UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

EFECTO DE ALTAS PRESIONES Y ULTRASONIDO EN LA GENERACIÓN DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS EN PROTEÍNA DE AMARANTO.

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

RUBI GUADALUPE COTONIETO SANCHEZ

Bajo la supervisión de: CONSUELO S.O. LOBATO CALLEROS, DRA.

Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Chapingo, Estado de México, noviembre de 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
1854
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
APROBADA

EFECTO DE ALTAS PRESIONES Y ULTRASONIDO EN LA GENERACIÓN DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS EN PROTEÍNA DE AMARANTO.

Tesis realizada por **Rubí Guadalupe Cotonieto Sánchez** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTORA: _____
DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

CO DIRECTOR: _____
DR. JOSÉ ELEAZAR AGUILAR TOALÁ

ASESOR: _____
DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO

ASESORA: _____
DRA. ROSY GABRIELA CRUZ MONTERROSA

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS vi
INDICE DE FIGURAS vii
DEDICATORIAS viii
AGRADECIMIENTOS ix
DATOS BIOGRÁFICOS x
RESUMEN GENERAL xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL 12
1.1 Objetivos 13
1.1.1 General 13
1.1.2 Específicos 13
1.2 Hipótesis 14
1.3 Organización de la tesis 14
1.4 Literatura citada 14
2. REVISIÓN DE LITERATURA 16
2.1 Amaranto: Composición química y valor nutricional del amaranto 16
2.2 Proteína de amaranto: estructura y propiedades 17
2.3 Péptidos bioactivos 18
2.4 Mecanismos de acción biológica de los péptidos bioactivos 19
2.5 Tecnologías emergentes para la modificación de proteínas 20
2.6 Altas presiones: microfluidización 21
2.6.1 Microfluidización aplicada a proteínas vegetales 22
2.7 Ultrasonido 24
2.7.1 Ultrasonido aplicado a proteínas vegetales 25
2.8 Digestibilidad proteica 26
2.9 Literatura citada 27
3. EFECTO DE ALTAS PRESIONES Y ULTRASONIDO EN LA GENERACIÓN DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS EN PROTEÍNA DE AMARANTO. 35

Resumen 35
Abstract 36
3.1 Introducción 37
3.2 Materiales y métodos 38
3.2.1 Ubicación del trabajo 38
3.2.2 Materiales 38
3.2.3 Acondicionamiento de la muestra 38
3.2.4 Preparación de harina de amaranto 38
3.2.5 Desgrasado 39
3.2.6 Análisis químico proximal 39
3.2.7 Solubilización alcalina 39
3.2.8 Microfluidización 40
3.2.9 Ultrasonicación 40
3.2.10 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) 41
3.2.11 Digestibilidad relativa *in vitro* 41
3.2.12 Tamaño de partícula 42
3.2.13 Potencial zeta (ζ) 42
3.3.14 Digestión gastrointestinal simulada (DGIS) 43
3.2.15 Determinación del grado de hidrolisis 43
3.2.16 Separación de fracciones peptídicas 44
3.2.17 Determinación de secuencias peptídicas por FT-ICR-MRMS 45
3.2.18 Análisis estadístico 46
3.3 Resultados y discusión 46
3.3.1 Análisis químico proximal de la harina desengrasada de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). 46
3.3.2 FTIR 47
3.3.3 Digestibilidad relativa *in vitro* 50
3.3.4 Tamaño de partícula 51
3.3.5 Potencial zeta (ζ) 53
3.3.6 Grado de hidrólisis 54
3.3.7 Determinación de secuencias peptídicas 55
3.3.8 Conclusiones 61

3.3.9 Literatura citada 62
4. CONCLUSIONES GENERALES 70
5. ANEXOS 71

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición químico proximal de harina desengrasada de amaranto *Amaranthus hypochondriacus*..... 47

Cuadro 2. Contenido relativo de los componentes de la estructura secundaria de PA, PAUS, PAMF de la deconvolución Gaussiana de FTIR en la región Amida I. 49

Cuadro 3. Digestibilidad relativa *in vitro* (PA, PAUS, PAMF) 51

Cuadro 4. Grado de hidrolisis después de digestión gastrointestinal simulada (PA, PAUS, PAMF) 55

Cuadro 5. Secuencias peptídicas identificados por MS para PA, PAUS, PAMF antes de la digestión gastrointestinal simulada (AH) a 3 y 10 kDa. 57

Cuadro 6. Secuencias peptídicas identificados por MS para PA, PAUS, PAMF después de la digestión gastrointestinal simulada (DH) a 3 y 10 kDa. 59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cambio de estructura de una proteína después de microfluidización. 24
Figura 2. Espectro FTIR de PA, PAUS y PAMF (a). Deconvolución Gaussiana de señales FTIR en la región Amida I PA (b) PAUS (c) PAMF (d). 49
Figura 3. Tamaño de partícula (nm)..... 56

Figura 4. Potencial- ζ (mV)..... 57

DEDICATORIAS

A mi padre Eterno por todas las bendiciones en mi vida, permitirme llegar y culminar este proyecto, porque todo es gracias a ÉL. “Con él estaré yo en la angustia; lo librare y le glorificaré” Salmo 91.

A mi Matías por llegar, ser mi fuerza, motivación, impulso, mi mayor alegría y mi regalo perfecto.

A mis padres Irene y Moisés por ser mi guía y ejemplo, sostener mis decisiones, creer en mí y alentarme a seguir adelante, cada uno de mis logros es el reflejo del amor, dedicación y trabajo que en mi han depositado y del cual les estaré eternamente agradecida.

A mis hermanas Tania y Mariam y mis sobrinos David y Tamara por su apoyo, amor, alegría, recordarme que siempre había luz al final del túnel y ser una motivación en esta etapa.

A Maximiliano por ser mi refugio al acompañarme con paciencia durante noches de desvelo y estrés, escucharme, brindarme su apoyo, su amor incondicional, ser mi equipo y darme ánimos cuando siempre lo necesité.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este trabajo de tesis a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y el Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por la oportunidad que me brindó y la formación académica adquirida.

A mi directora la Dra. Consuelo Lobato Calleros por brindarme generosamente su guía, conocimiento, sabiduría, paciencia, experiencia y orientación para desarrollar este trabajo de investigación. Muchas gracias.

Al Dr. José Eleazar Aguilar Toalá por su apoyo incondicional hacia las diferentes etapas de este trabajo, por su paciencia, aporte y orientación académica. Muchas gracias.

A mis asesores Dr. Eleazar Aguirre Mandujano y Dra. Rosy Grabriela Cruz Monterrosa por su conocimiento, disposición y orientación brindada.

Al laboratorio de Alimentos Funcionales e Innovadores de Preparatoria Agricola por brindarme acceso a sus espacios para poder desarrollar este proyecto y a los compañeros y académicos del laboratorio que me brindaron su orientación y conocimiento.

Al Dr. Yair Cruz Narváez y al laboratorio de Posgrado e Investigación de Operaciones Unitarias de la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del Instituto Politécnico Nacional por brindarme acceso a sus instalaciones para la realización de análisis experimentales.

A la Dra. Blanca E. Hernández Rodríguez por compartir generosamente su conocimiento y experiencia.

A Bethsi Hernández por su apoyo incondicional, amistad, acompañamiento y cariño sincero a lo largo de esta etapa en la que ambas sabemos el costo de nuestro esfuerzo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales



Nombre: Rubí Guadalupe Cotonieto Sánchez
Fecha de nacimiento: 14 de marzo de 2001
Lugar de nacimiento: Lomas de Sotelo, Miguel Hidalgo, CDMX
CURP: COSR010314MDFTNBA1
Profesión: Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Cédula profesional: 14328350

Desarrollo académico

Bachillerato: Universidad del Valle de México, Campus Texcoco (2016-2019)
Licenciatura: Licenciatura en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Lerma de Villada, Edo. Méx. (2019-2023).

RESUMEN GENERAL

EFECTO DE ALTAS PRESIONES Y ULTRASONIDO EN LA GENERACIÓN DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS EN PROTEÍNA DE AMARANTO.

La semilla de amaranto *(Amaranthus hypochondriacus L*.) es un pseudocereal de relevancia nutricional al poseer niveles altos de proteína que lo posicionan dentro de una buena fuente de péptidos bioactivos por contar con todos los aminoácidos esenciales, en este estudio se evaluó el efecto del ultrasonido y la microfluidización sobre la estructura y digestibilidad de la proteína de amaranto obtenida de harina desgrasada de la variedad Revancha, con un contenido proteico de 18.16 ± 0.08 %. El análisis FTIR mostró que ambos tratamientos conservaron las bandas características de la proteína, aunque indujeron cambios conformacionales. La digestibilidad *in vitro* aumentó significativamente de 89.11 % en la proteína nativa a 94.39 % con ultrasonido y 90.39 % con microfluidización. Asimismo, el tamaño de partícula disminuyó de 1931 nm a 317.93 y 716.43 nm, respectivamente. El potencial ζ varió con el pH, con un punto isoeléctrico entre 4.5 y 5.0, mientras que la microfluidización produjo el mayor grado de hidrólisis. Se identificaron los péptidos TAK, WNR, SIVKHER y DFR; este último destacó por su anotación asociada con actividad antiinflamatoria. También se encontraron secuencias vinculadas en la literatura con posibles actividades antimicrobianas, antidiabéticas e inhibitorias de proteasas. En conjunto, ambas tecnologías mejoraron la digestibilidad y modificaron las propiedades estructurales de la proteína, favoreciendo su potencial como ingrediente alimentario.

Palabras clave: *Amaranthus hypochondriacus,* digestibilidad, péptidos bioactivos, ultrasonido, altas presiones.

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Rubí Guadalupe Cotonieto Sánchez

Directora de Tesis: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

GENERAL ABSTRACT

EFFECT OF HIGH PRESSURE AND ULTRASOUND ON THE GENERATION OF PEPTIDE SEQUENCES IN AMARANTH PROTEIN.

The amaranth seed (*Amaranthus hypochondriacus L.)* is a pseudocereal of nutritional significance; its high protein content—which includes all essential amino acids—makes it a valuable source of bioactive peptides. This study evaluated the effects of ultrasound and microfluidization on the structure and digestibility of amaranth protein, extracted from defatted flour of the Revancha variety (protein content: 18.16 ± 0.08%). FTIR analysis revealed that while both treatments preserved the characteristic protein bands, they also induced conformational changes. *In vitro* digestibility increased significantly—from 89.11% for the native protein to 94.39% following ultrasound treatment and 90.39% following microfluidization. Furthermore, particle size decreased from 1931 nm to 317.93 nm and 716.43 nm, respectively. The zeta potential varied with pH, with an isoelectric point between 4.5 and 5.0, while microfluidization resulted in the highest degree of hydrolysis. Specific peptides—TAK, WNR, SIVKHER, and DFR—were identified; the latter is notable for its documented association with anti-inflammatory activity. Other sequences were also identified that, according to existing literature, may possess antimicrobial, antidiabetic, or protease-inhibitory properties. Overall, both technologies enhanced digestibility and altered the structural properties of the protein, thereby strengthening its potential as a food ingredient.

Keywords: *Amaranthus hypochondriacus*, digestibility, bioactive peptides, ultrasound, high pressures

---

Thesis. Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Rubí Guadalupe Cotonieto Sánchez

Advisor: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un pseudocereal de origen mesoamericano que ha sido cultivado y consumido desde épocas prehispánicas, particularmente en México y América Latina. En los últimos años, este cultivo ha ido adquiriendo relevancia debido a su alto valor nutricional y su potencial como fuente alternativa de proteína vegetal de calidad. La importancia de este pseudocereal radica principalmente en su contenido proteico; las proteínas son biomoléculas esenciales implicadas en múltiples funciones fisiológicas del organismo por ende de vital importancia en la dieta humana.

De acuerdo con la literatura, el contenido proteico del amaranto varía entre 14.0 y 22 %, lo que resulta superior al de otros pseudocereales y cereales verdaderos como la quinoa, el trigo y el maíz (Kumar et al., 2024). Aunque leguminosas como la soya (*Glycine max*) presentan un mayor contenido proteico, el amaranto destaca por su elevada digestibilidad y un perfil equilibrado de aminoácidos, comparable en valor nutricional al de proteínas de origen animal. En particular, la proteína de amaranto presenta una composición de aminoácidos esenciales superior a la de los cereales, debido a su mayor contenido de lisina, un aminoácido limitante en la mayoría de estos granos (Ariza-Ortega, 2025). Además, a diferencia de las proteínas animales presentes en carne o productos lácteos, el amaranto se encuentra libre de grasas saturadas y colesterol, lo que lo convierte en una alternativa nutricionalmente más saludable.

En los pseudocereales, la mayor proporción de proteína se localiza en el embrión, a diferencia de cereales como el trigo, donde las proteínas se distribuyen entre el endospermo, el germen y el salvado (Baraniak et. al, 2022). Las principales fracciones proteicas del amaranto corresponden a albúminas y globulinas, mientras que el contenido de prolaminas, responsables de la enfermedad celíaca, es mínimo o prácticamente insignificante, lo que clasifica al amaranto como un

alimento libre de gluten (Zhu, 2023) Estas fracciones presentan distintas propiedades de solubilidad: las albúminas son solubles en agua, las globulinas en soluciones salinas de pH cercano a la neutralidad, y las glutelinas en medios ácidos o alcalinos (Moll et al., 2022). Desde el punto de vista nutricional, la calidad proteica del amaranto se asocia directamente con su adecuada composición de aminoácidos esenciales, ya que la ausencia de alguno de ellos limita el aprovechamiento de los restantes, afectando el balance nitrogenado y el crecimiento (Hadidi et al., 2024a). Esta calidad proteica sustenta el interés en modificar estructuralmente sus proteínas para mejorar su funcionalidad y favorecer la generación de péptidos bioactivos.

El uso de tecnologías físicas no convencionales, como el ultrasonido y la microfluidización, representa una alternativa para modificar la estructura de las proteínas vegetales y mejorar sus propiedades funcionales. Aunque estas tecnologías se han estudiado principalmente por sus efectos en la solubilidad, el tamaño de partícula y las propiedades tecnofuncionales en la proteína de amaranto; su aplicación para favorecer la hidrólisis enzimática y la liberación de péptidos bioactivos aún requiere mayor investigación. En este sentido, resulta importante evaluar su efecto en las modificaciones estructurales inducidas por estos tratamientos y como pueden favorecer la exposición de sitios de corte enzimático e influir en las características y el potencial biológico de los péptidos obtenidos a partir de esta proteína.

