



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

“ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNA DE HORMIGA CHICATANA (*Atta mexicana*)”

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

DANIELA SOTO FELIX

Bajo la supervisión de: ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO, DR.



Chapingo, Estado de México a 25 de octubre de 2022



APROBADA




**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE
PROTEÍNA DE HORMIGA CHICATANA (*Atta mexicana*)**

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

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:




Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

ASESOR:



Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

ASESOR:



Dra. Blanca Elizabeth Hernández Rodríguez

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
DEDICATORIAS	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIBLIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL.....	xi
GENERAL ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
2 REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1 Consumo de insectos	16
2.1.1 Hormiga chicatana (<i>Atta mexicana</i>)	18
2.2 Péptidos bioactivos.....	20
2.2.1 Producción de péptidos bioactivos	22
2.2.1.1 Fermentación microbiana.....	22
2.2.1.2 Hidrólisis química.....	23
2.2.1.3 Hidrólisis enzimática	23
2.2.1.4 Hidrólisis enzimática secuencial	25
2.2.2 Propiedades biológicas de los péptidos	26
2.2.2.1 Actividad antioxidante	26
2.2.2.2 Actividad antidiabética	28
2.2.2.3 Actividad antihipertensiva	29
2.3 Literatura citada	31

3	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNA DE HORMIGA CHICATANA (<i>Atta mexicana</i>).....	39
3.1	RESUMEN.....	39
3.2	ABSTRACT.....	41
3.3	INTRODUCCIÓN.....	42
3.5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
3.5.1	Muestra y reactivos	45
3.5.2	Acondicionamiento de la muestra	45
3.5.2.1	Deshidratación	45
3.5.2.2	Desgrasado.....	46
3.5.3	Análisis químico proximal.....	46
3.5.4	Perfil de aminoácidos	46
3.5.5	Digestibilidad relativa <i>in vitro</i>	47
3.5.6	Determinación de solubilidad de proteínas en función del pH.....	48
3.5.7	Obtención de aislado de proteína.....	49
3.5.8	Potencial zeta (ζ).....	49
3.5.9	Digestión gastrointestinal simulada (DGIS)	49
3.5.10	Determinación del grado de hidrólisis	50
3.5.11	Determinación de secuencias peptídicas por FT-ICR-MRMS....	51
3.5.12	Caracterización molecular, fisicoquímica y biológica de los péptidos obtenidos por DGIS.....	51
3.5.13	Separación de fracciones peptídicas	52
3.5.14	Compuestos fenólicos totales (CFT)	52
3.5.15	Actividad antioxidante por inhibición de DPPH	53
3.5.16	Actividad antioxidante por inhibición de ABTS.....	53

3.5.17	Actividad antihipertensiva	54
3.5.18	Actividad antidiabética	55
3.5.19	Análisis estadístico	55
3.6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.6.1	Análisis químico proximal.....	56
3.6.2	Perfil de aminoácidos	57
3.6.3	Digestibilidad relativa <i>in vitro</i>	60
3.6.4	Solubilidad de las proteínas en función del pH	60
3.6.5	Potencial zeta (ζ).....	61
3.6.6	Grado de hidrólisis	62
3.6.7	Caracterización de péptidos	63
3.6.8	Compuestos fenólicos totales	68
3.6.9	Actividad antioxidante	69
3.6.10	Actividad antihipertensiva	72
3.6.11	Actividad antidiabética	73
3.7	CONCLUSIONES	76
3.8	LITERATURA CITADA	77

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Actividad de agua y análisis químico proximal de hormiga chicatana deshidratada.</i>	<i>20</i>
<i>Cuadro 2. Perfil de aminoácidos esenciales de hormiga chicatana (Atta mexicana).</i>	<i>20</i>
<i>Cuadro 3. Análisis químico proximal de la harina de hormiga chicatana (HH) .</i>	<i>56</i>
<i>Cuadro 4. Perfil de aminoácidos de las proteínas de hormiga chicatana.</i>	<i>58</i>
<i>Cuadro 5. Predicción de actividad biológica en péptidos identificados por MS.</i>	<i>66</i>
<i>Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de péptidos identificados por MS.</i>	<i>67</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Solubilidad de las proteínas de harina de hormiga chicatana a diferentes valores de pH.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 2. Potencial Z del aislado de proteína de hormiga chicatana (APH) en función del pH.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos totales en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática</i>	<i>69</i>
<i>Figura 4. Actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 5. Actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 6. Actividad antihipertensiva por inhibición de ECA-I en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática. .</i>	<i>72</i>
<i>Figura 7. Actividad antidiabética por inhibición de la enzima α-amilasa en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática.....</i>	<i>74</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

HH: Harina de hormiga chicatana

HHD: Harina de hormiga chicatana desgrasada

DM: Diabetes mellitus

APH: Aislado de proteína de hormiga chicatana

AH: Antes de hidrólisis

DH: Después de hidrólisis

CFT: Compuestos fenólicos totales

EAG: Equivalentes de ácido gálico

ECA-I: Enzima convertidora de angiotensina I

DGIS: Digestión gastrointestinal simulada

GH: Grado de hidrólisis

MS: Espectrometría de masas

DEDICATORIAS

..... *A nuestro profesor, Dr. César †*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y particularmente al departamento de Ingeniería Agroindustria por proveer las herramientas necesarias para mi formación profesional a lo largo de todos estos años.

Al posgrado de maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria por otorgarme la oportunidad de pertenecer a su programa.

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

A la Dra. Blanca Hernández Rodríguez por su apoyo en conocimientos, correcciones y enseñanzas, al igual que la amabilidad y sobre todo la paciencia brindada a lo largo de este proyecto.

A la Dr. Eleazar Aguirre Mandujano y Dra. Consuelo Lobato Calleros, por su apoyo y aportaciones en la guía de este trabajo.

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

Al Dr. José Eleazar Aguilar Toalá de la Universidad Autónoma Metropolitana, por su apoyo durante el análisis e interpretación de las secuencias peptídicas.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Daniela Soto Felix

Fecha de nacimiento: 12 de septiembre de 1997

Lugar de nacimiento: Tlanepantla, Estado de México

CURP: SOFD970912MMCTLN09

Profesión: Ingeniera Agroindustrial

Cedula profesional: 12322771



Desarrollo académico

Bachillerato: Preparatoria Agrícola en Universidad Autónoma Chapingo

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial en Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNA DE HORMIGA CHICATANA (*Atta mexicana*)

El crecimiento acelerado de la población mundial ha generado la necesidad de incrementar la producción de alimento de origen animal, lo cual, produce un impacto negativo en el medio ambiente, los recursos hídricos y la biodiversidad. Los insectos se han destacado por su alto contenido de proteína, por tanto, pueden considerarse como una alternativa nutricional sustentable al aporte de proteína para el consumo humano. Este trabajo, tuvo como objetivo evaluar la calidad nutricional de la harina de hormiga (HH) chicatana (*Atta mexicana*), así como la actividad biológica de sus hidrolizados enzimáticos, obtenidos mediante digestión gastrointestinal simulada *in vitro* (DGIS). Como resultado, se obtuvo que la HH presenta un alto contenido de proteínas biodisponibles por su alto porcentaje de digestibilidad ($93.46 \pm 0.47 \%$). Son fuente de aminoácidos esenciales como Leu y Lys, así como aminoácidos no esenciales (Glu, Asp, Pro) de importancia metabólica. Adicionalmente, por medio de una técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier con espectrometría de masas por resonancia magnética (FT-ICR-MRMS), se encontraron secuencias peptídicas (HLP, FLGGLMK) resistentes al proceso de hidrólisis enzimática (DGIS); así como nuevos péptidos (LWPL, AMGFVGMR) con diversas actividades biológicas. El proceso de DGIS incrementó los porcentajes de inhibición de la enzima α -amilasa y mantuvo constante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) así como del radical ABTS. La disminución observada en la actividad antioxidante sobre el radical DPPH, se atribuyó a la pérdida de compuestos fenólicos totales (CFT) durante el proceso de hidrólisis. Esta investigación, hasta nuestro conocimiento constituye el primer reporte sobre péptidos bioactivos derivados de HH, demostrando su potencial como una fuente de moléculas capaces de generar beneficios fisiológicos y, en consecuencia, surge el interés de incorporarlos en la formulación de alimentos funcionales.

Palabras clave

Atta mexicana, péptidos, actividad antioxidante, actividad antidiabética, actividad antihipertensiva.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Daniela Soto Felix

Director: Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

GENERAL ABSTRACT

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PEPTIDES OBTAINED FROM CHICATAN ANT PROTEIN (*Atta mexicana*)

The accelerated growth of the world population has generated the need to increase animal food production, which has a negative impact on the environment, water resources and biodiversity. Insects have been noted for their high protein content; therefore, they can be considered as a sustainable nutritional alternative to the supply of protein for human consumption. The objective of this study was to evaluate the nutritional quality of chikatana ant (*Atta mexicana*) flour (HH), as well as the biological activity of its enzymatic hydrolysates, obtained by simulated gastrointestinal digestion *in vitro* (DGIS). As a result, it was obtained that HH has a high content of bioavailable proteins due to its high percentage of digestibility (93.46 ± 0.47 %). They are a source of essential amino acids such as Leu and Lys, as well as non-essential amino acids (Glu, Asp, Pro) of metabolic importance. Additionally, by means of a high-performance liquid chromatography (HPLC) technique with Fourier transform ion cyclotron resonance with magnetic resonance mass spectrometry (FT-ICR-MRMS), peptide sequences (HLP, FLGGLMK) resistant to the enzymatic hydrolysis process (DGIS) were found; as well as new peptides (LWPL, AMGFVGM) with diverse biological activities. The DGIS process increased the inhibition percentages of α -amylase enzyme and maintained constant the inhibition of angiotensin I-converting enzyme (ECA-I) as well as ABTS radical. The observed decrease in antioxidant activity on the DPPH radical was attributed to the loss of total phenolic compounds (CFT) during the hydrolysis process. This research, to our knowledge, constitutes the first report on bioactive peptides derived from HH, demonstrating their potential as a source of molecules capable of generating physiological benefits and, consequently, the interest of incorporating them in the formulation of functional foods arises.

Keywords

Atta mexicana, peptides, antioxidant activity, antidiabetic activity, antihypertensive activity

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Daniela Soto Felix

Director: Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El crecimiento acelerado de la población mundial, albergando alrededor de 9 mil millones de personas según informes de la FAO, conlleva a un incremento en la producción de alimento de origen animal, generando un impacto negativo en el medio ambiente, los recursos hídricos y la biodiversidad. Por esto, se buscan nuevas estrategias para la producción de alimentos enfocadas, en sistemas de producción sustentables, que mantengan tanto la calidad como la seguridad alimentaria y al mismo tiempo cumpla con los requerimientos nutricionales de proteína animal (Avedaño, Sánchez, & Valenzuela, 2020).

Diversas investigaciones se han enfocado en la posibilidad del uso de materias primas, diferentes a las actuales, que satisfagan las necesidades antes mencionadas. Por ejemplo, el uso de insectos, ya que se han destacado como un alimento sostenible por su alto contenido de proteínas comparable con las de origen animal, por lo tanto, puede servir como una alternativa nutricional al aporte de proteína para el consumo humano, aprovechando la biodiversidad disponible del entorno, que a menudo presenta un potencial en la mejora de la alimentación, nutrición y seguridad (Abril, Pinzón, Hernández-Carrión, & Sánchez-Camargo, 2022) (Ribeiro, Sposito, Pinto, Varela, & Cunha, 2022) (Avedaño, Sánchez, & Valenzuela, 2020) (Zielínska, et al., 2018).

Actualmente, el consumo de insectos es ampliamente aceptado en diferentes países del mundo, como China, Australia, Japón, México. En países de Europa el interés por los insectos comestibles ha ido en incremento debido a su innovación dentro la industria alimentaria, así como la implementación del Reglamento nº 2015/2283 (vigente desde 1 de enero de 2018), el cual regulariza la producción y comercialización de insectos comestibles y productos derivados para su consumo (Pino-Cebrián, 2018).

En México no existe normativa que regule el consumo de insectos, sin embargo, esta práctica se ha realizado desde tiempos prehispánicos en la mayor parte del

país; consumiéndose principalmente en estados como Oaxaca, Chiapas, Morelos, Guerrero, Hidalgo, Veracruz y el Estado de México (Melo-Ruíz, Vilchis-Pérez, & Sánchez-Herrera, 2018) (Ramos-Elorduy & Pino, 2006).

