lo que incrementa las fuerzas electrostáticas. Como resultado, las fuerzas electrostáticas mejoran las interacciones entre la proteína y el agua (enlaces de hidrógeno) y aumenta en última instancia la hidrosolubilidad y el contenido de proteína soluble (Corzo-Martínez *et al.*, 2017). Los altos valores de hidrosolubilidad y contenido de proteína tienen alta correlación con los elevados niveles de HAA, AAA y EAA resultantes del tratamiento a 1080 W durante 15 min. Un mayor contenido de estos aminoácidos puede sugerir una mayor interacción entre las regiones hidrofílicas de los aminoácidos y el agua. La alta hidrosolubilidad de las proteínas es esencial para su uso en formulaciones alimentarias y una propiedad necesaria para su función como emulsionantes (Adal, 2024).

Propiedades espumantes

La implementación de HIU afectó positivamente la capacidad de formación (FC) y la estabilidad de la espuma (FS) de la CUSP (Tabla 3). La CUSP tratado a 600 W durante 10 min exhibió valores de FC y FS superiores a otros tratamientos, pero un aumento en la duración o intensidad del ultrasonido no mejoró estas propiedades. En tanto, aumentar la intensidad de 600 a 840 W durante 15 y 20 min resultó en una mejora significativa en la FC, pero una disminución en la FS ($p > 0.05$). Esta mejora puede atribuirse a la reducción en el tamaño de la proteína debido al HIU dado que moléculas de proteína más pequeñas permiten una mayor entrada de aire en la solución que las moléculas más grandes, lo que aumenta su adsorción en la interfaz aire-agua (Rahman & Lamsal, 2021; Xue *et al.*, 2018). Esto explicaría la falta de propiedades espumantes de la CUSP sin tratamiento a pesar de su alto contenido de HAA (Tabla 1), ya que la formación de la interfaz aire/agua no solo está influenciada por la hidrofobicidad superficial sino también por la orientación, el tamaño y la flexibilidad estructural de la proteína (Rahman & Lamsal, 2021).

Los resultados indicaron que altos niveles de energía ultrasónica (superiores a 600 W) y largos tiempos de procesamiento afectaron negativamente las propiedades de formación de espuma. En estas condiciones, los grupos hidrófobos de los aminoácidos quedan expuestos en la superficie, lo que provoca una mayor agregación proteica (Justino *et al.*, 2024). Este fenómeno explicaría que muestras con alto contenido de HAA presentaron reducidas propiedades de formación de espuma. La aplicación de HIU también mejoró la formación de espuma de los aislados de proteína de semilla

de calabaza (Du *et al.*, 2022) y ciruela (Xue *et al.*, 2018). Sin embargo, las propiedades de formación de espuma de estos aislados no se vieron afectadas considerablemente por el aumento de la potencia ultrasónica. Por otro lado, Ramondo *et al.* (2024) reportaron altas propiedades de formación de espuma en la proteína de semilla de calabaza tratada con HIU durante 5 min y 150 W y que la extensión del tiempo de procesamiento con HIU no produjo una mejora de estas propiedades.

Los resultados de este estudio mostraron diferencias con los reportados en otras proteínas vegetales, lo cual se atribuye a las condiciones del ultrasonido (potencias de ultrasonido <600 W), el tiempo de procesamiento y el tipo de proteína.

Propiedades emulsificantes

Con respecto a las propiedades emulsionantes, la CUSP tratada con HIU mostró mayores valores de EAI y ESI en comparación con el control (Tabla 3). El EAI aumentó en altos niveles de HIU y tiempos de procesamiento de 10 a 15 min, pero un tiempo de procesamiento más largos disminuyó esta propiedad. Referente al ESI, aumentar el nivel de HIU de 600 a 840 W en muestras de 10 y 20 min mejoró el ESI. Sin embargo, aumentar el HIU a 1080 W en estas muestras disminuyó notablemente este parámetro. Por lo tanto, los resultados mostraron que exponer la muestra a niveles de potencia de 600 y 1080 W durante 15 min produjo los mayores valores de EAI y ESI, mientras que extender el tiempo resultó en una disminución de estos índices. Este hallazgo resalta la correlación directa entre las propiedades de emulsificación, la hidrosolubilidad y el HAA detectado en estas muestras. La mejora en las propiedades de emulsificación se atribuyó a la presión generada por la ultrasonificación. Estas fuerzas alteran significativamente las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, dando como resultado una configuración más desordenada (Xue *et al.*, 2018), lo que favorece una mayor movilidad y rápida absorción en la interfaz aceite-agua de la CUSP tratada con HIU que el control, que probablemente tuvo una estructura más compacta.