1.1 Objetivos

1.1.1 General

Evaluar el efecto de altas presiones y ultrasonido en la generación de péptidos bioactivos a partir de proteína de amaranto

1.1.2 Específicos

Establecer las condiciones de sonicación y microfluidización a aplicar a la proteína de amaranto.

Determinar el grado de hidrólisis en respuesta a la aplicación de ultrasonido y altas presiones a la proteína de amaranto.

Evaluar la digestibilidad *in vitro* de la proteína de amaranto tras los tratamientos de ultrasonido y altas presiones.

Someter la proteína de amaranto tratada con ultrasonido y altas presiones a ultrafiltración (3 y 10 kDa).

Identificar las secuencias peptídicas obtenidas.

1.2 Hipótesis

La aplicación de altas presiones y ultrasonido modifica la estructura de la proteína de amaranto, favoreciendo la liberación de péptidos con potencial actividad biológica.

1.3 Organización de la tesis

La investigación se estructura en cinco capítulos. El primer capítulo muestra la introducción general. El segundo capítulo presenta una revisión de literatura que aborda los fundamentos teóricos relacionados con la semilla de amaranto, los péptidos bioactivos, las tecnologías emergentes para la modificación de proteínas y digestibilidad proteica. El tercer capítulo titulado “Efecto de altas presiones y ultrasonido en la generación de secuencias peptídicas en proteína de amaranto”, expone los resultados experimentales obtenidos, su análisis y discusión, así como conclusiones derivadas del estudio. El cuarto capítulo resume las conclusiones generales. Finalmente, el quinto capítulo corresponde a los anexos complementarios relevantes para la comprensión del estudio.

1.4 Literatura citada

Ariza-Ortega, J. A. (2025). *Evaluation of amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) oil and bioactive compounds with Fourier transform infrared spectroscopy*.

Baraniak, J., & Kania-Dobrowolska, M. (2022). The Dual Nature of Amaranth—Functional Food and Potential Medicine. *Foods*, *11*(4), 618. https://doi.org/10.3390/foods11040618

Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J. (2024b). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, *439*, 138164. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164

Kumar, H., Guleria, S., Kimta, N., Dhalaria, R., Nepovimova, E., Dhanjal, D. S., Alomar, S. Y., & Kuca, K. (2024). Amaranth and buckwheat grains: Nutritional profile, development of functional foods, their pre-clinical cum clinical aspects and enrichment in feed. *Current Research in Food Science*, *9*, 100836. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100836

Moll, P., Salminen, H., Griesshaber, E., Schmitt, C., & Weiss, J. (2022). Homogenization improves foaming properties of insoluble pea proteins. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4622-4635. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16320

Zhu, F. (2023). Amaranth proteins and peptides: Biological properties and food uses. *Food Research International*, *164*, 112405. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112405

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Amaranto: Composición química y valor nutricional del amaranto

Los cereales son plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia Poaceae (gramíneas), cuyos frutos se caracterizan por presentar paredes delgadas unidas a la semilla, como ocurre en el arroz, maíz, trigo, avena, sorgo, centeno, cebada y mijo (Kumar et al., 2024). En contraste, las plantas dicotiledóneas producen semillas con características similares a las de los cereales, pero se clasifican como pseudocereales o cereales falsos, entre los que se incluyen la quinoa (*Chenopodium quinoa*), la chía (*Salvia hispanica*), el trigo sarraceno (*Fagopyrum* spp.) y el amaranto (*Amaranthus* spp.) (Oteri et al., 2021). El género *Amaranthus* comprende aproximadamente 70 especies, de las cuales cerca de 40 son nativas del continente americano, mientras que el resto se distribuye en regiones como Australia, África, Asia y Europa (Oteri et al., 2021). El amaranto ha ganado un reconocimiento creciente en la alimentación humana debido a su alto potencial nutricional, siendo considerado un *superalimento* por su elevada densidad de nutrientes esenciales. Su semilla presenta una composición balanceada de macronutrientes, con un contenido aproximado de 17% de proteína, 61.43% de carbohidratos y 7% de lípidos (Kumar et al., 2024) además de una cantidad significativa de fibra, fundamental para la salud digestiva y el control de la glucosa en sangre. Asimismo, es una fuente importante de micronutrientes, incluyendo vitaminas hidrosolubles del complejo B como B1, B2 y B3, vitamina C y vitamina E y minerales esenciales como potasio, calcio, hierro y zinc (López et al., 2019). Desde el punto de vista lipídico, el amaranto contiene predominantemente ácidos grasos insaturados, los cuales representan aproximadamente el 77% de su fracción grasa, asociados con beneficios para la salud cardiovascular, como la reducción del colesterol LDL, lo que refuerza su importancia como ingrediente funcional en la alimentación humana (Das et al., 2025a).

2.2 Proteína de amaranto: estructura y propiedades

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos, los cuales se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos y constituyen los bloques estructurales fundamentales de estas biomoléculas (Rani et al., 2018). La incorporación adecuada de proteínas de alta calidad en la dieta humana representa uno de los principales retos en nutrición, debido a que estas macromoléculas desempeñan funciones esenciales en el organismo, incluyendo la estructura celular, el metabolismo, el transporte de moléculas y los mecanismos de defensa (Rodríguez & Tironi, 2023). En este contexto, las proteínas de origen vegetal han adquirido un interés creciente como alternativas sostenibles a las proteínas animales, siempre que presenten una composición adecuada de aminoácidos esenciales y una alta biodisponibilidad.

La proteína de amaranto destaca por su elevada calidad nutricional, atribuida principalmente a su perfil balanceado de aminoácidos esenciales, en el que sobresale el alto contenido de lisina, un aminoácido limitante en la mayoría de los cereales, así como la presencia de valina, leucina, histidina, triptófano y metionina (Das et al., 2025b). A pesar de su origen vegetal, la proteína de amaranto presenta un alto valor biológico, cercano al 86%, aproximándose a las recomendaciones establecidas por la Organización Mundial de la Salud, y se encuentra libre de grasas saturadas y colesterol, lo que la convierte en una opción nutricionalmente favorable frente a proteínas de origen animal. En los pseudocereales, la literatura reporta la mayor parte de la proteína se localiza en el embrión, a diferencia de cereales como el trigo, donde se distribuye en el endospermo, el germen y el salvado, además para el caso del amaranto presenta una composición estructural heterogénea, constituida principalmente por albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas, cuyas proporciones pueden variar dependiendo de la variedad, las condiciones de cultivo y los métodos de extracción. Entre estas fracciones, las albúminas y glutelinas suelen ser las predominantes, con proporciones reportadas de 46–65 % y 42.5–46.5 %, respectivamente. Las albúminas se caracterizan por su bajo peso molecular y por ser ricas en aminoácidos esenciales, particularmente lisina y metionina. Por su

parte, las globulinas representan aproximadamente el 16 % de la proteína total y presentan estructuras oligoméricas, destacando la fracción 11S, que posee una organización hexamérica. Estas diferencias en composición y organización estructural influyen en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la proteína de amaranto, así como en su susceptibilidad a la hidrólisis enzimática (Baraniak & Kania-Dobrowolska, 2022). Estas fracciones difieren en su composición de aminoácidos y propiedades de solubilidad, siendo las albúminas solubles en agua, las globulinas en soluciones salinas de pH cercano a la neutralidad y las glutelinas en medios ácidos o alcalinos (Sattar et al., 2024).

La adecuada proporción de aminoácidos esenciales y no esenciales en estas fracciones proteicas respalda la alta calidad nutricional del amaranto, ya que la deficiencia de un solo aminoácido esencial puede comprometer el aprovechamiento metabólico de los demás, afectando el balance nitrogenado del organismo (Baraniak & Kania-Dobrowolska, 2022).

2.3 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son fragmentos cortos de proteínas, constituidos generalmente por cadenas de 2 a 20 residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, que permanecen biológicamente inertes mientras forman parte de la proteína intacta (Lv et al., 2022). Estos péptidos se liberan a partir de proteínas precursoras mediante procesos como la hidrólisis enzimática, la fermentación o la digestión gastrointestinal, adquiriendo una conformación estructural que les permite ejercer funciones biológicas específicas. Una vez liberados, pueden interactuar con diferentes blancos moleculares, como enzimas, receptores celulares o radicales libres, lo que les confiere la capacidad de modular diversos procesos fisiológicos, han adquirido relevancia en el ámbito biotecnológico debido a sus diversas propiedades biológicas y a su potencial aplicación en el desarrollo de productos farmacéuticos y como ingredientes funcionales en alimentos (Roy et al., 2025a) entre las diversas propiedades fisiológicas de interés, la literatura destaca efectos antioxidantes, anticancerígenos, antitrombóticos, antihipertensivos, opioides e

inmunomoduladores, así como su capacidad para favorecer la unión y el transporte de minerales. Además, características como resistencia a la digestión gastrointestinal, su baja toxicidad y su capacidad para ejercer efectos biológicos a concentraciones reducidas los convierten en compuestos prometedores para su aplicación (Aderinola & Duodu, 2022). Un ejemplo de ellos con actividad antimicrobiana ejerce efectos inhibitorios sobre las bacterias mediante la interferencia en diversos procesos fisiológicos y celulares, algunos estudios sugieren que estos compuestos podrían presentar una eficacia comparable o incluso superior a la de ciertos antibióticos esto debido a su mecanismo de acción que puede involucrar la interacción con macromoléculas intracelulares esenciales para el funcionamiento bacteriano, así como la alteración de la integridad de la membrana mediante la formación de poros (Gluvić & Ulrih, 2019). Debido a la capacidad de las bacterias para adaptarse y desarrollar mecanismos de resistencia, los péptidos que actúan sobre la membrana celular modifican su permeabilidad o interfieren en los sistemas de transporte de sustancias representan una alternativa de particular interés. Estas propiedades funcionales se relacionan, en parte, con la presencia de residuos de aminoácidos con características tanto hidrofóbicas como cargadas, los cuales favorecen su interacción con las estructuras bacterianas.(Gluvić & Ulrih, 2019)

2.4 Mecanismos de acción biológica de los péptidos bioactivos

Desde el punto de vista estructural, los péptidos bioactivos suelen estar constituidos por cadenas cortas de aproximadamente 2 a 20 aminoácidos, aunque también se han identificado secuencias de hasta 50 residuos con actividad biológica. Su reducido tamaño molecular puede favorecer su comportamiento durante la digestión y, en determinadas condiciones, contribuir a la conservación de su actividad biológica frente a la acción de las enzimas gastrointestinales (Rani et al., 2018). La actividad biológica y multifuncionalidad de los péptidos bioactivos depende estrechamente de factores estructurales, tales como la composición,

número y secuencia de los aminoácidos así como de sus características fisicoquímicas, la estructura espacial, el peso molecular y la distribución de la carga de la cadena peptídica (Roy et al., 2025b). A su vez, estas características están influenciadas por las condiciones del proceso de hidrólisis, incluyendo el pH, la temperatura, el tipo de enzima utilizada, la fuente proteica y los tratamientos físicos o químicos aplicados. En los últimos años, los péptidos bioactivos derivados de proteínas de origen vegetal han cobrado un interés creciente debido a su potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos, destacándose aquellos provenientes del amaranto por su adecuada composición de aminoácidos y elevada digestibilidad, lo que favorece la liberación de secuencias peptídicas con potencial actividad fisiológica(Kamal et al., 2021)

2.5 Tecnologías emergentes para la modificación de proteínas

La modificación de proteínas se refiere al conjunto de procesos destinados a alterar la composición molecular o las características estructurales de las proteínas mediante métodos físicos, químicos o biológicos (Stani et al., 2020). Estas modificaciones pueden inducir cambios en propiedades químicas, biofísicas, tecnofuncionales y de superficie activa, tanto en proteínas aisladas como en aquellas presentes en formulaciones alimentarias o matrices complejas. En el caso de las proteínas de amaranto, distintos enfoques de modificación han demostrado una influencia directa sobre su comportamiento funcional y su potencial aplicación en sistemas alimentarios y nutracéuticos.

El principal objetivo de la modificación proteica es alcanzar una funcionalidad específica, mejorar la aplicabilidad tecnológica y aumentar la aceptabilidad general del ingrediente proteico en sectores como el alimentario, farmacéutico y nutracéutico (Das et al., 2021). La selección de la técnica de modificación depende de factores como las propiedades intrínsecas de la proteína, el tipo de alteración deseada y el uso final del aislado proteico (Moll et al., 2022). Los aislados de proteínas, obtenidos tras procesos extensos de purificación a partir de fuentes vegetales o animales, representan una forma altamente adecuada para este tipo

de tratamientos debido a su elevada concentración proteica y control composicional.

Dentro de las estrategias de modificación, los métodos físicos han cobrado especial relevancia por su capacidad de inducir cambios estructurales sin la adición de reactivos químicos. Estos enfoques se basan en la aplicación de campos de fuerza que pueden provocar reducción o redistribución del tamaño de partícula, despliegue de las cadenas polipeptídicas, desagregación o desnaturalización irreversible de la estructura proteica. Como resultado, se modifica la accesibilidad de grupos funcionales y sitios susceptibles a la hidrólisis, lo que resulta clave para mejorar la funcionalidad y favorecer la generación de péptidos bioactivos (Dabbour et al., 2025).

2.6 Altas presiones: microfluidización

La microfluidización es una técnica de homogeneización a alta presión empleada para potenciar los atributos funcionales de las proteínas mediante la reducción del tamaño de partícula y la modificación de su estructura (Meutter & Goormaghtigh, 2021). Este proceso favorece el incremento de propiedades tecno funcionales como la solubilidad, la capacidad emulsificante y la formación y estabilidad de espumas, atributos clave para su aplicación en sistemas alimentarios complejos.

El proceso de microfluidización se lleva a cabo mediante un microfluidizador diseñado con una cámara de interacción de alta presión, en la cual la suspensión proteica es forzada a través de microcanales con geometría precisa (Yücetepe et al., 2026).

El principio de funcionamiento de la microfluización es ofrecer una ultra alta presión (hasta 200 MPa) para transportar fluidos multifásicos por los microcanales de una cámara de interacción, haciendo que los fluidos estén expuestos a impactos a alta velocidad, corte intenso, vibración de alta frecuencia, oscilación, caída instantánea de presión, cavitación, hinchamiento y vórtices en menos de 5 segundos (Guo et al., 2020).

En comparación con otras tecnologías de modificación, la microfluidización es

significativamente superior en varios aspectos, como la ausencia de químicos exógenos, poca pérdida de componentes nutricionales, baja temperatura de tratamiento, operación continua y tiempo de procesamiento muy corto (Braspaiboon & Laokuldilok, 2024). Estas características la convierten en una tecnología atractiva para el procesamiento de aislados proteicos.