La hormiga chicatana (*Atta mexicana*) es un insecto consumido en gran parte del centro y sur de México, principalmente en los estados de Chiapas, Morelos y Oaxaca. Estas hormigas, han formado parte de los hábitos tradicionales de alimentación desde la época prehispánica debido, entre otras cosas, a su sabor agradable. En su etapa adulta tiene importantes componentes de macronutrientes como proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas destacando por su alto contenido de proteínas, alrededor del 42.59 % (m/m) (Melo-Ruíz, Vilchis-Pérez, & Sánchez-Herrera, 2018) (Ramos-Elorduy, 1997).

Actualmente, los estudios sobre insectos se han enfocado en el uso de diversas tecnologías de procesamiento para su uso como ingredientes en el desarrollo de productos innovadores o como fuentes de nuevos compuestos bioactivos. Entre las diferentes tecnologías de procesamiento, la hidrólisis de proteínas ha tenido un específico interés para el aprovechamiento del alto contenido proteico que presentan los insectos en la producción de péptidos con mayor biodisponibilidad además de la capacidad de presentar actividades biológicas como antioxidante, antidiabética, antihipertensiva, entre otras, que generan efectos fisiológicos benéficos en el consumidor (Castro-López, et al., 2020) (Leni, Soetemans, Caligiani, Sforza, & Bastiaens, 2020). Sin embargo, para la hormiga chicatana existe una falta de información sobre el efecto de los procesos de hidrólisis en la producción de péptidos bioactivos.

Con base en lo mencionado, se generó la siguiente hipótesis: Someter la harina de hormiga chicatana a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* permitirá obtener, mediante hidrólisis, biopéptidos con alto potencial nutricional y adecuada actividad biológica.

Acorde a lo anterior, el objetivo general de esta investigación fue determinar la actividad biológica de péptidos obtenidos a partir de una hidrólisis enzimática secuencial de la harina de hormiga chicatana (*Atta mexicana*).

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) Evaluar la calidad nutricional de la hormiga chicatana y sus proteínas mediante un análisis químico proximal y un perfil de aminoácidos; 2) Producir los hidrolizados de proteína por medio de un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* empleando como sustrato harina desgrasada de hormiga chicatana. 3) Caracterizar las secuencias de los péptidos liberados en el proceso de hidrólisis enzimática; 4) Separar las fracciones peptídicas mediante un proceso de ultrafiltración con cortes moleculares de 3 y 10 kDa. 5) Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, así como la actividad antioxidante, antihipertensiva y antidiabética de los hidrolizados enzimáticos.

Este documento consta de tres capítulos. El primero presenta una introducción general acerca de la importancia de los insectos y su consumo; el segundo capítulo muestra el estado del arte referente a los insectos y la bioactividad de los péptidos. Por último, el tercer capítulo está conformado por el desarrollo de las metodologías para el cumplimiento de los objetivos, así como la presentación de resultados y análisis de los mismos, sobre la caracterización fisicoquímica de la hormiga chicatana y sus péptidos bioactivos.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Consumo de insectos

La entomofagia es el consumo de insectos; se practica en muchos países de todo el mundo, pero principalmente en regiones de Asia, África y América Latina, donde los insectos son considerados como una fuente esencial de nutrientes, complementando la dieta de aproximadamente 2000 millones de personas. En países de Europa el interés por los insectos comestibles ha ido en incremento debido a su innovación dentro la industria alimentaria, así como la implementación del Reglamento nº 2015/2283 (vigente desde 1 de enero de 2018), el cual regulariza la producción y comercialización de insectos comestibles y productos derivados para su consumo (Pino-Cebrián, 2018). (Kröger, Dupont, Büsing, & Fiebelkorn, 2022) (Ribeiro, Sposito, Pinto, Varela, & Cunha, 2022); (Halloran & Vantomme, 2017).

Se estima que un aproximado de 2100 especies de insectos, divididas en 18 órdenes, son utilizadas actualmente como alimento (Tang, et al., 2019). Entre estas, Coleoptera (659 especies), Lepidoptera (362 especies), Hymenoptera (321 especies), Orthoptera (278 especies), Hemiptera (237 especies), Odonata (61 especies), Isoptera (59 especies) y Diptera (37 especies) tienen una mayor cantidad de especies comestibles (Jongema, 2017). De manera general, los insectos de mayor consumo a nivel mundial son los escarabajos (31 %), las orugas (17 %) así como las abejas, avispas y hormigas (15 %). También se consumen saltamontes, grillos, langostas (14 %), cigarras, chicharritas, cochinillas, chinches (11 %), termitas (3 %), libélulas, moscas y otros (9 %) (Fleta-Zaragozano, 2018).

El consumo de insectos se ha incrementado recientemente, debido al reconocimiento que se le ha dado a su valor nutricional, destacando principalmente por ser una fuente viable de proteína, presentando contenidos similares a la carne de res, cerdo y pollo, además de un alto contenido de ácidos

grasos poliinsaturados y minerales como hierro y zinc (Rumpold & Schlüter, 2013).

El contenido de proteína es alto y variable; por ejemplo, en el orden Coleoptera, representado por escarabajos y larvas se ha reportado un contenido de proteína entre 20-71 %, Diptera 36-70 % (moscas, mosquitos), Ephemeroptera entre 37-68 % (libélulas), Hymenoptera entre 10-62 % (abejas, abejorros, avispas y hormigas), Lepidoptera entre 13-64 % (orugas, polillas) y Orthoptera entre 27-76 % (grillos, saltamontes) (Sánchez-Muros, Barroso, & Manzano-Agugliaro, 2014).

Además, estas proteínas presentan un elevado contenido de aminoácidos esenciales. Los principales para el orden Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera y Diptera son los ácidos glutámico y aspártico, fenilalanina y alanina; para el orden Hemiptera, son prolina, leucina, tirosina, alanina, valina y metionina; y en el orden Hymenoptera destacan el ácido glutámico, leucina y alanina (Rumpold & Schlüter, 2013).

Otro reconocimiento que se le ha dado a los insectos es el bajo impacto ambiental que representa su producción, ya que requieren menor área de producción y un menor consumo de agua en comparación con la ganadería convencional, y tienen la posibilidad de alimentarse residuos biológicos transformándolos en proteínas de alta calidad. La emisión de gases de efecto invernadero y contaminantes (CO₂, CH₄, N₂O) son menores a la producida en la ganadería tradicional (Halloran & Vantomme, 2017) (Abbasi, Abbasi, & Abbasi, 2016).

Se reconoce que tienen una eficiencia de conversión alimenticia superior, al transformar 2 kg de alimento en 1 kg de masa de insecto, mientras que el ganado requiere 2.5, 5 y 10 kg de alimento para generar 1 kg de aumento de peso corporal en pollo, cerdo y res, respectivamente; además, pueden alimentarse de residuos biológicos como residuos alimentarios o de origen humano, abono y estiércol, siendo muy eficientes en la bioconversión de desechos orgánicos a proteínas de alta calidad (Halloran & Vantomme, 2017) (Van Huis, et al., 2013).

El aprovechamiento del peso comestible del insecto hace mayor la ventaja del consumo de insectos. Aproximadamente el 80 % del insecto es comestible y digerible, mientras que en los cerdos y pollos es del 55 % y 40 % para la res, teniendo así la producción de insectos un mayor rendimiento que la producción ganadera convencional (Nakagaki & De Foliart, 1991).

Por estas razones, diversas especies están recibiendo cada vez más atención con investigaciones que se enfocan en analizar las ventajas de la entomología y sus aportes como una alternativa en la alimentación de animales y humanos (Avedaño, Sánchez, & Valenzuela, 2020) (Castro-López, et al., 2020) (Van Huis, et al., 2013).

Brogan, Park, Matak y Jaczynski (2021) analizaron el aporte nutrimental de la proteína de dos insectos, *Acheta domesticus* y *Bombyx mori*; en *Hermetia illucens* se determinó por Caligiani et al (2017). BuBler et al., (2016) estudiaron las propiedades tecno-funcionales de harinas de *Tenebrio molitor* y larvas de *Hermetia illucens*, mientras que Myshyna et al. (2018) las determinaron en *Schistocerca gregaria* y *Apis mellifera*. Más investigaciones se han enfocado en el estudio de otras especies, sin embargo, debido a la amplia diversidad de especies de insectos, las investigaciones continúan generando y ampliando los conocimientos sobre el consumo de insectos.

2.1.1 Hormiga chicatana (*Atta mexicana*)

En México, es una práctica que se remonta a tiempos prehispánicos con aproximadamente 504 especies de insectos comestibles a lo largo del territorio, consumiéndose principalmente en estados como Oaxaca, Chiapas, Morelos, Guerrero, Hidalgo, Veracruz y el Estado de México; En Tabasco, Querétaro, Guanajuato, Puebla, Campeche, Jalisco y Michoacán también se informa su consumo, aunque de manera ocasional (Melo-Ruíz, Vilchis-Pérez, & Sánchez-Herrera, 2018) (Ramos-Elorduy & Pino, 2006). Entre la diversidad de insectos consumidos se encuentran saltamontes, grillos, cigarras, avispa, abejas y hormigas (Pino, et al., 2015) (Reyes-Prado, Pino, & García, 2015) (Reyes-Prado H. , et al., 2016) (Reyes-Prado & Pino, 2020).

Dentro de la diversidad de especies consumidas en México, la hormiga chicatana (*Atta mexicana*). Las hormigas chicatanas (del náhuatl “hormiga bolsa” de *tzicatli* = hormiga y *tanatli* = bolsa de palma) son las hembras reproductoras, del orden Hymenoptera, que previo a la fundación de un nuevo hormiguero, al inicio de la época de lluvias, realizan un vuelo nupcial en el cual la reina es fecundada; es durante este proceso en el que son recolectadas para su consumo (López-Morales, et al., 2021) (Ramos-Elorduy, 1997).

Las colonias de estas hormigas presentan un aproximado de 1×10^6 individuos con un tamaño de entre 2 y 12 mm cada uno, siendo de las colonias de hormigas más grandes. Han sido catalogadas como una de las principales cinco plagas de mayor importancia en América Latina, debido a que son insectos defoliadores, es decir, cortan material vegetal fresco para alimentarse y cultivar hongos simbióticos (del género *Leucoagaricus*) dentro del nido de la colonia, y son capaces de dañar sistemas completos agrícolas, forestales y ornamentales, causando importantes pérdidas económicas (Presa-Parra, y otros, 2021) (Tejeda, García, Pérez, & López, 2017) (Ríos-Casanova, 2014).

Las hembras y la reinas, en su etapa adulta, han sido utilizadas desde la época prehispánica como alimento debido entre otras cosas a su sabor agradable, además, aportan importantes macronutrientes como proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales y vitaminas (Cuadro 1), con una concentración de aminoácidos esenciales en los que destacan lisina, valina e isoleucina (Cuadro 2). Al igual que otras especies de insectos, la proteína de la hormiga chicatana presenta la posibilidad de aportar péptidos con actividad biológica que generen beneficios al consumirla, además de otros beneficios dados por los nutrientes que contiene (Castro-López, et al., 2020)

Es por esto, que se ha convertido en uno de los insectos comestibles más comunes en México, consumiéndose principalmente en gran parte del centro y sur del país, aunque su distribución se extiende en casi toda la República Mexicana (desde Guerrero, México hasta Arizona, EUA) (Melo-Ruíz, Vilchis-Pérez, & Sánchez-Herrera, 2018) (Mintzer, 1979).

Cuadro 1. Actividad de agua y análisis químico proximal de hormiga chicatana deshidratada.

Componente	Contenido g * 100 g⁻¹
Humedad	5.12
Proteína	43.74
Lípidos	32.00
Cenizas	4.33
Carbohidratos	12.97
Actividad de agua (aw)	0.05

Fuente: (López-Morales, et al., 2021)

Cuadro 2. Perfil de aminoácidos esenciales de hormiga chicatana (Atta mexicana).

Aminoácidos	Concentración (mg * g⁻¹ de proteína)
Triptofano	6.0
Metionina	19.0 - 40.0
Histidina	25.0
Fenilalanina	41.0 – 88.0
Treonina	43.0 – 60.0
Arginina	47.0
Lisina	49.0 – 51.0
Isoleucina	51.0 – 53.0
Valina	64.0
Leucina	75.0 – 80.0

Fuente: (Bukkens, 1997) (Ladrón de Guevara, et al., 1995) (Melo, et al., 2011)

2.2 Péptidos bioactivos

Los péptidos están formados por una serie de residuos de aminoácidos con longitudes de cadena variables, normalmente entre 2 a 20 aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, y son inertes por naturaleza dentro de la proteína (Bhandari, et al., 2020).

