



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA

PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNAS DE CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens*) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE SUS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

EMMANUEL RODEA LUCIO

Bajo la dirección de: OFELIA SANDOVAL CASTILLA, DRA.



APROBADA



Maestría en
Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Departamento de Ingeniería Agroindustrial Universidad Autónoma Chapingo

Chapingo, Estado de México, 23 de octubre de 2022

**PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNAS DE CHAPULÍN
(*Sphenarium purpurascens*) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
SUS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS**

Tesis realizada por Emmanuel Rodea Lucio bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR: 
Dra. Ofelia Sandoval Castilla

CODIRECTOR: 
Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

ASESOR: 
Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

Contenido

ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
DEDICATORIAS.....	ix
AGRADECIMIENTOS.....	x
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xi
RESUMEN GENERAL.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
2.1 Entomofagia.....	17
2.2 Insectos comestibles.....	17
2.3 Chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>).....	18
2.4 Hidrólisis enzimática.....	19
2.5 Propiedades biológicas de péptidos de insectos.....	20
2.6 Péptidos antioxidantes.....	21
2.7 Propiedades tecno-funcionales de proteínas.....	22
2.7.1 Solubilidad de las proteínas.....	22
2.7.2 Propiedad espumante.....	23
2.8 Literatura citada.....	25
3 PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNAS DE CHAPULÍN (<i>Sphenarium purpurascens</i>) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE SUS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS.....	31
3.1 RESUMEN.....	31

ABSTRACT	32
3.2 INTRODUCCIÓN.....	33
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.3.1 Chapulín.....	35
3.3.2 Reactivos analíticos	35
3.3.3 Acondicionamiento del chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>)	35
3.3.4 Análisis químico proximal.....	36
3.3.5 Perfil de aminoácidos totales	36
3.3.6 Solubilidad de las proteínas en función del pH	37
3.3.7 Aislamiento de proteína.....	38
3.3.8 Potencial zeta (ζ).....	38
3.3.9 Digestibilidad relativa <i>in vitro</i>	39
3.3.10 Hidrólisis de proteínas con pepsina y Alcalasa®.....	39
3.3.11 Determinación del grado de hidrólisis	40
3.3.12 Distribución de pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
3.3.13 Actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH	41
3.3.14 Actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS.....	42
3.3.15 Compuestos fenólicos totales (CFT)	42
3.3.16 Identificación de secuencias de aminoácidos de péptidos bioactivos 43	
3.3.17 Identificación de actividad biológica y propiedades fisicoquímicas	43
3.3.18 Capacidad (CE) y estabilidad (EE) espumante	44
3.3.19 Análisis estadístico.....	44
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46

3.4.1	Análisis químico proximal de harina de chapulín (<i>Sphenarium pupurascens</i>).....	46
3.4.2	Perfil de aminoácidos totales	46
3.4.3	Solubilidad de las proteínas de chapulín.....	49
3.4.4	Potencial zeta (ζ).....	50
3.4.5	Digestibilidad relativa <i>in vitro</i>	51
3.4.6	Grado de hidrólisis (GH).....	52
3.4.7	Distribución de pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	53
3.4.8	Actividad antioxidante de hidrolizados con pepsina	55
3.4.9	Actividad antioxidante de hidrolizados con Alcalasa [®]	57
3.4.10	Compuestos fenólicos totales (CFT)	59
3.4.11	Secuencias de péptidos bioactivos	62
3.4.12	Capacidad (CE) y estabilidad espumante (EE)	67
4	CONCLUSIONES.....	70
5	LITERATURA CITADA.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis químico proximal de harina de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>)	46
Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en harina de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>)	48
Cuadro 3. Secuencias de aminoácidos y propiedades fisicoquímicas de péptidos antioxidantes identificados por FT-ICR-MRMS.	64
Cuadro 4. Predicción de actividad biológica en péptidos identificados por FT-ICR-MRMS.	66
Cuadro 5. Capacidad (CE) y estabilidad espumante (EE) de APCh al 1% (m/v).	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de solubilidad de proteínas de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>).....	50
Figura 2. Variación del potencial zeta (ζ) en función del pH de disoluciones de APCh	51
Figura 3. Grado de hidrólisis de proteínas de chapulín (<i>Sphenarium purpurascens</i>).....	53
Figura 4. Distribución de pesos moleculares de hidrolizados con pepsina y Alcalasa®.....	54
Figura 5. Inhibición del radical DPPH por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con pepsina.	56
Figura 6. Inhibición del radical ABTS por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con pepsina.	57
Figura 7. Inhibición del radical DPPH por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con Alcalasa®.	58
Figura 8. Inhibición del radical ABTS por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con Alcalasa®.	59
Figura 9. Compuestos fenólicos totales en hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con pepsina.	61
Figura 10. Compuestos fenólicos totales en hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con Alcalasa®.	61
Figura 11. Micrográficas de espumas formadas con APCh al 1 % (m/v) a pH 5 y 7	69

DEDICATORIAS

A la vida y las personas que me llenaron de felicidad por permitirme culminar esta gran etapa.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al Departamento de Preparatoria Agrícola por brindarme la oportunidad de formarme como profesionalista, por los conocimientos adquiridos y por las facilidades brindadas para el desarrollo de esta investigación.

Al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por otorgarme la oportunidad de pertenecer al programa de Maestría y por los conocimientos adquiridos durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de esta maestría.

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla por su apoyo y conocimientos brindados para desarrollo y mejoramiento de la presente investigación.

A la Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez por su apoyo, enseñanzas y valiosas aportaciones en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez y Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros por sus aportaciones y sugerencias en esta investigación.

Al Dr. Yair Cruz Narvárez del Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo en el uso de equipos del laboratorio de Operaciones Unitarias, ESIQIE, IPN.

Al Dr. José Eleazar Aguilar Toalá de la Universidad Autónoma Metropolitana, por su apoyo y asesoría en el análisis las secuencias peptídicas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Emmanuel Rodea Lucio

Fecha de nacimiento: 11 de julio de 1997

Lugar de nacimiento: Rascón, San Luis Potosí

CURP: ROLE970711HSPDCM08

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Cedula profesional: 12322953



Desarrollo académico

Bachillerato: Preparatoria Agrícola en Universidad Autónoma Chapingo

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial en Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

El crecimiento poblacional y sus cambios en los hábitos de alimentación, ha generado interés en el consumo de insectos como una alternativa sostenible, saludable y nutritiva debido a su alto contenido proteico con propiedades de interés para la formulación de alimentos con alto valor nutricional, biológico, funcional y sensorial. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue determinar las propiedades tecno-funcionales de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), así como la actividad antioxidante de sus hidrolizados enzimáticos obtenidos por medio de dos enzimas, pepsina y Alcalasa®. El aislado de proteína de chapulín (APCh) presentó un alto valor de digestibilidad relativa *in vitro*, además de una significativa capacidad espumante a pH 7. El grado de hidrólisis (GH) fue mayor en el hidrolizados obtenido con Alcalasa® en comparación con los obtenidos con pepsina. Los péptidos obtenidos a 8 h de hidrólisis con pepsina mostraron una mayor inhibición del radical DPPH y los péptidos obtenidos a 2 h de hidrólisis con Alcalasa® presentaron una mayor inhibición del radical ABTS. Adicionalmente, empleando una metodología de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier con espectrometría de masas por resonancia magnética (FT-ICR-MRMS), se logró la identificación de secuencias peptídicas con potencial actividad antiinflamatoria, antiangiogénica, antihipertensiva y antiobesidad, así como la predicción de la actividad antioxidante con el uso de herramientas bioinformáticas. Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos generados vía enzimática pueden ejercer actividad antioxidante, inhibiendo el daño causado por la acción de los radicales libres, evitando así el riesgo a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas.

Palabras clave

Chapulín, proteína, péptidos, actividad antioxidante, capacidad espumante

ABSTRACT

Population growth and changes in eating habits have generated interest in the consumption of insects as a sustainable, healthy and nutritious alternative due to their high protein content with properties of interest for the formulation of foods with high nutritional, biological, functional and sensory value. In this context, the aim of this study was to determine the techno-functional properties of grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) proteins, as well as the antioxidant activity of its enzymatic hydrolysates obtained by means of two enzymes, pepsin and Alcalase®. The grasshopper protein isolate (APCh) presented a high relative digestibility value *in vitro*, in addition to a significant foaming capacity at pH 7. The degree of hydrolysis (GH) was higher in the hydrolysates obtained with Alcalase® compared to those obtained with pepsin. Peptides obtained at 8 h of hydrolysis with pepsin showed a higher inhibition of the DPPH radical and peptides obtained at 2 h of hydrolysis with Alcalase® showed a higher inhibition of the ABTS radical. Additionally, using a high-performance liquid chromatography (HPLC) methodology with Fourier transform ion cyclotron resonance with magnetic resonance mass spectrometry (FT-ICR-MRMS), the identification of peptide sequences with potential anti-inflammatory, anti-angiogenic, antihypertensive and anti-obesity activity was achieved, as well as the prediction of antioxidant activity with the use of bioinformatics tools. The results obtained suggest that peptides generated via enzymatic pathway can exert antioxidant activity, inhibiting the damage caused by the action of free radicals, thus avoiding the risk of developing chronic degenerative diseases.

Keywords

Grasshopper, protein, peptides, antioxidant activity, foaming capacity

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Debido al crecimiento de la población en el mundo, se acrecienta la demanda y diversificación de fuentes de proteína. En este sentido, se estima que para el año 2050 la población mundial supere los 9 mil millones de personas, lo que conlleva a un requerimiento implícito en la producción y suministro de alimentos. Por tanto, surge la necesidad de identificar y fomentar el uso de fuentes alternativas, como lo son los insectos comestibles (Godfray et al., 2010; Kouřimská, & Adámková, 2016). Adicionalmente, los insectos muestran una mayor eficiencia de conversión de alimento en comparación con el ganado mamífero. La conversión alimenticia de insectos como el grillo doméstico (*Acheta domesticus*) es 2 veces mayor que la de los pollos, 4 veces mayor que en los cerdos y más de 12 veces mayor que otros tipos de ganado (Van Huis et al., 2013).

La práctica del consumo de insectos ha ganado interés actualmente al representar una alternativa saludable y nutritiva, proporcionando ácidos grasos, vitaminas y micronutrientes como cobre, hierro, magnesio, fósforo, manganeso, selenio y zinc, destacando su alto contenido de proteína (Halloran & Vantomme, 2017; Sun-Waterhouse et al., 2016).

Diversas especies de insectos comestibles muestran, un alto contenido de proteína que oscila entre 35 a 77 % en base seca, siendo los insectos del orden Orthoptera quienes exhiben la mayor concentración en comparación con los demás ordenes de insectos (Purschke et al., 2018; Dürr & Ratompoarison, 2021). Además, estas proteínas poseen un alto valor nutritivo, con un contenido de aminoácidos esenciales que cumple con las necesidades dietéticas humanas (Liceaga et al., 2021). Sin embargo, no han sido caracterizadas en términos de tecno-funcionalidad y actividad biológica, específicamente en la producción de péptidos antioxidantes que pudieran derivarse de un proceso de hidrólisis enzimática.

Un método que ha tomado interés en la actualidad, sin embargo, no ha sido aplicada en el estudio de proteínas de insectos, es la identificación de secuencias peptídicas por medio de técnicas que permiten la detección sensible y precisa, como la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), una técnica analítica importante que genera información de la estructura y masa del péptido, diseñada para medir la relación masa-carga (m/z) de iones, así como el número de iones presentes en cada valor m/z . Entre las variantes del método de MS se encuentra la espectrometría de resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICR, por sus siglas en inglés), el cual ofrece la más alta resolución y precisión. Los datos provenientes de esta técnica requieren el uso de bases de datos especializadas como MASCOT, para procesar, validar e interpretar los datos, y posteriormente predecir sus propiedades biológicas y fisicoquímicas por medio de algunas bases de datos como BIOPEP, PepDraw, entre otras (Gallegos-Pérez, 2009; Abián et al., 2008).

Con base en lo expuesto, se generó la siguiente hipótesis: El análisis fisicoquímico de las proteínas solubles de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) permitirá identificar su potencial aplicación en sistemas alimentarios, mientras que la caracterización de las propiedades antioxidantes de sus péptidos derivados permitirá identificar su potencial como agente funcional y nutracéutico.

Para comprobar la hipótesis planteada, este proyecto tiene como objetivo determinar las propiedades tecno-funcionales de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), así como obtener hidrolizados enzimáticos y determinar su actividad antioxidante.

Para el cumplimiento del objetivo general se han planteado los siguientes objetivos particulares: a) Obtener un aislado de proteína de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), b) Determinar la capacidad y estabilidad espumante de las proteínas solubles de chapulín c) Realizar la hidrólisis enzimática de las proteínas solubles de chapulín empleando de manera independiente las enzimas pepsina y Alcalasa[®], d) Determinar la actividad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos, a través de la captación de los radicales libres DPPH y ABTS, y e)

Identificar la secuencia de los péptidos obtenidos y determinar su potencial biológico a través de las bases de datos BIOPEP, Peptide Ranker, PreAIP, AntiAngioPred, AHTPIN, iDPPIV y PepDraw.

Este trabajo de investigación está conformado por tres capítulos. En el primero, se muestra el apartado de introducción, abordando la importancia de los insectos comestibles y su potencial como fuente alternativa de proteínas, seguido del planteamiento de la hipótesis y el objetivo del estudio. Posteriormente, en el segundo capítulo se encuentra la información relevante acerca del consumo de insectos, aporte nutricional y el empleo de sus proteínas para la obtención de péptidos bioactivos. Finalmente, en el tercer capítulo se presenta un estudio para la determinación de propiedades fisicoquímicas y tecno-funcionales de las proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), así como de la actividad antioxidante de los péptidos obtenidos mediante la hidrólisis enzimática por pepsina y Alcalasa®.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Entomofagia

La entomofagia es la práctica del consumo de insectos por los seres humanos y representa un campo relativamente nuevo en la ciencia de los alimentos. Es una actividad que se practica en muchos países de todo el mundo, principalmente en regiones de Asia, África y América Latina. La ingesta de insectos complementa la dieta de aproximadamente 2,000 millones de personas, y se trata de un hábito que ha estado presente en la alimentación de los seres humanos. Sin embargo, ha sido en los últimos años que la entomofagia ha captado la atención de las instituciones de investigación, la industria alimentaria, los legisladores y demás organismos que se ocupan de la alimentación humana (Van Huis et al., 2013; Halloran & Vantomme, 2017).

2.2 Insectos comestibles

En México se han identificado más de 500 especies de insectos comestibles y debido a la gran diversidad de especies de insectos, presentan un valor nutricional muy diverso. Entre los órdenes de mayor consumo se encuentran: Coleoptera 31 % (escarabajos), Lepidoptera 18 % (orugas), Hymenoptera 14 % (abejas, avispas y hormigas), Orthoptera 13 % (saltamontes, langostas y grillos), Hemiptera 10 % (cigarras, saltahojas, cochinillas y chinches), Isoptera 3 % (termitas), Odonata 3 % (libélulas), Diptera 2 % (moscas) y otros órdenes 5 % (Halloran & Vantomme, 2017; Soares de Castro et al., 2018).

Como se mencionó, el orden Orthoptera representa el 13 % de todos los insectos comestibles. En particular, el chapulín es probablemente el saltamontes comestible más conocido de América Latina. Formando parte de la dieta humana durante siglos y que en la actualidad se consume en diversas partes de México, como en Los Valles del estado de Oaxaca, especialmente reconocidos por el consumo de esta especie, dado que se ha convertido en un alimento común no solo entre las comunidades indígenas sino también entre la población urbana (Cohen et al., 2009).

Los insectos tienen un gran potencial para su uso en la alimentación humana, por lo cual, se requiere de evaluaciones de seguridad antes de obtener los permisos correspondientes para la comercialización (Belluco et al., 2017)

Debido a esto se ha logrado un avance significativo de la situación legal de los insectos comestibles en la Unión Europea (UE), con el nuevo "Reglamento UE 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, 2015", sobre nuevos alimentos que entró en vigor el 1 de enero de 2018. Según el cual, los insectos se han denominado como un "nuevo alimento" y clasificado como un "alimento consistente en, aislado o producido a partir de animales o sus partes" (artículo 3, apartado 2). Sin embargo, aún es necesario desarrollar y optimizar sistemas de cría, así como métodos de procesamiento de los insectos comestibles para conservar las propiedades nutricionales y mejorar las propiedades tecnológicas, deseables en la formulación de nuevos productos (Mishyna et al., 2018).

2.3 Chapulín (*Sphenarium purpurascens*)

Esta especie puede encontrarse en los estados de Oaxaca, Hidalgo, Chiapas, Guerrero, Puebla, Estado de México, entre otros estados del centro del país con temperaturas que oscilan entre 5 a 25 °C y altitudes superiores a los 2000 msnm, alcanzando densidades de 10 a 55 individuos por metro cuadrado. Generalmente, es considerado una plaga que afecta a diversos cultivos agrícolas e incluso a plantas silvestres (Rodríguez-Miranda et al., 2019). *Sphenarium purpurascens* es uno de los insectos comestibles más importantes de México, con un amplio canal de comercialización y consumo tanto en mercados locales como restaurantes, además, se destacan por su disponibilidad y alto contenido de proteínas (Cerritos & Cano-Santana, 2008; Rodríguez-Miranda et al., 2019).