Desde un punto de vista estructural esta tecnología puede provocar modificaciones en la conformación de las proteínas como consecuencia de las fuerzas de cizallamiento, cavitación y turbulencia generadas durante el tratamiento, generando un desplegamiento parcial de las cadenas polipeptídicas, la exposición de grupos hidrofóbicos y sulfhidrilo, así como la disociación o reorganización de agregados proteicos (Shen & Tang, 2012). Un estudio de Kerezsi et. al, (2024) evaluó el efecto de la microfluidización a escala piloto sobre aislado de proteína de soya y reportaron que el tratamiento no produjo modificaciones detectables en la estructura primaria, sin embargo, si generó cambios en la estructura secundaria, particularmente en las proporciones de láminas beta, hélices alfa, giros beta y regiones desordenadas. Por otro lado la obtención de péptidos mediante esta tecnología depende principalmente de la hidrólisis enzimática posterior, debido a que la especificidad de la proteasa determina los sitios de corte y, por consiguiente, la longitud, composición de aminoácidos y características funcionales de los péptidos liberados (Diana Kerezsi et al., 2024). Hasta el momento no se ha evaluado el efecto de esta tecnología para la obtención de péptidos directamente sin pasar por un proceso enzimático, no rompe directamente los enlaces peptídicos de manera equivalente a una proteasa, más bien su acción mecánica favorece le desplegamiento parcial de las proteínas (Figura 1) y por consecuencia la exposición de regiones poco accesible a las enzimas facilitando la liberación de péptidos de diferentes pesos moleculares y modificar el grado de hidrólisis obtenido (L. Zhang et al., 2021).

2.6.1 Microfluidización aplicada a proteínas vegetales

En proteínas vegetales, la microfluidización ha sido empleada para mejorar propiedades como solubilidad, emulsificación y estabilidad estructural. Estos

efectos se atribuyen a la reducción del tamaño de partícula y a la reorganización de las cadenas polipeptídicas. Diversos estudios han logrado demostrar que la microfluidización mejora de manera significativa las propiedades tecnofuncionales de proteínas vegetales, incluyendo proteínas de guisante, arroz, avellana, cacahuete, semilla de perilla y almendra, lo que respalda su potencial aplicación en proteínas de amaranto con fines funcionales y nutracéuticos, al poseer ventajas como operación continua, tiempo de procesamiento muy corto y mínima pérdida de componentes nutricionales, puede reducir las deficiencias o mejorar las propiedades de algunas proteínas alimentarias para aumentar su utilización y valor (Guo et al., 2020). En un estudio por Shen&Tang (2012) al estudiar aislados de proteína de soya sometidos a microfluidización a 120MPa observaron un incremento en la solubilidad, la hidrofobicidad superficial y el contenido de enlaces disulfuro, mediante electroforesis y cromatografía de exclusión por tamaño e identificaron modificaciones en el estado de agregación de las proteínas, relacionadas con la transformación de agregados insolubles en estructuras de menor tamaño y mayor solubilidad. Estos resultados evidencian que la microfluidización puede inducir cambios conformacionales y reorganizaciones moleculares sin implicar necesariamente la ruptura de la estructura primaria de las proteínas. He et al., (2021) reportaron que la microfluidización a diferentes niveles de presión mejoraba la solubilidad, las propiedades emulsionantes y la hidrofobicidad superficial del aislado de proteína de maní y también podía aumentar las propiedades de formación de espuma y emulsificación de las globulinas al mejorar su flexibilidad y actividad superficial (He et al., 2021). Además, algunos investigadores reportaron que la microfluidización en combinación con un tratamiento térmico adicional podría desempeñar un papel mayor en la mejora de otras proteínas vegetales. Por ejemplo, Shen y Tang (2012) sugirieren que la microfluidización combinada con un pretratamiento térmico mejoró efectivamente las propiedades superficiales de las proteínas de soya.

Al respecto, Chen et al. (2016) estudiaron el efecto de la microfluidización como pretratamiento del aislado de proteína de soya antes de su hidrólisis con pancreatina. Los autores encontraron que la aplicación de 120 MPa, a una

concentración proteica de 30 g/L, favoreció la hidrólisis enzimática, incrementando la accesibilidad de las subunidades α′-7S, A-11S y *B*-11S a la acción de las enzimas. Asimismo, observaron que los hidrolizados obtenidos después del pretratamiento presentaron mejores propiedades emulsificantes, atribuidas a una mayor producción de péptidos solubles con actividad superficial. Particularmente, los hidrolizados con un grado de hidrólisis de 5.8 % mostraron una mayor estabilidad de las emulsiones y un menor tamaño de gota respecto a los obtenidos sin pretratamiento por microfluidización. Estos resultados demuestran que la modificación física previa puede influir tanto en la susceptibilidad enzimática como en las propiedades funcionales de los péptidos liberados (Chen et al., 2016)

En proteínas como las del amaranto, esta tecnología representa una estrategia viable para potenciar su aprovechamiento funcional.

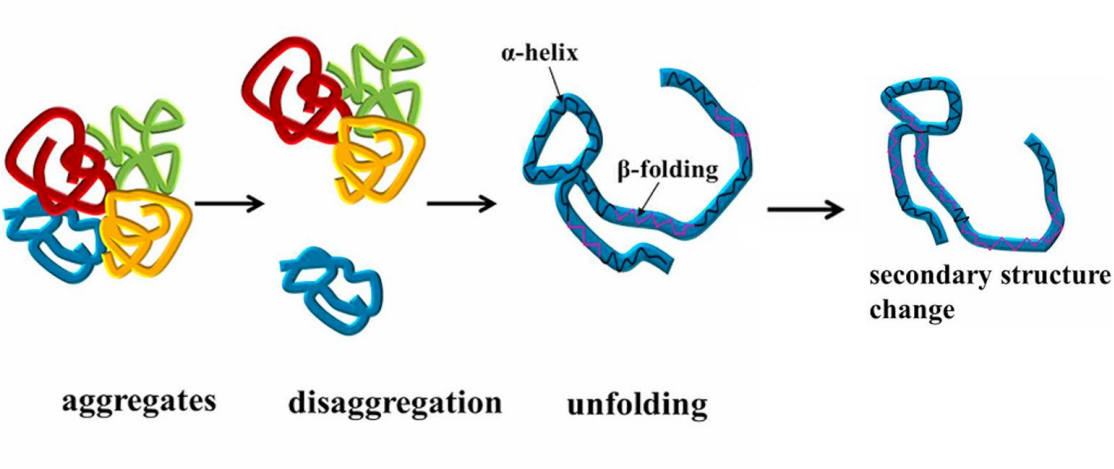

Figura 1 Cambio de estructura de una proteína después de microfluidización.

Fuente: (Guo et al., 2020)

2.7 Ultrasonido

El ultrasonido es una tecnología emergente que utiliza ondas acústicas de alta frecuencia para inducir efectos físicos y químicos en los sistemas alimentarios es una nueva tecnología de procesamiento físico no térmico que se ha utilizado ampliamente en la industria alimentaria especialmente en la extracción y modificación de diversas proteínas.(Jadhav et al., 2024) Su principal mecanismo

de acción es la cavitación acústica, fenómeno que genera microburbujas capaces de colapsar y producir altas temperaturas y presiones locales, este colapso genera zonas de energía muy localizadas y transitorias, a menudo llamadas “puntos calientes”, caracterizadas por gradientes extremos de temperatura y presión, así como por fuerzas de corte intensas, ondas de choque y microchorros (Yildiz & Yıldız, 2026). Este efecto provoca alteraciones en la estructura de las proteínas, tales como desnaturalización parcial y ruptura de interacciones no covalentes, lo que puede modificar significativamente sus propiedades funcionales (Chemat et al., 2011). Además, la aplicación de esta tecnología novedosa ha sido de interés en los últimos años al ser considerada una tecnología verde ecológica aplicable en la industria ejerciendo un papel destacable en la sostenibilidad ambiental

2.7.1 Ultrasonido aplicado a proteínas vegetales

De acuerdo con la literatura una de las principales ventajas del ultrasonido es que permite inducir modificaciones estructurales en las proteínas mediante efectos mecánicos localizados, sin generar necesariamente un incremento considerable de la temperatura global del sistema, esta característica resulta relevante para reducir el deterioro de propiedades nutricionales y funcionales sensibles al calor. En el caso de las proteínas vegetales, sus dispersiones acuosas constituyen sistemas dinámicos cuya organización molecular depende del equilibrio entre diversas fuerzas e interacciones intermoleculares, como los puentes de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas, las fuerzas electrostáticas y las interacciones de van der Waals (Yildiz & Yıldız, 2026). En condiciones nativas, estas interacciones contribuyen a mantener la conformación globular de las proteínas y a estabilizar las estructuras agregadas. Sin embargo, la aplicación de ultrasonido introduce fuerzas mecánicas que pueden modificar dicho equilibrio, promoviendo cambios graduales en la conformación, la asociación y la organización estructural de las proteínas en diferentes niveles jerárquicos (Zhang et al., 2020). A escala molecular, la cavitación generada por el ultrasonido produce fuerzas mecánicas capaces de alterar las interacciones no covalentes responsables de mantener la

conformación nativa de las proteínas y esto causar que los puentes de hidrógeno se debiliten y dejar expuestas parcialmente las regiones hidrofóbicas además modificar las interacciones relacionadas con los enlaces disulfuro debido a las perturbaciones mecánicas y a los cambios locales en las condiciones de oxidación-reducción (Hua et al., 2024). Estas alteraciones favorecen el desplegamiento parcial de las cadenas polipeptídicas, incrementando su flexibilidad y permitiendo a su vez la exposición de grupos funcionales que anteriormente permanecían ocultos en el interior de la estructura proteica originando que las proteínas pueden adoptar conformaciones más abiertas, lo que facilita su interacción con otras moléculas y puede incrementar su susceptibilidad a la acción enzimática y su capacidad de interacción en las interfaces (Yildiz & Yıldız, 2026).

Por consiguiente, esta tecnología representa no solo una alternativa de procesamiento físico, sino también una herramienta para modular las interacciones moleculares y reorganizar las estructuras proteicas, lo que puede repercutir en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales promover la generación de péptidos bioactivos con mayor actividad biológica, lo cual resulta de especial interés en matrices vegetales como el amaranto.

2.8 Digestibilidad proteica

La digestión gastrointestinal comprende una serie de procesos mecánicos, fisicoquímicos y enzimáticos mediante los cuales los alimentos se desintegran y sus macromoléculas se transforman en compuestos de menor tamaño que pueden ser absorbidos y utilizados por el organismo (Zhou et al., 2023). En el caso de las proteínas, la hidrólisis comienza principalmente en el estómago por acción de la pepsina, cuya actividad se favorece en un medio ácido, y continúa en el intestino delgado mediante enzimas pancreáticas, como la tripsina y la quimotripsina, además de peptidasas intestinales que contribuyen a generar péptidos pequeños y aminoácidos libres (Santos-Hernández et al., 2020). La digestibilidad proteica se refiere a la proporción de la proteína ingerida que se degrada durante la digestión y queda disponible para su posterior absorción; por

ello, constituye un factor determinante de la calidad nutricional de los alimentos sin embargo, la digestibilidad no depende exclusivamente de la composición de aminoácidos, sino también de la conformación de las proteínas, su grado de agregación, las interacciones con otros componentes de la matriz alimentaria y las condiciones de procesamiento. En este sentido, Santos-Hernández (2020) destaca que la fuente proteica, las características de la matriz y los tratamientos aplicados pueden modificar considerablemente la digestibilidad de los alimentos.

2.9 Literatura citada

Aderinola, T. A., & Duodu, K. G. (2022). Production, health-promoting properties and characterization of bioactive peptides from cereal and legume grains. *BioFactors*, *48*(5), 972-992. https://doi.org/10.1002/biof.1889

Ariza-Ortega, J. A. (2025). *Evaluation of amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) oil and bioactive compounds with Fourier transform infrared spectroscopy*.

Baraniak, J., & Kania-Dobrowolska, M. (2022). The Dual Nature of Amaranth—Functional Food and Potential Medicine. *Foods*, *11*(4), 618. https://doi.org/10.3390/foods11040618

Braspaiboon, S., & Laokuldilok, T. (2024). High Hydrostatic Pressure: Influences on Allergenicity, Bioactivities, and Structural and Functional Properties of Proteins from Diverse Food Sources. *Foods*, *13*(6), 922. https://doi.org/10.3390/foods13060922

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813-835. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, W., Ma, H., & Wang, Y.-Y. (2022). Recent advances in modified food proteins by high intensity ultrasound for enhancing functionality: Potential mechanisms, combination with other methods, equipment innovations and

future directions. *Ultrasonics Sonochemistry*, *85*, 105993. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105993

Chen, L., Chen, J., Yu, L., & Wu, K. (2016). Improved emulsifying capabilities of hydrolysates of soy protein isolate pretreated with high pressure microfluidization. *LWT - Food Science and Technology*, *69*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.030

Constantino, A. B. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2020). Modifications of physicochemical and functional properties of amaranth protein isolate (Amaranthus cruentus BRS Alegria) treated with high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, *95*, 103076. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103076

Dabbour, M., Hamoda, A., Wu, P., He, R., Wahia, H., Betchem, G., Salah, M., & Fikry, M. (2025). Functionalizing cottonseed protein by sequential pH-shifting and ultrasonication. *International Journal of Biological Macromolecules*, *323*, 147207. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.147207

Das, D., Mir, N. A., Chandla, N. K., & Singh, S. (2021). Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (Amaranthus hypochondriacus) seed protein isolates. *Food Chemistry*, *353*, 129466. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129466

Das, D., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2025a). Exploring the potential of amaranth proteins: Composition, functional characteristics, modifications, bioactive peptides, and possible applications in food and packaging industries. *Journal of Food Composition and Analysis*, *139*, 107146. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107146

Das, D., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2025b). Exploring the potential of amaranth proteins: Composition, functional characteristics, modifications, bioactive peptides, and possible applications in food and packaging industries.