Una vez que son liberados de la estructura de la proteína, son capaces de ejercer más de una actividad fisiológica. Esta multifuncionalidad dependerá de la composición de aminoácidos, número, orden de disposición y estructura espacial de la cadena peptídica, y a su vez, estos factores estarán influenciados por las condiciones del proceso de hidrólisis (pH, temperatura, enzima), las fuentes de proteínas, los tratamientos químicos, el peso molecular y la distribución de la carga (Wong, et al., 2020).

Actualmente, los péptidos derivados de alimentos están actualmente en el enfoque de la nutrición y la ciencia de alimentos debido a la seguridad y facilidad de producción industrial, así como por su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales y/o nutracéuticos para la prevención y el manejo de diversas enfermedades crónicas. Se han reportado más de 3000 péptidos bioactivos en la base de datos BIOPEP-UMW, derivados de una amplia gama de proteínas alimentarias, mismas que se han relacionado con propiedades bioactivas *in vitro*. Estos han sido identificados, por ejemplo, por sus propiedades antihipertensivas, antioxidantes, antidiabéticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, inmunomoduladoras y de unión a minerales (Barati, y otros, 2020) (Wong, et al., 2020) (Cicero, Fogacci, & Colletti, 2017) (Li-Chan, 2015).

Las proteínas que comúnmente presentan actividades biológicas potenciales se encuentran en sistemas como leche, huevos, carne y pescado, así como en diversas fuentes de origen vegetal (Yang, et al., 2021). Referente a los insectos, se han empleado un número limitado de insectos comestibles para la generación de péptidos bioactivos debido a la falta de estudios en el tema, sin embargo, con la creciente evidencia científica que asocia los compuestos bioactivos con la prevención de disminución de ciertas enfermedades en humanos, ha incrementado el análisis de la contribución de los insectos comestibles a la capacidad bioactiva, demostrando diversas bioactividades en péptidos obtenidos en diferentes especies de insectos (Yi, et al., 2019) (Kumah Mintah, et al., 2019) (Liu, et al., 2016) (Wei, et al., 2015).

Se ha demostrado la presencia de péptidos bioactivos en especies como *Tenebrio molitor* (Dai, et al., 2013), *Pterophylla beltrani* (Montiel-Aguilar, et al., 2020), *Schistocerca gregaria*, *Grylloides sigillatus* (Zielinska, Baraniak, & Karas, 2017), *Blaptica dubia*, *Gromphadorhina portentosa*, *Locusta migratoria*, *Zophobas morio*, *Amphiacusta annulipes* (Zielinska, Kara's, & Jakubczyk, 2017), entre otras especies, con una capacidad bioactiva diversa como antimicrobiana (Jozefiak & Engberg, 2017) (Hui-Yu, Munmun, Ya-Dong, & Xiao-Qiang, 2014), antiinflamatoria (Zielinska, Baraniak, & Karas, 2017), antioxidante (Kumah Mintah, et al., 2019), antihipertensiva (Dai, et al., 2013) (de Matos, de Lacerda, Zanetti, & de Castro, 2022), antidiabética (Rivero-Pino, Espejo-Carpio, Pérez-Galvéz, Guadix, & Guadix, 2020), entre otras.

2.2.1 Producción de péptidos bioactivos

Se han utilizado numerosos métodos para liberar péptidos bioactivos de las proteínas de los alimentos, que incluyen: a) hidrólisis enzimática utilizando enzimas vegetales, microbianas y / o de origen digestivo; b) hidrólisis originada a través del procesamiento de los alimentos, incluida la fermentación microbiana, el tratamiento térmico u otras tecnologías y c) hidrólisis química (Callmann, Thompson, & Gianneschi, 2020).

2.2.1.1 Fermentación microbiana

La fermentación es un método antiguo de conservación de alimentos, puede ser fermentación natural o controlada de bacterias del ácido láctico (LAB o microorganismos fúngicos (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2021). Además de las propiedades nutricionales y tecnológicas, así como el desarrollo de textura y sabor, la fermentación también es utilizada para la producción de péptidos activos con diferentes secuencias de aminoácidos y masas moleculares a través de las actividades metabólicas y de fermentación de los microorganismos (Mhina, Jung, & Kim, 2020). Este método se puede utilizar para productos que permitan la ingesta directa de los péptidos en el alimento fermentado, lo que tiene una alta seguridad y puede evitar la necesidad de purificar los péptidos generados por enzimas reduciendo así los costos de producción (Yang, et al., 2021).

La producción de péptidos bioactivos por fermentación microbiana es relativamente económica en comparación con la hidrólisis enzimática. Sin embargo, la explotación industrial de la fermentación se ve impedida debido a un bajo rendimiento y una falta de especificidad de la formación de péptidos (Raveschot, et al., 2018).

Un estudio evaluó el potencial de la actividad antioxidante y antihipertensiva de extractos de gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*) fermentados con cepas específicas de *Lactococcus lactis* aislada de queso artesanal (Mendoza-Salazar, et al., 2021). Sin embargo, la fermentación en insectos es un tema muy poco estudiado.

2.2.1.2 Hidrólisis química

La hidrólisis química de proteínas se usa ampliamente por ser simple y menos costosa, en ella se utilizan ácidos o alcalinos para escindir enlaces peptídicos, liberando péptidos y aminoácidos libres (Wang, Yu, Xing, & Li, 2017). Sin embargo, la hidrólisis química tiene muchas limitaciones, como las dificultades para controlar el proceso que dan como resultado composiciones químicas variables, disminuyendo la calidad nutricional y funcional del hidrolizado, por lo que no es el método de preferencia para la producción de péptidos bioactivos (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2021).

El uso de la hidrólisis química en insectos se ha aplicado en procesos para determinación de contenido de aminoácidos (Ghosh, Namin, Meyer-Rochow, & Jung, 2021) o para la purificación y recuperación de quitina; sin embargo, su aplicación para la obtención de péptidos con actividades biológicas no ha sido estudiado

2.2.1.3 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es el método de producción de biopéptidos más utilizado debido a la alta especificidad, así como la mínima producción de disolventes orgánicos y químicos tóxicos residuales; es un proceso que suele realizarse en un reactor, con condiciones controladas de pH, temperatura, tiempo,

concentración de sustrato y actividad enzimática (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2021). Inicialmente se disuelve el sustrato en agua, se estabiliza el pH y la temperatura óptima de la enzima seleccionada; a continuación, se agrega la proteasa iniciando la hidrólisis. A medida que transcurre la reacción, se produce una disminución del pH debido a la ruptura de los enlaces peptídicos, por lo que se hace uso de una base o ácido diluido para mantener el pH óptimo durante todo el tiempo de proceso. Para finalizar, la enzima se inactiva con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos (Benitez, Ibarz, & Pagan, 2008).

Varias condiciones, como la especificidad de la enzima, el tiempo de hidrólisis, la relación enzima/sustrato y la concentración del sustrato, contribuyen al rendimiento, la composición y la actividad funcional de los péptidos bioactivos producidos. (Tavano, 2013).

La efectividad del proceso de hidrólisis suele ser medida mediante el grado de hidrólisis del sustrato. Este parámetro tiende a incrementar a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis hasta que alcanza un punto estable. El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación con la proteína original, su valor está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la especificidad de la enzima y tipo de actividad (Benitez, Ibarz, & Pagan, 2008).

Industrialmente, se utiliza este método por su corto tiempo de reacción, la facilidad de escalabilidad y la previsibilidad, Además, se puede aprovechar al máximo los residuos del procesamiento de alimentos, aumentando así el valor de los subproductos y mejorando el aprovechamiento de los recursos (Yang, et al., 2021).

La mayoría de las investigaciones en insectos se han enfocado en el procesamiento de sus proteínas por medio de hidrólisis enzimática por encima de la hidrólisis química, debido a que se tiene un mayor control de la reacción,

facilita su aceptación y genera compuestos con mejores propiedades biológicas (Kumah Mintah, et al., 2019) (Nongoniema & FitzGerald, 2017)

La hidrólisis enzimática ha sido ampliamente utilizada para modificar los componentes de los insectos, no solo por facilitar su aceptación, sino también por permitir la obtención de compuestos con mejores propiedades biológicas, como los péptidos bioactivos (Nongoniema y FitzGerald, 2017).

La alcalasa es una de las enzimas más utilizadas en la hidrólisis de proteína de insectos; Dai, et al., (2013) la utilizaron para procesar proteínas de *Tenebrio molitor*, mientras que Kumah Mintah, et al., (2019) la utilizaron para procesar proteínas de larvas de *Hermetia illucens*. Purschke, et al., (2018) procesaron proteínas de langosta migratoria con alcalasa, además implementaron tratamientos con uso de neutrasa, papaina y flavourzyme.

2.2.1.4 Hidrólisis enzimática secuencial

La hidrólisis secuencial de proteínas es el proceso en el que se emplea una combinación de proteasas, que se pueden usar simultáneamente o a tiempos separados, dependiendo de las condiciones óptimas de cada enzima, y se emplea para la producción de fragmentos más pequeños con actividades biológicas (Ulug, Jahandideh, & Wu, 2021).

También es utilizada para simular la digestión gastrointestinal *in vitro* con proteasas gastrointestinales, emulando en dos etapas el proceso. En primer lugar, una hidrólisis con pepsina a pH ácido y a continuación una digestión con extracto pancreático a pH básico (Roufik, Gauthier, & Turgeon, 2006); para evaluar su efecto sobre la liberación de péptidos pequeños y su posibilidad de ser ejercer un efecto fisiológico (Marciniak, et al., 2018) (Singh, Izhar, & Tahir, 2014).

En insectos, el uso de combinaciones de enzimas para la hidrólisis de las proteínas se ha implementado para analizar su efecto en la producción de péptidos bioactivos. De Matos, Zanetti y de Castro, (2022) evaluaron la hidrólisis

con Flavourzyme™, Alcalasa™ y Neutrasa™ en proteínas de grillo negro. Rivero-Pino, et al., (2020) utilizaron subtilisina y tripsina en proteínas de *Tenebrio molitor*.

Algunos autores como Montiel-Aguilar, et al., (2020) y Zielinska, Karas y Jakubczyk (2016) implementaron la hidrólisis enzimática secuencial con el uso de pepsina, tripsina y quimotripsina para realizar una digestión gastrointestinal simulada (DGIS) *in vitro* en proteínas de diferentes insectos. Sin embargo, las investigaciones que apliquen DGIS en insectos aún son escasas.

2.2.2 Propiedades biológicas de los péptidos

Los péptidos funcionales derivados de proteínas de origen alimentario han sido estudiados y se ha demostrado que son capaces de presentar actividades biológicas en sistemas fisiológicos como el digestivo, nervioso y e inmune manifestando un efecto positivo en la salud (De Castro & Sato, 2015). Dentro de las diversas actividades biológicas reportadas se encuentra la actividad antioxidante, antidiabética y antihipertensiva.

2.2.2.1 Actividad antioxidante

El oxígeno es un agente oxidante no metálico extremadamente reactivo que puede reaccionar fácilmente con la mayoría de los elementos y otros compuestos químicos para formar óxidos. En el estado fundamental, el oxígeno molecular posee dos electrones desapareados, por lo que el oxígeno puede aceptar un par de electrones aportados por otras moléculas (Gulcin, 2020) (Parham & Ihami, 2018).

Las reacciones de oxidación-reducción, representan procesos metabólicos indispensables en el organismo, sin embargo, existen factores externos (como la contaminación, los componentes del tabaco o la radiación) que pueden producir un desequilibrio en las transferencias de electrones individuales no apareados, generando radicales libres (Yang, et al., 2021) (Wang, y otros, 2019).

Los radicales libres son moléculas que están en continua formación en las células y son neutralizados de manera natural por las defensas antioxidantes del

organismo. Los radicales libres, se caracterizan por tener uno o más electrones desapareados, cuya característica los hace particularmente reactivos y son responsables de provocar directamente la escisión del entrecruzamiento de la doble cadena del ADN, la desnaturalización de proteínas y enzimas intracelulares y la peroxidación de lípidos de la membrana lipídica, lo que conlleva al envejecimiento prematuro y desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer, Alzheimer, etc. (Yang, et al., 2021) (Wang, y otros, 2019).

Existe una gran variedad de radicales libres presente en los organismos vivos. La mayoría de ellos son o surgen a partir del oxígeno, nitrógeno y azufre.

Entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) se encuentran el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), los radicales alcoxilo ($\text{RO}\bullet$), los radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$), el radical hidropoxilo ($\bullet\text{OOH}$) y el radical anión superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$). En las especies reactivas de nitrógeno (RNS) están el anión peroxinitrito (ONOO^-), el monóxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}$) y el dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$). Por último, en las especies reactivas de azufre (RSS), los más comunes son los radicales tiilo ($\text{RS}\bullet$), los ácidos sulfónicos (RSOH) y los óxidos de disulfuro ($\text{RS(O)}_2\text{SR}$) (Yang, et al., 2021).

Todo esto ha llevado a la búsqueda de compuestos antioxidantes naturales para la prevención de la oxidación por parte de los radicales libres. Por lo tanto, los péptidos antioxidantes constituyen una alternativa para mejorar la capacidad antioxidante del cuerpo.

Los péptidos de origen alimentario han tenido un creciente interés, debido a la capacidad antioxidante que han demostrado tener, además de que mantienen la seguridad alimentaria y nutricional. Son compuestos de bajo peso molecular (cadenas de 5 a 16 residuos de aminoácidos), de fácil absorción y con alta actividad biológica (Sarmadi & Imaíl, 2010) (Xie, Huang, Xu, & Jin, 2008).

La actividad antioxidante de los péptidos con actividad biológica se atribuye a la secuencia de aminoácidos que los conforman; los aminoácidos con grupos aromáticos como la tirosina, fenilalanina y triptófano, así como, aminoácidos que

contienen grupos sulfuros como la cisteína, los cuales tienen el potencial de donar protones a los radicales libres. Los aminoácidos de carácter básico (lisina y arginina) y ácido (aspartato y glutamato) ejercen actividad antioxidante quelando iones metálicos (Sarmadi & Imail, 2010)

En insectos, se ha estudiado ampliamente la capacidad antioxidante de diversas especies mediante la inhibición de radicales, así como por quelación de metales, demostrando que podrían incluirse como suplementos en la dieta humana.

La determinación de la actividad antioxidante se ha determinado por los ensayos de inhibición de radicales libre, ABTS y DPPH en especies como *Gryllodes sigillatus* (Hall, Johnson, & Liceaga, 2018) *Pterophylla beltrani* (Rosales-Escobar, Villanueva-Bocanegra, Torres-Castillo, Arellano-Méndez, & Moreno-Ramírez, 2018); *Gromphadorhina portentosa*, *Locusta migratoria*, *Zophobas morio* y *Cricket Amphiacusta* (Zielinska, Kara´s, & Jakubczyk, 2017), entre otras especies. También se ha determinado por actividad inhibitoria de otros radicales libres (Dutta, Dey, Dihingia, Manna, & Kalita, 2017) (Dutta, Dey, Manna, & Kalita, 2016), poder reductor férrico (Di Mattia, Battista, Sacchetti, & Serafini, 2019) y actividad quelante de iones (Zielinska, Kara´s, & Jakubczyk, 2017). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de investigaciones existentes, debido a la amplia variedad de insectos, aún hay muchas especies de insectos que no han sido estudiadas.

2.2.2.2 Actividad antidiabética

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico caracterizado por niveles elevados de glucosa en sangre (Okimura, Jiang, Liang, Yamaguchi, & Oda, 2019), esto es debido a la producción insuficiente de insulina por parte de las células β del páncreas (tipo I) o debido a la incapacidad de las células del cuerpo para responder adecuadamente a la insulina producida (tipo II), lo que dificulta el transporte de glucosa desde el torrente sanguíneo hacia células (Qiangqiang, et al., 2019).

La diabetes mellitus tipo II es de mayor prevalencia (90-95 % de los casos) en comparación con la DM tipo I, y en ésta influyen también factores como malos hábitos alimenticios, inactividad física, antecedentes familiares, edad del individuo, entre otros (Ramadhan, et al., 2018)

Algunos métodos para tratar la diabetes como, un cambio en la dieta y el énfasis en el ejercicio continuo para controlar la presión arterial y el sobrepeso corporal se complementan con el uso de fármacos comerciales que minimizan los síntomas de la diabetes, controlando los niveles de glucosa en la sangre. Sin embargo, su consumo ha presentado diversos efectos secundarios. Por esta razón, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de compuestos naturales con capacidad antidiabética que puedan actuar como inhibidores de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, que puedan prevenir la hiperglucemia sin efectos secundarios (Ramadhan, et al., 2018).

Por lo anterior, durante los últimos años, los péptidos bioactivos derivados de las proteínas alimentarias han surgido como una alternativa para el manejo del índice glucémico. En particular, los provenientes de las proteínas de insectos han tomado importancia en la actualidad como fuente potencial de actividad antidiabética. Rivero-Pino, et al., (2020) determinó el potencial en hidrolizados de *Tenebrio molitor* por inhibición de la enzima α -glucosidasa, al igual que Zielinska, et al., (2020) quienes determinaron en *Schistocerca gregaria* y *Grylloides sigillatus*. De Matos, Zanetti y de Castro, (2022) determinaron la inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa en proteína hidrolizada de grillo negro. Sin embargo, las investigaciones son recientes por lo que aún hay múltiples especies con posible capacidad antidiabética que aún no han sido estudiados.

2.2.2.3 Actividad antihipertensiva

La hipertensión es una enfermedad crónica que se caracteriza por presentar un aumento persistente de la presión arterial debido a una relajación insuficiente de los vasos sanguíneos (Yathisha, Bhat, Karunasagar, & Mamatha, 2019). En el cuerpo humano, la presión arterial está regulada principalmente por el sistema renina-angiotensina (RAS). La proteasa renina actúa hidrolizando el

angiotensinógeno para producir angiotensina I, un decapeptido fisiológicamente inactivo. Luego, la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) cataliza la conversión de la angiotensina-I en el octapeptido vasoactivo angiotensina-II, que se une a los receptores en la pared vascular para provocar las contracciones de los vasos sanguíneos (Aluko, 2015) (Rizzello, y otros, 2016).

Para tratar la hipertensión se utiliza una serie de medicamentos sintéticos que inhiben la acción de la ECA-I, mismos que generalmente producen efectos secundarios indeseables como tos, alteraciones del gusto y erupciones cutáneas. Por lo anterior, los péptidos inhibidores de la ECA-I derivados de alimentos podrían considerarse una alternativa a los fármacos sintéticos, sin producir las secuelas mencionadas (Chen, Wang, Wu, & Xia, 2013).

La presencia de actividad antihipertensiva observada en los péptidos derivados de proteínas alimentarias se correlaciona con su estructura. En este sentido, suelen ser secuencias cortas que varían de 2 a 12 aminoácidos, y se ha indicado que el tripéptido C-terminal juega un papel importante al unirse competitivamente al sitio activo de la ECA-I. La presencia de aminoácidos aromáticos hidrofóbicos (como Tyr, Phe, Trp) o aminoácidos con cadenas laterales ramificadas hidrofóbicas (como Val, Leu e Ile) unidos en la posición C-terminal, así como aminoácidos cargados positivamente como Pro, Lys o Arg, pueden influenciar positivamente en la actividad inhibitoria del péptido (Puchalska, Marina , & García, 2015) (Dai, et al., 2013).

Una de las primeras publicaciones que informaron sobre hidrolizados de proteínas de insectos (*B. mori*, *B. terrestris*, *S. gregaria* y *S. littoralis*) y con péptidos inhibidores de la ECA-I fue la de Vercruyssen, Smagghe, et al. (2005). En años posteriores, se publicaron múltiples estudios que demuestran la presencia de péptidos con esta actividad antihipertensiva, derivados de proteína de diversas especies de insectos como *Tenebrio molitor* (Brai, et al., 2022) (Dai, et al., 2013), *Bombyx moris* (Tao, et al., 2017) (Jia, Wu, Yan, & Gui, 2015), *Galleria mellonella* (Cito, et al., 2017), *Oecophylla smaragdina* (Pattarayingsakul, et al., 2017), entre otras.

2.3 Literatura citada

- Abbasi, T., Abbasi, T., & Abbasi, S. A. (2016). Reducing the global environmental impact of livestock production: The minilivestock option. *Journal of Cleaner Production.*, 112, 1754-1766. DOI: 10.1016/j.jclepro.2015.02.094
- Abril, S.; Pinzón, M.; Hernández-Carrión, M.; & Sánchez-Camargo, A. P. (2022). Edible Insects in Latin America: A Sustainable Alternative for Our Food Security. *Frontier in Nutrition.* 9 (904812). DOI: 10.3389/fnut.2022.904812
- Aluko, R. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual review of food science and technology.*, 6, 232-262. DOI: 10.1146/annurev-food-022814-015520
- Avedaño, C., Sánchez, M., & Valenzuela, C. (2020). Insects: an alternative for animal and human feeding. *Revista Chilena de Nutrición*, 47(6), 1029-1037. DOI: 10.4067/S0717-75182020000601029
- Barati, M., Javanmardi, F., Jazayeri, S., Jabbari, M., Rahmani, J., Barati, F., Khaneghah, A. (2020). Techniques, perspectives, and challenges of bioactive peptide generation: A comprehensive systematic review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 1488-1520. DOI: 10.1111/1541-4337.12578
- Benitez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53542208>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.*, 26, 139-150. DOI: 10.1007/s10989-019-09823-5
- Brai, A.; Immacolata, C. T.; Vagaggini, C.; Stella, R.; Angeletti, R.; Iovenitti, G.; Francardi, V.; Dreassi, E. (2022). Proteins from *Tenebrio molitor*: An interesting functional ingredient and a source of ACE inhibitory peptides. *Food Chemistry*. 393. 133409. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.133409
- Bukkens, S. G. (1997). The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition.*, 36, 287-319. DOI: 10.1080/03670244.1997.9991521
- Caligiani, A.; Marseglia, A.; Giulia, L.; Baldassarre, S.; Maistrello, L.; Dossena, A.; Sforza, S. (2017). Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.12.012
- Callmann, C. E., Thompson, M. P., & Gianneschi, N. C. (2020). Poly(peptide): Synthesis, structure, and function of peptide-polymer amphiphiles and protein-like polymers. *Accounts of Chemical Research.*, 53, 400-413. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00518

- Castro-López, C., Santiago-López, L., Vallejo-Cordoba, B., González-Cordova, A. F., Liceaga, A., García, H., & Hernández-Mendoza, A. (2020). An insight to fermented edible insects: A global perspective and prospective. *Food Research International*(137), 1-11. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109750
- Chen, J., Wang, Y., Wu, Y., & Xia, W. (2013). Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I converting enzyme. *Food Chemistry*, 141, 3324-3329. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.048
- Cicero, A. G., Fogacci, F., & Colletti, A. (2017). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology.*, 174(11), 1378-1394. DOI: 10.1111/bph.13608
- Cito A., Dreassi E., Frosinini R., Zanfini A., Pianigiani C., Botta M., Francardi V. – The potential beneficial effects of *Tenebrio molitor* (Coleoptera Tenebrionidae) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera Pyralidae) on human health. *REDIA*. 100. 125-133. DOI: 10.19263/REDIA-100.17.16
- Dai, C., Ma, H., Luo, L., Yin, X., , & . (2013). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. *European Food Research and Technology.*, 236(4), 681-689. DOI: 10.1007/s00217-013-1923-z
- De Castro, R. J., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.013
- De Matos, F.; de Lacerda, J. T. J. G.; Zanetti, G.; y de Castro, R. J. S. (2022). Production of black cricket protein hydrolysates with α -amylase, α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities using a mixture of proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 39. 102276.
- Dutta, P., Dey, T., Dihingia, A., Manna, P., & Kalita, J. (2017). Antioxidant and glucose metabolizing potential of edible insect, *Brachytrupes orientalis* via modulating Nrf2/AMPK/GLUT4 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 556–563. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.094
- Dutta, P., Dey, T., Manna, P., & Kalita, J. (2016). Antioxidant Potential of *Vespa affinis* L., a Traditional Edible Insect Species of North East India. *PLOS ONE*, 11(5), e0156107. DOI: 10.1371/journal.pone.0156107
- Fleta-Zaragozano, J. (2018). Entomofagia: ¿una alternativa a nuestra dieta tradicional? *Revista de Sanidad Militar*, 74(1), 41-46. DOI: 10.4321/s1887-85712018000100008
- Ghosh, S.; Namin, S.M.; Meyer-Rochow, V.B.; Jung, C. (2021). Chemical Composition and Nutritional Value of Different Species of *Vespa* Hornets. *Foods*. 10. 418. DOI: 10.3390/foods10020418

- Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. DOI: 10.1007/s00204-020-02689-3
- Hall, F., Johnson, P. E., & Liceaga, A. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllos sigillatus*) protein. *Food Chemistry*, 262, 39–47. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.04.058
- Halloran, A., & Vantomme, P. (2017). Edible insects: future prospects for food and feed security. *FAO*, 1-4. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>
- Hui-Yu, Yi; Munmun, Chowdhury; Ya-Dong, Huang; Xiao-Qiang, Yu. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98. 5807-5822. DOI: 10.1007/s00253-014-5792-6
- Jia, J., Wu, Q., Yan, H. and Gui, Z., 2015. Purification and molecular docking study of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of ultrasonic-pretreated silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein. *Process Biochemistry* 50. 876-883. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.07.026
- Jongema, Y. (2017). Worldwide list of recorded edible insects. *Wageningen University & Research*. Disponible en: https://www.wur.nl/upload_mm/8/a/6/0fd35a1696_Worldwide%20list%20of%20edible%20insects%202017.pdf
- Kröger, T., Dupont, J., Büsing, L., & Fiebelkorn, F. (2022). Acceptance of insect-based food products in western societies: A systematic review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 759885. DOI: 10.3389/fnut.2021.759885
- Ladrón de Guevara, O. L., Padilla, P., García, L., Pino, J. M., Ramos-Elorduy, J., & . (1995). Amino-acid determination in some edible mexican insects. *Amino Acids*, 9, 161-173. DOI: 10.1007/BF00805837
- Leni, G.; Soetemans, L.; Caligiani, A.; Sforza, S.; Bastiaens, L. (2020). Degree of Hydrolysis Affects the Techno-Functional Properties of Lesser Mealworm Protein Hydrolysates. *Foods*. 9 (381). 1-13. DOI: 10.3390/foods9040381
- Li-Chan, E. C. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28-37. DOI: 10.1016/j.cofs.2014.09.005
- Liu, Y., Wan, S., Liu, J., Zou, Y., Liao, S., & . (2016). Antioxidant activity and stability study of peptides from enzymatically hydrolyzed male silkworm. *Journal of Food Processing and Preservation*., 41(1), 13081. DOI: 10.1111/jfpp.13081

- López-Morales, V. A., Ariza-Ortega, J. A., Díaz-Reyes, J., Castañeda-Antonio, D., Ramos-Cassellis, M. E., Ariza-Ortega, T. E., . . . Cruz-Cansino, N. (2021). Proximal chemical evaluation and fatty acid in the chicatana ant and jumile. *Journal of Insects as Food and Feed.*, 7(2), 197-204. DOI: 10.3920/JIFF2020.0030
- Marciniak, A., Suwai, S., Naderi, N., Pouliot, Y., Doyen, A., & . (2018). Enhancing Enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science & Technology.*, 80, 187-198. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.08.013
- Melo, V., García, M., Sandoval, H., Jiménez, H. D., Calvo, C., & . (2011). Quality proteins from edible indigenous insect food of Latin America and Asia. *Emirates Journal of Food and Agriculture.*, 23, 283-289. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286882182_Quality_proteins_from_edible_indigenous_insect_food_of_latin_America_and_Asia
- Melo-Ruíz, V., Vilchis-Pérez, A., & Sánchez-Herrera, K. (2018). Macronutrient composition of the Chicatana ant (*Atta mexicana*), Edible Insect during the rainy season in Mexico. *J. Nutr. Health Food Eng.*, 8(6), 437-440. DOI: 10.15406/jnhfe.2018.08.00306
- Mendoza-Salazar, A.; Santiago-López, L.; Torres-Llanez, M.J.; Hernández-Mendoza, A.; Vallejo-Cordoba, B.; Liceaga, A.M.; González-Córdova, A.F. (2021). In Vitro Antioxidant and Antihypertensive Activity of Edible Insects Flours (Mealworm and Grasshopper) Fermented with *Lactococcus lactis* Strains. *Fermentation*, 7, 153. DOI: 10.3390/fermentation7030153
- Mhina, C. F., Jung, H. Y., & Kim, J. K. (2020). Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. *Chemosphere.*, 253, 1-9. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126728
- Mintzer, A. (1979). Foraging activity of the mexican leafcutting ant *atta mexicana* (f. Smith), in a Sonoran desert habitat (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 26(4), 364-372. DOI: 10.1007/BF02223555
- Nakagaki, B.J. & De Foliart, G.R. 1991. Comparison of diets for mass-rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as a novelty food, and comparison of food conversion efficiency with values reported for livestock. *Journal of Economic Entomology*, 84(3): 891–896. DOI: 10.1093/JEE/84.3.891
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., (2017). Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 43, 239–252. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.08.014.
- Okimura, T., Jiang, Z., Liang, Y., Yamaguchi, K., & Oda, T. (2019). Suppressive effect of ascophyllan HS on postprandial blood sugar level through the

- inhibition of α -glucosidase and stimulation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 125, 453-458. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.084
- Parham, T., & Ihami, G. (2018). Antioxidant and anticholinergic properties of olivetol. *Journal of Food Biochemistry*, 42(3), e121516. DOI: 10.1111/jfbc.12516
- Pattarayingsakul, W., Nilavongse, A., Reamtong, O., Chittavanich, P., Mungsantisuk, I., Mathong, Y., Prasitwuttisak, W.; Panbangred, W. (2017). Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides from digestion of larvae and pupae of Asian weaver ant, *Oecophylla smaragdina*, Fabricius. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(10), 3133–3140. DOI:10.1002/jsfa.8155
- Pino-Cebrián, Marina. (2018). Por qué todavía no comemos insectos: marco legal en la Unión Europea. *Revista de Bioética y Derecho*. (42), 311-341. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872018000100016&lng=es&nrm=iso
- Presa-Parra, E., Llarena-Hernández, C., Serna-Lagunes, R., Briones-Ruíz, G., Herrera-Solano, A., Nuñez-Pastrana, R., & García-Martínez, M. A. (2021). Effects of Concentrations of Azadirachtin Oil on Mortality and Post-Exposure Time of *Atta mexicana* Leaf-Cutter Worker Ants. *Southwestern Entomologist*, 46(1). DOI: 10.3958/059.046.0108
- Puchalska, P., Marina, M. L., & García, M. C. (2015). Isolation and characterization of peptides with antihypertensive activity in foodstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 521-551. DOI: 10.1080/10408398.2012.664829
- Qiangqiang, J. R., Lin, L., Lili, W., Yiwen, C., Dandan, Z., Fangfang, M., . . . Dongwei, Z. (2019). *Salvia miltiorrhiza* in diabetes: a review of its pharmacology, phytochemistry, and safety. *Phytomedicine*, 58, 152871. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152871.
- Ramadhan, A., Nawas, T., Zhang, X., Pembe, W., Xia, W., & Xu, Y. (2018). Purification and identification of a novel antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate against α -amylase and α -glucosidase. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 3360-3372. DOI: 10.1080/10942912.2017.1354885
- Ramos-Elorduy, J. (1997). Insects: a sustainable source of food. *Ecology of Food and Nutrition*, 36, 247-276. DOI: 10.1080/03670244.1997.9991519
- Ramos-Elorduy, J., & Pino, J. M. (2006). Algunos ejemplos de aprovechamiento comercial de varios insectos comestibles y medicinales. *Ent. Mex.*, 1, 524-533.

- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., & Drider, D. (2018). Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: From gene to applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02354
- Ribeiro, J., Sposito, G., Pinto, M., Varela, P., & Cunha, L. (2022). Insects as food and feed in Portugal and Norway – Cross-cultural comparison of determinants of acceptance. *Food Quality and Preference*, 102, 104650. DOI: 10.1016/j.foodqual.2022.104650
- Ríos-Casanova, L. (2014). Biodiversidad de hormigas en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.*, 85, 392-398. DOI: 10.7550/rmb.32519
- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F. J., Pérez-Galvéz, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2020). Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. *Food and Bioproducts Processing*, 123, 217-224. DOI: 10.1016/j.fbp.2020.07.003
- Rizzello, C., Tagliazucchi, D., Babini, E., Rutella, G., Saa, D., & Gianotti, A. (2016). Bioactive peptides from vegetable food matrices: research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27, 549-569. DOI: 10.1016/j.jff.2016.09.023
- Rosales-Escobar, O. E.; Villanueva-Bocanegra, B.; Torres-Castillo, J. A.; Arellano-Méndez, L.; Moreno-Ramírez, Y. R. (2018). Valor Antioxidante de la Grilleta *Pterophylla beltrani* para Suplementar Alimentos. *Southwestern Entomologist*. 43 (2). 475-483. DOI: 10.3958/059.043.0219
- Roufik, S., Gauthier, S. F., & Turgeon, S. L. (2006). In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine beta-lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 16, 294-302. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.03.010
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.*, 17, 1-11. DOI: 10.1016/j.ifset.2012.11.005
- Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16-27. DOI: 10.1016/j.jclepro.2013.11.068
- Sarmadi, B. H., & Imail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides.*, 31(10), 1949-1956. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.020
- Singh, A., Izhar, S., & Tahir, T. M. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.01.022

- Tang, C., Yang, D., Liao, H., Sun, H., Liu, C., Wei, L., & Li, F. (2019). Edible insects as a food source: A review. *Food Production, Processing and Nutrition.*, 1, 8. DOI: 10.1186/s43014-019-0008-1
- Tao, M.; Wang, C.; Liao, D.; Liu, H.; Zhao, Z.; Zhao, Z.; (2017). Purification, modification and inhibition mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein hydrolysate. *Process Biochemistry.* 54: 172-179. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.12.022
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis (B: Enzymatic).*, 90, 1-11. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.01.011
- Tejeda, C., García, A., Pérez, B., & López, J. (2017). Alternativa Agroecológica para el Manejo de *Atta mexicana* en Puebla, México. *Southwestern Entomologist*, 42(1), 261-273. DOI: 10.3958/059.042.0123
- Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology.*, 108, 27-39. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.002
- Van Huis, A.; Van Itterbeeck, J.; Klunder, H.; Mertens, E.; Halloran, A.; Muir, G.; Vantomme, P.; (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>
- Vercruyse, L., Smagghe, G., Herregods, G., & Van Camp, J. (2005). ACE Inhibitory Activity in Enzymatic Hydrolysates of Insect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5207-5211. DOI: 10.1021/jf050337q
- Wang, M., Cong, L., Houyu, L., Zibo, W., Bang, C., Yibo, L., & Yehua, S. (2019). In Vitro and In Silico Antioxidant Activity of Novel Peptides Prepared from *Paeonia Ostii* 'Feng Dan' Hydrolysate. *Antioxidants*, 8(10), 433. DOI: 10.3390/antiox8100433
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., & Li, P. (2017). Characterization, preparation and purification of marine bioactive peptides. *BioMed Research International.*, 1-16. DOI: 10.1155/2017/974672
- Wei, L., Huang, C., Yag, H., Li, M., Yang, J., & Qiao, X. (2015). A potent anti-inflammatory peptide from the salivary glands of horsefly. *Parasites & Vectors.*, 8, 556. DOI 10.1186/s13071-015-1149-y
- WHO/FAO/UNU. (2007). *Expert consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition.* Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43411/WHO_TRS_935_eng.pdf;jsessionid=871EB337DC5E894D712DA742897E0D6F?sequence=1

- Wong, F. C., Xiao, J. B., Wang, S. Y., Ee, K. Y., Chai, T. T., & . (2020). Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources. *Trend in Food Science & Technology*, 99, 44-57. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.02.012
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.*, 111, 370-376. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.078
- Yang, F.-j., Chen, X., Huang, M.-C., Yang, Q., Cai, X.-X., Chen, X., Wang, S.. (2021). Molecular characteristics and structure-activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313-2332. DOI. 10.1016/S2095-3119(20)63463-3
- Yathisha, U., Bhat, I., Karunasagar, I., & Mamatha, B. (2019). Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 2363-2374. DOI: 10.1080/10408398.2018.145218
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., Yu, X. Q., , & . (2019). Insect antimicrobial peptides and their applications to improve their techno-functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 468-483. DOI: DOI: 10.1007/s00253-014-5792-6
- Zielńska, E.; Karas, M.; Jakubczyk, A. (2016). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science and Technology*. DOI:10.1111/ijfs.13282
- Zielinska, E.; Baraniak, B.; Karas, M. (2017). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hydrolysates and Peptide Fractions Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Selected Heat-Treated Edible Insects. *Nutrients*. 9. 970. DOI: 10.3390/nu9090970
- Zielńska, E., Kara´s, M., Jakubczyk, A., Baraniak, B., , & . (2018). Edible insects as source of proteins. (J. M. Mérillon, & K. Ramawat, Eds.) *Bioactive Molecules in Food*, 1. Disponible en: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-319-54528-8_67-1
- Zielinska, E., Kara´s, M., Baraniak, B., Jakubczyk, A., 2020). Evaluation of ACE, α -glucosidase, and lipase inhibitory activities of peptides obtained by in vitro digestion of selected species of edible insects. *European Food Research and Technology*. 246, 1361–1369. DOI: 10.1007/s00217-020-03495-y