Sin embargo, con tiempos de sonicación más prolongados, se forman agregados proteicos más grandes debido a la despolimerización derivada de interacciones no covalentes o por oxidación, lo que resulta en una menor hidrofobicidad superficial en comparación con las muestras tratadas durante un período más corto (Rahman & Lamsal, 2021). Además, la aplicación de una fuerza mecánica excesiva durante períodos prolongados puede provocar la desnaturalización de las proteínas y disminuir su funcionalidad. Nazari *et al.* (2018) y Zhao *et al.* (2022) informaron una relación significativa entre la exposición de grupos hidrofóbicos por HIU y la mejora de las propiedades emulsionantes en el concentrado de proteína de mijo y en el aislado proteico de papa.

Tabla 1. Propiedades espumantes y emulsionantes de CUSP tratada y no tratada con HIU.

Tratamiento HIU (W)	Capacidad espumante (%)			Estabilidad de la espuma (%)		
	10 min	15 min	20 min	10 min	15 min	20 min
0 (Control)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
600	41.67 ± 3.64 ^{b,A}	19.44 ± 4.81 ^{b,B}	5 ± 0.4 ^{b,C}	25.56 ± 4.71 ^{b,A}	13.89 ± 4.81 ^{b,B}	13.39 ± 2.81 ^{b,B}
840	10.00 ± 1.89 ^{c,A}	23.99 ± 6.3 ^{b,B}	23.89 ± 5.31 ^{c,B}	16.78 ± 3.48 ^{c,A}	12.78 ± 9.48 ^{b,AB}	9.72 ± 2.41 ^{b,B}
1080	2.78 ± 0.21 ^{d,A}	5.56 ± 1.2 ^{c,B}	15.00 ± 3.01 ^{d,C}	4.44 ± 4.19 ^{d,A}	4.44 ± 4.19 ^{c,A}	8.89 ± 7.7 ^{b,A}
Tratamiento HIU (W)	Índice de actividad emulsionante (m ² /g)			Índice de estabilidad de la emulsión (min)		
	10 min	15 min	20 min	10 min	15 min	20 min
0 (Control)	11.97 ± 3.56 ^a	11.97 ± 3.56 ^a	11.97 ± 3.56 ^a	47.98 ± 1.88 ^a	47.98 ± 1.88 ^a	47.98 ± 1.88 ^a
600	20.08 ± 4.77 ^{b,A}	42.06 ± 0.29 ^{b,B}	13.72 ± 1.18 ^{a,C}	131.47 ± 10.48 ^{b,A}	287.93 ± 12.15 ^{b,B}	194.92 ± 27.96 ^{b,C}
840	14.49 ± 0.39 ^{a,A}	39.27 ± 1.13 ^{c,B}	21.3 ± 0.29 ^{b,C}	261.63 ± 22.4 ^{c,A}	51.91 ± 14.08 ^{c,B}	219.31 ± 15.05 ^{b,C}
1080	23.61 ± 8.28 ^{ab,A}	43.09 ± 0.02 ^{d,B}	28.02 ± 0.39 ^{c,A}	138.13 ± 8.02 ^{b,A}	284.35 ± 0.82 ^{b,B}	110.06 ± 12.19 ^{c,C}

Letras minúsculas diferentes en columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos a un tiempo específico. Letras mayúsculas diferentes en las filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tiempos de tratamiento a un nivel específico de HIU. Fuente: Elaboración propia en base a resultados.