Journal of Food Composition and Analysis, *139*, 107146. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107146

Das, D., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2025c). Exploring the potential of amaranth proteins: Composition, functional characteristics, modifications, bioactive peptides, and possible applications in food and packaging industries. *Journal of Food Composition and Analysis*, *139*, 107146. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107146

Dhenge, R., Rinaldi, M., Rodolfi, M., Barbanti, D., & Ganino, T. (2023). Modification of structural characteristics of vegetables by high-pressure processing: A review. *Food Bioscience*, *56*, 103407. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103407

Diana Kerezsi, A., Jacquet, N., Lelia Pop, O., Othmeni, I., Figula, A., Francis, F., Karamoko, G., Karoui, R., & Blecker, C. (2024). Impact of pilot-scale microfluidization on soybean protein structure in powder and solution. *Food Research International*, *188*, 114466. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114466

Figueroa-González, J. J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J., & Martínez-Velasco, A. (2022). Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments. *LWT*, *153*, 112561. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112561

Gluvić, A., & Ulrih, N. P. (2019). Peptides derived from food sources: Antioxidative activities and interactions with model lipid membranes. *Food Chemistry*, *287*, 324-332. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.092

Guo, X., Chen, M., Li, Y., Dai, T., Shuai, X., Chen, J., & Liu, C. (2020). Modification of food macromolecules using dynamic high pressure microfluidization: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *100*, 223-234. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.004

Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J.

(2024a). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, *439*, 138164. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164

Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J. (2024b). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, *439*, 138164. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164

He, X., Chen, J., He, X., Feng, Z., Li, C., Liu, W., Dai, T., & Liu, C. (2021). Industry-scale microfluidization as a potential technique to improve solubility and modify structure of pea protein. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *67*, 102582. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102582

Hua, N., Ren, X., Yang, F., Huang, Y., Wei, F., & Yang, L. (2024). The Effect of Hydrodynamic Cavitation on the Structural and Functional Properties of Soy Protein Isolate–Lignan/Stilbene Polyphenol Conjugates. *Foods*, *13*(22), 3609. https://doi.org/10.3390/foods13223609

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

Jojo, H., Loushigam, G. L., Bajaj, M., Badgujar, P. C., Sari, T. P., Jaiswal, R., & Pareek, S. (2025). Structural and Functional Enhancement of Guar Meal Protein Concentrate Using High-Pressure Microfluidization. *ACS Food Science & Technology*, *5*(4), 1578-1590. https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.5c00008

Kamal, H., Mudgil, P., Bhaskar, B., Fisayo, A. F., Gan, C.-Y., & Maqsood, S. (2021). Amaranth proteins as potential source of bioactive peptides with enhanced inhibition of enzymatic markers linked with hypertension and diabetes. *Journal of Cereal Science*, *101*, 103308. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103308

Kumar, H., Guleria, S., Kimta, N., Dhalaria, R., Nepovimova, E., Dhanjal, D. S., Alomar, S. Y., & Kuca, K. (2024). Amaranth and buckwheat grains: Nutritional profile, development of functional foods, their pre-clinical cum clinical aspects and enrichment in feed. *Current Research in Food Science*, *9*, 100836. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100836

López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, *116*, 419-429. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.056

Lv, R., Dong, Y., Bao, Z., Zhang, S., Lin, S., & Sun, N. (2022). Advances in the activity evaluation and cellular regulation pathways of food-derived antioxidant peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *122*, 171-186. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.026

Meutter, J. D., & Goormaghtigh, E. (2021). FTIR Imaging of Protein Microarrays for High Throughput Secondary Structure Determination. *Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C03677

Moll, P., Salminen, H., Griesshaber, E., Schmitt, C., & Weiss, J. (2022). Homogenization improves foaming properties of insoluble pea proteins. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4622-4635. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16320

Oteri, M., Gresta, F., Costale, A., Lo Presti, V., Meineri, G., & Chiofalo, B. (2021). Amaranthus hypochondriacus L. as a Sustainable Source of Nutrients and Bioactive Compounds for Animal Feeding. *Antioxidants*, *10*(6), 876. https://doi.org/10.3390/antiox10060876

Rani, S., Pooja, K., & Pal, G. K. (2018). Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination. *Trends in Food Science & Technology*, *80*, 61-70. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.013

Rivero Meza, S. L., Hirsch Ramos, A., Cañizares, L., Raphaelli, C. de O., Bueno Peres, B., Gaioso, C. A., Egea, I., Estrada, Y., Flores, F. B., & de Oliveira, M. (2023). A review on amaranth protein: Composition, digestibility, health

benefits and food industry utilisation. *International Journal of Food Science and Technology*, *58*(3), 1564-1574. https://doi.org/10.1111/ijfs.16056

Rodríguez, M., & Tironi, V. A. (2023). Chemical and cell antioxidant activity of amaranth flour and beverage after simulated gastrointestinal digestion. Role of peptides. *Food Research International*, *173*, 113410. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113410

Roy, T., Singh, A., Kumar Das, K., Sari, T. P., & Wagh, M. D. (2025a). Rice protein-derived bioactive peptides: Production, purification, health promoting benefits and food applications. *Journal of Food Composition and Analysis*, *148*, 108142. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108142

Roy, T., Singh, A., Kumar Das, K., Sari, T. P., & Wagh, M. D. (2025b). Rice protein-derived bioactive peptides: Production, purification, health promoting benefits and food applications. *Journal of Food Composition and Analysis*, *148*, 108142. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108142

Santos-Hernández, M., Alfieri, F., Gallo, V., Miralles, B., Masi, P., Romano, A., Ferranti, P., & Recio, I. (2020). Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. *Food Research International*, *137*, 109708. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109708

Sattar, M., Saeed, F., Afzaal, M., Rasheed, A., Asif, A., Sharif, S., Hussain, M., Asad Ur Rehman, H., Raza, M. A., Munir, H., & Al Jbawi, E. (2024). An overview of the nutritional and therapeutic properties of amaranth. *International Journal of Food Properties*, *27*(1), 263-272. https://doi.org/10.1080/10942912.2024.2304266

Shen, L., & Tang, C.-H. (2012). Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate. *Food Research International*, *48*(1), 108-118. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.006

Stani, C., Vaccari, L., Mitri, E., & Birarda, G. (2020). FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *229*, 118006. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118006

Valadez-Vega, C., Lugo-Magaña, O., Figueroa-Hernández, C., Bautista, M., Betanzos-Cabrera, G., Bernardino-Nicanor, A., González-Amaro, R. M., Alonso-Villegas, R., Morales-González, J. A., & González-Cruz, L. (2022). Effects of Germination and Popping on the Anti-Nutritional Compounds and the Digestibility of Amaranthus hypochondriacus Seeds. *Foods*, *11*(14), 2075. https://doi.org/10.3390/foods11142075

Yildiz, G., & Yıldız, G. (2026). Ultrasound-assisted multiscale structural engineering of plant proteins: Mechanisms and structure–property relationships. *Frontiers in Soft Matter*, *6*, 1893101. https://doi.org/10.3389/frsfm.2026.1893101

Yücetepe, A., Güneş, Z. S., Adrar, N., & Esatbeyoglu, T. (2026). Non-thermal processing of plant-based proteins: Comparison of cold plasma treatment with high hydrostatic pressure, ultraviolet radiation, and ultrasonication treatments. *European Food Research and Technology*, *252*(3), 143. https://doi.org/10.1007/s00217-026-05071-2

Zhang, L., Chen, X., Wang, Y., Guo, F., Hu, S., Hu, J., Xiong, H., & Zhao, Q. (2021). Characteristics of rice dreg protein isolate treated by high-pressure microfluidization with and without proteolysis. *Food Chemistry*, *358*, 129861. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129861

Zhang, Z., Wang, Y., Jiang, H., Dai, C., Xing, Z., Kumah Mintah, B., Dabbour, M., He, R., & Ma, H. (2020). Effect of dual-frequency ultrasound on the formation of lysinoalanine and structural characterization of rice dreg protein isolates. *Ultrasonics Sonochemistry*, *67*, 105124. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105124

Zhou, H., Tan, Y., & McClements, D. J. (2023). Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, *14*(1), 135-156. https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235

Zhu, F. (2023). Amaranth proteins and peptides: Biological properties and food uses. *Food Research International*, *164*, 112405.

https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112405

3. EFECTO DE ALTAS PRESIONES Y ULTRASONIDO EN LA GENERACIÓN DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS EN PROTEÍNA DE AMARANTO.

Resumen

El amaranto *(Amaranthus hypochondriacus L*.) representa una fuente proteica vegetal de interés nutricional y tecnológico. En este estudio se evaluó el efecto de tratamientos físicos de altas presiones, específicamente ultrasonido y microfluidización, sobre las propiedades estructurales y digestivas de la proteína de amaranto obtenida a partir de harina desgrasada de la variedad Revancha. El análisis químico proximal confirmó el valor nutricional de la materia prima, con 18.16 ± 0.08 % de proteínas, 2.85 ± 0.42 % de grasa, 7.75 ± 0.03 % de humedad, 5.14 ± 0.50 % de cenizas, 5.54 ± 0.01 % de fibra y 60.56 ± 0.30 % de carbohidratos. Los espectros FTIR evidenciaron las bandas características de Amida I, II y III en todas las muestras, lo que indica que los tratamientos no modificaron la identidad química global de la proteína, aunque promovieron reacomodos conformacionales asociados con cambios en la estructura secundaria e interacciones intermoleculares. La digestibilidad *in vitro* aumentó significativamente después de los tratamientos, alcanzando valores de 89.11 ± 0.02 % para la proteína nativa, 94.39 ± 0.03 % para el tratamiento de ultrasonido y 90.39 ± 0.04 % para microfluidización. Asimismo, el ultrasonido redujo con mayor eficiencia el tamaño de partícula pasando de 1931 ± 24.6 nm a 317.93 ± 4.3 nm, mientras que la microfluidización alcanzó 716.43 ± 6.8 nm. El potencial-ζ mostró un comportamiento dependiente del pH, con punto isoeléctrico cercano a 4.5–5.0. Finalmente, el grado de hidrólisis fue mayor en la proteína microfluidizada. Se identificaron secuencias peptídicas relevantes como: TAK, WNR y SIVKHER además el péptido DFR presentó interés particular por su anotación relacionada con actividad antiinflamatoria y secuencias asociadas en la literatura con posibles actividades antimicrobianas, antidiabéticas e inhibitorias de proteasas. Estos resultados demuestran que ambas tecnologías modifican favorablemente la proteína de amaranto y potencian su funcionalidad como ingrediente alimentario.

Palabras clave: amaranto, tratamientos físicos, ultrasonido, altas presiones, péptidos

---

Tesis de Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Rubí Guadalupe Cotonieto Sánchez

Directora de Tesis: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

EFFECT OF HIGH PRESSURE AND ULTRASOUND ON THE GENERATION OF PEPTIDE SEQUENCES IN AMARANTH PROTEIN.

Abstract

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus L*.) represents a plant-based protein source of both nutritional and technological interest. This study evaluated the effect of high-pressure physical treatments—specifically ultrasound and microfluidization—on the structural and digestive properties of amaranth protein obtained from defatted flour of the Revancha variety. Proximal chemical analysis confirmed the nutritional value of the raw material, consisting of 18.16 ± 0.08% protein, 2.85 ± 0.42% fat, 7.75 ± 0.03% moisture, 5.14 ± 0.50% ash, 5.54 ± 0.01% fiber, and 60.56 ± 0.30% carbohydrates. FTIR spectra revealed characteristic Amide I, II, and III bands in all samples, indicating that the treatments did not alter the overall chemical identity of the protein, although they did promote conformational rearrangements associated with changes in secondary structure and intermolecular interactions. *In vitro* digestibility increased significantly following the treatments, with values of 89.11 ± 0.02% for the native protein, 94.39 ± 0.03% for the ultrasound-treated protein, and 90.39 ± 0.04% for the microfluidized protein. Furthermore, ultrasound was more efficient at reducing particle size—from 1931 ± 24.6 nm to 317.93 ± 4.3 nm—whereas microfluidization resulted in a particle size of 716.43 ± 6.8 nm. The zeta potential (ζ-potential) exhibited pH-dependent behavior, with an isoelectric point near 4.5–5.0. Finally, the degree of hydrolysis was higher in the microfluidized protein. Relevant peptide sequences were identified, such as TAK, WNR, and SIVKHER. Furthermore, DFR was of particular interest due to its annotation related to anti-inflammatory activity, along with sequences associated in the literature with potential antimicrobial, antidiabetic, and protease-inhibitory activities. These results demonstrate that both technologies favorably modify amaranth protein and can enhance its potential functionality as a food ingredient.

Keywords: amaranth, physical treatments, ultrasound, high pressures, peptides

---

Thesis. Maestría en Ciencia, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Rubí Guadalupe Cotonieto Sánchez

Advisor: Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros

3.1 Introducción

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) es un pseudocereal originario de Mesoamérica, cultivado desde la época prehispánica y de creciente interés en la actualidad debido a su alto valor nutricional y su potencial como fuente alternativa de proteína vegetal. Su relevancia se enmarca en la seguridad alimentaria y en el desarrollo de alimentos funcionales, ya que las proteínas cumplen funciones fisiológicas esenciales en el organismo. (Sattar et al., 2024)

El contenido proteico del amaranto oscila entre 14.0 y 16.5 %, superando al de cereales como el trigo y el maíz, y presentando además una elevada digestibilidad y un perfil equilibrado de aminoácidos. Destaca su alto contenido de lisina, aminoácido limitante en la mayoría de los cereales, lo que le confiere una calidad proteica comparable a la de proteínas de origen animal. Asimismo, el amaranto no contiene gluten, grasas saturadas ni colesterol, lo que lo posiciona como una alternativa nutricionalmente saludable. Las proteínas del amaranto se localizan principalmente en el embrión y están constituidas mayoritariamente por albúminas y globulinas, con una presencia mínima de prolaminas. Esta composición, junto con su adecuado perfil de aminoácidos esenciales, sustenta el interés en modificar estructuralmente sus proteínas para mejorar su funcionalidad y favorecer la generación de péptidos bioactivos.

En este contexto, el objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de altas presiones y ultrasonido en la generación de péptidos bioactivos a partir de la proteína de amaranto. Como objetivos específicos se plantearon: establecer las condiciones de sonicación y microfluidización, determinar el grado de hidrólisis, evaluar la digestibilidad *in vitro*, fraccionar los hidrolizados mediante ultrafiltración (3 y 10 kDa) e identificar las secuencias peptídicas obtenidas y su potencial nutracéutico.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Ubicación del trabajo

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Alimentos Funcionales, adscrito al Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.2 Materiales

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus L.*, variedad Revancha, fueron proporcionadas por una productora local de San Francisco Tlaltenco, delegación Tláhuac, CDMX, México, con coordenadas GPS de 19.30134°N, 99.01302° O y una elevación sobre el nivel del mar de 2240 m. El ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) fueron suministrados por J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México El agua usada en los experimentos fue destilada y desionizada.

3.2.3 Acondicionamiento de la muestra

Las semillas de amaranto se transportaron en bolsas negras de polietileno a temperatura ambiente 18 ± 22°C.