3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS OBTENIDOS A PARTIR DE PROTEÍNA DE HORMIGA CHICATANA (*Atta mexicana*)

3.1 RESUMEN

En este estudio se evaluó la generación de péptidos bioactivos mediante un proceso de digestión gastrointestinal simulada (DGIS) de harina de hormiga chicatana (HH) (*Atta mexicana*). La DGIS mostró la generación de nuevos péptidos (LWPL, AMGFVGMR) así como la prevalencia de otros (HPL) con actividad antihipertensiva, antioxidante, antiangiogénica y antiinflamatoria. Las muestras previas a la hidrólisis (AH) y después de la hidrólisis (DH) se fraccionaron en F1 (<3 kDa), F2 (3 – 10 kDa) y F3 (>10 kDa), para posteriormente determinar en cada una de ellas el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), la capacidad inhibitoria de radicales libres (DPPH y ABTS), enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) y α -amilasa. La HH presentó un porcentaje de digestibilidad de 93.46 ± 0.47 % y un grado de hidrólisis de 74.88 ± 0.66 %, lo que determina que es una proteína de calidad por su alta disponibilidad de absorción intestinal. La fracción 2 antes de la hidrólisis (F2AH), presentó el mayor contenido de CFT, el cual disminuyó notablemente después de la DGIS de 152.87 ± 3.01 a 20.43 ± 0.62 mg EGA * g⁻¹, lo que influyó en la inhibición de los radicales libres. La HH mostró altos porcentajes de inhibición de la ECA-I (72 – 96 %), tanto en muestras AH como DH. Con respecto a la actividad antidiabética, se observó un incremento en el porcentaje de inhibición en las fracciones DH con respecto a las fracciones AH. Los aminoácidos presentes en mayor concentración en la HH fueron tanto esenciales (Leu, Lys, Thr), como no esenciales (Glu, Asp, Pro), mismos que estuvieron presentes en las secuencias identificadas y, por lo tanto, se relacionaron con la bioactividad de los péptidos. Esta investigación reporta los primeros datos sobre péptidos en HH, demostrando ser una fuente rica de péptidos bioactivos capaces de generar beneficios fisiológicos, teniendo un uso potencial en la formulación de alimentos funcionales enfocados en el enriquecimiento nutricional de la dieta.

Palabras clave

Atta mexicana, péptidos, actividad antioxidante, actividad antidiabética, actividad antihipertensiva.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Daniela Soto Felix

Director: Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PEPTIDES OBTAINED FROM CHICATAN ANT PROTEIN (*Atta mexicana*)

3.2 ABSTRACT

In this study, the generation of bioactive peptides was evaluated by a simulated gastrointestinal digestion process (DGIS) of chicatana ant (HH) flour (*Atta mexicana*). The DGIS showed the generation of new peptides (LWPL, AMGFVGMR) as well as the prevalence of others (HPL) with antihypertensive, antioxidant, antiangiogenic and anti-inflammatory activity. The pre-hydrolysis (AH) and post-hydrolysis (DH) samples were fractionated into F1 (<3 kDa), F2 (3 - 10 kDa) and F3 (>10 kDa), to subsequently determine in each of them the content of total phenolic compounds (CFT), free radical inhibitory capacity (DPPH and ABTS), angiotensin I-converting enzyme (ECA-I) and α -amylase. The HH presented a digestibility percentage of 93.46 ± 0.47 % and a degree of hydrolysis of 74.88 ± 0.66 %, which determines that it is a quality protein due to its high availability for intestinal absorption. Fraction 2 before hydrolysis (F2_{AH}), presented the highest CFT content, which decreased notably after DGIS from 152.87 ± 3.01 to 20.43 ± 0.62 mg EAG * g⁻¹, which influenced the inhibition of free radicals. HH showed high percentages of ECA-I inhibition (72 - 96 %), both in AH and DH samples. With respect to antidiabetic activity, an increase in the percentage of inhibition was observed in the DH fractions with respect to the AH fractions. The amino acids present in higher concentration in the HH were both essential (Leu, Lys, Thr) and non-essential (Glu, Asp, Pro), which were present in the identified sequences and, therefore, were related to the bioactivity of the peptides. This research reports the first data on peptides in HH, showing it to be a rich source of bioactive peptides capable of generating physiological benefits, having a potential use in the formulation of functional foods focused on the nutritional enrichment of the diet.

Keywords

Atta mexicana, peptides, antioxidant activity, antidiabetic activity, antihypertensive activity

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Daniela Soto Felix

Director: Dr. Eleazar Aguirre Mandujano

3.3 INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) predice que la población mundial se acercará a los 9 000 millones para el año 2050. Este incremento acelerado genera la necesidad de incrementar la producción de carne, sin embargo, existe una disminución en la disponibilidad de área territorial y recursos naturales, por lo que los métodos convencionales, como la cría de ganado, se hace cada vez menos viable para la producción a futuro y, por esto, se buscan alternativas de fuentes de proteína animal para satisfacer la demanda futura (Brogan, Park, Matak, & Jaczynski, 2021) (Boland, et al., 2013).

Los insectos comestibles son un recurso natural renovable que ha sido aprovechado desde la antigüedad con fines alimenticios y medicinales, sin embargo, es hasta años recientes que se les ha dado reconocimiento a su valor nutricional (alto contenido en micro y macronutrientes), a los beneficios potenciales que representa su consumo para la salud (presencia de sustancias bioactivas) y al bajo impacto ambiental durante su desarrollo (emisión de bajos niveles de contaminantes y uso de menor cantidad de recursos) así como una alta tasa de conversión de alimentos en proteínas de alta calidad, lo cual ha generado un incremento en su consumo (Castro-López, et al., 2020).

Los insectos son una fuente de proteína en cualquier etapa de su desarrollo, presentando contenidos que van del 20 al 75 % en base seca y con un perfil de rico en aminoácidos esenciales, además, presentan porcentajes de digestibilidad de sus proteínas en un rango de 77% a 98 % (Ramos-Elorduy, et al., 1997) lo que implica la presencia de proteínas de calidad por su alta disponibilidad de absorción intestinal para su aprovechamiento en la dieta (Kumar, et al., 2022)

Además, el consumo de insectos también puede enriquecer la dieta humana en componentes bioactivos, por ejemplo, péptidos con actividad antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante, antiinflamatoria o hipocolesterolemica (Kara's, et al., 2017) (Zielinska, Kara's, & Jakubczyk, 2017). Los péptidos bioactivos como constituyentes de alimentos funcionales, se consideran excelentes agentes nutracéuticos, que funcionan como nutrientes y promueven beneficios para la

salud (Cito, et al., 2017). A partir de esto, surge el interés por el descubrimiento y caracterización de péptidos.

En la actualidad, se utilizan diferentes técnicas analíticas para la identificación de secuencias peptídicas para su posterior análisis biológico. Este campo es relativamente nuevo y progresa a la par de tecnologías de alto rendimiento basadas en la espectrometría de masa (MS). La MS permite la detección sensible y precisa del contenido de péptidos totales aun en mezclas complejas, midiendo la relación masa-carga (m/z) de iones, así como el número de iones presentes en cada valor m/z . Cada pico generado en el espectro representa una molécula ionizada (péptido) con la altura del mismo, directamente proporcional a la abundancia del péptido. Dentro de la variedad de métodos de MS, la espectrometría de masas de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR-MS) es el sistema más reciente y con la más alta resolución para la determinación de la masa de un ión (Abián, Carrascal, & Gay, 2008). La determinación de las secuencias peptídicas se hace por medio de una comparación entre las masas experimentales y las teóricas calculadas *in silico* almacenadas en bases de datos como MASCOT (Gallegos-Pérez, 2009).

Este análisis se ha complementado con la predicción computacional de la función potencial de los péptidos por medio de varias bases de datos disponibles como BIOPEP que cubre una variedad de actividades biológicas como antitrombótica, antioxidante, anticancerígena, antibacteriana, antiamnésica, neuropéptidos, hemolíticos, inmunomoduladores, opioides, inhibidores, reguladores y estimulantes (Mooney, Haslam, Pollastri, & Shields, 2012), además de bases de datos que predicen actividades específicas, como PreAIP, iDPPV-SCM, AHTPIN y AntiAngioPred, y que determinan las propiedades fisicoquímicas de la secuencia, como la base de datos de PepDraw.

Aunque existen estudios sobre la composición nutricional, el perfil de aminoácidos y las funciones biológicas de péptidos en diferentes especies de insectos (Amarender, Giannouli, & Morris, 2020) (Kumah Mintah, et al., 2019) (Mishyna, Martínez, Chen, & Benjamin, 2018) (Jozefiak & Engberg, 2017), aún

hay especies con propiedades novedosas por descubrir y proponer como candidatas para el desarrollo de alimentos nutritivos y funcionales, además, la determinación de sus secuencias por MS es un área que aún no ha sido estudiada.

La hormiga chicatana (*Atta mexicana*) es uno de los insectos comestibles más comunes en México; contiene un valor aproximado de 42 % de proteína en base seca, por lo anterior, se puede considerar a esta especie como una fuente alternativa de proteína, mejorando tanto la nutrición como la seguridad alimentaria (Amarender, Giannouli, & Morris, 2020) (Ramos-Elorduy, 1997).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar las secuencias peptídicas y su actividad biológica (antioxidante, antihipertensiva y antidiabética), en los péptidos obtenidos a partir de una hidrólisis enzimática secuencial de las proteínas presentes en la harina de hormiga chicatana (*Atta mexicana*).

3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1 Muestra y reactivos

La muestra de hormiga chicatana (*Atta mexicana*) fue obtenida con recolectores del municipio de Bochil, Chiapas, México (16°59'47"N, 92°53'25"O, 1148 m.s.n.m). Las enzimas pepsina, pancreatina, α -amilasa, α -glucosidasa, proteasa bacteriana y la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I), así como los reactivos analíticos ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), L-Leucina, ácido gálico, almidón soluble de maíz, ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS), ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), N-Hippuryl-His-Leu (HHL), albúmina sérica bovina (BSA), Folin-Ciocalteu, dodecilsulfato de sodio (SDS) y persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A). Los reactivos analíticos, ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de sodio (NaOH), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), carbonato de sodio (Na_2CO_3), fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), sulfito de Sodio (Na_2SO_3), metanol (CH_3OH), etanol (C_2H_5OH), éter de petróleo, ácido acético (CH_3COOH), acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$), ácido bórico, borato de sodio, cloruro de sodio (NaCl), acetato de etilo ($C_4H_8O_2$), tartrato de sodio y potasio ($KOCO(CHOH)_2COONa \cdot 4H_2O$) y sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 4H_2O$) se adquirieron de Química Meyer® (Química Suastes S.A. de C.V., CDMX, México).

3.5.2 Acondicionamiento de la muestra

3.5.2.1 Deshidratación

Se colocaron 100 g de hormiga chicatana en charolas de vidrio. Posteriormente, se deshidrataron empleando una estufa (RIOSSA, modelo HCF-62) a 45 ± 1 °C por 26 h, hasta registrar peso constante. Los insectos deshidratados se molieron empleando un equipo Nutri-Bullet® (modelo NBR-1240M, motor de 600W, velocidad 10 000 rpm, NutriBullet, México) durante 3 min, para obtener la harina de hormiga chicatana (HH).

3.5.2.2 Desgrasado

Se utilizó un equipo Soxhlet empleando éter de petróleo como disolvente para la extracción. Se introdujeron 30 g de HH en cartuchos de papel filtro durante 6 h a partir del primer sifón. Posteriormente, se dejó evaporar el disolvente en una campana de extracción por 3 h, obteniendo finalmente la harina de hormiga chicatana desgrasada (HHD), la cual se almacenó a -20 ± 1 °C hasta su análisis posterior.