Distribución de tamaño de gota de las emulsiones

El tamaño de gota de una emulsión es fundamental para comprender sus características estructurales. La estabilidad de las emulsiones está estrechamente relacionada con la distribución de las partículas dispersas, y las partículas más pequeñas contribuyen a una mayor estabilidad del sistema. Las emulsiones estabilizadas con la CUSP tratada con HIU mostraron distribuciones de tamaño de partícula bimodales (Figura 1). Sin embargo, los datos indicaron que aumentar la potencia del HIU disminuyó el diámetro de gota y el PDI para muestras con 10 y 15 min de HIU, mientras que extender el tratamiento a 20 min afectó negativamente la distribución del tamaño de gota. Estos resultados concuerdan con las propiedades emulsionantes mencionadas anteriormente, en las que las muestras tratadas con HIU durante 15 min presentaron valores de EAI y ESI más altos que los otros tratamientos. Cabe destacar que el PDI y el tamaño de gota de las emulsiones estabilizadas con la CUSP tratada con HIU fueron menores que los reportados para las emulsiones estabilizadas con hidrolizados proteicos de hojas de yaca (Calderón-Chiu *et al.*, 2022). Estos hallazgos indican que el HIU mejora la funcionalidad de proteínas vegetales y puede ser una alternativa a los métodos enzimáticos, que con frecuencia requieren la optimización de las condiciones del proceso, como el tipo de enzima, la concentración y la duración de la hidrólisis.

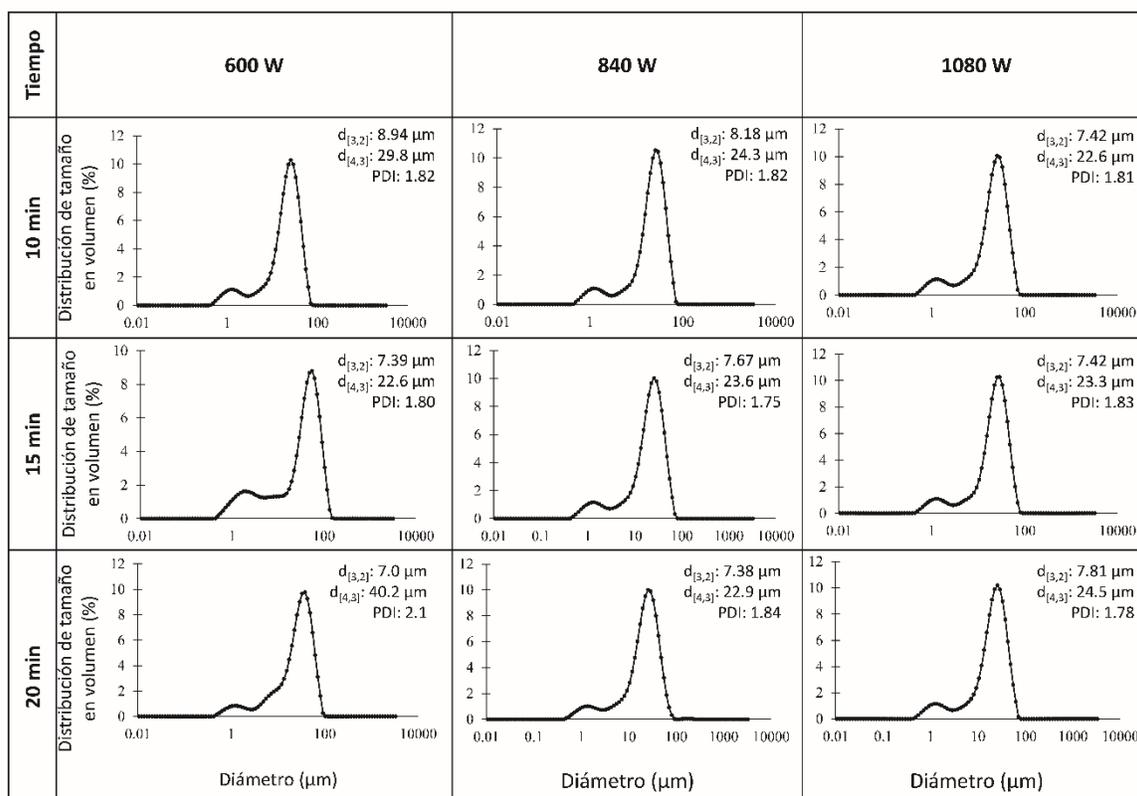


Figura 1. Distribución del tamaño de gota de emulsiones estabilizadas con CUSP tratada y no tratada con HIU. Fuente: Elaboración propia con base a resultados.