3.2.4 Preparación de harina de semilla de amaranto

Las semillas de amaranto se sometieron inicialmente a un proceso de lavado con agua purificada y, posteriormente, se deshidrataron en una estufa (HCF-62, Riossa Digital, Ciudad de México, México) a 35 °C durante 48 h, manteniendo una ventilación constante. Una vez secas, se trituraron mediante un procesador de alimentos (NB-101B, Nutribullet® 600, CAPBRANG HOLDINGS LLC., California, EUA). El material molido se tamizó a través de una malla No. 50 (División de Mallas y Tamices, DUVESA, CDMX, México) para obtener una harina de granulometría uniforme, la cual se conservó en bolsas de polietileno

herméticamente cerradas a una temperatura de 4 ± 1 °C hasta su utilización.

3.2.5 Desgrasado

El desgrasado de la harina se realizó en equipo Soxleth con 150 mL de hexano a 180 °C, usando un cartucho de papel filtro con 40 g de harina, que estuvo bajo reflujo durante 5 h. La harina desgrasada se dejó en una campana de flujo laminar (RDM, LF-102P, Midland, Ontario, Canadá) durante 3 h con extracción de aire para la evaporación total del hexano; se almacenó en bolsas de polietileno con cierre hermético a 4 ± 1 °C hasta su utilización (Martínez y Añón, 1996).

3.2.6 Análisis químico proximal

A la harina desgrasada se le realizó un análisis químico proximal (AOAC, 1996). Determinando el contenido de proteína por el método Kjeldahl (N x 6.25) AOAC 954.01, el extracto etéreo por el método de Soxhlet (AOAC 920.39), el porcentaje de cenizas (AOAC 942.05) y fibra cruda (AOAC 991.42) de acuerdo con los procedimientos estándar de la AOAC (2002). El contenido de carbohidratos se calculó por diferencia.

$$Carbohidratos\ (\%) = 100 - Lipidos\ (\%) - Proteína\ (\%) - Cenizas\ (\%) - Fibra\ (\%)$$

3.2.7 Solubilización alcalina

Se elaboró una dispersión de la harina de amaranto desgrasada en agua destilada a una concentración del 10 % (p/v), se mantuvo bajo agitación suave a 600rpm a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por 12 h. Subsiguientemente el pH de la dispersión se llevó a 10. (pH 120, Conductronic, Santa Cruz Buenavista, Puebla, México) con NaOH 1N siguiendo la metodología de Figueroa-González et al,. 2022 y se dejó en agitación continua durante 60 min más. Después, las dispersiones se centrifugaron a 9000 xg a 10 °C por 15 min (Centrifuge 5810 R,

Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). El valor del pH del sobrenadante se neutralizó con NaOH 0.1 N hasta pH 7. El sobrenadante se guardó a 4°C hasta su uso. Se tomo una muestra del sobrenadante y se liofilizó directamente sin someterlo a ningún tratamiento para actuar como control y se identificó como (PA).

3.2.8 Microfluidización

Se siguió la metodología reportada por Jojo et al. (2025), con algunas modificaciones. Se utilizó el sobrenadante obtenido previamente de la solubilización alcalina de proteína de amaranto. La dispersión de sobrenadante se sometió al proceso de microfluidización utilizando un microfluidizador de sobremesa (modelo M110P, Microfluidics, EE. UU.), aplicando una presión de 120 MPa (equivalente a 17,500 psi) en un solo pase. Para regular la temperatura de salida durante el tratamiento a alta presión y prevenir el sobrecalentamiento, se utilizó agua con hielo en la chaqueta de las bobinas de salida que rodea el vaso del microfluidizador. Una vez finalizado el proceso, la muestra fue liofilizada e identificada como (PAMF), posteriormente se almacenó a 4 °C hasta su análisis.

3.2.9 Ultrasonicación

Se siguió la metodología de Figueroa-González et al 2022, se utilizó el sobrenadante de proteína, se mantuvo bajo agitación constante a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) durante 1h. Posteriormente, el pH de la dispersión se ajustó a 12 mediante la adición de NaOH 2.5 N, empleando un potenciómetro (pH-metro H1221, Hanna Instruments, Ciudad de México, México). Se mantuvo en agitación durante 1h. La muestra fue sometida a sonicación utilizando un procesador ultrasónico equipado con una sonda de acero inoxidable de 8 mm de diámetro (VCX 130 PB 500/750 W, Sonics and Materials, Inc., Newton, CT, USA), aplicando una amplitud del 50% durante 10 min. Durante este proceso, el sobrenadante se mantuvo en baño de hielo para evitar incrementos de temperatura que pudieran inducir desnaturalización proteica no controlada.

Finalizado el tratamiento, se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, el pH se ajustó a 7.0 con HCl 2.5 N bajo agitación continua. La muestra se liofilizó y etiqueto como (PAUS), finalmente se almaceno a 4°C hasta su uso.

3.2.10 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El espectro FTIR (10 mg de muestra seca) se obtuvo con el equipo Frontier de PerkinElmer (CDMX, México), provisto de un accesorio universal de reflectancia total atenuada. La muestra se colocó en contacto con el cristal de diamante usando un ajuste de geometría (60 unidades de dinamómetro) y la absorbancia se midió en longitudes de onda de 4000-400 cm^{-1} con una resolución de 40 cm^{-1} (López-Monterrubio, Lobato-Calleros, Álvarez-Ramírez, y Vernon-Carter, 2020). Se realizó un análisis cuantitativo del espectro FTIR mediante deconvolución numérica por mínimos cuadrados utilizando funciones de base gaussiana con el paquete OriginLab® (versión 2018). En todos los casos, se eliminó la línea base. En particular, se analizó la región Amida I (1700-1600 cm1) para evaluar la estructura secundaria de la proteína, y la identificación de los picos se realizó según Kong y Yu (2007). La fracción de contribución de cada pico se obtuvo como la relación entre el área de cada pico individual y el área total de los picos deconvolucionados.

3.2.11 Digestibilidad relativa *in vitro*

Para determinar la digestibilidad relativa in vitro se realizó una hidrólisis multienzimática descrita por Bodwell et al. (1980) y Carbonaro et al. (1997) con ligeras modificaciones. Se disolvieron 63.8 mg de PA, PAUS y PAMF liofilizadas en 10 mL de agua destilada a 37 ± 1 °C y el pH se ajustó a 8.0 mediante la adición de NaOH 1 N. A continuación, se incorporó 1 mL de una solución enzimática preparada con 1.58 mg de tripsina pancreática porcina (tipo IX, 15 310 unidades mg^{-1} de proteína) y 3.65 mg de quimotripsina pancreática bovina (tipo II, 48 unidades mg^{-1} de sólido). Se mantuvieron en agitación durante 10 min

manteniendo la temperatura constante inicial. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 mL de una segunda solución enzimática con 1.48 mg de proteasa bacteriana (tipo XIV, 4.4 Unidades mg^{-1} de sólido), continuando la digestión durante 9 min a 55 ± 1 °C. Al finalizar el proceso, la mezcla de reacción se ajustó a 37 ± 1 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 1 min. Posteriormente, se registró el valor de pH, el cual se empleó para calcular el porcentaje de digestibilidad relativa de la proteína *in vitro* (DRP %), mediante la siguiente ecuación:

$$DRP\,(\%) = (234.84 - 22.56)\,X$$

donde X es el pH final de la mezcla de reacción.

3.2.12 Tamaño de partícula

Se prepararon disoluciones de liofilizado de proteína de amaranto de los tres tratamientos (PA, PAUS, PAMF) diluida al 0.2 % (m/v) en agua destilada y se realizaron las mediciones en el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) para determinar tamaño de partícula de los dos tratamientos y el control.

3.2.13 Potencial Zeta ζ

El potencial (ζ) se determinó mediante el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido), empleando el modelo matemático de Smoluchowski para el cálculo de los valores correspondientes. Se prepararon disoluciones de liofilizado de proteína de amaranto de los tres tratamientos (PA, PAUS, PAMF) diluida al 0.2 % (m/v) en agua destilada y se ajustó el pH se ajustó en un rango de valores de 3 a 12, usando soluciones de NaOH 0.5 M, HCl 0.25 M empleando un potenciómetro (Conductronic PC45, Puebla, México) (Goncalves, De Freitas, Fernandes, & García-Rojas, 2020).

3.3.14 Digestión gastrointestinal simulada (DGIS)

La hidrólisis enzimática se realizó según la metodología descrita por (Montiel Aguilar, et al., 2020). Para simular el proceso gastrointestinal, se realizó una digestión secuencial con pepsina y pancreatina. Se preparó una dispersión de PA, PAUS y PAMF liofilizadas a una concentración del 5 % (m/v) en agua destilada y se mantuvieron bajo agitación continua durante 1 h a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Posteriormente, el pH se ajustó a 2.0 mediante la adición de HCl 1 M. Los sistemas se incubaron a 37 ± 1 °C, manteniendo esta temperatura constante durante todo el procedimiento de la digestión. A continuación, se incorporó pepsina al 4 % y la reacción enzimática se llevó a cabo durante 2 h. Una vez concluida esta etapa, el pH se elevó a 5.3 mediante la adición de bicarbonato de sodio 0.9 M y, posteriormente, a 7.5 utilizando NaOH 1 M. Bajo estas condiciones, se añadió pancreatina al 10 % y las dispersiones se mantuvieron en agitación durante 2 h. Se recolectaron alícuotas antes y después del proceso de hidrólisis, las cuales se denominaron AHPA, AHPAUS y AHPAMF para las muestras previas a la hidrólisis, y DHPA, DHPAUS y DHPAMF para aquellas obtenidas después del tratamiento enzimático. Las muestras correspondientes a la etapa posterior a la hidrólisis se sometieron a ebullición durante 15 min para inactivar las enzimas y detener la reacción. Posteriormente, se centrifugaron (Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 rpm durante 15 min a 4 ± 1 °C. Finalmente, los sobrenadantes recuperados se conservaron a −20 ± 1 °C hasta su posterior análisis.

3.2.15 Determinación de grado de hidrolisis (GH)

El grado de hidrólisis (GH) se evaluó siguiendo la metodología descrita por Adler-Nissen (1979), con algunos cambios. Para ello, en tubos ámbar se mezclaron 64 µL de muestra con 1 mL de amortiguador de fosfatos (0.2 M, pH 8.2) y 0.5 mL de ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS) al 0.01 % (v/v). Posteriormente, las mezclas se incubaron a 50 ± 1 °C durante 30 min. Una vez transcurrido este

tiempo, se añadió 1 mL de sulfito de sodio 0.1 M y se dejaron reposar a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) durante 15 min. La absorbancia se registró a 420 nm utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Las concentraciones correspondientes se determinaron mediante interpolación en una curva de calibración elaborada con L-leucina (0–6 mM) (Anexo 2). Por otra parte, el contenido total de grupos α-amino de las muestras se determinó mediante hidrólisis ácida de las proteínas. Para este procedimiento, se colocaron 0.5 g de muestra liofilizada de PA, PAUS y PAMF en ampolletas de vidrio, a las cuales se adicionaron 4.5 mL de HCl 6 N. Las ampolletas se sellaron al vacío y se sometieron a hidrólisis en una estufa para su incubación (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México) a 110 ± 1 °C durante 24 h. Finalizado este tratamiento, las mezclas se neutralizaron mediante la adición de 4.5 mL de NaOH 6 N y se filtraron a través de papel Whatman No. 1 para eliminar los residuos de cenizas. Finalmente, el porcentaje de grado de hidrólisis (GH) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$GH\ (\%) = [(NH2tx - NH2t0) / (NH2HT - NH2t0)]\ x\ 100$$

Donde: $NH2tx$ = total de grupos aminos α-amino terminal al tiempo x (tx);
N$H2t0$ = total de grupos aminos α-amino terminal al tiempo cero (t0);
N$H2HT$ = total de grupos aminos α-amino terminal posterior a la hidrólisis ácida total.

3.2.16 Separación de fracciones peptídicas

Las suspensiones de AHPA, AHPAUS, AHPAMF y DHPA, DHPAUS, DHPAMF se fraccionaron utilizando concentradores de filtro centrífugo con membrana de corte de 3 y 10 kDa (Amicon ®, Merck, Ultra-15, Milipore, Sigma-Aldrich, Co. Cork IRL) para así obtener las siguientes fracciones peptídicas: (F1 y F2 de AHPA),(F1 y F2 de AHPAUS), (F1 y F2 de AHPAMF) y (F1 y F2 de DHPA), (F1 y F2 de DHPAUS) y (F1 y F2 de DHPAM) donde: F1 corresponde a las fracciones 3 kDa

y F2 a fracciones 10 kDa, las cuales se almacenaron a -20 ± 1 °C hasta su análisis.

3.2.17 Determinación de secuencias peptídicas por FT-ICR-MRMS

Los péptidos presentes en las fracciones (F1 y F2 de AHPA),(F1 y F2 de AHPAUS), (F1 y F2 de AHPAMF) y (F1 y F2 de DHPA), (F1 y F2 de DHPAUS) y (F1 y F2 de DHPAM), fueron identificados mediante un espectrómetro de masas de transformada de Fourier por resonancia ciclotrón iónica Bruker solariX (FT-ICR MS, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) equipado con un imán superconductivo de 7 Tesla (Magnex Scientific Inc., Yarton, GB) y una fuente APOLO II ESI (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) operada en modo de ionización negativo/positivo, siguiendo la metodología de Aguilar-Toalá et al, 2024. Los espectros de masas de alta resolución FTICR fueron exportados a listas de picos con un umbral de relación señal/ruido (S/N) de 6 usando el software DataAnalysis 6.0. Antes del análisis, las muestras experimentales se combinaron y se inyectaron mediante análisis de inyección por flujo (FIA) sobre la pieza del equipo utilizando una jeringa tipo Hamilton de 250 µL con caudal de 120 µL/h usando ESI positiva y negativa (450 V, 1 nA Capilar; 500 V, 9.451 nA Desplazamiento del plato final) para asegurar una eficiencia de ionización óptima y un mayor número de péptidos identificados. Las condiciones de aplicación fueron: 42.99 m/z baja, 3000 m/z alta, 24 escaneos promediados, 0.1 accum (s) y 8 M de resolución. El establecimiento del gas de la fuente fue N2, con nebulización a 100 kPa, gas seco a 2 L/min y temperatura seca de 176.5 °C. El programa DataAnalysis v.6.0 se utilizó para los datos generados. Las secuencias de péptidos se obtuvieron a partir de los datos de espectrometría de masas utilizando el servidor Mascot (Matrix Science, Inc., Boston MA, EE. UU., http://www.matrixscience.com) frente a las secuencias de la base de datos Swiss-Prot. Las búsquedas en Mascot se realizaron con una tolerancia en la medición de masas de 1.2 Da en modo MS y 0.6 Da para iones MS/MS. Ninguna de las modificaciones se seleccionó como modificación fija o variable y se configuró para permitir hasta 1 ruptura de enlace no detectada. Asimismo, las secuencias

peptídicas identificadas se sometieron a un análisis mediante la plataforma BioPep (https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/), con la finalidad de predecir su potencial para presentar sus posibles actividades biológicas.