3.5.3 Análisis químico proximal

Se realizó un análisis químico proximal de la HHD determinando el contenido de proteína por el método Kjeldahl ($N \times 6.25$) 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.

$$\text{Carbohidratos (\%)} = 100 - \text{Lípidos(\%)} - \text{Proteína(\%)} - \text{Cenizas(\%)} - \text{Fibra (\%)} \dots \text{(Ec. 1)}$$

3.5.4 Perfil de aminoácidos

El contenido de aminoácidos presentes en la HHD se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Reis et al. (2020) con algunas modificaciones. Para la extracción de los aminoácidos se disolvieron 2 g de HHD en 3 mL de ácido tricloroacético (1.6 % m/v). La muestra se agitó a 200 rpm durante 2 min y posteriormente, fue centrifugada a $7000 \times g$ por 4 min a 4 ± 1 °C, el sobrenadante se filtró con papel Whatman No. 1 y colectó en un matraz volumétrico de 25 mL. Después, se adicionaron 40 μL de L-norvalina (50 mM) como estándar interno a 9.960 mL de la muestra, previo a la derivatización de la misma. Se tomó una alícuota de 500 μL y se neutralizaron con 300 μL de NaOH (0.1 M). A partir de la mezcla anterior, se tomaron 5 μL y se adicionaron 30 μL de amortiguador de borato (AccQ.Fluor®, Milford, MA, EUA) y 15 μL de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), dejando reposar durante un minuto y después se introdujo en baño de agua a 55 ± 1 °C durante 10 min. El extracto se filtró utilizando una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) con tamaño de

poro de 0.22 μm (Minisart SRP 4[®], Sartorius, Gottingen, Alemania) y se analizó por HPLC.

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

3.5.5 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 HHD en 10 mL de agua destilada a 37 ± 1 °C, ajustando el pH a 8.0 con NaOH 1 N. Posteriormente, se adicionó 1 ml de disolución acuosa enzimática constituida por 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 mantuvo en agitación por 10 min a temperatura constante. Posterior a este periodo, se añadió 1 mL de una disolución enzimática que contenía 1.48 mg de proteasa bacteriana (tipo XIV, 4,4 Unidades mg^{-1} de sólido); y el proceso continuó durante 9 min a 55 ± 1 °C. Luego de la digestión, la mezcla de reacción se llevó a 37 ± 1 °C y se mantuvo estable durante un minuto seguido de la medición de pH, cuyo valor se utilizó para determinar el porcentaje de la digestibilidad relativa de la proteína *in vitro* (DRP %) de acuerdo con la ecuación 2:

$$DRP (\%) = 234.84 - 22.56 X \dots\dots\dots (\text{Ec. 2})$$

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

3.5.6 Determinación de solubilidad de proteínas en función del pH

La determinación del porcentaje de solubilidad de las proteínas de hormiga chicatana se realizó utilizando amortiguadores de ácido acético con acetato de sodio para valores de pH de 2 a 5; amortiguador de fosfatos para valores de pH de 6 a 8, y amortiguadores de bicarbonato de sodio con carbonato de sodio para valores de pH de 9 a 14. Se pesaron muestras de 5 g de HHD y se mezclaron con 50 mL de cada amortiguador, ajustando el valor de pH con HCl 1 N o NaOH 1 N, y empleando un potenciómetro (Conductronic PC45, Conductronic, Puebla, Puebla, México). La muestra se agitó a 50 rpm y se mantuvo a temperatura constante (25 ± 1 °C) por 30 min. Al final de este periodo, se tomaron alícuotas por triplicado para cada nivel de pH, las cuales fueron centrifugadas (Centrifuge 5810 R, Eppendor, AG, Hamburgo, Alemania) durante 15 min a 8000 rpm a 4 ± 1 °C y se obtuvieron los sobrenadantes.

La concentración de proteína soluble a cada valor de pH se determinó en los sobrenadantes por el método de Lowry modificado (Peterson, 1977). Con este propósito, se preparó una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) 10 % (m/v), sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.1 % (m/v) y tartrato de sodio y potasio ($\text{KOCO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0.2 % (m/v) y se mezcló con NaOH 0.8 M y dodecilsulfato de sodio (SDS) 10 % (m/v) en proporciones iguales. Un mL de esta mezcla se agregó a un tubo de ensaye con 10 μL de muestra diluidos en 990 μL de agua destilada. Se agitó y se dejó en reposo durante 10 min a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Posteriormente se adicionaron 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.3 N y se dejó en reposo durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Para calcular la concentración de proteína se construyó una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración de 0.01 – 0.1 mg mL^{-1} .

3.5.7 Obtención de aislado de proteína

El aislado de proteína de hormiga chicatana (APH) se obtuvo siguiendo el método de Montiel-Aguilar et al., (2020) con algunas modificaciones. Se dispersó la HDD en amortiguador de carbonato de sodio a pH 12 en una relación 1:10. La dispersión se homogeneizó con agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Al final de este periodo, se centrifugó (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8,000 rpm por 20 min a 4 ± 1 °C. Se recuperó el sobrenadante para llevar a cabo una precipitación isoeléctrica de las proteínas a pH 4, con la adición de HCL 1y 3 N, manteniendo el sistema de agitación a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) durante 1 h. Al cabo de este tiempo, el sistema fue centrifugado en las condiciones descritas y el redimento recuperado fue deshidratado en una estufa (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México) a 35 ± 1 °C por 24 h hasta observar peso constante. La muestra se sometió a un procedimiento de reducción de tamaño de partícula en un mortero y se almacenó a -20 ± 1 °C hasta su análisis.

3.5.8 Potencial zeta (ζ)

Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido) para determinar potencial zeta (ζ) utilizando el modelo matemático de Smoluschwsky. Se prepararon disoluciones de aislado de proteína diluida al 0.2 % (m/v) en agua destilada y se ajustó el pH se ajustó en un rango de valores de 3 a 6 con incrementos de 0.5 unidades, 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)

3.5.9 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 HDD al 5 % (m/v) en agua destilada, la cual, se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) por 1 h y después se ajustó el pH a 2.0 con

HCl 1 M. El sistema se incubó a una temperatura de 37 ± 1 °C y se mantuvo constante durante todo el proceso de digestión. A la dispersión se adicionó pepsina 4 % y la reacción se desarrolló durante 2 h. Al término de este periodo, se ajustó el pH a 5.3 adicionando bicarbonato de sodio 0.9 M y después a pH 7.5 con NaOH 1 M. En estas condiciones, se adicionó pancreatina 10 % y se agitó durante 2 h. Se tomaron alícuotas antes después del proceso de hidrólisis, las cuales se identificaron como AH y DH, respectivamente. Estas últimas, se llevaron a ebullición por 15 minutos para detener la reacción y finalmente se centrifugaron (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania) a 8000 rpm por 15 minutos a 4 ± 1 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 ± 1 °C hasta su análisis.

3.5.10 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó de acuerdo con el método reportado por Adler-Nissen (1979), con algunas modificaciones. En tubos ámbar se adicionaron 64 μ L 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). La mezcla se incubó a 50 ± 1 °C durante 30 min. Al término de la incubación se adicionó 1 mL de sulfito de sodio 0.1 M y se mantuvo a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) durante 15 min. Posteriormente, utilizando un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se midió la absorbancia a 420 nm.

Los valores obtenidos se interpolaron en una curva estándar de L-leucina (0-6 mM). El número total de grupos α -amino en la muestra, se determinó empleando un método de hidrólisis ácida de las proteínas. Para lo cual, se depositaron en una ampolleta de vidrio 0.5 g de HHD con 4.5 mL de HCL 6 N, la cual se selló al vacío y se incubó en una estufa (Riossa Digital HCF-62, Ciudad de México, México) a 110 ± 1 °C durante 24 h. Al cabo de este tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó adicionando 4.5 mL de NaOH 6 N. La muestra se filtró utilizando un papel Whatman No.1 para la remoción de cenizas y por medio de la ecuación 3 se calculó el porcentaje de grado de hidrólisis GH:

$$GH (\%) = [(NH_{2tx} - NH_{2t0}) / (NH_{2HT} - NH_{2t0})] \times 100 \dots\dots\dots (\text{Ec. 3})$$

Donde, NH_{2tx} = cantidad de grupos aminos α -amino terminal al tiempo x (tx);
 NH_{2t0} = cantidad de grupos aminos α -amino terminal al tiempo cero (t0);
 NH_{2HT} = cantidad de grupos aminos α -amino terminal después de una hidrólisis ácida total.

3.5.11 Determinación de secuencias peptídicas por FT-ICR-MRMS

Para la caracterización de los péptidos, las muestras AH y DH se analizaron mediante la técnica de resonancia de ciclotrón de iones por transformada de Fourier con espectrometría de masas por resonancia magnética (FT-ICR-MRMS) (Bruker Solarix XR, Bremen, Alemania). Los parámetros se ajustaron, capilaridad 4500V, presión del nebulizador 1.0 bar, flujo de N_2 de 2.0 L min^{-1} a $100 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; flujo de inyección de $120 \mu\text{L h}^{-1}$. El análisis se realizó en modo polaridad positiva, el rango de exploración fue de 150 a 3000 m/z.

Los datos fueron procesados en el software Compass Data Analysis, posteriormente se analizaron en la base de datos MASCOT (https://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=S [Q](#)) para obtener las secuencias peptídicas.

3.5.12 Caracterización molecular, fisicoquímica y biológica de los péptidos obtenidos por DGIS.

Cada secuencia identificada se evaluó en cuanto a su probabilidad bioactiva utilizando la herramienta bioinformática PeptideRanker (<http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/>), que identifica la probabilidad de un péptido de ser bioactivo (Mooney, Haslam, Pollastri, & Shields, 2012). La secuencia de aminoácidos se ingresa al sistema y éste otorga un puntaje entre 0 y 1, siendo los valores cercanos a 1 los péptidos con mayor probabilidad de ser bioactivos. Para esta investigación, se eligieron las secuencias con valores >0.5 para su posterior análisis.

Las secuencias de los péptidos seleccionados se introdujeron en el sistema de diferentes servidores en línea, para obtener una predicción de su actividad biológica y propiedades fisicoquímicas. Para la actividad antiinflamatoria se utilizó el programa PreAIP (<http://kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PreAIP/>), AHTPIN (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpin/>) para actividad antihipertensiva, AntiAngioPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/antiangiopred/>) para actividad antiangiogénica, iDPPV-SCM (<http://camt.pythonanywhere.com/iDPPIV-SCM>) para actividad antidiabética y PepDraw (<https://pepdraw.com/>) para la determinación de propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad, carga neta, punto isoeléctrico y peso molecular). Adicionalmente, se analizaron en BioPep (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>) para la predicción de diversas actividades biológicas.

3.5.13 Separación de fracciones peptídicas

Las suspensiones de AH y DH se fraccionaron con base en su masa molecular empleando un sistema de ultrafiltración de acuerdo con la metodología propuesta por Cho et al., (2004). Se utilizaron dos membranas de tamaño de corte de 3 y 10 kDa (Amicon®, Merck, Ultra-15, Milipore, Sigma-Aldrich, Co. St Louis, USA) para así obtener las siguientes fracciones peptídicas: Menor a 3 kDa (F1_{AH} y F1_{DH}), mayor a 3 y menor a 10 kDa (F2_{AH} y F2_{DH}) y mayor a 10 kDa (F3_{AH} y F3_{DH}), las cuales se almacenaron a -20 ± 1 °C hasta su análisis.

3.5.14 Compuestos fenólicos totales (CFT)

La concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) en las muestras se determinó de acuerdo con el método descrito por Singleton y Rossi, (1965) modificado por Gómez-Maldonado, et al., (2020). Se adicionaron 250 µL de las muestras (AH, DH y sus respectivas fracciones peptídicas) a una concentración de proteína de 0.9 mg mL^{-1} en un tubo que contenía 200 µL de Folin-Ciocalteu y 1250 µL de agua destilada. La mezcla se agitó y dejó reposar durante 3 min. Posteriormente, se adicionaron 300 µL de carbonato de sodio (15 % m/v), y se incubó a temperatura ambiente (21 ± 1 °) por 30 min. Terminado este periodo, se leyó la absorbancia a 760 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S UV-VIS

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA.). Adicionalmente, se preparó una curva estándar de ácido gálico (0 – 60 mg L⁻¹). El contenido de CFT se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (mg EAG * g⁻¹).