Es importante destacar el contenido proteico de esta especie, dado que se han registrado valores hasta de 75.87 % en base seca (Melo-Ruiz et al., 2015). Por lo anterior, se le puede considerar como fuente sostenible de proteínas, representando una solución a las preocupaciones que surgen en la actualidad

debido a la seguridad alimentaria, la sostenibilidad y el impacto ambiental de la producción ganadera (Baigts-Allende et al., 2021; Téllez-Morales et al., 2022).

2.4 Hidrólisis enzimática

Es el método comúnmente más empleado para generar péptidos con actividad biológica, los cuales tienen la capacidad de generar efectos fisiológicos que favorecen la salud del consumidor. Estos procesos se llevan a cabo en condiciones controladas de pH, temperatura, concentración de sustrato, tiempo de reacción y tipo de enzima (Zambrowicz et al., 2013). Éstas últimas, son poseedoras de características que favorecen la eficacia de estos procesos, tales como, estabilidad estructural, alta especificidad, eficiencia catalítica y elevadas tasas de conversión (Chai et al., 2017; Esfandi et al., 2019). Otros criterios que favorecen la aplicación de los procesos enzimáticos en las industrias alimentaria y farmacéutica, para la producción de péptidos bioactivos refieren a la ausencia de efluentes contaminantes al medio ambiente, dado que no se requiere el empleo de disolventes orgánicos y reactivos químicos tóxicos (Marciniak et al., 2018).

Uno de los factores más importantes en la obtención de péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática es la selección de las enzimas, debido a que diferentes proteasas presentan sitios de escisión específicos, que pueden producir una gran variedad de péptidos bioactivos. Es importante considerar la especificidad y el sitio de corte en la cadena polipeptídica, porque definirán de manera significativa el perfil de pesos moleculares de los péptidos generados y su bioactividad. Por lo anterior, el uso de enzimas para la hidrólisis de proteínas puede mejorar las propiedades fisicoquímicas, funcionales y biológicas de las proteínas nativas, bajo condiciones controladas (Sarmadi & Ismail, 2010; Muzaiifa et al., 2012; Hong et al., 2019). Los péptidos bioactivos obtenidos mediante hidrólisis enzimática utilizando enzimas de calidad alimentaria, generalmente se consideran GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros, por sus siglas en inglés). Entre las proteasas con mayor aplicación y disponibilidad comercial para la producción de

péptidos bioactivos, se encuentran Alcalasa®, Neutrasa®, tripsina, pepsina, quimotripsina y papaína (Gómez et al., 2020; Ulug et al., 2021).

2.5 Propiedades biológicas de péptidos de insectos

Actualmente, existe un creciente interés por buscar fuentes emergentes y sostenibles de proteína, las cuales también representarían nuevas alternativas para la obtención de péptidos bioactivos (Wang et al., 2022). Además, surge el interés por comprender el potencial los péptidos bioactivos como alternativas naturales, seguras y rentables para prevenir o tratar enfermedades y preservar la salud. Los péptidos bioactivos son pequeños fragmentos de proteínas que están conformados generalmente de 2 a 20 residuos de aminoácidos, y una vez liberados de las proteínas nativas, exhiben diversas actividades biológicas, las cuales se determinan en gran medida por las secuencias de aminoácidos. Pueden ejercer una amplia gama de funciones reguladoras y otros efectos fisiológicos después de ser absorbidos en el sistema circulatorio y alcanzar los sitios objetivo-específicos. Por lo tanto, los péptidos bioactivos pueden considerarse ingredientes potenciales para su uso como alimentos funcionales y nutracéuticos (Daliri et al., 2018; Chalamaiah et al., 2019; Wang et al., 2022).

Muchos de los péptidos que son liberados mediante procesos *in vitro* de hidrólisis enzimática a partir de proteínas animales o vegetales, son bioactivos y tienen la capacidad de presentar funciones reguladoras en los seres humanos (Segura et al., 2009; Segura et al., 2013). Por lo tanto, son una alternativa importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

Se ha informado de una amplia gama de actividades biológicas que pueden presentar los péptidos, incluyendo actividad antioxidante, quelante de metales, antitrombótica, opioide, antihipertensiva, antimicrobiana, hipocolesterolémica e inmunomoduladora (Korhonen, 2009). El estudio de la funcionalidad y bioactividad de péptidos de insectos puede motivar la extracción de proteínas y su uso en la suplementación alimentaria (Soares de Castro et al., 2018).

2.6 Péptidos antioxidantes

Los antioxidantes tienen la capacidad de inhibir, o bien reducir el daño causado por la acción de los radicales libres. Estos últimos, atacan los lípidos de la membrana, provocan modificación oxidativa de las proteínas y daño del ADN, además representan un factor de riesgo significativo en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas (Soares de Castro et al., 2018; Vercruysse et al., 2009). Los radicales libres podrían eliminarse mediante moléculas antioxidantes sintéticas, sin embargo, se ha informado que estos antioxidantes también tienen la capacidad causar daños al ADN y proteínas, por esta razón, el uso debe ser estrictamente controlado (Liu et al., 2020). Por lo anterior, es importante obtener péptidos GRAS, derivados de proteínas que se encuentran generalmente en productos de consumo humano o fuentes alternas. En este sentido, se ha considerado el uso de proteínas de insectos para obtener péptidos que exhiban actividad antioxidante, surgiendo recientes estudios como el de Mudd et al., (2022) en péptidos de proteínas de grillo (*Gryllodes sigillatus*) y Khammuang et al., (2022) para hidrolizados de proteína de *Bombyx mori*.

Mediante investigaciones, se ha mostrado frecuentemente que los péptidos con actividad antioxidante contienen en su estructura aminoácidos que de manera individual la ejercen como His, Lys, Pro, Tyr, Met y Trp (Wang & De Mejia, 2005). Liu et al., (2016) explicaron que los péptidos de bajo peso molecular presentan más aminoácidos expuestos, lo que favorece la interacción con los radicales libres y de esta manera mejora su efecto antioxidante. Además, existe evidencia de que radicales como los peroxilo, son estabilizados mediante la adición de un hidrógeno que puede ser donado por aminoácidos como Hys, Tyr, Leu y Met (Byun et al., 2009). Adicionalmente, se ha informado que ocho aminoácidos diferentes como, Ala, Cys, His, Ile, Leu, Lys, Trp y Val son responsables de la supresión del estrés oxidativo en las células intestinales (Katayama & Mine, 2007).

2.7 Propiedades tecno-funcionales de proteínas

Los concentrados de proteínas tienen la capacidad de presentar propiedades funcionales deseables, y, por lo tanto, pueden ser usados en la formulación de alimentos. Son capaces de formar sistemas complejos e interactuar con otros componentes como proteínas, grasas, carbohidratos y minerales. (Gravel & Doyen, 2020). Además, el empleo de estos concentrados de proteínas de insectos para complementar los productos alimenticios requiere un amplio conocimiento tanto de su composición como de sus propiedades tecno-funcionales, tales como solubilidad, estabilidad térmica, capacidad gelificante, emulsionante y espumante (Bußler et al., 2016).

Estas propiedades están principalmente relacionadas con la estructura y composición de aminoácidos de las proteínas nativas. Los insectos comestibles han ganado mayor importancia como fuentes sostenibles de proteínas en la cadena de suministro de ingredientes para la industria alimentaria. Son reconocidos por su alto contenido de proteína, con atributos tecno-funcionales, por lo tanto, se puede extraer para su aplicación en la industria alimentaria con el objetivo de mejorar las propiedades nutricionales y tecno-funcionales. Diversos estudios han sugerido que los insectos comestibles pueden aplicarse a los productos alimenticios en forma de harina o aislados de proteína (Mintah et al., 2019; Zielinska et al., 2018; Gravel & Doyen, 2020).

2.7.1 Solubilidad de las proteínas

La solubilidad de proteínas es la propiedad funcional de mayor importancia en los alimentos debido a que influye en otras propiedades como gelificación, formación de espuma y emulsiones (Williams et al, 2016). Esta propiedad depende de su estructura, siendo que una configuración proteica menos compacta favorece las interacciones con el agua; la composición de aminoácidos polares y cargados negativamente en la superficie de la proteína también afectan positivamente la solubilidad al igual que la reducción del tamaño de la molécula (Kramer et al., 2012; Sathe et al., 2018). Debido a esto se considera que los procesos de hidrólisis son capaces de aumentar las fuerzas repulsivas y la hidratación de las

proteínas a medida que se liberan péptidos de bajo peso molecular con grupos más ionizables aumentando así la solubilidad (Gould & Wolf, 2018; Sathe et al., 2018).

Los factores extrínsecos también influyen en la solubilidad de las proteínas. La temperatura generalmente mejora esta propiedad, sin embargo, a temperaturas muy elevadas, las moléculas se desnaturalizan exponiendo las secuencias hidrofóbicas provocando la precipitación de las proteínas. Otro factor es la fuerza iónica, a valores bajos los iones evitan las fuerzas de atracción entre moléculas de proteínas, evitando su agregación y precipitación, por lo tanto, la solubilidad incrementa (Sathe et al., 2018; Duong-Ly et al., 2014). De igual manera, el pH influye en esta propiedad, mientras más cercano al punto isoeléctrico de las proteínas la solubilidad será menor, esto debido a que en ese punto la carga neta de la molécula es neutra favoreciendo las interacciones entre ellas ocasionando su precipitación (Sathe et al., 2018; Ma et al., 2018).

En insectos, se ha estudiado la solubilidad de proteínas en especies de insectos como *Apis mellifera*, *Schistocerca gregaria* (Mishyna et al., 2018), *Hermetia illucens* (Mshayisa Van y Zozo, 2022), *Patanga succincta*, *Chondracris roseapbrunner* (Chatsuwan et al., 2018), entre otros.

2.7.2 Propiedad espumante

Las espumas se pueden definir como un gas suspendido en una fase dispersa formada por un líquido y estabilizadas por proteínas en la interfaz aire-líquido. Estas proteínas tienen la capacidad de migrar a la interfase y desplegarse fácilmente para la formación de una capa alrededor de las burbujas aportando una mayor estabilidad. La flexibilidad de las proteínas, la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y la tensión superficial reducida son factores que influyen en las propiedades espumantes. En este sentido, es importante mencionar que las proteínas globulares y compactas suelen ser menos efectivas en la formación de espuma (Mazloomi-Kiyapey et al., 2019). Las espumas presentan procesos de desestabilización, los cuales consisten en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión

de las burbujas, hasta alcanzar una menor área superficial. A este proceso se opone la película proteica superficial actuando como agente espumante, que como barrera mecánica es más efectiva cuanto mayor sea su viscoelasticidad y rigidez. Los mecanismos de desestabilización son procesos que ocurren simultánea y sinérgicamente en los que las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por la difusión de gas a través de la lamela, y posteriormente el colapso de la espuma por ruptura de las lamelas (Abirached et al., 2010).

Se ha estudiado la propiedad espumante de las proteínas de insectos comestibles, los datos muestran que, en las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica, las proteínas podrían usarse en la formulación de alimentos con fines de formación de espuma (Zielinska et al., 2018). Sin embargo, complementar los productos alimentarios con proteínas a base de insectos requiere un amplio conocimiento de sus propiedades fisicoquímicas como solubilidad, pH y propiedades tecno-funcionales. La separación de proteínas en función de su solubilidad produce fracciones solubles e insolubles en agua, que se pueden utilizar para aplicaciones específicas en la industria alimentaria. La extracción de proteínas de insectos para su incorporación en productos alimentarios es un proceso que actualmente se está llevando a cabo para aumentar la aceptabilidad y mejorar las propiedades tecno-funcionales de los alimentos (Bußler et al., 2016).

2.8 Literatura citada

- Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*. (2). 16-35.
- Abirached, C., Medrano, C. A., Panizzolo, L. A., Moyna, P. & Añón, M. C. (2010). Estabilidad de espumas formuladas con proteínas de soja tratadas a pH ácido. *INNOTEC*. 5. 58-62 Laboratorio Tecnológico del Uruguay Montevideo, Uruguay. DOI: 10.26461/05.10
- Baigts-Allende, D., Sedaghat Doost, A., Ramírez-Rodrigues, M., Dewettinck, K., Van der Meeren, P., de Meulenaer, B. & Tzompa-Sosa D. (2021). Insect protein concentrates from mexican edible insects: Structural and functional characterization. *Food Science and Technology*. 152. 1-8. 112267. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112267
- Belluco, S., Halloran, A., y Ricci, A. (2017). New protein sources and food legislation: the case of edible insects and EU law. *Food Security*, 9 (4). 803-814. DOI: 10.1007/s12571-017-0704-0
- Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. & Schlüter, O. (2016). Recovery and technofunctionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*. 2 (12) e00218. DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00218
- Byun, H.-G., Lee, J. K., Park, H. G., Jeon, J.-K., & Kim, S.-K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochemistry*, 44 (8), 842–846. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.003
- Cerritos, R. & Cano-Santana, Z. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Science Direct*, 27(3-5), 473–480. DOI: 10.1016/j.cropro.2007.08.001
- Chai, T. T., Law, Y. C., Wong, F. C. & Kim, S. K. (2017). Enzyme-assisted discovery of antioxidant peptides from edible marine invertebrates: A review. *Marine Drugs*, 15, 1–26. DOI: 10.3390/md15020042
- Chalamaiah, M., Ulug, S. K., Hong, H. & Wu, J. (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*. 58. 123-129. DOI: 10.1016/j.jff.2019.04.050
- Chatsuwana, N.; Nalinanon, S.; Puechkamut, Y.; Lamsal, B. P.; Pinsiroadom, P. (2018). Characteristics, Functional Properties, and Antioxidant Activities of Water-Soluble Proteins Extracted from Grasshoppers, *Patanga*

succincta and *Chondracris roseapbrunner*. *Journal of Chemistry*. 1-11. DOI: 10.1155/2018/6528312.

- Cohen, J. H., Sanchez, N., Mata, D., & Montiel-Ishino, F. (2009). Chapulines and food choices in rural Oaxaca. *Gastronomica*, 9(1), 61–65. DOI: 10.1525/gfc.2009.9.1.61
- Daliri, E. B., Lee, B. H. & Oh, D. H. (2018). Current trends and perspectives of bioactive peptides. *Food Science and Nutrition*. 58 (13), 2273-2284. DOI: 10.1080/10408398.2017.1319795
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Capítulo siete - Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* .541, pp. 85-94): Academic Press.
- Dürr, J. & Ratompouison, C. (2021). Nature’s “Free Lunch”: The contribution of edible insects to food and nutrition security in the central highlands of Madagascar. *Foods*. 10, 2978. DOI: 10.3390/foods10122978
- Esfandi, R., Walters, M. E. & Tsopmo, A. (2019). Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon*, 5 (4). e01538. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01538
- Gallegos-Pérez, J. L. (2009). Aplicación de la espectrometría de masas en proteómica para la búsqueda de biomarcadores. *Mensaje Bioquímico*. 23. 130-146.
- Godfray, H. C., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Nisbett, N., Pretty, J., Robinson, S., Toulmin, C. y Whiteley, R. (2010). The future of the global food system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 69–77. DOI: 10.1098/rstb.2010.0180
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., Zapata, J. E., López-García, G., Cilla, A. & Alegría, A. (2020). Optimization of the red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysis for obtaining ironbinding peptides and evaluation of in vitro iron bioavailability. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9 (7): 883. DOI: 10.3390/foods9070883
- Gould, J., & Wolf, B. (2018). Interfacial and emulsifying properties of mealworm protein at the oil/water interface. *Food Hydrocolloids*, 77, 57-65. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.09.018
- Gravel, A. & Doyen, A. (2020). The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 59: 1022-1072. DOI: 10.1016/j.ifset.2019.102272
- Halloran, A. & Vantomme, P. (2017). La contribución de los insectos a la seguridad alimentaria, los medios de vida y el medio ambiente. FAO. Roma, Italia.