3.2.18 Análisis estadístico

Los ensayos experimentales se efectuaron por triplicado bajo un diseño completamente al azar. Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar. Para el análisis estadístico, los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y, cuando se identificaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Se estableció un nivel de significancia estadística de $p \leq 0.05$. El procesamiento de los datos se realizó mediante el software estadístico Minitab® versión 19.1.1 (Minitab Inc., 2019, Pennsylvania, EUA).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Análisis químico proximal de harina desengrasada de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).

El análisis químico proximal de la harina desgrasada de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) mostró un contenido de humedad de 7.75 ± 0.03 % (Cuadro 1), cercana al 7.11 %, reportado por Rosales-García et al. (2017) en semillas sometidas a extracción con fluidos supercríticos, lo que sugiere que procesos de extracción lipídica favorecen la reducción adicional de humedad.

El contenido de ceniza fue de 5.14 ± 0.5 % (Cuadro 1), valor que se encuentra dentro del intervalo reportado por Rosales-García et al. (2017). La extracción lipídica podría contribuir a una mayor concentración relativa de esta fracción. Asimismo, las diferencias entre estudiospueden relacionarse con la composición mineral del suelo, las condiciones agroclimáticas, el manejo poscosecha y la proporción de las distintas estructurasde la semilla (Constantino & Garcia-Rojas, 2020).

El contenido de proteína fue de 18.16 ± 0.08 (Cuadro 1), este resultado es cercano al límite superior del intervalo de 15-20 % reportado por Constantino & Garcia-Rojas (2020) y coincide con el valor de 18.80% registrado por Valadez-Vega et al. (2022) para la misma especie.

Por su parte, el contenido de grasa fue de 2.85 ± 0.42 % (Cuadro 1), este valor es inferior al rango de 5-7% reportado por Ariza-Ortega (2025) para harina de semilla sin desgrasar, estos resultados permiten asociar el efecto del desengrasado empleado en este estudio, con una reducción del contenido lipídico.

El contenido de fibra fue de 5.54 ± 0.01 %, valor comprendido en el intervalo de 4.84-5.85 % reportado por Oteri et al. (2021) para la misma especie.

Los carbohidratos constituyeron la fracción mayoritaria, con un contenido de 60.56 ± 0.3 % (Cuadro 1). Este resultado es congruente con la naturaleza amilácea de la semilla de amaranto, cuyo perispermo es rico en almidón (Hadidi et al., 2024b). Asimismo, el valor obtenido está dentro del rango de 55.5-67.06 % reportado por Valadez-Vega et al. (2022).

Cuadro 1. Composición químico proximal de harina desengrasada de amaranto *Amaranthus hypochondriacus*

Parámetro	**(%) (b.s.)**
Humedad	7.75± 0.03
Cenizas	5.14 ± 0.5
Proteína	18.16 ± 0.08
Grasa	2.85 ± 0.42
Fibra	5.54 ± 0.01
Carbohidratos	60.56 ± 0.3

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

3.3.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier FTIR

El análisis de la región Amida I mediante deconvolución (Figura 2) evidenció diferencias significativas en la estructura secundaria de la proteína de amaranto

después de los tratamientos físicos (Cuadro 2). La muestra control (PA) presentó predominio de estructuras β-lámina (72.52 ± 0.49%), mientras que las fracciones correspondientes a α-hélice y estructura desordenada fueron de 0.969 ± 0.04 y 7.909 ± 0.04%, respectivament. La elevada contribución de la β-lámina es consistente con lo descrito por Figueroa et al. (2022) en aislados de proteína de amaranto, cuyos espectros mostraron una contribución importante de estas estructuras en la región de Amida I.

La muestra tratada con ultrasonido (PAUS) presentó la modificación conformacional más pronunciada, disminuyendo la contribución de β-lámina hasta 42.37 ± 0.34 %, acompañada por un incremento de α-hélice hasta 20.43 ± 0.15 % y de estructura desordenada hasta 19.26 ± 0.09 %. Estos resultados sugieren una reorganización de la estructura secundaria, posiblemente asociada con la perturbación de las interacciones no covalentes que estabilizan la conformación proteica como consecuencia de las fuerzas generadas durante la cavitación acústica (Meutter & Goormaghtigh, 2021). Este comportamiento concuerda con lo reportado por Das et al. (2025), quienes observaron modificaciones en las fracciones de α-hélice, β-lámina, β-giro y estructuras desordenadas de la proteína de amaranto después del tratamiento con ultrasonido.

Por su parte, la muestra tratada con microfluidización (PAMF) también modificó significativamente la estructura secundaria, aunque en menor magnitud respecto a la β-lámina, cuya contribución disminuyó a 56.787 ± 0.37%, mientras que la α-hélice aumentó a 18.192 ± 0.49%. En comparación con PAUS, PAMF presentó la menor proporción de estructura desordenada (9.664 ± 0.03%) (Cuadro 2).

En conjunto, estos resultados sugieren que ambos tratamientos promovieron mecanismos de reorganización conformacional en la estructura de la proteína. Sin embargo, la sonicación produjo una mayor perturbación de la organización secundaria de la proteína, mientras que la microfluidización promovió una reorganización que conservó una mayor proporción de estructuras β.

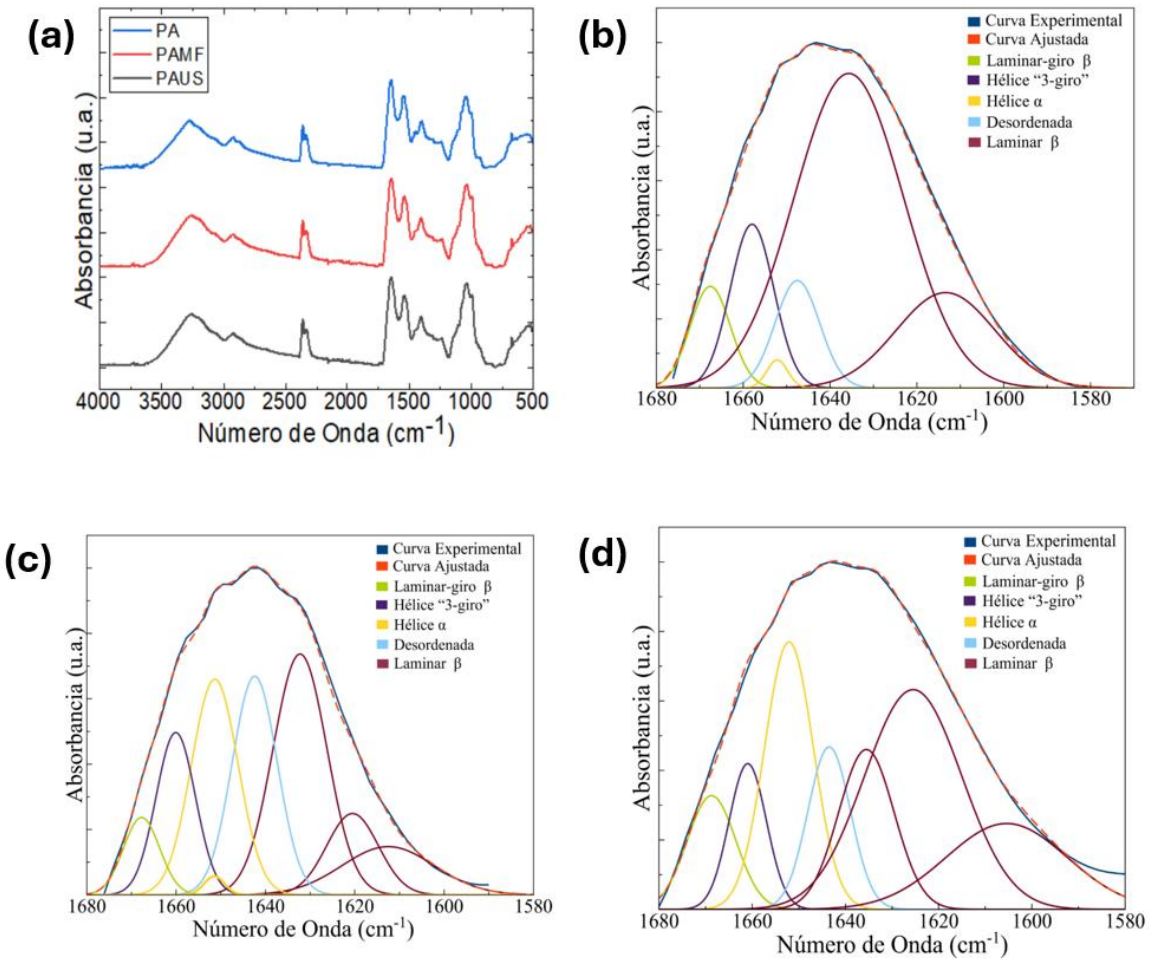

Figura 2. Espectro FTIR de PA, PAUS y PAMF (a). Deconvolución Gaussiana de señales FTIR en la región Amida I PA (b) PAUS (c) PAMF (d).

Cuadro 2. Contenido relativo de los componentes de la estructura secundaria de PA, PAUS, PAMF de la deconvolución Gaussiana de FTIR en la región Amida I.

Componente de Estructura Secundaria (%)	PA	PAUS	PAMF
Laminar-giro β	6.777 ± 0.02 b	5.456 ± 0.26 c	7.734 ± 0.06 a
Hélice "3-giro"	11.835 ± 0.07 b	12.483 ± 0.03 a	7.624 ± 0.08 c
Hélice α	0.969 ± 0.04 c	20.43 ± 0.15 a	18.192 ± 0.49 b
Desordenada	7.909 ± 0.04 c	19.26 ± 0.09 a	9.664 ± 0.03 b
Laminar β	72.52 ± 0.49 a	42.37 ± 0.34 c	56.787 ± 0.37 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) ± desviación estándar

3.3.3 Digestibilidad relativa *in vitro*

La digestibilidad relativa *in vitro* de las proteínas de amaranto mostró diferencias significativas entre tratamientos, con el siguiente orden: PA US (94.39 ± 0.03%) > PA MF (90.39 ± 0.04%) > PA (89.11 ± 0.02%) (Cuadro 3). Este comportamiento indica que tanto el ultrasonido como la microfluidización modificaron la susceptibilidad de la proteína a la hidrólisis multienzimatica, aunque el efecto fue más marcado para el tratamiento con ultrasonido.

El incremento de la digestibilidad observado en PAUS sugiere que el ultrasonido favoreció una mayor accesibilidad de las enzimas en los sitios de corte en la proteína. Este efecto ha sido atribuido a cambios en la conformación molecular, reducción del tamaño de agregados y exposición de residuos antes menos accesibles a la acción proteolítica (Rivero Meza et al., 2023). En proteínas vegetales, el ultrasonido puede inducir desenrollamiento parcial de la estructura, ruptura de interacciones no covalentes y reorganización supramolecular, lo que facilita la acción de las enzimas digestivas (Figueroa-González et al., 2022). Esta tendencia también es coherente con revisiones recientes que describen a las proteínas de amaranto como altamente digestibles, pero sensibles a mejoras adicionales cuando se aplican procesos que modifican su estructura (Rivero Meza et al., 2023). En proteína de amaranto sometida a tratamientos físicos Figueroa-González et al., (2022) reportaron que el aumento de la digestibilidad se relacionó estrechamente con una mayor exposición de sitios susceptibles a las enzimas digestivas y cambios en la microestructura proteica.

Por otra parte, PAMF presentó una digestibilidad superior a la muestra PA, sin embargo, su valor fue menor que el obtenido con ultrasonido. Esto sugiere que la microfluidización también promovió cambios estructurales favorables para la acción enzimática, pero en menor magnitud. La microfluidización genera fuerzas intensas de cizalla, turbulencia e impacto que pueden desintegrar agregados, reducir el tamaño de partícula y modificar la organización proteica (Jojo et al., 2025). Sin embargo, dependiendo de la intensidad del tratamiento y de la naturaleza de la proteína, estos cambios pueden producir simultáneamente desagregación y reagregación parcial, lo que limitaría la exposición máxima de

sitios de hidrólisis.

En este sentido, el mayor incremento de la digestibilidad observado PAUS respecto a PA, en comparación con el registrado en PAMF respecto a PA, sugiere que el ultrasonido favoreció una conformación proteica más suseptible a la proteólisis bajo las condiciones del ensayo. Asimismo, la digestibilidad de PA (89.11%; Cuadro 3) indica que, aun sin tratamiento, la proteína de amaranto presenta una elevada digestibilidad. Este resultado concuerda con la literatura que describe al amaranto como una fuente proteica de buena calidad nutricional y alta digestibilidad comparada con otros materiales vegetales (Das et al., 2025a). Los resultados muestran el incremento de la digestibilidad a partir de la aplicación de procesos físicos, lo que podría relacionarse con los cambios estructurales inducidos.

Cuadro 3. Digestibilidad relativa *in vitro* (PA, PAUS, PAMF)

	PA	**PA US**	**PA MF**
Digestibilidad relativa *in vitro*	89.11± 0.02 c	94.39 ± 0.03 a	90.39 ± 0.04 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.3.4 Tamaño de partícula

Los tratamientos con ultrasonido y microfluidización modificaron significativamente el tamaño de partícula de la proteína de amaranto (Figura 2). La muestra sin tratamiento (PA) presentó el mayor tamaño de partícula, con un valor de a 1931 ±24.6 nm, lo que coincide con Figueroa et al., (2022) quienes reportan valores de 1167,0 ±15,6 a 2490,0 ±5,3 nm para proteína de amaranto, mientras que la proteína procesada con ultrasonido (PAUS) presentó el menor tamaño (317.93 ±4.3 nm), lo que indica que el ultrasonido pudo promover una desnaturalización extensa de la proteína y favorecer la formación de agregados, a través de enlaces no covalentes (Constantino & Garcia-Rojas, 2020).

Por su parte, la muestra sometida a microfluidización (PAMF) presentó un tamaño de 716.43 ±6.8 nm, cercano al valor de 701 ± 0.4 nm reportado por Moll et al. (2022) en proteína de chícharo. Estos autores atribuyeron la reducción del tamaño de partícula a la ruptura de agregados proteicos grandes por efecto de las fuerzas de cizalla, la turbulencia y la cavitación generadas durante el proceso. Con estas diferencias significativas respecto a PA se sugiere que ambos tratamientos promovieron la desintegración de agregados en la proteína, aunque el ultrasonido fue más eficiente para reducir el tamaño de la partícula.