Actividad de eliminación de radicales ABTS⁺

La actividad de eliminación de radicales ABTS⁺ de la CUSP tratado con HIU fue significativamente ($p < 0.05$) más notable que la del control en todos los niveles de potencia y tiempos probados (Figura 2). La capacidad antioxidante aumentó significativamente en la CUSP tratado con HIU a 600 W ($p < 0.05$), sin cambios considerables debido al tiempo de procesamiento. Aumentar el nivel de potencia a 840 W durante 10 y 15 min mejoró significativamente la capacidad antioxidante de la muestra. En tanto, a 1080 W, la capacidad antioxidante disminuyó al aumentar el tiempo de ultrasonificación. La capacidad antioxidante más alta se observó a 840 W y 15 min (97.21 ± 0.23 %), que fue aproximadamente el doble de la actividad de eliminación de radicales del control (51.07 %). Estos resultados pueden sugerir que el uso de HIU en la CUSP potencialmente mejora la actividad antioxidante al liberar grupos de aminoácidos de la estructura proteica, lo que facilita reacciones efectivas con oxidantes (Hussain *et al.*, 2024).

Los aminoácidos liberados o expuestos durante el tratamiento con HIU juegan un papel importante en la capacidad antioxidante de las proteínas. Curiosamente, los tratamientos con alto HAA exhibieron una actividad de eliminación de radicales ABTS⁺ ligeramente menor en comparación con aquellos tratamientos que mostraron mayor capacidad antioxidante (840 W y 15 min), lo que sugiere que la capacidad antioxidante no está determinada únicamente por la exposición a HAA. El tratamiento con la mayor capacidad antioxidante presentó mayores niveles de ácido glutámico y prolamina. Las propiedades antioxidantes de la prolina y el ácido glutámico surgen de los electrones excedentes que interactúan con los radicales libres. Este comportamiento también se observó en proteínas de girasol tratadas con HIU (Rawat & Saini, 2023).

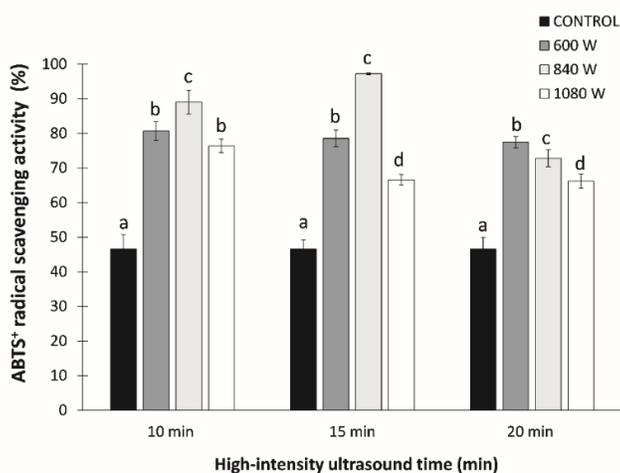


Figura 2. Actividad de eliminación de radicales de la CUSP tratada con HIU y sin tratar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con HIU en tiempos específicos. Fuente: Elaboración propia con base a resultados.

Conclusiones

La aplicación de ultrasonido de alta intensidad (HIU) a la proteína de semilla de *Coccoloba uvifera* (CUSP) alteró el perfil de aminoácidos, afectando significativamente su funcionalidad. La CUSP expuestas a HIU exhibió perfiles de aminoácidos mejorados, hidrosolubilidad, capacidades espumantes y emulsionantes, y propiedades antioxidantes en comparación con las muestras sin tratar. Cabe destacar que se encontró que esta mejora dependía de la duración y del nivel de HIU aplicado. La exposición de la CUSP a HIU a 600 y 1080 W durante 15 min resultó en una recuperación más significativa de aminoácidos hidrofóbicos, lo que condujo directamente a propiedades emulsionantes mejoradas. La aplicación de HIU a 600 W durante 10 min a la CUSP mejoró las propiedades espumantes.