- Hong, G. P., Min, S. G. & Jo, Y. J. (2019). Anti-oxidative and anti-aging activities of porcine by-product collagen hydrolysates produced by commercial proteases: Effect of hydrolysis and ultrafiltration. *Molecules*, 24 (6), 1104. DOI: 10.3390/molecules24061104
- Katayama, S. & Mine, Y. (2007). Antioxidative activity of amino acids on tissue oxidative stress in human intestinal epithelial cell model. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55 (21), 8458–8464. DOI: 10.1021/jf070866p
- Khammuang, S., Sarnthima, R. & Sanachai, K. (2022). Purification and identification of novel antioxidant peptides from silkworm pupae (*Bombyx mori*) protein hydrolysate and molecular docking study. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 42. 1-9. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102367
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: from science to applications, *Journal of Functional Foods*. 2 (1): 177–187. DOI: 10.1016/j.jff.2009.01.007
- Kouřimská, L. & Adámková, A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *Nutrition & Food Science Journal*. 4. 22-26. DOI: 10.1016/j.nfs.2016.07.001
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical journal*, 102(8), 1907-1915. DOI: 10.1016/j.bpj.2012.01.060
- Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2021). Insects as an alternative protein source. *Annual Review of Food Science and Technology*, 13, 19-34. DOI: 10.1146/annurev-food-052720-112443
- Liu, Q., Yang, M., Zhao, B. & Yang, F. (2020). Isolation of antioxidant peptides from yak casein hydrolysate. *RSC Advances*. 10 (34), 19844–19851. DOI: 10.1039/D0RA02644A
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M. y Yang, Q. (2012). Antioxidant activity and phenolic compounds of *Holotrichia parallela* Motschulsky extracts. *Food Chemistry*, 134 (4), 1885–1891. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.091
- Liu, Y., Wan, S., Liu, J., Zou, Y. & Liao, S. (2016). Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm, *Journal of Food Processing and Preservation*, 41 (1), 13081. DOI: 10.1111/jfpp.13081
- Luan, Y., Cui, X. y Ferrat, M. (2013). Historical trends of food self-sufficiency in Africa, *Food Secur.* 5, 393–405. DOI: 10.1007/s12571-013-0260-1

- Ma, M.; Ren, Y.; Xie, W.; Zhou, D.; Tang, S.; Kuang, M.; Wang, Y.; Du, S.-K. (2018). Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. *Food Chemistry*, 240, 856–862. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.030
- Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Pouliot, Y. & Doyen, A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science & Technology*. 80: 187-198. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.08.013
- Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atherosclerosis*. 15(5): 218–227. DOI: 10.22122%2Farya.v15i5.1755
- Melo-Ruiz, V., Sandoval-Trujillo, H., Quirino-Barreda, T., Sánchez-Herrera, K., Díaz-García, R. & Calvo-Carrillo, C. (2015). Chemical composition and amino acids content of five species of edible Grasshoppers from Mexico. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(8). 654-658. DOI: 10.9755/ejfa.2015.04.093
- Mishyna, M., Martinez, J. J., Chen, J. y Ofir, B. (2018). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). *Food Research International*, 116, 697-706. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.098
- Mintah, B., He, R., Dabbour, M., Xiang, J., Agyekum, A. & Ma, H. (2019). Techno-functional attribute and antioxidative capacity of edible insect protein preparations and hydrolysates thereof: Effect of multiple mode sonochemical action. *Ultrasonics – Sonochemistry*. 58. 1-8. 104676. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2019.104676
- Mshayisa, V., Van Wyk, J., & Zozo, B. (2022). Nutritional, Techno-Functional and Structural Properties of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Flours and Protein Concentrates. *Foods*, 11, 724-744. DOI: 10.3390/foods11050724
- Mudd, N., San Martin-Gonzalez, F., Ferruzzi, M. Liceaga, A. M. (2022). In vivo antioxidant effect of edible cricket (*Grylloides sigillatus*) peptides using a *Caenorhabditis elegans* model. *Food Hydrocolloids for Health*, 2. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100083
- Muzaifa, M., Safriani, N. & Fahrizad, Z. (2012). Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation*. 5(1), 36-39.
- Purschke, B., Meinlschmidt, P., Horn, C., Rieder, O. & Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from

migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*. 244, 999–1013. DOI: 10.1007/s00217-017-3017-9

- Reglamento (EU) 2015/2283. Parlamento Europeo y del Consejo. Nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea. Consultado 04 junio de 2022 en <https://www.boe.es/doue/2015/327/L00001-00022.pdf>
- Rodríguez-Miranda, J., Alcántar-Vázquez, J. P., Zúñiga-Marroquín, T. & Juárez-Barrientos, J. M. (2019). Insects as an alternative source of protein: a review of the potential use of grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.) as a food ingredient. *European Food Research and Technology*. 245, 2613–2620. DOI: 10.1007/s00217-019-03383-0
- Sarmadi, B. H. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31,1949-1956. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.020
- Sathe, S. K., Zaffran, V. D., Gupta, S., & Li, T. (2018). Protein Solubilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8), 883-901. DOI: 10.1002/aocs.12058
- Segura, M., Chel, L. & Betancur, D. (2009). Péptidos bioactivos como promotores de la salud, *Industria Alimentaria* 31: 10–15.
- Segura, M., Chel, L. & Betancur, D. (2013). Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias, *Omnia Science*, Barcelona. DOI: 10.3926/oms.136.
- Soares de Castro, R. J., Ohara, A., Gonçalves dos Santos, J. & Fontenele, M. A. (2018). Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 76. 82-84. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.04.006
- Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G., You, L., Zhang J., Liu, Y., Ma, L., Gao, J. & Dong, Y. (2016). Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International*, 89. 129-151. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.10.001
- Téllez-Morales, J. A., Hernández-Santos, B., O. Navarro-Cortez, R. & Rodríguez-Miranda, J. (2022). Impact of the addition of cricket flour (*Sphenarium purpurascens*) on the physicochemical properties, optimization and extrusion conditions of extruded nixtamalized corn flour. *Applied Food Research*. 2 (2). 1-8. DOI: 10.1016/j.afres.2022.100149
- Ulug, S. K., Jahandideh, F. & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*. 108: 27-39. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.002

- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G. y Vantomme, P. (2013). Edible insects: Future prospects for food and feed security. FAO Forestry Paper. Rome.
- Vercruyse, L., Smaghe, G., Beckers, T. y Van Camp, J. (2009). Antioxidant and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Food Chemistry*. 114(1). DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.011
- Wang, S., Zhao, M., Fan, H. & Wu. (2022). Emerging proteins as precursors of bioactive peptides/hydrolysates with health benefits. *Food Science*. 48, 1-15 100914. DOI: 10.1016/j.cofs.2022.100914
- Wang, W. Y. & De Meija, E. G. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases comprehensive. *Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 63–78. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x
- Williams, J. P., Williams, J. R., Kirabo, A., Chester, D., & Peterson, M. (2016). Chapter 3 - Nutrient Content and Health Benefits of Insects. In A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos & M. G. Rojas (Eds.), *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press, San Diego. 61-84.
- Zambrowicz, A., Timmer, M., Polanowski, A., Lubec, G., & Trziszka, T. (2013). Manufacturing of peptides exhibiting biological activity. *Amino Acids*, 44: 315–320. DOI: 10.1007/s00726-012-1379-7
- Zielińska, E., Karaś, M. & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 91, 168 -174. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.01.058

3 PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNAS DE CHAPULÍN (*Sphenarium purpurascens*) Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE SUS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS

3.1 RESUMEN

El chapulín (*Sphenarium purpurascens*) destaca por su alto contenido proteico, del cual pueden obtenerse péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática. En el presente estudio se determinó el grado de hidrólisis (GH) de las proteínas de chapulín a diferentes tiempos de hidrólisis empleando pepsina y Alcalasa®, registrándose porcentajes de 23.05 ± 1.19 (8 h) y 44.30 ± 1.33 (7 h), respectivamente. El aislado de proteína de chapulín (APCh) presentó un valor de digestibilidad relativa *in vitro* de 90.98 %. Además, se evaluaron las propiedades tecno-funcionales del APCh obteniendo una capacidad espumante de 73.77 % a una concentración de proteína de 1 % (m/v) a pH 7. El potencial antioxidante se determinó como la capacidad inhibitoria de los radicales libres DPPH y ABTS, los péptidos obtenidos a 8 h de hidrólisis con pepsina mostraron una mayor inhibición del radical DPPH (97.87 %), y los péptidos obtenidos a 2 h de hidrólisis con Alcalasa® presentaron una mayor inhibición del radical ABTS (87.81 %). Adicionalmente, empleando una metodología de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier con espectrometría de masas por resonancia magnética (FT-ICR-MRMS), se logró la identificación de secuencias peptídicas potencialmente bioactivas, y la predicción de la actividad antioxidante con el uso de herramientas bioinformáticas. Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos generados vía enzimática e identificados mediante bases de datos, pueden ejercer actividad antioxidante, inhibiendo el daño causado por la acción de los radicales libres y con ello, evitar el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas. Además, las proteínas presentaron valores significativos de capacidad espumante, lo cual puede aprovecharse para la formulación de alimentos.

Palabras clave

Chapulín, proteína, péptidos, actividad antioxidante, capacidad espumante

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Emmanuel Rodea Lucio

Director: Dra. Ofelia Sandoval Castilla

FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEINS FROM GRASSHOPPER (*Sphenarium purpurascens*) AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THEIR ENZYMATIC HYDROLYSATES

ABSTRACT

The grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) stands out for its high protein content, from which bioactive peptides can be obtained by enzymatic hydrolysis. In the present study, the degree of hydrolysis (GH) of grasshopper proteins was determined at different hydrolysis times using pepsin and Alcalase®, registering percentages of 23.05 ± 1.19 (8 h) and 44.30 ± 1.33 (7 h), respectively. The grasshopper protein isolate (APCh) presented an in vitro relative digestibility value of 90.98 %. In addition, the techno-functional properties of APCh were evaluated, obtaining a foaming capacity of 73.77 % at a protein concentration of 1 % (m/v) at pH 7. The antioxidant potential was determined as the inhibitory capacity of the free radicals DPPH and ABTS, the peptides obtained at 8 h of hydrolysis with pepsin showed a higher inhibition of the DPPH radical (97.87 %), and the peptides obtained at 2 h of hydrolysis with Alcalase® presented a higher inhibition of the ABTS radical (87.81 %). Additionally, using a high-performance liquid chromatography (HPLC) methodology with Fourier transform ion cyclotron resonance magnetic resonance mass spectrometry (FT-ICR-MRMS), the identification of potentially bioactive peptide sequences and the prediction of antioxidant activity were achieved with the use of bioinformatics tools. The results obtained suggest that the peptides generated via enzymatic means and identified by means of databases can exert antioxidant activity, inhibiting the damage caused by the action of free radicals and thus avoiding the risk of developing chronic diseases. In addition, the proteins presented significant values of foaming capacity, which can be used for food formulation.

Keywords

Grasshopper, protein, peptides, antioxidant activity, foaming capacity

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Emmanuel Rodea Lucio

Director: Dra. Ofelia Sandoval Castilla

3.2 INTRODUCCIÓN

Actualmente, se ha incrementado el interés de la industria alimentaria por la obtención de productos formulados con proteína de fuentes alternas sostenibles, con alto valor nutricional, biológico, sensorial y funcional, como respuesta a las demandas nutricionales generadas por factores como el aumento de la población y los cambios en las dietas; impulsando el mercado mundial de ingredientes proteicos, el cual ha sido valorado en 38 500 millones USD en 2020 y se espera el aumento a una tasa (CAGR) del 10.5 % en el periodo de 2021 a 2028 (Research, 2021, Talens et al., 2022). Debido a esto, las proteínas de insectos pueden ser una alternativa a las proteínas convencionales (vegetales y animales), como ingredientes clave en la formulación de alimentos (Talens et al., 2022).

Los insectos poseen un alto valor nutricional que depende de su etapa de desarrollo, hábitat y dieta. Son reconocidos por ser fuente importante de diversos componentes como lípidos, fibra y minerales, resaltando el contenido de proteína que en algunas especies puede alcanzar hasta un 77 % en base seca (Van Huis & Oonincx, 2017; Purschke et al., 2018). Y en el caso específico del chapulín (*Sphenarium purpurascens*), se ha registrado un alto contenido de proteína de 75.87 % en base seca (Melo-Ruiz et al., 2015).

Estas proteínas pueden emplearse para la obtención de fracciones peptídicas las cuales se producen por medio de la proteólisis enzimática y presentan la capacidad de actuar como moduladores fisiológicos potenciales (Byun et al., 2009). Han ganado interés debido a la capacidad de presentar diversas actividades biológicas entre las que destaca la actividad antioxidante (Liceaga et al., 2021).

La oxidación es un proceso útil que ocurre dentro del cuerpo humano, sin embargo, puede llegar a ser alterado y provocar daños en moléculas vitales a nivel celular, causando diversas enfermedades (Sánchez & Vázquez, 2017). El cuerpo humano tiene la capacidad de producir compuestos antioxidantes para

combatir estos efectos dañinos, sin embargo, es necesario incrementar su ingesta través de los alimentos, siendo una alternativa el uso de péptidos antioxidantes de insectos como nutraceuticos en diversos productos (Mudd et al., 2022).

Además de su valor nutricional y su bioactividad, la información sobre la funcionalidad de las proteínas de insectos suele ser escasa (Baigts-Allende et al., 2021). La funcionalidad de las proteínas en los sistemas alimentarios es determinada por sus características estructurales, así como la conformación, carga e hidrofobicidad. Dichas características dependen de factores intrínsecos, como la composición de la proteína, y extrínsecos, como parámetros de extracción que provocan cambios en las mismas. Por lo tanto, resulta relevante identificar proteínas que exhiban propiedades funcionales, como gelificación, formación de espuma, retención de agua, emulsión y capacidad de absorción de grasa (Talens et al., 2022), aplicables en los sistemas alimentarios (Delahaije et al., 2015; Baigts-Allende et al., 2021).

El uso de proteínas de insectos como complemento de productos alimenticios requiere un amplio conocimiento tanto de su composición como de sus propiedades tecno-funcionales. Con base en lo anterior, este proyecto tiene como objetivo determinar las propiedades tecno-funcionales de proteínas solubles de chapulín (*Sphenarium purpurascens*), así como obtener fracciones peptídicas derivadas de un proceso de hidrolisis enzimática y determinar su actividad antioxidante.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Chapulín

Las muestras de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) provenientes del estado de Oaxaca, México., fueron adquiridas con el proveedor Be-xoo, S.A de C.V. (Ciudad de México, México).

3.3.2 Reactivos analíticos

Los reactivos utilizados fueron L-leucina, ácido 2,4,6- trinitrobencensulfónico (TNBS), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), persulfato de potasio (K₂S₂O₈), Trolox, ácido gálico, quercetina, albúmina sérica bovina (BSA), dodecilsulfato de sodio (SDS), Folin-Ciocalteu, y las enzimas tripsina pancreática porcina, quimotripsina pancreática bovina, proteasa bacteriana y pepsina (EC 3.4.23.1) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), Alcalasa® (EC 3.4.21.62) fue adquirida en EMD Millipore Corporation (Merck KGaA, Alemania). Los reactivos empleados para la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida fueron adquiridos de Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA); hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) de la marca J.T.Baker® (Phillipsburg, NJ, USA). Etanol (C₂H₅OH), metanol (CH₃OH), agua destilada y desionizada, ácido acético (CH₃COOH), tartrato de sodio y potasio (KOCO(CHOH)₂COONa·4H₂O), sulfato de cobre (CuSO₄·4H₂O), éter de petróleo, carbonato de sodio (Na₂CO₃), bicarbonato de sodio (NaHCO₃), fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄), ácido bórico, borato de sodio, acetato de etilo (C₄H₈O₂), cloruro de sodio (NaCl), sulfito de Sodio (Na₂SO₃), acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) se adquirieron de Química Meyer® (Química Suastes S.A. de C.V., CDMX, México).

3.3.3 Acondicionamiento del chapulín (*Sphenarium purpurascens*)

Los chapulines fueron distribuidos (100 g) en charolas de vidrio y se deshidrataron empleando una estufa (RIOSSA, modelo HCF-62) a 45 °C hasta

peso constante. Posteriormente, los chapulines deshidratados se pulverizaron empleando un equipo Nutribullet® (modelo NBR-1240M, motor de 600 W, velocidad 10,000 rpm, Nutribullet, México) durante 3 min, obteniendo de esta manera la harina de chapulín (HCh). Posteriormente, se desgraso HCh en un equipo Soxhlet empleando éter de petróleo como disolvente. En cartuchos de papel filtro se introdujeron 30 g de HCh durante 6 h a partir del primer sifón. Terminado este tiempo, se dejó evaporar el disolvente en una campana de extracción por 3 h, obteniendo la harina de chapulín desgrasada (HCh_d), finalmente se almacenó a -20 ± 1 °C hasta su análisis.

3.3.4 Análisis químico proximal

La composición químico proximal de la HCh se determinó de acuerdo con los procedimientos estándar de la AOAC (2002). El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl (945.01), humedad (método de secado a la estufa, 930.15/90), cenizas (método 942.05), lípidos (método Soxhlet, 963.15), carbohidratos se determinó por diferencia y los resultados se expresaron en base seca (BS).

3.3.5 Perfil de aminoácidos totales

La composición de aminoácidos totales de HCh_d fue determinada según el método reportado por Reis et al. (2020) con ligeras modificaciones. Se realizó la extracción de aminoácidos de 2 g de HCh_d en 3 mL de ácido tricloroacético (1.6 % m/v), la muestra fue sometida a agitación a 200 rpm durante 2 min, posteriormente y se centrifugó dos veces a $7000 \times g$ durante 4 min a 4 ± 1 °C. El sobrenadante obtenido se filtró con papel Whatman No. 1 y se colectó en un matraz volumétrico. Previo a la derivatización de los extractos en la precolumna, fue adicionado el estándar interno se adicionaron 40 µL de estándar interno (L-norvalina 50 mM) a la dispersión de HCh_d (40 µL de estándar interno adicionando 9.960 mL de la dispersión de HCh_d). Se tomó una alícuota de 500 µL de esta dispersión y se neutralizó con 300 µL de NaOH (0.1 M). Tras la homogeneización, se mezclaron 5 µL de dispersión neutralizada con 30 µL de amortiguador de borato (AccQ.Fluor®, Milford, MA, EUA) y 15 µL de carbamato de 6-

aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil (AQC), se dejó en reposo durante 1 min y posteriormente se calentó en un baño de agua a 55 ± 1 °C durante 10 min. El extracto se filtró utilizando una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22 μm de tamaño de poro (Minisart SRP 4®, Sartorius, Gottingen, Alemania) y se analizó por HPLC.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC Nexera, SHIMADZU® Scientific Instruments, Kioto, Japón) para realizar la separación de aminoácidos, con una columna de fase reversa (C18 Luna, Phenomenex®, California, EUA) acoplado a un detector UV. Para el sistema de disolventes se utilizó acetato de sodio de 0.01 M ajustado a pH 4.8 con ácido acético (A) y acetonitrilo (B) en elución en gradiente. El volumen de inyección fue de 2 μL y la elución en gradiente se realizó a un caudal de 0.9 mL min⁻¹ de la siguiente manera: inicial-2.5 min/0-0 % B; 2.8-4.5 min/0-3 % B; 4.5-10.0 min/3-30 % B; 10.0-11.0 min/30-100 % B; 11.0-11.75 min/100-100 % B; 11.75-12.5 min/100-0 % B, y nuevamente se reequilibró en las condiciones iniciales por 2.5 min. El cálculo de concentración de aminoácidos se realizó mediante la interpolación en las respectivas curvas analíticas y empleando la recuperación del estándar interno. Los resultados se expresaron en $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ de proteína.