Este comportamiento puede relacionarse con los efectos mecánicos de cada tecnología. En el caso del ultrasonido, la cavitación acústica genera microburbujas que colapsan violentamente, provocando fuerzas de corte locales capaces de romper agregados y dispersar estructuras proteicas (Chen et al., 2022). Por otro lado, la microfluidización somete la muestra a fuerzas de cizalla e impacto, así como turbulencia; sin embargo, su efecto depende en gran medida de la presión aplicada, del número de pasos y de la tendencia de las proteínas a reagregarse después del tratamiento (Dhenge et al., 2023). En proteínas vegetales, se ha reportado que ambos procesos pueden disminuir el tamaño de partícula y modificar la organización molecular, con posibles repercuciones en la solubilidad, estabilidad coloidal y digestibilidad (Hadidi et al., 2024b).

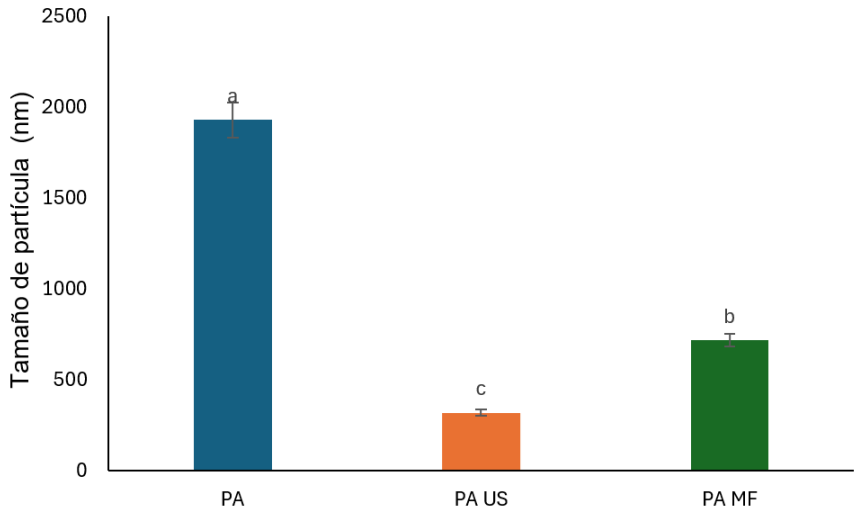

Figura 3. Tamaño de partícula (nm).

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.3.5 Potencial zeta (ζ)

El potencial zeta ζ cambió en función del pH, es decir, presentó valores positivos en condiciones ácidas, cercanos a cero alrededores de pH 4 y valores negativos a partir de pH 5 (Figura 3). Este comportamiento sugiere que, alrededor de pH 4, las muestras se encontraban próximas a su punto isoeléctrico (pI). Este valor es consistente con el rango de 4.0 a 5.0, reportado por Hadidi et al. (2024) para proteína de amaranto.

De acuerdo con Das et al. (2021) la variación del pH modifica el estado de ionización de los grupos funcionales de los aminoácidos y, en consecuencia, la carga superficial efectiva de las partículas en proteínas vegetales. En condiciones ácidas predominan las cargas positivas, asociadas principalmente con la protonación de grupos amino. A medida que incrementa el pH, aumenta la desprotonación de grupos carboxilo, lo que genera una carga superficial progresivamente negativa.

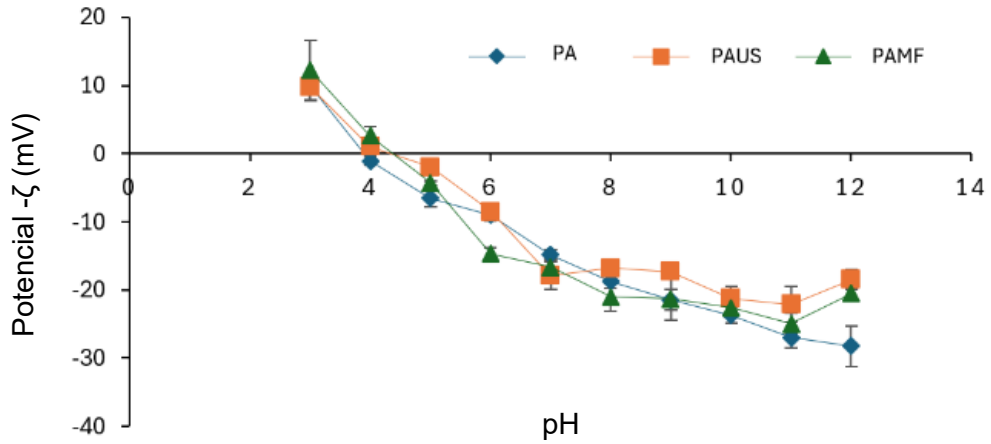

Figura 4. Potencial- ζ (mV).

3.3.6 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis de la proteína de amaranto se determinó al finalizar el proceso de digestión gastrointestinal simulada. Los tratamientos físicos modificaron significativamente este parámetro, observándose el siguiente orden: PAMF > PAUS > PA (Cuadro 4). Estos resultados indican que tanto el ultrasonido como la microfluidización incrementaron la susceptibilidad de la proteína de amaranto a la acción proteolítica, con un mayor efecto de la microfluidización (Constantino & García-Rojas, 2020).

Este comportamiento sugiere que los tratamientos promovieron modificaciones estructurales que facilitaron el acceso de las enzimas a los enlaces peptídicos. En proteínas vegetales, el incremento del grado de hidrólisis después de aplicar tratamientos físicos suele atribuirse a fenómenos como desagregación parcial, desplegamiento molecular, exposición de regiones hidrofóbicas o de sitios de corte antes menos accesibles, así como cambios en la organización molecular. Este tipo de respuesta ya ha sido descrito en proteínas tratadas por tecnologías físicas de alta energía, donde la modificación conformacional incrementa la eficiencia de la hidrólisis enzimática y puede mejorar propiedades funcionales asociadas (Figueroa-González et al., 2022).

En este sentido, el mayor grado de hidrólisis observado en PAMF (Cuadro 4) podría relacionarse con una reordenación estructural que favoreció el acceso de las enzimas a los enlaces (Jojo et al., 2025). Este hallazgo es relevante porque una mayor hidrólisis puede asociarse con la generación de péptidos de menor peso molecular, mejora en propiedades tecnofuncionales y posible modificación de la bioactividad, lo cual amplía el potencial de uso de la proteína de amaranto en el desarrollo de ingredientes alimentarios especializados.

Cuadro 4. Grado de hidrolisis después de digestión gastrointestinal simulada (PA, PAUS, PAMF)

	GH (%)
PA	50.43 ± 0.22 c
PAUS	70.64 ± 0.33 b
PAMF	80.77 ± 0.28 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.3.7 Determinación de secuencias peptídicas

Las secuencias peptídicas de las muestras de PA, PAUS y PAMF, se determinaron en dos etapas: antes (AH) y después (DH) de la digestión gastrointestinal simulada, y se identificaron mediante el software MASCOT en las fracciones obtenidas con puntos de corte de 3 y 10 kDa (Cuadro 5 y 6). La entre ambas etapas mostró cambios en las secuencias detectadas según el tratamiento aplicado y la fracción analizada.

En PAUS, se detectaron las secuencias TAK, WNR y SIVKHER antes y después de la hidrólisis en ambas fracciones. La secuencia HER se detectó en ambas etapas en la fracción de 3 kDa. Por su parte, CGPK, DFR y CIPK , que estuvieron presentes en AH PAUS 10, dejaron de detectarse en DH PAUS 10 (Cuadro 5).

En PAMF, las secuencias TAK, CGPK, WNR y SIVKHER se detectaron em ambas fracciones, mientras que DFR y SLNYK se detectaron después de la

hidrólisis en PAMF 10 (Cuadro 6). Estas diferencias sugieren que el perfil de secuencias detectadas varió en función del tratamiento y de la fracción analizada. Posteriormente, las secuencias identificadas se analizaron mediante la herramienta BIOPEP-UWM, y se encontraron asociaciones con posibles actividades antimicrobianas, inmunomoduladoras, antidiabéticas y antiinflamatorias. En particular, la secuencia DFR se detectó antes de la hidrólisis en AH PAMF 3 y AH PAUS 10, y después en DH PAMF 3 y DH PAMF 10 respectivamente. Este tripéptido coincide con la misma secuencia reportada por Liu et al. (2025) obtenida de nuez (*Carya cathayensis*) cuyo potencial antiinflamatorio se evaluó mediante análisis computacionales y ensayos in vitro.

Es importante tomar en cuenta que la funcionalidad de los péptidos encontrados está determinada principalmente por la presencia de ciertos aminoácidos, así como el peso molecular, punto isoeléctrico y posición en los que se encuentren dentro de la proteína. (Lv et al., 2022)

El punto isoeléctrico de las secuencias tuvo variación entre 6.12 a 9.7 con masas menores a 1kDa (320.13 - 869.27) (Cuadro 5, 6).

Cuadro 5. Secuencias peptídicas identificados por MS para PA, PAUS, PAMF antes de la digestión gastrointestinal simulada (AH) a 3 y 10 kDa.

Muestra	Secuencia peptídica	Masa observada (Da)	Intensidad	pI	Funcionalidad
AH PAUS 3	TAK	320.133	1.65E+07	8.76	Antimicrobiano/ Inmunomodulador
	HER	441.058	6711894	8.76	Antimicrobiano
	WNR	476.292	2.47E+07	7.12	Antidiabético
	YCGR	497.234	2.00E+07	8.76	Antimicrobiano
	SIVKHER	869.274	4.58E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
AH PAMF 3	TAK	318.972	1.67E+07	8.76	Antimicrobiano
	CGPK	405.101	1.27E+07	6.12	Antidiabético
	DFR	437.215	6751994	8.76	Antiinflamatorio
	HER	441.058	5.57E+07	8.76	Antimicrobiano
	WNR	475.211	7925731	6.12	Antidiabético
	SGFTK	538.984	2.75E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
	SIVKHER	869.274	4.71E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
AH PAUS 10	TAK	320.133	6954211	8.76	Antimicrobiano/ Inmunomodulador
	CGPK	403.233	1.15E+07	6.12	Antidiabético
	DFR	437.215	1.24E+07	8.76	Antiinflamatorio
	CIPK	460.273	8558915	6.12	Antidiabético
	WNR	475.211	8510610	6.12	Antidiabético
	SLNYK	624.378	3.14E+07	9.7	Proteína de transferencia de lípidos no específica
	SIVKHER	869.274	1.05E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
AH PAMF 10	TAK	318.972	5480241.5	8.76	Antimicrobiano/ Inmunomodulador
	CGPK	405.101	1.25E+07	6.12	Antidiabético
	HER	441.058	3.89E+07	8.76	Antimicrobiano
	SIVK	446.553	2.28E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina

WNR	475.211	5477172.5	6.12	Antidiabético
SIVKHER	869.274	3.85E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina

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.

Cuadro 6. Secuencias peptídicas identificados por MS para PA, PAUS, PAMF después de la digestión gastrointestinal simulada (DH) a 3 y 10 kDa.

Muestra	Secuencia peptídica	Masa observada (Da)	Intensidad	pI	Funcionalidad
DH PA 3	HER	441.05829	2.28E+08	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
	SGFTK	538.98427	1.48E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
	SIVKHER	869.27398	2.66E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
DH PAUS 3	TAK	320.1334	318.1903	8.76	Antimicrobiano/ Inmunomodulador
	CGPK	403.23254	7216883	6.12	Antidiabético
	DFR	437.2145	4.36E+02	8.76	Antiinflamatorio
	HER	441.05829	4.40E+02	8.76	Antimicrobiano
	WNR	475.21061	1.02E+07	6.12	Inhibidor de tripsina/subtilisina
	SLNYK	624.37848	623.3278	9.7	Inhibidor de tripsina/subtilisina
	SIVKHER	869.27398	1.05E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
DH PAMF 3	TAK	320.1334	1.07E+07	8.76	Antimicrobiano/ Inmunomodulador
	CGPK	403.23254	9624298	6.12	Antidiabético
	DFR	437.2145	2.24E+07	8.76	Antiinflamatorio
	HER	441.05829	5761514	8.76	Antimicrobiano
	CIPK	460.27288	1.02E+07	6.12	Antidiabético
	WNR	475.21061	9524457	6.12	Antidiabético
	SLNYK	624.37848	1.42E+07	9.7	Proteína de transferencia de lípidos no específica
	SIVKHER	869.27398	9616903	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
DH PA 10	CGPK	403.23254	1.30E+07	6.12	Antidiabético
	DFR	437.2145	1.49E+07	8.76	Antiinflamatorio
	WNR	475.21061	1.10E+07	6.12	Inhibidor de tripsina/subtilisina
	SIVKHER	869.27398	1.15E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina

DH PAUS 10	TAK	320.1334	3.40E+07	8.76	Antimicrobiano/ inmunomodulador
	SIVK	446.55273	4067305.5	8.76	Antibacterial
	WNR	476.29208	1.44E+07	6.12	Antidiabético
	YCGR	497.23404	6268148.5	8.76	Antimicrobiano
	SLNYK	624.37848	2.87E+07	9.7	Proteína de transferencia de lípidos no específica
	SIVKHER	869.27398	6.91E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina
DH PAMF 10	TAK	320.1334	1.13E+07	8.76	Antimicrobiano/ inmunomodulador
	CGPK	403.23254	1.03E+07	6.12	Antidiabético
	DFR	437.2145	2.37E+07	8.76	Antiinflamatorio
	WNR	475.21061	8676071	6.12	Antidiabético
	SLNYK	624.37848	2.19E+07	9.7	Proteína de transferencia de lípidos no específica
	SIVKHER	869.27398	1.25E+07	8.76	Inhibidor de tripsina/subtilisina

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.

3.3.8 Conclusiones

Los tratamientos con ultrasonido y microfluidización aplicados a la proteína de amaranto modificaron de forma significativa su estructura interna, su comportamiento coloidal y su susceptibilidad enzimática. El ultrasonido produjo la mayor reducción del tamaño de partícula y presentó la mayor digestibilidad relativa *in* vitro, lo que sugiere una mayor accesibilidad de la proteína a la acción enzimática. por otro lado, la microfluidización permitió alcanzar el mayor grado de hidrólisis al finalizar la digestión gastrointestinal simulada.