Todos los tratamientos con HIU demostraron una mayor capacidad antioxidante en comparación con la muestra sin tratar. Sin embargo, el tratamiento a 840 W durante 15 min tuvo superior capacidad antioxidante debido a una alta liberación de prolina y ácido glutámico. Estos hallazgos sugieren que la aplicación de condiciones adecuadas de HIU a la CUSP puede lograr propiedades nutricionales, funcionales o antioxidantes específicas. Por lo tanto, la aplicación de HIU a la CUSP mejoró su funcionalidad, lo que indicaría su potencial como nueva proteína vegetal para la industria alimentaria cuando se cultive a gran escala. No obstante, se requieren estudios de optimización adicionales para maximizar las propiedades identificadas en este estudio.

Contribuciones de la autora

Conceptualización: FZRC, MCS y JARS. Metodología, gestión del software, validación experimental, análisis de resultados: FZRC, CCC, MCS, DEHM, KEMR y JARS. Gestión de datos, redacción y preparación del manuscrito, redacción, revisión y edición: FZRC, CCC, MCS y JARS. Gestión del proyecto y obtención de financiación: JARS. “Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo”.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la red temática CYTED código 319RT0576.

Declaraciones éticas

No aplicable

Declaración de consentimiento informado

No aplicable

Agradecimientos

Los autores extienden su agradecimiento al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt), a la red temática CYTED por el apoyo del proyecto 319RT0576 y a Julio César Barros-Castillo por el apoyo técnico para el análisis GC-MS.

Conflicto de los intereses

Los autores afirman que no tienen ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Adal, E. (2024). Modification of faba bean protein isolate by high-intensity ultrasound treatment: screening of physicochemical, thermal, and structural properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(3), 2438–2449. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02379-z>
- Aderinola, T. A., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M., & Aluko, R. E. (2018). Amino acid composition and antioxidant properties of Moringa oleifera seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 4(10), e00877. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00877>
- Official methods of analysis of the association of official analytical chemists [AOAC]. (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (15th ed). <https://doi.org/https://es.scribd.com/document/663913126/AOAC-920-87>

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Brion-Espinoza, I. A., Iñiguez-Moreno, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Barros-Castillo, J. C., Calderón-Chiu, C., & Calderón-Santoyo, M. (2021). Edible pectin film added with peptides from jackfruit leaves obtained by high-hydrostatic pressure and pepsin hydrolysis. *Food Chemistry: X*, 12, 100170. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100170>

Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Barros-Castillo, J. C., Díaz, J. A., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2022). Structural Modification of Jackfruit Leaf Protein Concentrate by Enzymatic Hydrolysis and Their Effect on the Emulsifier Properties. *Colloids and Interfaces*, 6(4), 52. <https://doi.org/10.3390/colloids6040052>

Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: Physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, 112, 106319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106319>

Collantes-Chávez-Costa, A., Alanis-Rodríguez, E., Yam-Uicab, O., López-Contreras, C., Sarmiento-Muñoz, T., & Tapia-Muñoz, J. L. (2019). Composition, structure and diversity of coastal vegetation in the northeastern of Cozumel, Mexico. *Botanical Sciences*, 97(2), 135–147. <https://doi.org/10.17129/botsci.2044>

Corzo-Martínez, M., Villamiel, M., & Moreno, F. J. (2017). Impact of High-intensity Ultrasound on Protein Structure and Functionality during Food Processing. In *Ultrasound in Food Processing* (pp. 417–436). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118964156.ch16>

Du, H., Zhang, J., Wang, S., Manyande, A., & Wang, J. (2022). Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the physicochemical, structural, rheological, behavioral, and foaming properties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)-seed protein isolates. *LWT*, 155, 112952. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112952>

Flores-Jiménez, N. T., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., & Hidalgo-Millán, A. (2023). Modification of rheological properties of animal and vegetable proteins treated with high-intensity ultrasound: A review. *Food Frontiers*, 4(2), 700–720. <https://doi.org/10.1002/fft2.220>

González-Muñoz, A., Valle, M., Aluko, R. E., Bazinet, L., & Enrione, J. (2022). Production of antihypertensive and antidiabetic peptide fractions from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Food Science and Human Wellness*, 11(6), 1650–1659. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2022.06.024>