3.3.6 Solubilidad de las proteínas en función del pH

Se prepararon dispersiones de HCh_d en amortiguador a valores de pH de 2 a 14 con agitación constante a 50 rpm durante 30 min a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas en un equipo (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8 000 rpm a 4 ± 1 °C durante 15 min y se recuperó el sobrenadante para determinación de proteína soluble.

La determinación de proteína soluble se realizó por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977). Se depositaron en tubos de ensaye 20 μL de muestra diluidos en 980 μL de agua destilada, posteriormente se agregó 1 mL de una disolución conformada por una mezcla en partes iguales de las siguientes disoluciones: 1) Na₂CO₃ al 10 % (m/v), CuSO₄•5H₂O al 0.1 % (m/v) y

KOCO(CHOH)₂COONa•4H₂O al 0.2 % (m/v), 2) NaOH 0.8 M y 3) SDS al 10 % (m/v), dejándose en reposo durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.3 N y se dejó en reposo durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV–VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.) y los valores obtenidos fueron interpolados con un modelo obtenido a partir de una curva estándar de BSA (0 - 0.1 mg · mL⁻¹).

3.3.7 Aislamiento de proteína

El aislado de proteína se obtuvo en condiciones alcalinas seguido de una precipitación isoeléctrica, de acuerdo con el método descrito por Montiel-Aguilar et al. (2020) con ligeras modificaciones. Se preparó una dispersión de HCh_d en un amortiguador de fosfatos (pH 13.6) en una relación 1:10. La dispersión se homogeneizó mediante agitación magnética durante 1 h a 40 ± 1 °C. Al cabo de este periodo, fue centrifugada en un equipo Centrifuge 5810 R (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 rpm durante 20 min y se recuperó el sobrenadante para realizar la precipitación isoeléctrica a pH 4 mediante la adición de HCl 1M. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm durante 20 min. Después de retirar el sobrenadante, el sedimento fue deshidratado y molido en un mortero, obteniendo así el aislado de proteína de chapulín (APCh) y se almacenó a -20 ± 1 °C hasta su análisis.

3.3.8 Potencial zeta (ζ)

Se determinó el potencial ζ empleando la metodología descrita por López-Monterrubio et al. (2020), se prepararon dispersiones de APCh al 0.1 % (m/v) cuyo pH se ajustó a valores en el rango de 3 a 5 usando NaOH 1 M o HCl 1 M y utilizando un potenciómetro (Conductronic PC45). Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), que convierte las medidas de la movilidad electroforética en valores de potencial ζ utilizando el modelo matemático Smoluchowski.

3.3.9 Digestibilidad relativa *in vitro*

La digestibilidad relativa se evaluó empleando el método multienzimático descrito por Bodwell et al. (1980) y Carbonaro et al. (1997) con ligeras modificaciones. Se utilizaron 63.8 mg de muestra de APCh en 10 mL de agua destilada a 37 ± 1 °C; se realizó un ajuste de pH a 8.0 con NaOH 1 N. Se adicionó 1 mL de disolución acuosa enzimática que contenía 1.58 mg de tripsina pancreática porcina (tipo IX, 15 310 unidades \cdot mg⁻¹ de proteína) y 3.65 mg de quimotripsina pancreática bovina (tipo II, 48 unidades \cdot mg⁻¹ de sólido) y se llevó a cabo la digestión durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, la mezcla de reacción se acondicionó a 55 ± 1 °C y agregó 1 mL de disolución de proteasa bacteriana (tipo XIV, 4,4 unidades \cdot mg⁻¹ de sólido) (1.48 mg) para continuar la digestión durante 10 min. Al cabo de este periodo, se redujo la temperatura de la mezcla a 37 ± 1 °C y se registró el valor de pH, el cual se utilizó para determinar la digestibilidad de la proteína *in vitro*, empleando la ecuación 1.

$$\text{DRP (\%)} = 234.84 - 22.56X \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde, DRP es el porcentaje de digestibilidad relativa *in vitro* de la proteína y X es el pH de la suspensión después de 20 min de digestión.

3.3.10 Hidrólisis de proteínas con pepsina y Alcalasa®

Se llevó a cabo la hidrólisis enzimática con pepsina y Alcalasa® preparando dispersiones de APCh al 5 % (m/v) en amortiguador de ácido acético y acetato de sodio 0.1 M (pH 2) y amortiguador de fosfatos 0.1 M (pH 8), respectivamente. La dispersión se acondicionó a una temperatura de 37 ± 1 °C (pepsina) o 50 ± 1 °C (Alcalasa®) con agitación continua a 150 rpm por 15 min y se ajustó nuevamente el valor de pH con HCl 1 M o NaOH 1 M. Posteriormente, la reacción de hidrólisis se inició con la adición de la enzima 4% (m/v). La temperatura y el pH se monitorearon y ajustaron durante el proceso. Se tomaron alícuotas al tiempo 0, 30, 60 min y posteriormente en intervalos de 60 min durante 8 h, las alícuotas se llevaron a ebullición en baño maría durante 15 min para detener la reacción. Las alícuotas fueron centrifugadas (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C, seguido de la

recuperación de los sobrenadantes, mismos que se almacenaron a -20 ± 1 °C para su posterior análisis (Grado de hidrólisis, actividad antioxidante, distribución de pesos moleculares (SDS-PAGE) y compuestos fenólicos totales (CFT)).

3.3.11 Determinación del grado de hidrólisis

El GH se determinó de acuerdo con el método reportado por Adler-Nissen (1979) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se preparó en tubos ámbar, a los cuales se adicionaron 64 μL de alícuotas ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$), obtenidas a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h de hidrólisis enzimática, 1 mL de amortiguador de fosfatos (0.2 M, pH 8.2) y 0.5 mL de TNBS al 0.01 % (v/v). La mezcla se agitó en vórtex y se colocó en baño maría a 50 ± 1 °C por 30 min. La reacción se detuvo con la adición de 1 mL de sulfito de sodio 0.1 M. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente por 15 min y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de L-leucina (0-6 mM) y el resultado se expresó en términos de los grupos α -amino terminal. El porcentaje de grado de hidrólisis (% GH) se calculó empleando la ecuación 2.

$$\%GH = [((\text{NH}_2)_{t_x} - (\text{NH}_2)_{t_0}) / ((\text{NH}_2)_{\text{HT}} - (\text{NH}_2)_{t_0})] \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde, $(\text{NH}_2)_{t_x}$ = cantidad de grupos α -amino terminal al tiempo t_x , $(\text{NH}_2)_{t_0}$ = cantidad de grupos α -amino terminal al tiempo 0, $(\text{NH}_2)_{\text{HT}}$ = cantidad de grupos α -amino terminal después de una hidrólisis ácida total. Para cada muestra, se realizaron ensayos por triplicado y los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar.

3.3.11.1 Hidrólisis ácida

En una ampolleta de vidrio se depositaron 0.1 g de APCh y 0.9 mL de HCl 6 N, la cual fue sellada e incubada a 100 ± 1 °C por 24 h. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó adicionando 0.9 mL de NaOH 6 N. La muestra

hidrolizada fue filtrada utilizando papel Whatman No.1 para la remoción de cenizas y se determinó el GH por el método descrito por Adler-Nissen (1979).

3.3.12 Distribución de pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El análisis fue realizado mediante la técnica de electroforesis (SDS- PAGE) reportada por Laemmli (1970) con un gel de separación de poliacrilamida (12 %). Se mezclaron 60 μL de cada muestra ($13 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$), correspondientes a las alícuotas de los tiempos 0, 2 y 8 h de hidrólisis con Pepsina (Pt0, Pt2 y Pt8) y Alcalasa[®] (At0, At2 y At8), con 10 μL de una disolución amortiguadora (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 10 % (m/v), glicerol 25 mL L^{-1} , 2- β -mercaptoetanol 10 mL L^{-1} y azul de bromofenol 0.20 g L^{-1}). Se depositaron 20 μL de Pt0, Pt2, Pt8; 8, 14, y 15 μL de At0, At2 y At8, respectivamente, y 10 μL de un estándar de pesos moleculares (17.434 – 102.663 Da) en los carriles del gel, que fue montado en un equipo de electroforesis (Mini-PROTEAN[®], Tetra Cell, 4- Gel System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, EUA). Los geles fueron teñidos por 30 min con una disolución de azul brillante de Coomassie G-250 al 0.01 % (m/v) y desteñidos con dos lavados de 30 min cada uno, en una disolución constituida por ácido acético 10 % (v/v), metanol 40 % (v/v) y agua desionizada 50 % (v/v) (Switzer et al., 1979).

3.3.13 Actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH

Se evaluó según el método descrito por Soares de Castro & Harumi (2014) con ligeras modificaciones. Este se fundamenta en la estabilidad del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), el cual fue empleado para evaluar la actividad antioxidante de los péptidos derivados de las proteínas de chapulín por la hidrólisis enzimática con pepsina y Alcalasa[®]. Los ensayos se realizaron mezclando 1.5 mL de una solución 0.08 mM de DPPH en metanol al 80 % (v/v) con 0.5 mL de muestra de hidrolizados enzimáticos ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$)-obtenidos a los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) después de 60 min de reacción en la oscuridad. Se preparó un blanco

con 1.5 mL de metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de agua destilada y un control con 1.5 mL de una solución 0.08 mM de DPPH en metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de agua destilada. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó mediante la ecuación 3:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left(\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

3.3.14 Actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS

Se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Re et al. (1999) con ligeras modificaciones. La actividad antioxidante por medio de la captación del catión radical ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). Se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM con 88 μL de persulfato de potasio 140 mM. La mezcla se mantuvo en la oscuridad por 16 h antes de su uso. Al final de este periodo, la disolución se diluyó con etanol, hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.002 a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para los ensayos, se mezclaron 960 μL de la disolución del radical ABTS con 40 μL de hidrolizados enzimáticos ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenidos a los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h. La reacción transcurrió durante 6 min y se midió la absorbancia a 734 nm. Se preparó un blanco con 960 μL de etanol y 40 μL de agua destilada y un control con 960 μL de la disolución del radical ABTS y 40 μL de agua destilada. El porcentaje de inhibición del radical ABTS, se calculó empleando la ecuación 4.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left(\frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

3.3.15 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Se determinó según el método descrito por Singleton y Rossi (1965) y modificado por Gómez-Maldonado et al. (2020). Se colocaron 250 μL de hidrolizados enzimáticos ($1 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtenidos a los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8

h en un tubo que contenía 200 μL de Folin-Ciocalteu y 1250 μL de agua destilada y tras agitar la mezcla, se dejó en reposo 3 min. Se adicionaron 300 μL de carbonato de sodio (15 % m/v), se incubó a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) por 30 min y se midió la absorbancia a 760 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Posteriormente, se preparó una curva estándar de ácido gálico (0 – 60 mg \cdot L⁻¹). El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) \cdot g⁻¹ de muestra seca.

3.3.16 Identificación de secuencias de aminoácidos de péptidos bioactivos

Las secuencias de aminoácidos de los péptidos contenidos en las muestras Pt2, Pt8, At2 y At8, se identificaron por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier con espectrometría de masas por resonancia magnética (FT-ICR-MRMS) en un equipo Bruker Solarix XR (Bremen, Alemania). El volumen de inyección fue de 100 μL con un flujo de 120 $\mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ empleando electro spray con flujo de nitrógeno de 2.0 L \cdot min⁻¹, presión del nebulizador 1.0 bar y capilaridad 4500V. Las moléculas viajan hasta el lector donde se realizaron las lecturas en un rango de 50 – 3000 m \cdot z⁻¹. Los resultados fueron analizados con el software Compass Data Analysis y se identificaron las secuencias de aminoácidos empleando la base de datos MASCOT.

3.3.17 Identificación de actividad biológica y propiedades fisicoquímicas

Se emplearon diferentes bases de datos para predecir la bioactividad de los péptidos. BIOPEP (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) se utilizó para predecir la actividad antioxidante, mientras que Peptide Ranker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>) fue empleado para identificar la posible bioactividad de péptidos empleando una red neuronal con base en las secuencias de aminoácidos. Utiliza una puntuación en un rango de 0 a 1, que indica la probabilidad de que un péptido presente bioactividad. Para la predicción de las diferentes actividades biológicas se utilizó PreAIP (<http://kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PreAIP/>) para potencial antiinflamatorio,

AntiAngioPred (<http://webs.iiitd.edu.in/raghava/antiangiopred/>) para el potencial antiangiogénico, AHTPIN (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpin/>) para potencial antihipertensivo y iDPPIV (<https://camt.pythonanywhere.com/iDPPIV-SCM>) para potencial antidiabético mediante la inhibición de la enzima DPPIV. Además, se determinaron propiedades fisicoquímicas, como hidrofobicidad, punto isoeléctrico y peso molecular con el uso de PepDraw (<https://pepdraw.com/>).

3.3.18 Capacidad (CE) y estabilidad (EE) espumante

Se empleó la metodología descrita por Burgos-Díaz et al. (2016) con ligeras modificaciones. Para ello, se prepararon dispersiones de APCh (1 % m/v) a pH 7, agitándose durante una hora a temperatura ambiente (21 ± 1 °C), posteriormente se transfirió a una probeta graduada de 100 mL. La dispersión fue homogeneizada usando un equipo ULTRA-TURRAX® (T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, DE, EUA.) a 8000 rpm durante 2 min. El volumen de la capa de espuma se registró 10 s después de finalizar la homogeneización. La capacidad de formación de espuma se calculó de acuerdo con la ecuación 5.

$$\text{Capacidad de formación de espuma (\%)} = \left(\frac{H_t - H_0}{H_0} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde H_t es el volumen después de un tiempo de formación de la espuma (mL) y H_0 es el volumen inicial de la muestra (mL).

La estabilidad de la espuma se determinó a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min mediante la ecuación 6.

$$\text{Estabilidad de espuma (\%)} = \left(\frac{V_t}{V_0} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde, v_0 es el volumen de la muestra homogenizada al tiempo 0 y v_t es el volumen de la muestra homogenizada a diferentes intervalos de tiempo.

3.3.19 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes se

sometieron una prueba de comparación de medias de Tukey. La significancia se estableció con un $p \leq 0.05$ y los datos se analizaron utilizando el software estadístico Minitab® 19.1.1 (Minitab Inc., 2019, Pennsylvania, EUA).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Análisis químico proximal de harina de chapulín (*Sphenarium pupurascens*)

La composición químico proximal presentó un contenido proteico de 72.07 ± 0.03 % (Cuadro 1), siendo uno de los insectos con mayor contenido (Williams et al., 2016), similar al registrado por Melo-Ruiz et al., (2015) de 75.87 ± 0.6 % para la misma especie. Anteriormente, se han reportado valores altos de proteína en insectos comestibles del orden Orthoptera como *Locusta migratoria* y *Acheta domesticus* con 82.30 % y 89.50 %, respectivamente (Villaseñor et al., 2021). Adicionalmente, en este trabajo se encontró un contenido de carbohidratos inferior con respecto a los valores reportados por Melo-Ruiz et al., (2015), mientras que el contenido de lípidos y fibra fue ligeramente mayor, los valores mencionados son, 8.51 ± 0.2 , 6.02 ± 1.1 y 7.08 ± 0.9 , respectivamente. Las variaciones en los contenidos de cada componente, en comparación con otros resultados de la misma especie, pueden explicarse debido a su etapa de desarrollo, hábitat y dieta (Van Huis & Oonincx, 2017).

Cuadro 1. Análisis químico proximal de harina de chapulín (*Sphenarium pupurascens*)

Componente	Porcentaje ¹ (Base seca)
Proteína	72.07 ± 0.03
Lípidos	10.15 ± 0.11
Cenizas	3.35 ± 0.06
Fibra	10.62 ± 0.05
Carbohidratos	3.81 ± 0.02^2

¹Los resultados obtenidos son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

²El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia

3.4.2 Perfil de aminoácidos totales

Los aminoácidos son imprescindibles ya que conforman las secuencias que constituyen a las proteínas, las cuales participan en la regulación y el control de

actividades vitales, desde la generación de energía, el transporte, el metabolismo, la transducción de señales y la apoptosis (Mayer & Yu, 2018; Zhang et al., 2022).