Los efectos observados en FTIR y el potencial-ζ confirmaron que ambos procesos indujeron modificaciones conformacionales y en la carga superficial de la proteína. En cuanto a las secuencias peptídicas identificadas, se observaron diferencias en los perfiles obtenidos antes y después de la hidrólisis, así como entre los tratamientos y las fracciones de ultrafiltración de 3 y 10 kDa. Las secuencias TAK, WNR y SIVKHER se detectaron de manera recurrente, mientras que DFR destacó por su asociación reportada con actividad antiinflamatoria. También se identificaron secuencias relacionadas con posibles actividades antimicrobianas, antidiabéticas e inhibitorias de proteasas. Estos hallazgos amplían la caracterización de los hidrolizados de proteína de amaranto y permiten reconocer secuencias de interés para futuras aplicaciones como ingredientes con potencial bioactivo.

En conjunto, el ultrasonido y la microfluidización constituyen alternativas para modificar las características de la proteína de amaranto y favorecer a su aprovechamiento como ingrediente alimentario. Su selección dependerá del objetivo del procesamiento.

3.3.9 Literatura citada

Aderinola, T. A., & Duodu, K. G. (2022). Production, health-promoting properties and characterization of bioactive peptides from cereal and legume grains. *BioFactors*, *48*(5), 972-992. https://doi.org/10.1002/biof.1889

Ariza-Ortega, J. A. (2025). *Evaluation of amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) oil and bioactive compounds with Fourier transform infrared spectroscopy*.

Baraniak, J., & Kania-Dobrowolska, M. (2022). The Dual Nature of Amaranth—Functional Food and Potential Medicine. *Foods*, *11*(4), 618. https://doi.org/10.3390/foods11040618

Braspaiboon, S., & Laokuldilok, T. (2024). High Hydrostatic Pressure: Influences on Allergenicity, Bioactivities, and Structural and Functional Properties of Proteins from Diverse Food Sources. *Foods*, *13*(6), 922. https://doi.org/10.3390/foods13060922

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813-835. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, W., Ma, H., & Wang, Y.-Y. (2022). Recent advances in modified food proteins by high intensity ultrasound for enhancing functionality: Potential mechanisms, combination with other methods, equipment innovations and future directions. *Ultrasonics Sonochemistry*, *85*, 105993.

https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105993

Constantino, A. B. T., & Garcia-Rojas, E. E. (2020). Modifications of physicochemical and functional properties of amaranth protein isolate (Amaranthus cruentus BRS Alegria) treated with high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, *95*, 103076. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103076

Dabbour, M., Hamoda, A., Wu, P., He, R., Wahia, H., Betchem, G., Salah, M., & Fikry, M. (2025). Functionalizing cottonseed protein by sequential pH-shifting and ultrasonication. *International Journal of Biological Macromolecules*, *323*, 147207. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.147207

Das, D., Mir, N. A., Chandla, N. K., & Singh, S. (2021). Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (Amaranthus hypochondriacus) seed protein isolates. *Food Chemistry*, *353*, 129466. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129466

Das, D., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2025a). Exploring the potential of amaranth proteins: Composition, functional characteristics, modifications, bioactive peptides, and possible applications in food and packaging industries. *Journal of Food Composition and Analysis*, *139*, 107146. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107146

Das, D., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2025b). Exploring the potential of amaranth proteins: Composition, functional characteristics, modifications, bioactive peptides, and possible applications in food and packaging industries.

Journal of Food Composition and Analysis, *139*, 107146. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107146

Das, D., Sheikh, M. A., & Mir, N. A. (2025c). Exploring the potential of amaranth proteins: Composition, functional characteristics, modifications, bioactive peptides, and possible applications in food and packaging industries. *Journal of Food Composition and Analysis*, *139*, 107146. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.107146

Dhenge, R., Rinaldi, M., Rodolfi, M., Barbanti, D., & Ganino, T. (2023). Modification of structural characteristics of vegetables by high-pressure processing: A review. *Food Bioscience*, *56*, 103407. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103407

Figueroa-González, J. J., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J., Aguirre-Mandujano, E., Alvarez-Ramirez, J., & Martínez-Velasco, A. (2022). Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments. *LWT*, *153*, 112561. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112561

Gluvić, A., & Ulrih, N. P. (2019). Peptides derived from food sources: Antioxidative activities and interactions with model lipid membranes. *Food Chemistry*, *287*, 324-332. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.092

Guo, X., Chen, M., Li, Y., Dai, T., Shuai, X., Chen, J., & Liu, C. (2020). Modification of food macromolecules using dynamic high pressure microfluidization: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *100*, 223-234. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.004

Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J.

(2024a). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, *439*, 138164. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164

Hadidi, M., Aghababaei, F., Mahfouzi, M., Zhang, W., & McClements, D. J. (2024b). Amaranth proteins: From extraction to application as nanoparticle-based delivery systems for bioactive compounds. *Food Chemistry*, *439*, 138164. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138164

He, X., Chen, J., He, X., Feng, Z., Li, C., Liu, W., Dai, T., & Liu, C. (2021). Industry-scale microfluidization as a potential technique to improve solubility and modify structure of pea protein. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *67*, 102582. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102582

Hua, N., Ren, X., Yang, F., Huang, Y., Wei, F., & Yang, L. (2024). The Effect of Hydrodynamic Cavitation on the Structural and Functional Properties of Soy Protein Isolate–Lignan/Stilbene Polyphenol Conjugates. *Foods*, *13*(22), 3609. https://doi.org/10.3390/foods13223609

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

Jojo, H., Loushigam, G. L., Bajaj, M., Badgujar, P. C., Sari, T. P., Jaiswal, R., & Pareek, S. (2025). Structural and Functional Enhancement of Guar Meal Protein Concentrate Using High-Pressure Microfluidization. *ACS Food*

Science & Technology, *5*(4), 1578-1590. https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.5c00008

Kamal, H., Mudgil, P., Bhaskar, B., Fisayo, A. F., Gan, C.-Y., & Maqsood, S. (2021). Amaranth proteins as potential source of bioactive peptides with enhanced inhibition of enzymatic markers linked with hypertension and diabetes. *Journal of Cereal Science*, *101*, 103308. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103308

Kumar, H., Guleria, S., Kimta, N., Dhalaria, R., Nepovimova, E., Dhanjal, D. S., Alomar, S. Y., & Kuca, K. (2024). Amaranth and buckwheat grains: Nutritional profile, development of functional foods, their pre-clinical cum clinical aspects and enrichment in feed. *Current Research in Food Science*, *9*, 100836. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100836

López, D. N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D., & Boeris, V. (2019). Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. *Food Research International*, *116*, 419-429. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.056

Lv, R., Dong, Y., Bao, Z., Zhang, S., Lin, S., & Sun, N. (2022). Advances in the activity evaluation and cellular regulation pathways of food-derived antioxidant peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *122*, 171-186. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.026

Meutter, J. D., & Goormaghtigh, E. (2021). FTIR Imaging of Protein Microarrays for High Throughput Secondary Structure Determination. *Analytical Chemistry*. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C03677

Moll, P., Salminen, H., Griesshaber, E., Schmitt, C., & Weiss, J. (2022).

Homogenization improves foaming properties of insoluble pea proteins. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4622-4635. https://doi.org/10.1111/1750-3841.16320

Oteri, M., Gresta, F., Costale, A., Lo Presti, V., Meineri, G., & Chiofalo, B. (2021). Amaranthus hypochondriacus L. as a Sustainable Source of Nutrients and Bioactive Compounds for Animal Feeding. *Antioxidants*, *10*(6), 876. https://doi.org/10.3390/antiox10060876

Rani, S., Pooja, K., & Pal, G. K. (2018). Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination. *Trends in Food Science & Technology*, *80*, 61-70. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.013

Rivero Meza, S. L., Hirsch Ramos, A., Cañizares, L., Raphaelli, C. de O., Bueno Peres, B., Gaioso, C. A., Egea, I., Estrada, Y., Flores, F. B., & de Oliveira, M. (2023). A review on amaranth protein: Composition, digestibility, health benefits and food industry utilisation. *International Journal of Food Science and Technology*, *58*(3), 1564-1574. https://doi.org/10.1111/ijfs.16056

Rodríguez, M., & Tironi, V. A. (2023). Chemical and cell antioxidant activity of amaranth flour and beverage after simulated gastrointestinal digestion. Role of peptides. *Food Research International*, *173*, 113410. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113410

Roy, T., Singh, A., Kumar Das, K., Sari, T. P., & Wagh, M. D. (2025a). Rice protein-derived bioactive peptides: Production, purification, health promoting benefits and food applications. *Journal of Food Composition and Analysis*, *148*, 108142. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108142

Roy, T., Singh, A., Kumar Das, K., Sari, T. P., & Wagh, M. D. (2025b). Rice protein-derived bioactive peptides: Production, purification, health promoting benefits and food applications. *Journal of Food Composition and Analysis*, *148*, 108142. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.108142

Santos-Hernández, M., Alfieri, F., Gallo, V., Miralles, B., Masi, P., Romano, A., Ferranti, P., & Recio, I. (2020). Compared digestibility of plant protein isolates by using the INFOGEST digestion protocol. *Food Research International*, *137*, 109708. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109708

Sattar, M., Saeed, F., Afzaal, M., Rasheed, A., Asif, A., Sharif, S., Hussain, M., Asad Ur Rehman, H., Raza, M. A., Munir, H., & Al Jbawi, E. (2024). An overview of the nutritional and therapeutic properties of amaranth. *International Journal of Food Properties*, *27*(1), 263-272. https://doi.org/10.1080/10942912.2024.2304266

Stani, C., Vaccari, L., Mitri, E., & Birarda, G. (2020). FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: New insight into the amide III band. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *229*, 118006. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.118006

Valadez-Vega, C., Lugo-Magaña, O., Figueroa-Hernández, C., Bautista, M., Betanzos-Cabrera, G., Bernardino-Nicanor, A., González-Amaro, R. M., Alonso-Villegas, R., Morales-González, J. A., & González-Cruz, L. (2022). Effects of Germination and Popping on the Anti-Nutritional Compounds and the Digestibility of Amaranthus hypochondriacus Seeds. *Foods*, *11*(14), 2075. https://doi.org/10.3390/foods11142075

Yildiz, G., & Yıldız, G. (2026). Ultrasound-assisted multiscale structural

engineering of plant proteins: Mechanisms and structure–property relationships. *Frontiers in Soft Matter*, *6*, 1893101. https://doi.org/10.3389/frsfm.2026.1893101

Yücetepe, A., Güneş, Z. S., Adrar, N., & Esatbeyoglu, T. (2026). Non-thermal processing of plant-based proteins: Comparison of cold plasma treatment with high hydrostatic pressure, ultraviolet radiation, and ultrasonication treatments. *European Food Research and Technology*, *252*(3), 143. https://doi.org/10.1007/s00217-026-05071-2

Zhang, Z., Wang, Y., Jiang, H., Dai, C., Xing, Z., Kumah Mintah, B., Dabbour, M., He, R., & Ma, H. (2020). Effect of dual-frequency ultrasound on the formation of lysinoalanine and structural characterization of rice dreg protein isolates. *Ultrasonics Sonochemistry*, *67*, 105124. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105124

Zhou, H., Tan, Y., & McClements, D. J. (2023). Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review. *Annual Review of Food Science and Technology*, *14*(1), 135-156. https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235

Zhu, F. (2023). Amaranth proteins and peptides: Biological properties and food uses. *Food Research International*, *164*, 112405. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112405

4. CONCLUSIONES GENERALES

En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que la aplicación de ultrasonido y microfluidización constituye una estrategia prometedora para modificar las propiedades estructurales, fisicoquímicas y enzimáticas de la proteína de amaranto, favoreciendo su aprovechamiento como materia prima para la obtención de péptidos con potencial bioactivo. Ambas tecnologías indujeron cambios en la organización molecular y la carga superficial de la proteína, aunque con efectos predominantes distintos: el ultrasonido destacó por su capacidad para reducir el tamaño de partícula y favorecer la digestibilidad relativa in vitro, mientras que la microfluidización presentó un mayor grado de hidrólisis. Estas diferencias evidencian que los tratamientos físicos pueden modificar la accesibilidad de las proteínas a las enzimas digestivas y, en consecuencia, influir en la liberación de fragmentos peptídicos durante la hidrólisis gastrointestinal simulada. Asimismo, las variaciones observadas en los perfiles peptídicos antes y después de la hidrólisis, así como entre los tratamientos y las fracciones obtenidas por ultrafiltración, demuestran que las condiciones de procesamiento influyen en las secuencias identificadas. La detección de péptidos como TAK, WNR, SIVKHER y DFR, junto con otras secuencias relacionadas en la literatura con posibles actividades biológicas, representa una base para continuar investigando el potencial funcional de los hidrolizados de amaranto.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta investigación respaldan el uso del ultrasonido y la microfluidización como herramientas para modificar las características de la proteína de amaranto y favorecer su aprovechamiento como ingrediente proteico

5. ANEXOS

Anexo 1. Concentración de proteína soluble (µg/100µL).

Tratamiento	Concentración de proteína soluble (µg/100µL)
PA	21.8 ± 0.02
PA US	15.3 ± 0.06
PA MF	12.9 ± 0.04
DH PA	32.7 ±0.03
DH PA US	23.5 ± 0.02
DH PA MF	17.1 ± 0.02
F3 DH PA	5.5 ± 0.03
F3 DH PA US	3.0 ± 0.03
F3 DH PA MF	2.6 ±0.06
F10 DH PA	12.4 ± 0.06
F10 DH PA US	9.4± 0.04
F10 DH PA MF	4.3 ± 0.01

PA (proteína de amaranto), **PA US** (proteína de amaranto con ultrasonido), **PA MF** (proteína de amaranto con microfluidización), **DH PA** (después de hidrolisis proteína de amaranto), **DH PA US** (después de hidrolisis proteína de amaranto con ultrasonido), **DH PA MF** (después de hidrolisis proteína de amaranto con microfluidización), **F3 DH PA** (fracción 3 kDa después de hidrolisis proteína de amaranto), **F3 DH PA US** (fracción 3 kDa después de hidrolisis proteína de amaranto con ultrasonido), **F3 DH PA MF** (fracción 3 kDa después de hidrolisis proteína de amaranto con microfluidización), **F10 DH PA** (fracción 10 kDa después de hidrolisis proteína de amaranto), **F10 DH PA US** (fracción 10 kDa después de hidrolisis proteína de amaranto con ultrasonido), **F10 DH PA MF** (fracción 10 kDa después de hidrolisis proteína de amaranto con microfluidización).

Anexo 2. Curva L-leucina