Hussain, M., Zhong, H., Hussain, K., Manzoor, M. F., Qayum, A., Liu, X., Xu, J., Hussain, A., Ahsan, H. M., & Guan, R. (2024). Emerging high intensity ultrasound for soymilk in boosting bioactivity, amino acids release, reducing anti-nutritional factors and allergenicity. *Food Bioscience*, 59, 104138. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104138>

Jadhav, H. B., Das, M., Das, A., V, G., Choudhary, P., Annapure, U., & Alaskar, K. (2024). Enhancing the functionality of plant-based proteins with the application of ultrasound—A review. *Measurement: Food*, 13, 100139. <https://doi.org/10.1016/j.meafao.2024.100139>

Justino, H. de F. M., dos Santos, I. F., de Souza, R. C. N., Sanches, E. A., Bezerra, J. de A., Lamarão, C. V., Pires, A. C. dos S., & Campelo, P. H. (2024). Exploring ultrasound-assisted technique for enhancing techno-functional properties of plant proteins: a comprehensive review. *International Journal of Food Science & Technology*, 59(1), 498–511. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16673>

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2012). Storage Stability of Protein Hydrolysate from Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *International Journal of Food Properties*, 15(5), 1042–1053. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.513025>

Nazari, B., Mohammadifar, M. A., Shojaei-Aliabadi, S., Feizollahi, E., & Mirmoghtadaie, L. (2018). Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.002>

Rahman, M. M., Byanju, B., Grewell, D., & Lamsal, B. P. (2020). High-power sonication of soy proteins: Hydroxyl radicals and their effects on protein structure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105019. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105019>

Rahman, M. M., & Lamsal, B. P. (2021). Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1457–1480. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12709>

Ramondo, A., Marulo, S., Sorrentino, A., Masi, P., & Di Pierro, P. (2024). Modification of Physicochemical and Functional Properties of Pumpkin Seeds Protein Isolate (PsPI) by High-Intensity Ultrasound: Effect of Treatment Time. *ACS Food Science & Technology*, 4(1), 40–48. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.3c00253>

Rawat, R., & Saini, C. S. (2023). Modification of sunnhemp (*Crotalaria juncea*) protein isolate by high intensity ultrasound: Impact on the molecular structure, amino acid composition and nutritional profiling. *Food Bioscience*, 56, 103100. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103100>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Segura Campos, M. R., Ruiz Ruiz, J., Chel-Guerrero, L., & Betancur Ancona, D. (2015). *Coccoloba uvifera* (L.) (Polygonaceae) Fruit: Phytochemical Screening and Potential Antioxidant Activity. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/534954>

Sun, X., Abioye, R. O., Acquah, C., & Udenigwe, C. C. (2023). Application of Ultrasound Technology in Plant-Based Proteins: Improving Extraction, Physicochemical, Functional, and Nutritional Properties. In *Green Protein Processing Technologies from Plants* (pp. 265–289). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-16968-7_11

Vera-Salgado, J., Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Barros-Castillo, J. C., López-García, U. M., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2022). Ultrasound-Assisted Extraction of *Artocarpus heterophyllus* L. Leaf Protein Concentrate: Solubility, Foaming, Emulsifying, and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates. *Colloids and Interfaces*, 6(4), 50. <https://doi.org/10.3390/colloids6040050>

World Health Organization/Food and Agricultural Organization [WHO/FAO]. (2007). Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007. WHO Technical Report Series No. 935. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/43411/WHO_TRS_935_eng.pdf

Xue, F., Zhu, C., Liu, F., Wang, S., Liu, H., & Li, C. (2018). Effects of high-intensity ultrasound treatment on functional properties of plum (*Pruni domesticae* semen) seed protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5690–5699. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9116>

Yu, N., Jiang, C., Ning, F., Hu, Z., Shao, S., Zou, X., Meng, X., & Xiong, H. (2021). Protein isolate from *Stauntonia brachyanthera* seed: Chemical characterization, functional properties, and emulsifying performance after heat treatment. *Food Chemistry*, 345, 128542. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128542>

Zhao, R., Liu, X., Liu, W., Liu, Q., Zhang, L., & Hu, H. (2022). Effect of high-intensity ultrasound on the structural, rheological, emulsifying and gelling properties of insoluble potato protein isolates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 85, 105969. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105969>