En el análisis realizado para harina de *Spherarium purpurascens* se obtuvo el contenido de 20 aminoácidos (Cuadro 2). El aminoácido en mayor concentración fue Ala, el cual tiene la capacidad de funcionar como transportador de nitrógeno. Además, se encontraron todos los aminoácidos esenciales, registrándose en mayor concentración Leu, superando incluso los requerimientos establecidos para el consumo diario en adultos según FAO/WHO/UNU (2007), participa como regulador del recambio de proteínas, transportador de nitrógeno en el cerebro y regulador de la traducción (Melo-Ruiz et al., 2015), adicionalmente, se ha demostrado que en insectos del orden Orthoptera se presentan altos contenidos de Leu, incluso mayores a los de algunas proteínas vegetales como soya con 1.3 g 100 g⁻¹ de proteína (Churchward-Venne et al. 2017), así también, aminoácidos como Val, Thr, y Phe + Tyr superan los requerimientos establecidos por FAO/WHO/UNU (2007). Por lo anterior, este insecto puede considerarse como una fuente importante de aminoácidos esenciales.

En un estudio realizado por Inje et al., (2018) de *Gryllus assimilis*, reportaron contenidos de Val, Thr, Glu, Tyr, Arg y Ser similares a los obtenidos en este trabajo. Adicionalmente, *Sphenarium purpurascens* presentó mayor contenido de Leu, Ala, Cys, Pro y Gly, con respecto a *Gryllus assimilis*. Las ligeras variaciones en el perfil de aminoácidos entre ambos insectos pudieran explicarse debido a diferencias estructurales entre especies, dieta y etapa de desarrollo (Von Hackewitz, 2018).

Cuadro 2. Contenido de aminoácidos en harina de chapulín (*Sphenarium purpurascens*)

Aminoácidos	Chapulín ¹ <i>Sphenarium purpurascens</i>		Grillo <i>Gryllus assimilis</i>	FAO/WHO/UNU*
	g · 100 ⁻¹ harina	g · 100 ⁻¹ proteína	g · 100 ⁻¹ proteína **	g · 100 ⁻¹ proteína
Aminoácidos esenciales				
Leucina (Leu)	5.322 ± 0.030	7.38 ± 0.04 ¹	6.62 ± 0.01	5.9
Valina (Val)	3.537 ± 0.091	4.90 ± 0.12	4.63 ± 0.04	3.9
Lisina (Lys)	2.694 ± 0.018	3.73 ± 0.02	5.29 ± 0.01	4.5
Treonina (Thr)	1.750 ± 0.006	2.42 ± 2.42	3.09 ± 0.07	2.3
Isoleucina (Ile)	0.928 ± 0.045	1.28 ± 0.06	3.36 ± 0.06	3.0
Fenilalanina (Phe) + Tirosina (Tyr)	3.319 ± 0.00	4.59 ± 0.00	-	3.8
Fenilalanina (Phe)	0.292 ± 0.028	0.40 ± 0.03	3.37 ± 0.03	-
Triptófano (Trp)	0.070 ± 0.001	0.09 ± 0.00	2.53 ± 0.04	0.6
Histidina (His)	0.022 ± 0.000	0.03 ± 0.00	2.52 ± 0.00	1.5
Metionina (Met)	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.00	2.29 ± 0.04	1.6
Aminoácidos no esenciales				
Alanina (Ala)	8.581 ± 0.104	11.90 ± 0.14	6.23 ± 0.13	-
Ácido glutámico (Glu)	6.657 ± 0.148	9.23 ± 0.20	10.60 ± 0.02	-
Ácido aspártico (Asp)	5.061 ± 0.031	7.02 ± 0.04	8.25 ± 0.25	-
Cisteína (Cys)	5.500 ± 1.511	7.63 ± 2.09	1.14 ± 0.02	-
Prolina (Pro)	5.023 ± 0.598	6.96 ± 0.82	5.09 ± 0.11	-
Glicina (Gly)	4.572 ± 0.229	6.34 ± 0.31	4.03 ± 0.46	-
Tirosina (Tyr)	3.027 ± 0.057	4.19 ± 0.07	4.23 ± 0.00	-
Arginina (Arg)	3.032 ± 0.073	4.20 ± 0.10	4.14 ± 0.04	-
Serina (Ser)	2.823 ± 0.049	3.91 ± 0.06	3.80 ± 0.30	-
Glutamina (Gln)	0.067 ± 0.001	0.09 ± 0.002	-	-
Asparagina (Asn)	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.00	-	-

¹Los resultados obtenidos son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

*(WHO/FAO/UNU, 2007)

** (Inje et al., 2018)

3.4.3 Solubilidad de las proteínas de chapulín

Se evaluó el perfil de solubilidad de las proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) en función del pH, las cuales presentaron el punto isoeléctrico a pH 4, en donde se observó el menor porcentaje de solubilidad (5.08 %). Este valor ($pI = 4.0$) coincide al registrado por Bußler et al., (2016) para otras especies de insectos comestibles como larva del gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y mosca soldado negra (*Hermetia illucens*). Por su parte, Mishyna et al., (2018) reportaron valores similares de pI para saltamontes (*Schistocerca gregaria*) y abeja melífera (*Apis mellifera*), siendo de 4 y 5, respectivamente. En este trabajo, se obtuvo la mayor solubilidad (47.7 %) de las proteínas a pH 14, siendo este, un valor elevado comparado con los reportados por Bußler et al., (2016) para larvas del gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), siendo 10 y 12, respectivamente. También es un valor elevado con respecto a los resultados obtenidos por Mishyna et al., (2018) para saltamontes (*Schistocerca gregaria*) y abeja melífera (*Apis mellifera*), cuyas proteínas presentaron una mayor solubilidad a pH 10.

Los resultados obtenidos se consideraron para el aislamiento de las proteínas de chapulín, mediante la solubilidad en condiciones alcalinas a pH 14 seguido de una precipitación isoeléctrica a pH 4.

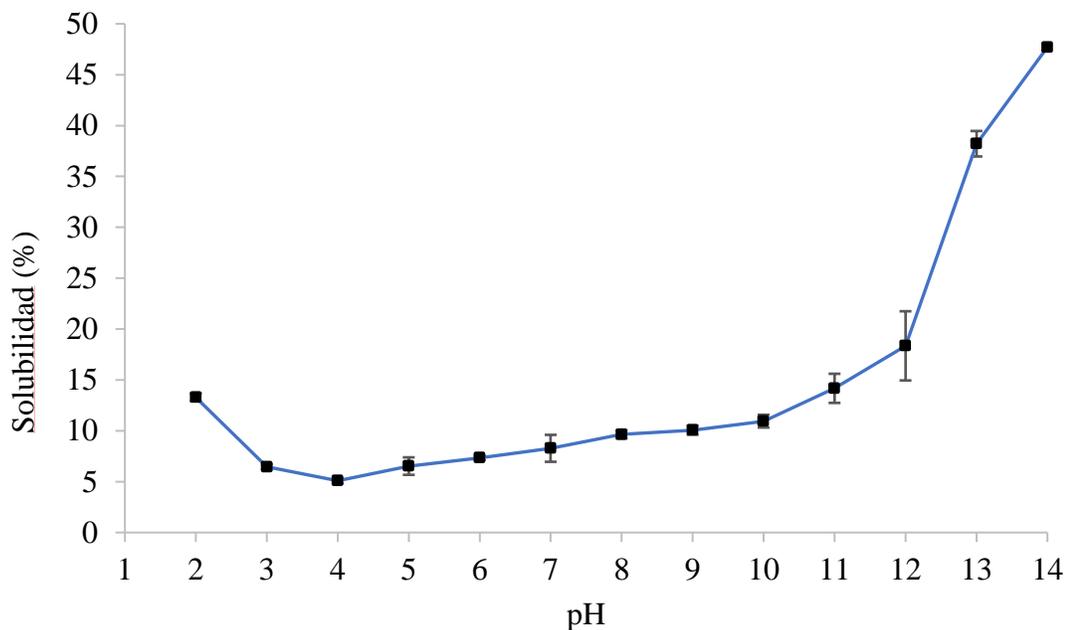


Figura 1. Curva de solubilidad de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*)

3.4.4 Potencial zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) es empleado en la determinación del valor de pH en el cual la carga neta total de las partículas es cero, a este valor se encuentra el punto isoeléctrico en donde el número de cargas positivas de una molécula se iguala al número de cargas negativas (Amaringo & Anaguano, 2013; Mshayisa et al., 2022).

Se analizaron las cargas de las moléculas del APCh mediante el análisis de potencial ζ en un rango de pH de 3 a 5 (Figura 2). Se observó una disminución en los valores de carga de positivos a negativos, proporcional al incremento del pH, lo que se explica por la deprotonación gradual de grupos carboxilo y grupos amonio de las proteínas, generando un cambio en la repulsión electrostática. Se observaron valores positivos (4.05 ± 0.10 a 0.61 ± 0.10) en un rango de pH de 3.0 a 3.9, esto debido al estado protonado de los grupos amino ($-\text{NH}_2$) de los aminoácidos, produciendo grupos amonio ($-\text{NH}_3^+$). Los valores negativos (-0.60 ± 0.18 a -4.12 ± 0.03) en el rango de pH de 4.1 a 5.0 son ocasionados por la

ionización de los grupos carboxílico (-COOH) produciendo grupos carboxilato (-COO⁻) (Ladjal-Ettoumi et al., 2015). Además, se observó que la carga neta cero se encontró en un valor de pH de 4, siendo este el punto isoeléctrico de las proteínas de chapulín; en el cual, las proteínas precipitan, presentando así el menor porcentaje de solubilidad (Figura 1). Así también se han registrado puntos isoeléctricos en el rango de pH ácido, como es el caso del estudio realizado por Mshayisa et al., (2022) en el cual, reportan un punto isoeléctrico de 4.5 para concentrados proteicos de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*).

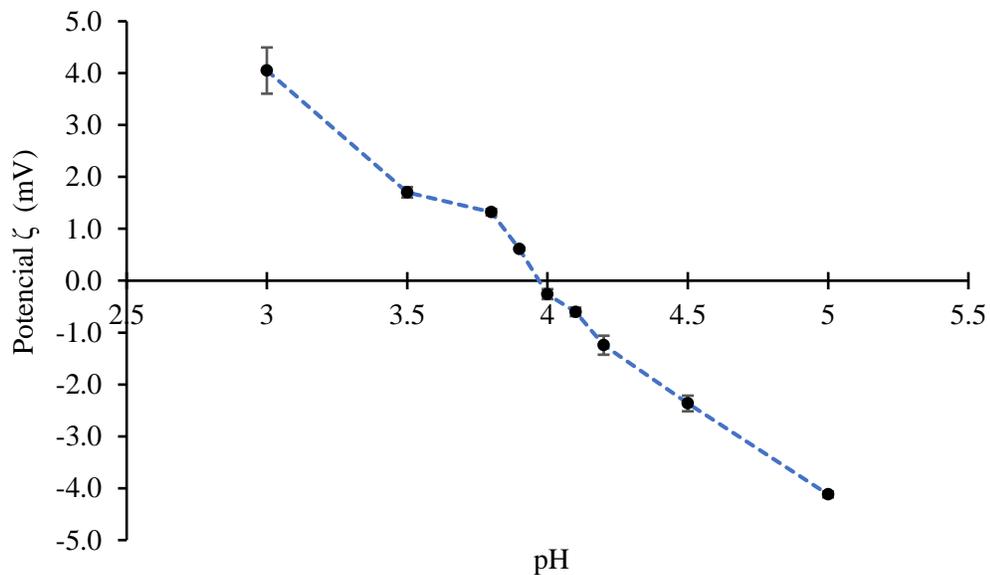


Figura 2. Variación del potencial zeta (ζ) en función del pH de disoluciones de APCh

3.4.5 Digestibilidad relativa *in vitro*

Los insectos se han convertido actualmente en una fuente alternativa de suministro de proteínas para la humanidad debido a su alto contenido proteico, sin embargo, se presentan desafíos debido a que la información fundamentada en evidencias científicas aún es limitada con respecto a la seguridad y digestibilidad. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el porcentaje de digestibilidad *in vitro*, a través de una metodología de laboratorio que intenta

simular el proceso digestivo (Meshulam-Pascoviche et al., 2022, Rodríguez-Rodríguez et al., 2022).

La digestibilidad relativa *in vitro* mediante el método multienzimático para proteínas de chapulín presento un valor alto de 90.98 ± 0.56 %, por lo que es posible que el tratamiento térmico aplicado antes de aislar las proteínas influyó positivamente en el resultado por el desdoblamiento de las cadenas polipeptídicas y consecuentemente la pérdida de la estructura terciaria. Rodríguez-Rodríguez et al., (2022) han demostrado que los valores de digestibilidad pueden aumentar según el procesamiento del insecto antes de la digestión, como los diferentes métodos de obtención de aislados proteicos, desgrasado y tratamiento térmico.

Estudios previos han registrado valores de digestibilidad altos en proteínas de insectos, la mayoría de las especies han mostrado valores entre el 80 y 90% (Rodríguez-Rodríguez et al., 2022). Adicionalmente, un trabajo realizado por Murugu et al. (2021) determinó la digestibilidad *in vitro* de los insectos *Scapsipedus icipe* y *Gryllus bimaculatus*, pertenecientes al orden Orthoptera, en los cuales se obtuvieron valores de 87.8 y 79.5 %, respectivamente.

3.4.6 Grado de hidrólisis (GH)

El APCh fue sometido a hidrolisis enzimática con pepsina y Alcalasa[®], en ambos casos el GH incrementó con respecto al tiempo de progreso de la reacción (Figura 3). El GH registró un valor final de 23.05 ± 1.19 % a las 8 h de hidrolisis con pepsina. Zielinska *et al.*, (2017) presentaron valores de GH = 15.8 % para *Amphiacusta annulipes* y 36.29 % para *Locusta migratoria*. Por lo anterior, se observó que el GH puede diferir debido a factores como tipo de enzima y su concentración, así como el grado de desnaturalización inicial de las proteínas y las condiciones del proceso de hidrolisis utilizado (Purschke et al., 2018).

En este trabajo, se obtuvo un mayor GH (44.73 ± 1.77 %) empleando la enzima Alcalasa[®] a las 7 h de reacción. Lo anterior, podría explicarse a la amplia especificidad de la enzima, es decir, puede actuar en diversos puntos de la

cadena polipeptídica, particularmente en donde se localizan por orden de preferencia, aminoácidos alifáticos (Gly, Ala, Pro, Val, Leu, Ile) y aminoácidos polares sin carga (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln). Algunas investigaciones han registrado mayores valores de GH respecto a los obtenidos en esta investigación, tal es el caso de la hidrólisis de un aislado de proteínas de *Grylloides sigillatus* (52.4%) con Alcalasa® a 1.5 h (Hall et al., 2017) e incluso menores como fue el caso de la hidrólisis del aislado de proteínas de *Bombyx mori* L (32 %), a 5 h de reacción con Alcalasa® (Yang et al., 2013).

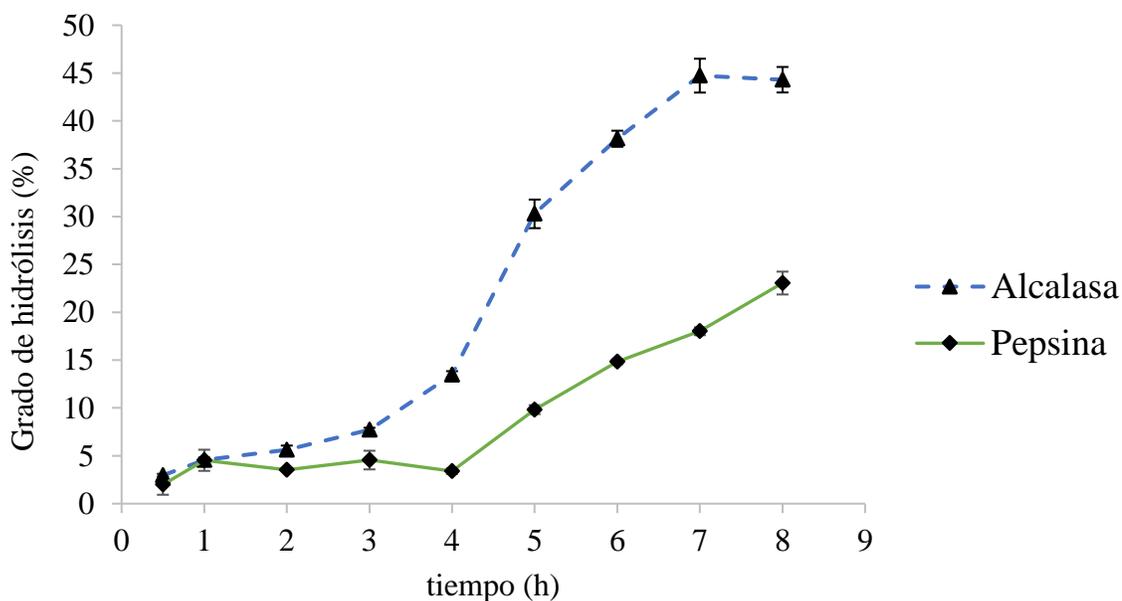


Figura 3. Grado de hidrólisis de proteínas de chapulín (*Sphenarium purpurascens*).

3.4.7 Distribución de pesos moleculares por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se determinó la distribución de los pesos moleculares de las muestras sin hidrolizar (Pt0 y At0) y en los hidrolizados a los tiempos 2 y 8 h para ambas enzimas (Figura 4). Los resultados de las muestras Pt0, Pt2 y Pt8 no mostraron bandas correspondientes a los pesos moleculares del estándar, indicando que

contienen valores menores a 17.434 kDa, esto debido a que el valor inicial de las muestras era de pH 2, y se modificó al momento de la preparación de la muestra previo a la inyección en los geles, resultando en un pH final de 6.8, este cambio ocasionó la precipitación de las proteínas, dejando así solo la presencia de péptidos solubles de bajo peso molecular. Un comportamiento similar reportó Bußler et al (2016) para harina de *Tenebrio molitor*, donde se observó que a valores de pH entre 5 y 8 se observaron bandas correspondientes a los pesos moleculares entre 10 y 15 kDa, mientras que a valores bajos de pH (2 y 3) las bandas presentes correspondieron a pesos moleculares de 20, 30, 40 y 100 kDa, este comportamiento fue ocasionado debido a que a bajos valores de pH, la solubilidad de los péptidos de alto peso molecular (hasta 250 kDa) aumentó, mientras que en los valores de de 5 a 8 la solubilidad fue mayor en los péptidos de peso molecular entre 13 a 18 kDa.

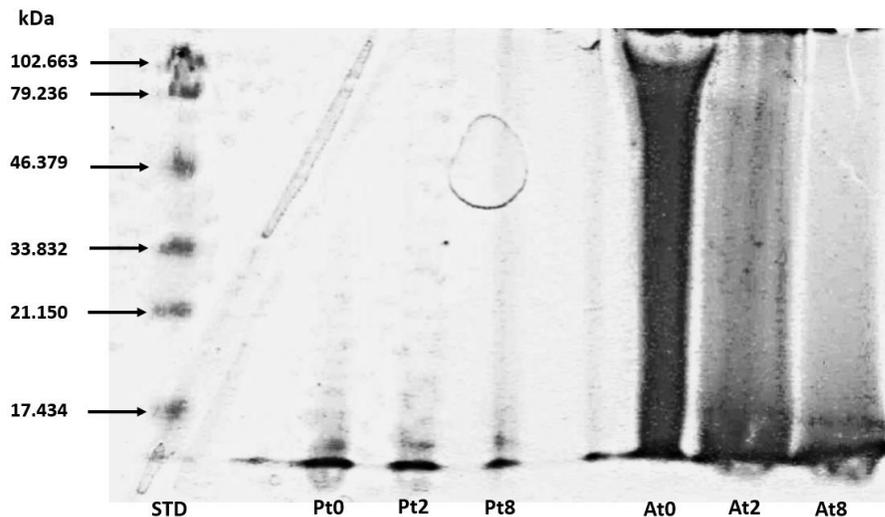


Figura 4. Distribución de pesos moleculares de hidrolizados con pepsina y Alcalasa®.

En las muestras de Alcalasa®, se observaron al tiempo 0 (At0) bandas correspondientes a los pesos moleculares de hasta 102.663 kDa, por las proteínas que mantienen aún sus estructuras nativas, después de 2 h de hidrólisis (At2) se observó una disminución en el tamaño de los péptidos, en un rango de

17.434 a 79.236 kDa, mientras que, a las 8 h de hidrólisis, las bandas se concentraron en valores de pesos moleculares menores a 17.435 kDa. Esto demuestra que la enzima Alcalasa® generó una hidrólisis completa después de un tiempo de 8 h, liberando péptidos de bajo peso molecular de la estructura de la proteína por efecto de las escisiones de los enlaces peptídicos (Wong, et al., 2020; Benitez et al., 2008). El efecto de la hidrólisis en la reducción de pesos moleculares ha sido reportado por otras investigaciones, tales como, Sandoval-Sicairos et al., (2021), en la cual observaron bandas correspondientes a pesos moleculares entre 15 a 100 kDa de proteínas nativas presentes en harina de amaranto germinado, la mayoría de estas bandas desaparecieron después de 3 h de hidrólisis con pepsina, observando bandas de pesos moleculares por debajo de 40 kDa; después de 10 min de hidrólisis con pancreatina, las únicas bandas presentes mostraban pesos menores a 10 kDa. Por otra parte, Purschke et al., (2018) demostraron el efecto de la hidrolisis en los pesos moleculares de los péptidos de proteína de langosta migratoria, presentando inicialmente bandas en el rango de 25 a 37 kDa las cuales disminuían hasta desaparecer con el transcurso del proceso de hidrólisis quedando finalmente bandas correspondientes a 10 y 15 kDa.

3.4.8 Actividad antioxidante de hidrolizados con pepsina

La actividad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrolisis enzimática con Pepsina se determinó mediante la inhibición de los radicales DPPH y ABTS. Los valores más elevados de actividad antioxidante sobre el radical DPPH ($97.87 \pm 0.57 \%$) ($p \leq 0.05$), se obtuvieron con los péptidos obtenidos a las 8 h de hidrolisis (Figura 5), mientras que sobre el radical ABTS ($41.80 \pm 0.60 \%$), se obtuvieron con los péptidos obtenidos a las 5 h de reacción (Figura 6). Este último valor es 2.3 veces inferior al obtenido por la inhibición del radical DPPH, lo cual se puede atribuir a la especificidad de la pepsina, que escinde preferentemente los enlaces peptídicos con Lys, Leu, Glu, Ala y aromáticos (Phe, Tyr y Trp) en el extremo carboxilo terminal (Nasri, 2016). Lo anterior, sugiere la probable formación de interacciones hidrofóbicas entre los residuos de Leu, Glu, Lys y Ala de los péptidos antioxidantes con el radical DPPH y la formación de puentes de

hidrogeno a través de los residuos de Lys. Mientras que el radical ABTS interactúa con los péptidos a través de la formación de puentes de hidrógeno con Arg, Gln y Ser e interacciones hidrofóbicas con Asp (Wen, 2021). Sin embargo, por la especificidad de la enzima, estos aminoácidos no prevalecen en el extremo carboxilo terminal de los péptidos liberados. Wen (2021) demostró mediante el estudio de la relación estructura-actividad de péptidos antioxidantes de semillas de sandía, que los residuos de aminoácidos en péptidos pueden interactuar efectivamente con las moléculas de radicales libres DPPH, lo que hace que el péptido tenga una fuerte actividad de eliminación de estos radicales.

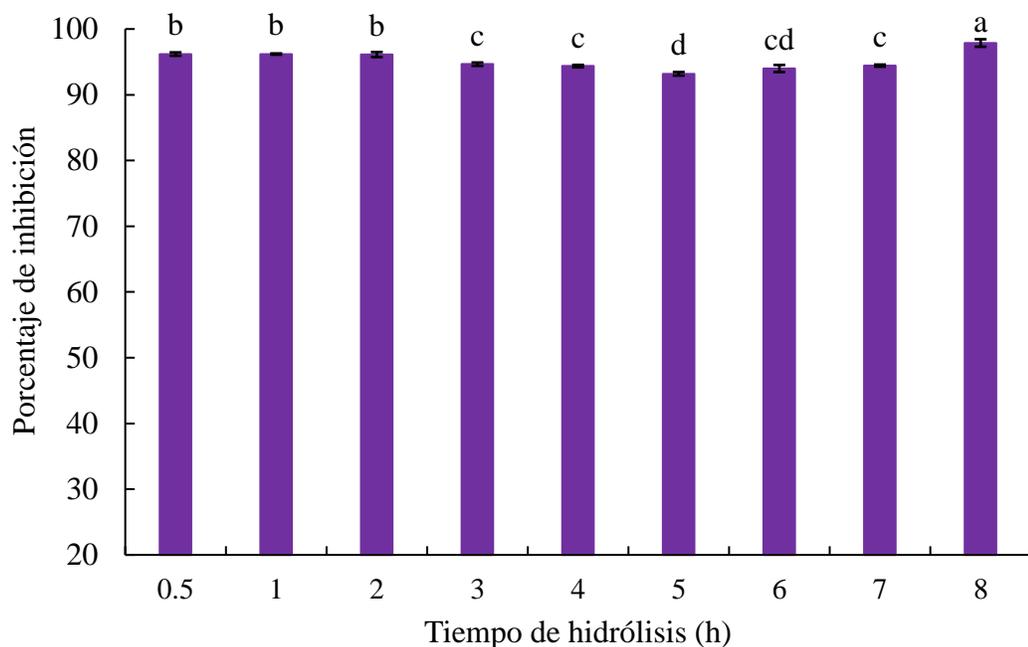


Figura 5. Inhibición del radical DPPH por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con pepsina. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

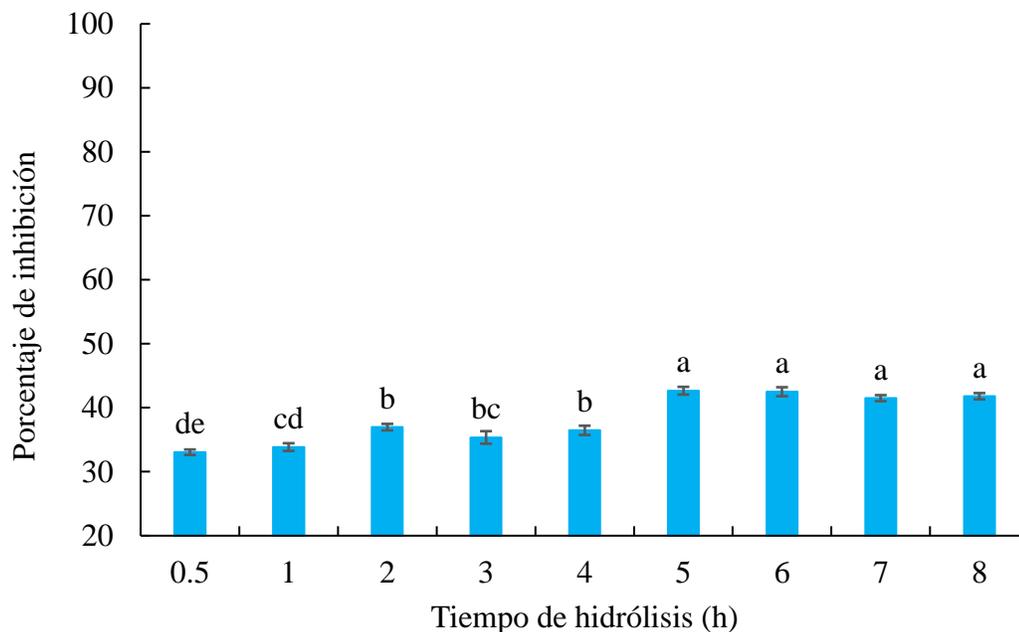


Figura 6. Inhibición del radical ABTS por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con pepsina. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

3.4.9 Actividad antioxidante de hidrolizados con Alcalasa®

La actividad antioxidante de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con Alcalasa® se determinó mediante la inhibición de los radicales DPPH y ABTS. Se registró un valor máximo de 64.25 ± 0.83 % ($p \leq 0.05$) de inhibición del radical DPPH con péptidos obtenidos a las 8 h de hidrólisis (Figura 7), y un valor máximo de 87.81 ± 0.15 % de inhibición del radical ABTS para los péptidos obtenidos a las 2 h de hidrólisis (Figura 8).

Este comportamiento se podría explicar, al considerar que la enzima Alcalasa® presenta una amplia especificidad por la mayoría de los aminoácidos y mayor especificidad por aminoácidos alifáticos (Gly, Ala, Pro, Val, Leu, Ile) y polares sin carga (Ser, Thr, Cys, Asn, Gln), lo que permite una mayor interacción con el radical ABTS por la formación de puentes de hidrogeno con los aminoácidos Gln y Ser e interacciones hidrofóbicas con Gly, mientras que el radical DPPH presenta una mayor interacción con Leu, Glu, Lys y Ala Asp (Wen, 2021). Estos

resultados coinciden con el reporte de Nasri (2016), quien concluye que la actividad antioxidante de los péptidos puede mostrar resultados diferentes, dependiendo del radical libre empleado, la especificidad de las enzimas hidrolíticas, así como de las propiedades de los péptidos (longitud, hidrofobicidad y composición).

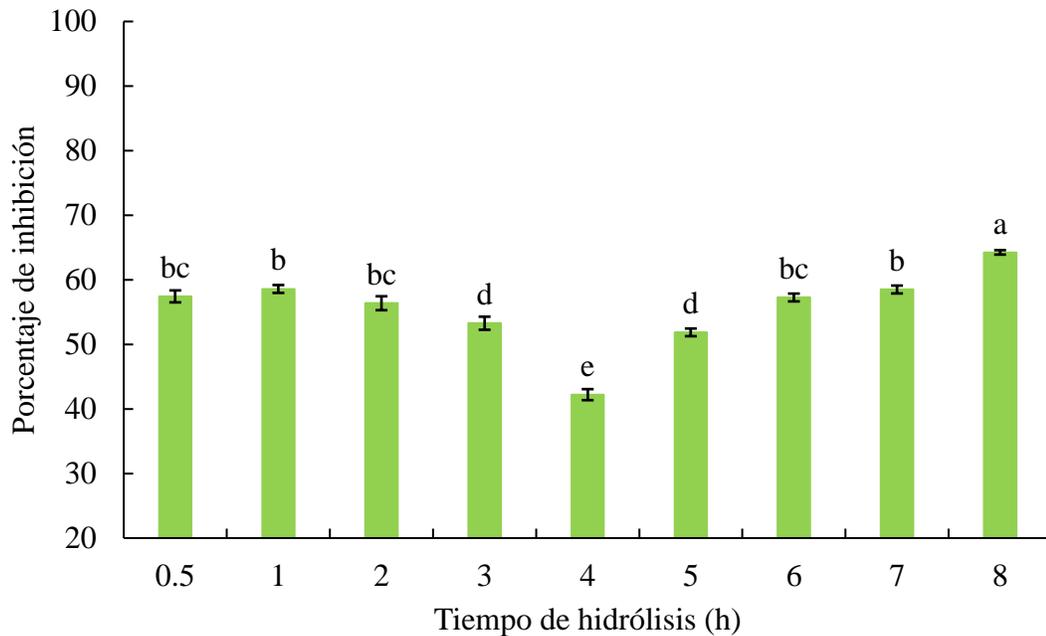


Figura 7. Inhibición del radical DPPH por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con Alcalasa®. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

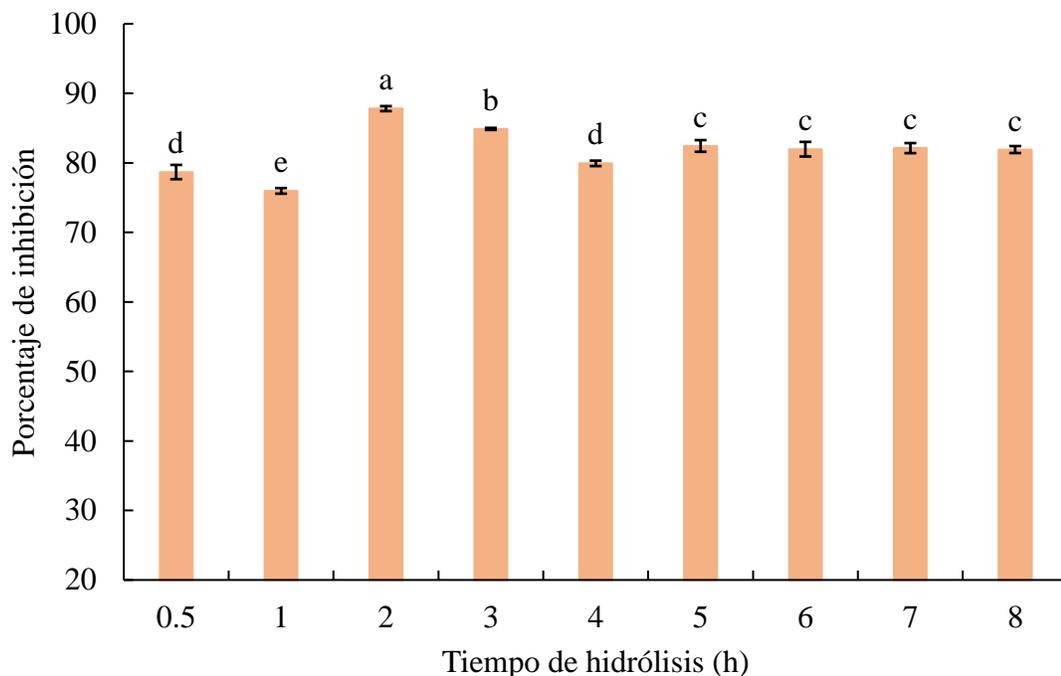


Figura 8. Inhibición del radical ABTS por hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con Alcalasa®. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

3.4.10 Compuestos fenólicos totales (CFT)

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en organismos vegetales y están involucrados en la protección de los tejidos contra la radiación solar, resistencia ante patógenos microbianos y confieren pigmentación a flores y frutos. Sin embargo, se ha evidenciado la presencia de estos metabolitos en insectos debido al metabolismo y absorción de las plantas presentes en su dieta (Cheynier, 2012; Nino et al., 2021), por lo cual al estudiar la actividad antioxidante de bioactivos presentes en el chapulín, se considera necesario determinar el contenido de CFT.

En las figuras 9 y 10 se encuentra el comportamiento del contenido de CFT durante el proceso de hidrólisis de proteínas de chapulín con pepsina y Alcalasa®, observándose valores en un rango de 40-60 mg EAG · g⁻¹ de muestra seca. Las concentraciones más elevadas, se encontraron a las 5 h de hidrólisis, con valores de 59.51 ± 0.19 y 55.49 ± 0.99 mg EAG · g⁻¹ de muestra seca, para hidrolizados

con pepsina y Alcalasa[®], respectivamente. Diversas investigaciones han evidenciado contenidos de CFT en insectos, como el estudio realizado por Navarro et al., (2020), quienes reportan un contenido de 50 mg EAG · g⁻¹ de muestra seca para *Acheta domesticus* perteneciente al orden Orthoptera. Se obtuvieron contenidos y comportamientos similares de CFT entre los hidrolizados con pepsina y Alcalasa[®], lo cual indica que el tipo de enzima y el valor de pH no influyeron en estas variables. Además, se observó un incremento en la concentración de CFT, con respecto al tiempo de hidrólisis hasta las 5 h, y posteriormente una disminución, sugiriendo que la temperatura y el tiempo prolongado de hidrólisis pueden afectar el contenido de CFT (Sepúlveda & Zapata, 2019).

Se ha demostrado mediante estudios *in vitro* que estos compuestos son capaces de exhibir actividad antioxidante, aún después de ser ingeridos por los insectos. Este potencial bioactivo se debe a sus características químicas, es decir, a la presencia de uno o más anillos aromáticos en su estructura con al menos un grupo hidroxilo unido que les permite estabilizar especies reactivas de oxígeno y quelar iones metálicos prooxidantes (Nino et al., 2021).

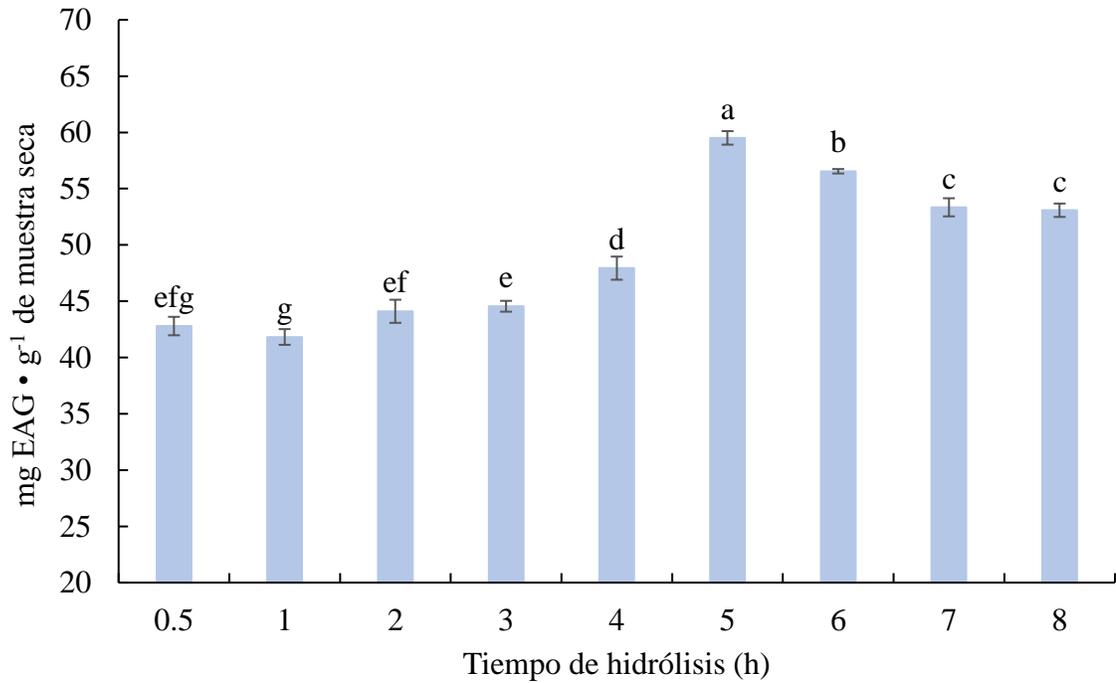


Figura 9. Compuestos fenólicos totales en hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con pepsina. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

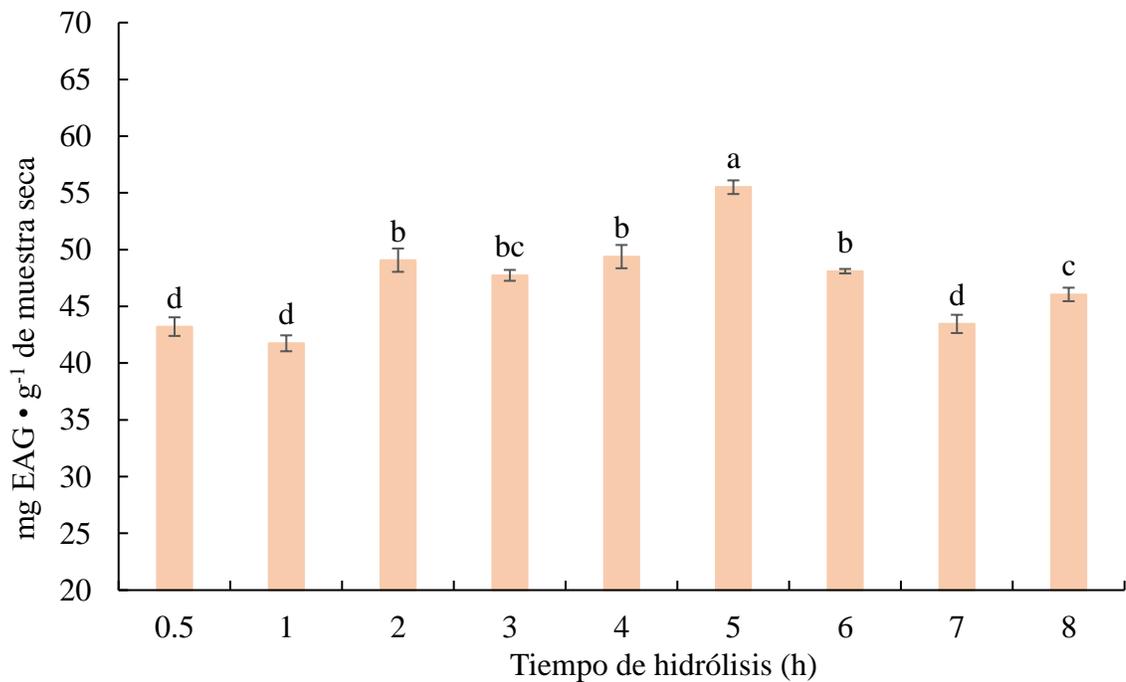


Figura 10. Compuestos fenólicos totales en hidrolizados de proteína de chapulín obtenidos con Alcalasa®.

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

3.4.11 Secuencias de péptidos bioactivos

Se analizaron los hidrolizados de proteína empleando la base de datos MASCOT, el cual requiere los datos obtenidos mediante un análisis de FT-ICR-MRMS, para identificar las secuencias de aminoácidos de péptidos presentes en las muestras. Los hidrolizados analizados fueron Pt2, Pt8, At2 y At8, los cuales se obtuvieron a partir de los procesos catalíticos con pepsina y Alcalasa® a 2 y 8 h de reacción. Se utilizó la base de datos PepDraw en la determinación de las propiedades fisicoquímicas y el uso de BIOPEP para la predicción de la bioactividad, donde se registraron péptidos con potencial actividad antioxidante (Cuadro 3), en los cuales se encontró Lys, el cual ha demostrado tener la capacidad de presentar actividad antioxidante, debido a que contiene un átomo de nitrógeno en su cadena lateral con un par de electrones libres, que lo hacen susceptible a la oxidación al donarlos a los radicales libres (Xu et al., 2017), así también, en estos péptidos se encuentra presente Ala y Leu que se han demostrado la capacidad de exhibir actividad antioxidante (Mazloomi-Kiyapey et al., 2019), además, el anillo de pirrolidina presente en Pro, podría funcionar como donante de hidrógeno a través de sus grupos hidroxilo, actuando como captador de radicales hidroxilo (Tang-Bin et al., 2016). Además, se ha demostrado que la capacidad antioxidante de péptidos se encuentra relacionada con las características estructurales, como la masa molecular, composición de aminoácidos, secuencia e hidrofobicidad (Bin et al., 2014; Tang-Bin et al., 2016).

Mediante investigaciones de bioactividad de péptidos se ha evidenciado la relación entre peso molecular y actividad antioxidante, identificándose péptidos conformados por cadenas cortas de aminoácidos (3 y 6), con pesos moleculares menores a 1000 Dalton (Da) capaces de mostrar una mayor actividad antioxidante, como los obtenidos para las secuencias peptídicas de chapulín mostradas en el cuadro 3, demostrándose que un bajo peso molecular de los péptidos puede ejercer un efecto significativo sobre la actividad antioxidante.

Además, se ha informado que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como Trp, Pro, Val, Phe, Leu e Ile, en péptidos aporta un mayor potencial antioxidante, considerándose la hidrofobicidad como un factor clave en la capacidad de eliminación de radicales libres (Tang-Bin et al., 2016).

Cuadro 3. Secuencias de aminoácidos y propiedades fisicoquímicas de péptidos antioxidantes identificados por FT-ICR-MRMS.

Muestra	Secuencia	Secuencia bioactiva*	Masa molecular** (Da)	pI**	Hidrofobicidad** Kcal · mol ⁻¹
Pt2 Pt8 At2 At8	AAKTGIGMVKPIENIFIPNQQK	KP, VKP	2396.32	10.39	19.68
Pt2	MAATALK	LK	704.38	9.91	10.53
Pt8	FLGALLK	LK	760.48	9.93	6.89
At2 At8	VVGGKPAK	KP	754.46	10.64	15.52
At8	TAGGWLK	LK	731.39	9.82	10.41
At8	GFGMALK	LK	722.37	10.16	9.87

Aminoácidos: A (Alanina), R (Arginina), N (Asparagina), D (Ácido aspártico), C (Cisteína), Q (Glutamina), E (Ácido glutámico), G (Glicina), H (Histidina), I (Isoleucina), L (Leucina), K (Lisina), M (Metionina), F (Fenilalanina), P (Prolina), S (Serina), T (Treonina), W (Triptófano), Y (Tirosina), V (Valina).

*Información obtenida con la base de datos BIOPEP

**Información obtenida con la base de datos PepDraw

Posteriormente, se realizó un análisis de los péptidos empleando la herramienta Peptide Ranker permitiendo predecir la probabilidad de que los péptidos analizados presenten actividad biológica, para ello se empleó esta red neuronal basada en secuencias de aminoácidos, que emplea una puntuación en un rango de 0 a 1 representando la probabilidad de que un péptido sea bioactivo. Se seleccionaron los péptidos con una puntuación >0.5 , registrándose 18 péptidos con actividad antioxidante (Cuadro 4). Lo anterior, debido a que en estos péptidos se encuentran Lys y Arg, los cuales pertenecen al grupo de aminoácidos que tienen átomos de nitrógeno en la cadena lateral, el cual posee electrones que puede donar a moléculas de radicales libres, lo que conduciría a la inhibición de su actividad. Además, estos péptidos presentan Cys, el cual contiene un átomo de azufre en la cadena lateral, con dos pares de electrones libres que lo hace susceptible a la oxidación (Xu et al., 2017).

Adicionalmente, se realizó la predicción de potenciales actividades biológicas que pueden presentar estos péptidos, mediante el uso de bases de datos específicas para actividad antiinflamatoria, antiangiogénica, antihipertensiva y antidiabética a través de la inhibición de la enzima DPP-IV (Cuadro 4). La base de datos PreAIP identificó 14 péptidos con diferente potencial de actividad antiinflamatoria (baja, media y alta); AntiAngio-Pred empleada para predicción de péptidos con actividad antiangiogénica, reportó 6 péptidos, sin embargo, es importante mencionar que debido a las limitaciones de esta base de datos no fue posible predecir dicha actividad en péptidos conformados por menos de 5 aminoácidos; AHTpin realizó la predicción de actividad antihipertensiva de 4 péptidos, mencionando que presenta la limitación para procesar secuencias menores de 3 aminoácidos y para el caso de la actividad antidiabética, se empleó la base de datos iDPPIV en donde se encontraron 5 péptidos capaces de inhibir la enzima DPP-IV.

Cuadro 4. Predicción de actividad biológica en péptidos identificados por FT-ICR-MRMS.

Muestra	Secuencia	Peptide Ranker Score	Antioxidante	PreAIP		AntiAngio-Pred		AHTpin		iDPPIV	
			Pred	Score	Pred	Score	Pred	Score	Pred	Score	Pred
At2 At8	GQDFMR	0.8632	AA	0.336	Low	-0.19	Non-A	-1.41	Non-AH	286.4	Non-I
At2 At8	MR	0.8491	AA	0.264	Non	ND	ND	ND	ND	472	I
At8	NFLRL	0.8233	AA	0.431	Medium	1.22	A	-0.63	Non-AH	303	I
At2	DGPCPSYMDTCCLSPDR	0.8201	AA	0.547	High	2.9	A	0.25	AH	238.12	Non-I
At8	GFGMALK	0.8076	AA	0.367	Low	-1.43	Non-A	-0.29	Non-AH	248.83	Non-I
At2 At8	GLL	0.7538	AA	0.365	Low	ND	ND	ND	ND	365.5	I
At8	ASLFNAPR	0.7422	AA	0.409	Medium	0.27	A	-0.22	Non-AH	271.43	Non-I
Pt8	FLGALLK	0.7052	AA	0.536	High	-0.47	Non-A	0.01	AH	249.67	I
At2	SPGALEDEHNDNFLRF	0.6969	AA	0.477	High	-1.24	Non-A	-0.62	Non-AH	262.87	Non-I
Pt2	TNDFMR	0.6415	AA	0.35	Low	0.93	A	-1.24	Non-AH	303.6	I
Pt2	AISLLLLISAMVFSIIEPVPKK	0.6174	AA	0.615	High	-0.45	Non-A	-1.41	Non-AH	241.29	Non-I
At8	ALCNCNR	0.6125	AA	0.559	High	2.66	A	-0.98	Non-AH	214.83	Non-I
At2	CGK	0.5772	AA	0.365	Low	ND	ND	ND	ND	113.5	Non-I
At8	TAGGWLK	0.5553	AA	0.405	Medium	-0.24	Non-A	0.52	AH	256	Non-I
Pt2 Pt8	HTAGFIPR	0.5401	AA	0.401	Medium	-0.31	Non-A	1.26	AH	288	Non-I
Pt8	SPSLR	0.5244	AA	0.324	Non	1.4	A	-0.16	Non-AH	239.75	Non-I
At2	HGR	0.5066	AA	0.243	Non	ND	ND	ND	ND	271	Non-I
At2	MLGK	0.5038	AA	0.305	Non	ND	ND	-0.53	Non-AH	279.33	Non-I

ND: No determinado debido a las limitaciones del servidor; AA: Los péptidos con puntuación de Peptide Ranker > 0.5 se predice como péptidos antioxidantes; PreAIP: los péptidos con una puntuación < 0.342 se predicen como péptidos no antiinflamatorios (Non AIP), > 0.468 se predicen como péptidos altamente antiinflamatorios (High); AntiAngio-Pred: se predice una puntuación positiva como péptido antiangiogénico (A); AHTpin: se predice una puntuación positiva como péptido antihipertensivo (AH); iDPPIV: los péptidos con puntuación > 294 se predice como péptidos inhibidores de DPPVI (I).

3.4.12 Capacidad (CE) y estabilidad espumante (EE)

Las proteínas poseen la capacidad de formación de espumas, las cuales pueden reducir la tensión superficial en la interfaz líquido-gas y evitar la coalescencia de burbujas. Además, pueden desplegarse, reaccionar entre sí y formar una película de proteína multicapa que conduce a una mayor flexibilidad en la interfaz, permitiendo la formación de una espuma firme y evitando la desestabilidad de las burbujas (Mazloomi-Kiyapey 2019).

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 5, donde se observó una mayor capacidad espumante a un pH 7 (73.77 ± 2.32 %), ligeramente menor a la reportada por Stone et al., (2019) para el grillo *Gryllodes sigillatus* con un 82 %, lo cual pudo ser debido al uso de una mayor concentración de proteína 4 % (m/v). Además, se observó una disminución de la estabilidad durante el transcurso del tiempo a diferentes valores de pH, mostrándose una marcada disminución a un tiempo de 30 min, debido a un aumento de la tensión superficial en la interfaz líquido-aire dada por la tendencia de la fase gaseosa discontinua al formar una fase continua, debido a la coalescencia de las burbujas. Este fenómeno se pudo apreciar en la Figura 11, donde se observó la coalescencia de las burbujas durante el transcurso del tiempo, ocurriendo un aumento en el tamaño de las burbujas partiendo de estructuras esféricas a poliédricas, característico de la desestabilidad y aumento de tensión superficial (Mazloomi-Kiyapey, 2019 Kubbutat et al., 2021).

Cuadro 5. Capacidad (CE) y estabilidad espumante (EE) de APCh al 1% (m/v).

pH	CE (%)	EE (%) a diferentes tiempos (min)						
		0	15	30	45	60	90	120
5	26.23 ± 0.00	100 ± 0.00	96.75 ± 0.92	92.21 ± 1.84	83.12 ± 1.84	81.17 ± 0.92	80.52 ± 0.00	79.87 ± 0.92
7	73.77 ± 2.32	100 ± 0.00	93.40 ± 1.25	73.10 ± 2.36	62.73 ± 1.16	58.49 ± 0.55	58.02 ± 0.11	57.55 ± 0.77

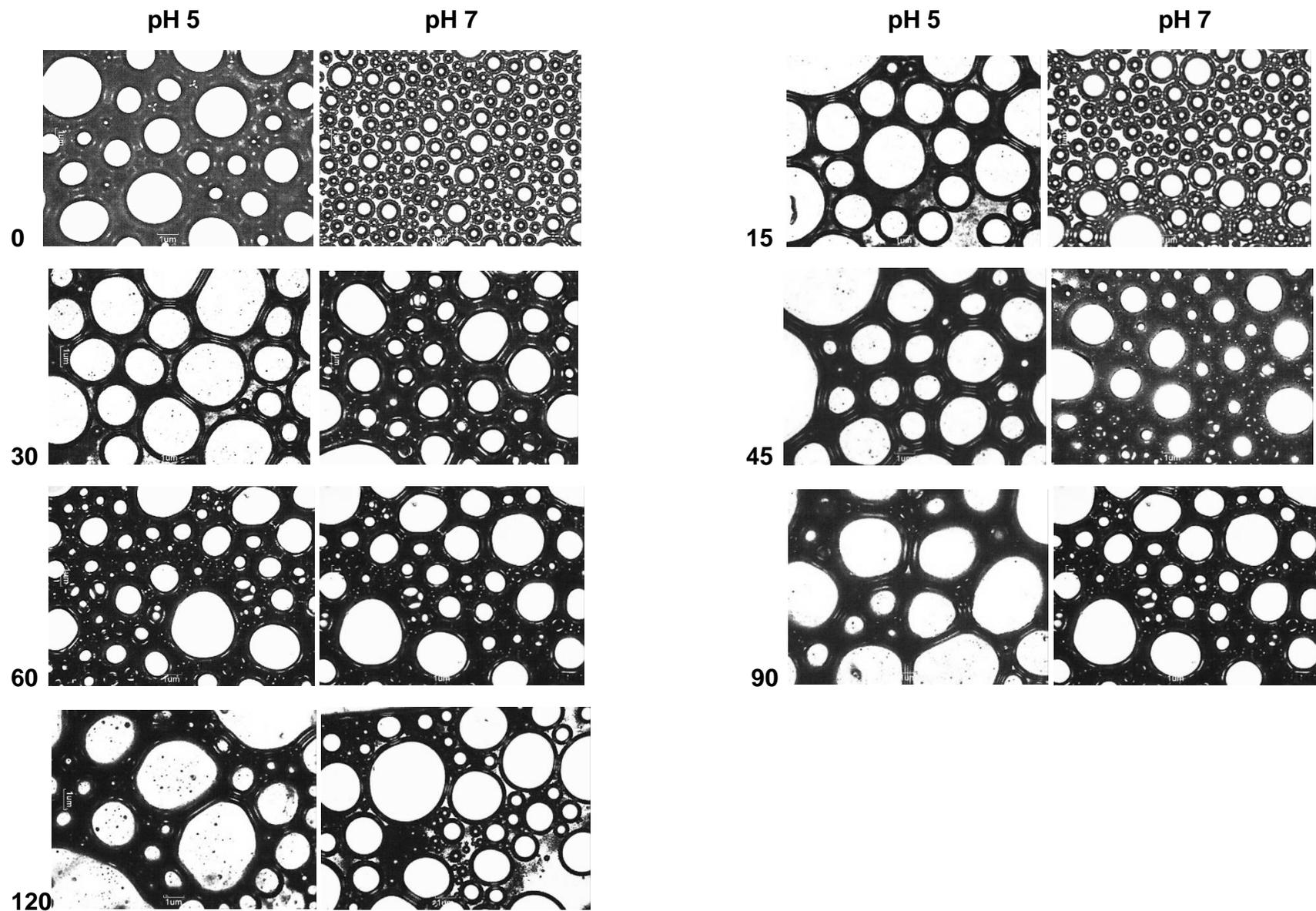


Figura 11. Micrografías de espumas formadas con APCh al 1 % (m/v) a pH 5 y 7

4 CONCLUSIONES

La harina de chapulín exhibió un alto contenido proteico de 72.07 ± 0.03 % superior al de otros ordenes de insectos y un contenido importante de aminoácidos esenciales, así también de aminoácidos con capacidad de presentar actividad biológica, como Pro, Lys Ala, Leu Trp, Val, Phe, Leu, Ile, Cys y Arg. Además, los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas de chapulín presentaron una alta actividad antioxidante, observándose una mayor inhibición del radical DPPH en péptidos obtenidos a 8 h de hidrólisis con pepsina y la mayor inhibición del radical ABTS con los péptidos a 2 h de hidrólisis con Alcalasa®. Se logró también la identificación de secuencias peptídicas con potencial actividad antioxidante, como GQDFMR, NFLRL, GFGMALK, ASLFNAPR, FLGALLK, TNDFMR y la predicción de otras posibles actividades biológicas que pueden presentar estos péptidos, como actividad antiinflamatoria, antiangiogénica, antihipertensiva y antidiabética a través de la inhibición de la enzima DPP-IV. Por lo anterior, los péptidos obtenidos a partir de proteínas de chapulín son moléculas con actividad biológica, que ayudan a evitar el riesgo de desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas. Además, se demostró que las proteínas de chapulín son capaces de exhibir propiedades tecno-funcionales como la capacidad de formación de espumas, siendo esta información útil para su posterior aplicación en matrices alimentarias, mejorando las propiedades funcionales y aumentando el valor nutricional de los alimentos.

5 LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (6) 27, 1256-1262. DOI: 10.1021/jf60226a042
- Amaringo, F. A. & Anaguano, A. H. (2013). Determinación del punto de carga cero y punto isoeléctrico de dos residuos agrícolas y su aplicación en la remoción de colorantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 4(2). 1-10. DOI: 10.22490/21456453.982
- AOAC. (2002). Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., USA.
- Baigts-Allende, D., Sedaghat Doost, A., Ramírez-Rodrigues, M., Dewettinck, K., Van der Meeren, P., de Meulenaer, B. & Tzompa-Sosa D. (2021). Insect protein concentrates from Mexican edible insects: Structural and functional characterization. *Food Science and Technology*. 152. 1-8. 112267. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112267.
- Benitez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236
- Bin, W., Yan-Dan, G., Zhong-Rui, L., Di, Y., Chang-Feng, C. & Jian-Yin, M. (2014). Isolation and characterization of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. *Journal of Functional Foods*. 6:176–185. DOI: 10.1016/j.jff.2013.10.004
- Bodwell, C.E., Satterlee, L.D. & Hackler, L.R., (1980). Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by *in vitro* enzymic digestion methods. *Am. J. Clin. Nutr.* 33 (3), 677–686. DOI: 10.1093/ajcn/33.3.67
- Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. & Schlüter, O. (2016). Recovery and technofunctionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*. 218. DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00218
- Burgos-Díaz, C., Piornos, J. A., Wandersleben, T., Ogura, T., Hernández, X., & Rubilar, M. (2016). Emulsifying and foaming properties of different protein fractions obtained from a novel lupin variety AluProt-CGNA®

(Lupinus luteus). *Journal of Food Science*, 81(7), 1699–1706. DOI: 10.1111/1750-3841.13350

- Byun, H.-G., Lee, J. K., Park, H. G., Jeon, J.-K., & Kim, S.-K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochemistry*, 44 (8), 842–846. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.003
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M. & Carnovale, E., (1997). Solubility–digestibility relationship of legume proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3387–3394. DOI: 10.1021/jf970070y
- Cheynier, V., (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews* 11. 153-177. DOI: 10.1007/s11101-012-9242-8
- Churchward-Venne, T. A., Pinckaers, P. J., van Loon, J. J. & van Loon, L. J. (2017). Consideration of insects as a source of dietary protein for human consumption. *Nutrition Reviews*. 75 (12): 1035–45. DOI: 10.1093/nutrit/nux057
- Delahaije, R., Wierenga, P., Giuseppin, M. & Gruppen, H. (2015). Comparison of heat-induced aggregation of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(21), 5257–5265. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00927
- Gómez-Maldonado, D., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Leyva-Mir, S. G., Robles-Yerena, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT*, 126. 1-9. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109337
- Hall, F. G., Jones, O. G., O’Haire, M. E. & Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 224. 414-422. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.138
- Inje, O. F., Olufunmilayo, A. H., Audu, J. A., Ndaman, S. A. & Chidi. E. E. (2018). Protein quality of four indigenous edible insect species in Nigeria. *Food Science and Human Wellness*. 7 (2). 175-183. DOI: 10.1016/j.fshw.2018.05.003
- Kubbutat, P., Leitão, L. & Kulozik, U. (2021). Stability of Foams in Vacuum Drying Processes. Effects of Interactions between Sugars, Proteins, and Surfactants on Foam Stability and Dried Foam Properties. *Foods*. 10 (8). 1-19 DOI: 2304-8158/10/8/1876/htm#
- Ladjal-Ettoumi, Y., Boudries, H., Chibane, M. & Romero, A. (2015). Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties. *Food Biophysics*. 11(1):43-51. DOI: 10.1007/s11483-015-9411-6

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 277, 680-685.
- Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2021). Insects as an Alternative Protein Source. *Food Science and Technology*, 13. 19-34 DOI: 10.1146/annurev-food-052720-112443
- López-Monterrubio, D. I., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Saff.) protein: Composition, structure, physicochemical and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 108. 1-12. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106043
- Mayer, B. J. & Yu, J. (2018). Protein clusters in phosphotyrosine signal transduction. *Journal of Molecular Biology*. 430 (22). 4547-4556. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.05.040
- Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atherosclerosis*. 15(5): 218–227. DOI: 10.22122/2Farya.v15i5.1755
- Melo-Ruiz, V., Sandoval-Trujillo, H., Quirino-Barreda, T., Sánchez-Herrera, K., Díaz-García, R. & Calvo-Carrillo, C. (2015). Chemical composition and amino acids content of five species of edible Grasshoppers from Mexico. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27(8). 654-658. DOI: 10.9755/ejfa.2015.04.093
- Meshulam-Pascoviche, D., David-Birman, T., Refael, G. & Lesmes, U. (2022). Big opportunities for tiny bugs: Processing effects on the techno-functionality and digestibility of edible insects. *Trends in Food Science & Technology*. 122, 265–274. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.02.012
- Mishyna, M., Martinez, J. J., Chen, J. y Ofir, B. (2018). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). *Food Research International*, 18. 697-706. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.098
- Montiel-Aguilar, L. J., Torres-Castillo, J. A., Rodríguez-Servin, R., López-Flores, A. B., Aguirre-Arzola, V. E., Méndez-Zamora, G. & Sinagawa-García, S. R. (2020). Nutraceutical effects of bioactive peptides obtained from *Pterophylla beltrani* (Bolivar & Bolivar) protein isolates. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 19, 756-7861. DOI: 10.1016/j.aspen.2020.06.006
- Mshayisa, V. V., Wyk, J. V. & Zozo, B. (2022). Nutritional, Techno-Functional and Structural Properties of Black Soldier Fly (*Hermetia*

illucens) Larvae Flours and Protein Concentrates. *Foods*. 11 (5). 724. DOI: 10.3390/foods11050724

- Mudd, N., San Martin-Gonzalez, F., Ferruzzi, M. & Liceaga, A. M. (2022). *In vivo* antioxidant effect of edible cricket (*Grylloides sigillatus*) peptides using a *Caenorhabditis elegans* model. *Food Hydrocolloids for Health*. 2. 100083. DOI: 10.1016/j.fhfh.2022.100083
- Murugu, D. K., Onyango, A. N., Ndiritu, A. K., Osuga, I. M., Xavier, C., Nakimbugwe, D. & Tanga, C. M. (2021). From farm to fork: Crickets as alternative source of protein, minerals, and vitamins. *Frontiers in Nutrition*. 8. 704002. DOI: 10.3389/fnut.2021.704002
- Nasri, M. (2016). Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*. 2-51. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.10.003
- Navarro, J., Gutiérrez-Docio, A., Otero, P., Reglero, G. & Martin, D. (2020). Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Food Chemistry*. 309. 1-36 DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125742
- Nino, M. C., Reddivari, L., Osorio, C., Kaplan, I. & Liceaga, A. M. (2021). Insects as a source of phenolic compounds and potential health benefits. *Journal of Insects as Food and Feed*. 7 (7). 1077-1087. DOI: 10.3920/jiff2020.0113
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, (2) 83, 346-350.
- Purschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O. & Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*. 244, 999–1013. DOI: 10.1007/s00217-017-3017-9
- 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*, 26(9-10), 1231–1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Reis, G. C. L., Dala-Paula, B. M., Tavano, O. L., Guidi, L. R., Godoy, H. T., & Gloria, M. B. A. (2020). In vitro digestion of spermidine and amino acids in fresh and processed *Agaricus bisporus* mushroom. *Food Research International*, 137, 109616. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109616
- Research, G. V. (2021). Protein ingredients market size, share & trends analysis report by product (plant proteins, animal/dairy proteins, microbe-based proteins, insect proteins), by application, by region, and segment

forecasts. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/protein-ingredients-market>.

- Rodríguez-Rodríguez, M., Barroso, F. G., Fabrikov, D. & Sánchez-Muros, M. J. (2022). *In Vitro* Crude Protein Digestibility of Insects: A Review. *Insects*. 13, 682. DOI: 10.3390/insects13080682
- Sandoval-Sicairos, E. S.; Milán-Noris, A. K.; Luna-vital, D. A.; Milán-Carrillo, J.; & Montoya-Rodríguez, A. (2021). Anti-inflammatory and antioxidant effects of peptides released from germinated amaranth during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 343. 128394. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128394.
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. DOI: 10.1093/fqsafe/fyx006
- Sepúlveda, C. T. & Zapata, J. E. (2019). Efecto de la temperatura, el pH y el contenido en sólidos sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del extracto de *Bixa orellana* L. *Información tecnológica*. 30 (50). 57-66. DOI:10.4067/S0718-07642019000500057
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144.
- Soares de Castro, R. J., & Harumi, S. H. (2014). Advantages of an acid protease from *Aspergillus oryzae* over commercial preparations for production of whey protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 58–65. DOI: 10.1016/j.bcab.2013.11.012
- Stone, A. K., Tanaka, T. & Nickerson, M. T. (2019). Protein quality and physicochemical properties of commercial cricket and mealworm powders. *Journal of Food Science and Technology*. 56(7). 3355–3363. DOI: 10.1007/s13197-019-03818-2
- Switzer, R. C., Merril, C. R., & Shifrin, S. (1979). A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochemistry*, 98(1), 231-237. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90732-2
- Tang-Bin, Z., Tai-Ping, H., Hua-Bin, L., Huan-Wen, T. & En-Qin, X. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*. 21(1): 72. DOI: 10.3390/molecules21010072
- Talens, C., Lago, M., Simo-Boyle, L., Odriozola-Serrano, I. & Ibarguen, M. (2022). Desirability-based optimization of bakery products containing pea, hemp and insect flours using mixture design methodology. *Food Science and Technology*. 168. 113878. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113878
- Villaseñor, V. M., Enriquez-Vara, J. N., Urías-Silva, J. E. & Mojica, L. (2021). Edible insects: Techno-functional properties food and feed

applications and biological potential. *Food Reviews International*. 1-27. DOI: 10.1080/87559129.2021.1890116

- Van Huis, A., & Oonincx, D. G. A. B. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5).
- Von Hackewitz, L. (2018). The house cricket *Acheta domestica*, a potential source of protein for human consumption. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. 17. 1-33.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y. & Ma, H. (2021). Study on the structure–activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations. *Food Chemistry*. 364. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130432
- WHO/FAO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Food and agriculture organization of the United States/World health organization/United Nations University. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Geneva, Switzerland. World Health Organization.
- Williams, J. P., Williams, J. R., Kirabo, A., Chester, D., & Peterson, M. (2016). Nutrient Content and Health Benefits of Insects. *Insects as Sustainable Food Ingredients*, 61–84. DOI:10.1016/b978-0-12-802856-8.00003-x
- Xu, N., Chen, G. & Liu, H. (2017). Antioxidative categorization of twenty amino acids based on experimental evaluation. *Molecules*. 22(12), 2066. DOI: 10.3390/molecules22122066
- Yang, R., Zhao, X., Kuang, Z. & Ye, M. (2013) Optimization of antioxidant peptide production in the hydrolysis of silkworm (*Bombyx mori* L.) pupa protein using response surface methodology. *Journal of Food Agriculture and Environment* 11(1):952-956.
- Zhang, W., Zhang, Y., Wang, R., Zhang, P., Zhang, Y., Randell, E., Zhang, M. & Jia, Q. (2022). Development and application of surface molecularly imprinted polymers toward amino acids, peptides, and proteins. *Analytica Chimica Acta*. 1-77. DOI: 10.1016/j.aca.2022.340319
- Zielinska, E., Karas', M. & Jakubczyk, A. (2017). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 306–312. DOI: 10.1111/ijfs.13282