3.5.15 Actividad antioxidante por inhibición de DPPH

La actividad antioxidante fue determinada por la capacidad de inhibición del radical libre DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil), de acuerdo con el método descrito por Cheison, Wang y Xu (2007) con algunas modificaciones. Los ensayos se realizaron mezclando 1.5 mL de una disolución de DPPH 0.08 mM en metanol al 80 % (v/v) y 0.5 mL de las muestras (AH, DH y sus respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL⁻¹. Se incubó durante 60 min a temperatura ambiente (21 ± 1 °C) protegido de la luz. Terminado el tiempo de reacción se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 515 nm. Se utilizó metanol al 80% como blanco. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación 4.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[\frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] * 100 \dots\dots\dots \text{(Ec. 4)}$$

Donde $Abs_{control}$ es la absorbancia del ensayo sin adición de la muestra.

3.5.16 Actividad antioxidante por inhibición de ABTS

La determinación de actividad antioxidante por medio de la capacidad de inhibición del radical libre ABTS (2,2 'azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) se determinó de acuerdo con el método descrito por (Re, et al., 1999) con algunas modificaciones. Se mezclaron 5 mL de ABTS 7 mM con 88 µL de persulfato de potasio 140 mM. La mezcla se incubó protegida de la luz, durante 16 h antes de su uso. Al final de este periodo, la disolución se diluyó con etanol, hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.002 a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV–VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para los ensayos, se mezclaron 960 µL de la disolución del radical ABTS con 40 µL de las muestras (AH, DH y SUS respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL⁻¹ y se incubó durante 6 min a temperatura ambiente (21 ± 1 °C). Finalizada la reacción

se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), utilizando etanol como blanco. El porcentaje de inhibición del radical se calculó mediante la ecuación 5.

$$Inhibición (\%) = \left[\frac{Abs_{control} - Abs_{muestra}}{Abs_{control}} \right] * 100 \dots\dots\dots (\text{Ec. 5})$$

Donde $Abs_{control}$ es la absorbancia del ensayo sin adición de la muestra.

3.5.17 Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva se determinó por la capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I). Se adicionaron 100 μL de muestra (AH, DH y sus respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL^{-1} con 100 μL de ECA-I (2 mU). Se incubaron durante 20 min a 37 ± 1 °C, posterior a este tiempo se agregaron 200 μL de N-Hippuryl-His-Leu (HHL) 5 mM en amortiguador de borato (pH 8.3 0.1 M), y se incubó a 37 ± 1 °C durante 45 min. Finalizada la reacción se agregó un volumen de 300 μL de HCl 1N y 1 mL de acetato de etilo, se agitó por 30 s en vórtex y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 15 ± 1 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania). Una vez separadas las fases, se tomaron 750 μL de la fase superior, que contiene la mezcla de acetato de etilo con ácido hipúrico, y se depositaron en un tubo de ensaye; se sometió a un baño maría con agua en ebullición, una vez evaporada la fase líquida de la mezcla el sedimento se rehidrató con 1.2 mL de agua destilada y se agitó por 20 s en vórtex. Finalmente, se midió la absorbancia a 284 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El porcentaje de inhibición se obtuvo por diferencias de absorbancia entre las reacciones enzima-sustrato (ES) y enzima-sustrato-inhibidor (ESI), calculado según la ecuación 6:

$$Inhibición (\%) = \left[\frac{Abs_{ES} - Abs_{ESI}}{Abs_{ES}} \right] * 100 \dots\dots\dots (\text{Ec. 6})$$

3.5.18 Actividad antidiabética

La actividad antidiabética fue determinada por la capacidad de inhibición de la enzima α -amilasa, siguiendo el método descrito por (Montiel-Aguilar, et al., 2020) con algunas modificaciones. Se hizo una mezcla de 100 μ L de α -amilasa de origen pancreático porcino ($1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) y 100 μ L de muestra (AH, DH y las respectivas fracciones peptídicas) a 0.9 mg de proteína mL^{-1} . La mezcla se incubó durante 45 min a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se adicionaron 800 μ L de una dispersión de almidón soluble de maíz en amortiguador de fosfato (fosfato de sodio 20 mM con cloruro de sodio 6,7 mM, pH 6.8) al 1 %. La reacción se realizó a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min, para detener la reacción concluido ese tiempo, se agregó 1 mL de una solución de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) 96 mM en amortiguador (tartrato de sodio y potasio 5.3 M en NaOH 2 M) y se llevó a ebullición por 5 minutos. El sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente ($21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) y finalmente se diluyó 1:10 en amortiguador de fosfato para medir la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S-UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Se utilizó amortiguador de fosfato como blanco, y el porcentaje de inhibición se estableció por diferencia de absorbancia entre las reacciones enzima-sustrato (ES) y enzima-sustrato-inhibidor (ESI), calculado con la ecuación 7:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[\frac{Abs_{ES} - Abs_{ESI}}{Abs_{ES}} \right] * 100 \dots\dots\dots \text{(Ec. 7)}$$

3.5.19 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes una prueba de comparación de medias de Tukey. La significancia se estableció a $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Minitab® 19.1.1 (Minitab Inc., 2019, Pennsylvania, EUA). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar.

3.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.6.1 Análisis químico proximal

La composición química proximal de la HH en base seca se presenta en el Cuadro 3; mostrando valores dentro de los rangos reportados por Sánchez-Muros et al. (2014) para el orden Hymenoptera, 10 a 62 % para proteína y de 6 a 42 % para lípidos y un contenido de carbohidratos por debajo del rango (2-78 %).

Cuadro 3. Análisis químico proximal de la harina de hormiga chicatana (HH)

Parámetros	% (base seca)
Proteína	37.98 ± 0.007
Lípidos	35.75 ± 0.54
Cenizas	4.18 ± 0.23
Carbohidratos	0.75 ± 0.00
Fibra	21.32 ± 0.42

Paniagua-Martínez et al. (2021) reportaron un valor de proteína de 35.20 ± 0.22 % en base seca, en muestras de hormiga chicatana proveniente de Veracruz, mientras que Melo-Ruiz et al. (2018) reportaron un contenido de proteína de 31.88 % en muestras de hormiga chicatana proveniente de Oaxaca. Estos mismos autores reportaron valores de lípidos de 23.88 ± 0.37 % y 34.65 %, respectivamente. El contenido de cenizas y fibra fueron mayores a los reportados por Reyes-Prado et al. (2016) con valores de 3.75 y 14.12 %, respectivamente; sin embargo, el valor que reportaron de carbohidratos (0.41 %) fue similar al reportado en esta investigación.

Con base en lo anterior, se puede observar que hay diferencias en la composición nutricional de la hormiga chicatana con respecto a otras investigaciones, esto puede ser atribuirse a la amplia distribución que tiene la especie en la mayor parte del país (Melo-Ruíz, Vilchis-Pérez, & Sánchez-Herrera, 2018), por lo que las fuentes vegetales que forman parte de su alimentación son diversas en cada

región y tienen un efecto directo sobre la composición nutricional del insecto (Di Mattia, Battista, Sacchetti, & Serafini, 2019). Por lo anterior, la composición nutrimental es menos variable en estudios donde la muestra analizada es de un mismo origen, sin embargo, es posible que otros factores estén influyendo en los resultados como la preparación de la muestra o las metodologías empleadas para la determinación de las propiedades nutricionales, aunque es necesario el desarrollo de más investigaciones que eluciden el efecto de estos factores (Rendón-Martínez, Paniagua-Martínez, Gallardo-López, & Ramírez-Martínez, 2022).

3.6.2 Perfil de aminoácidos

El contenido de aminoácidos presentes en un alimento es importante debido a que representan un papel como reguladores clave de diversas vías metabólicas. La composición de aminoácidos permite definir la calidad de la proteína de un alimento, particularmente el balance entre aminoácidos esenciales y no esenciales (Wang, Qiao, & Li, 2008).

Los principales aminoácidos que contienen los insectos son el ácido glutámico, leucina y alanina para el orden Hymenoptera (Sánchez-Muros, Barroso G., & Manzano-Agugliaro, 2014), como se pudo observar en el perfil de aminoácidos de la hormiga chicatana (Cuadro 4) donde el valor más alto fue el del ácido glutámico, aminoácido que es de importancia metabólica debido a su función como precursor de síntesis de otros aminoácidos como la prolina y arginina (Wang, Qiao, & Li, 2008), además de participar en procesos relacionados con la funcionalidad gastrointestinal como fuente energética de las células epiteliales intestinales (Albarracín, Baldeón, Sangronis, Cucufate, & Reyes, 2016).

Cuadro 4. Perfil de aminoácidos de las proteínas de hormiga chicatana.

Aminoácido	Hormiga chicatana (<i>Atta mexicana</i>)		Requerimientos de consumo en adultos ¹	<i>Bombus terrestris</i> ²
	g * 100 g ⁻¹ de harina	g * 100 g ⁻¹ de proteína	g * 100 g ⁻¹ de proteína	g * 100 g ⁻¹ de harina
Aminoácidos esenciales				
Leucina (Leu)	2.11 ± 0.83	5.56 ± 2.19	2.1	3.07
Lisina (Lys)	1.40 ± 0.43	3.67 ± 1.13	1.8	3.03
Treonina (Thr)	1.08 ± 0.38	2.85 ± 0.99	1.1	0.9
Valina (Val)	0.85 ± 0.53	2.23 ± 1.41	1.5	2.36
Fenilalanina (Phe)	0.15 ± 0.01	0.39 ± 0.03	-	1.17
Isoleucina (Ile)	0.11 ± 0.004	0.28 ± 0.009	1.5	1.85
Histidina (His)	0.006 ± 0.003	0.02 ± 0.007	1.5	1.02
Triptófano (Trp)	< 0.002 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.5	ND
Metionina (Met)	< 0.001 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	0.32
Phe + Tyr		2.84 ± 0.00	2.1	
Aminoácidos no esenciales				
Ác. Glutámico (Glu)	4.62 ± 0.84	12.15 ± 2.20	-	4.84
Prolina (Pro)	3.26 ± 0.67	8.59 ± 1.75	-	3.81
Ác. Aspártico (Asp)	3.25 ± 0.80	8.57 ± 2.12	-	1.46
Glicina (Gly)	3.19 ± 0.61	8.41 ± 1.61	-	3.09
Alanina (Ala)	2.91 ± 0.65	7.66 ± 1.71	-	3.94
Cisteina (Cys)	2.44 ± 1.06	6.43 ± 2.78	-	2.05
Serina (Ser)	1.40 ± 0.42	3.67 ± 1.10	-	2.37
Tirosina (Tyr)	0.93 ± 0.48	2.45 ± 1.26	-	1.16
Arginina (Arg)	0.82 ± 0.03	2.17 ± 0.07	-	1.88
Glutamina (Gln)	0.04 ± 0.003	0.09 ± 0.007	-	ND
Asparagina (Asn)	< 0.001 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	ND

ND: No Determinado

¹ (FAO/OMS/UNU, 1985)

² (Ghosh, Choi, Kim, & Jung, 2017)

El análisis de la proteína de hormiga chicatana mostró la presencia de la mayoría de los aminoácidos esenciales, siendo la leucina la que presentó un mayor contenido, y suele ser de los aminoácidos más abundantes en alimentos proteicos de alto valor biológico. La importancia radica en su participación en diversas rutas metabólicas que proporcionan la energía necesaria para la síntesis e inhibición de asimilación de proteínas en el músculo, además de tener diferentes funciones en la prevención y tratamiento de diferentes patologías neurológicas, hepáticas, cardiometabólicas, cáncer, entre otras (Garlick, 2005).

La metionina y el triptofano se encontraron en cantidades mínimas, debido a la sensibilidad ante las condiciones de hidrólisis (Bougatef, et al., 2009). Estos aminoácidos se han reportado en bajas cantidades en diversas especies de insectos (Williams, Williams, & Kirabo, 2016). Además, en un estudio de *Vespa velutina nigrithorax* se reportó la falta de estos dos aminoácidos, lo que podría ser característico del orden Hymenoptera (Jeong, et al., 2020).

El contenido de aminoácidos en la HH es comparable con otros estudios sobre insectos comestibles, como el reportado por (Ghosh, Choi, Kim, & Jung, 2017) donde presenta el perfil de aminoácidos de reinas de *Bombus terrestris* (orden: Hymenoptera), reportando valores de Thr, Asp y Cys menores a los encontrados para hormiga chicatana, mientras que los contenidos de Pro, Gly y Glu fueron similares, siendo el ácido glutámico el principal aminoácido en *Bombus terrestris*, mientras que la metionina presentó el contenido más bajo, demostrando ser características del orden Hymenoptera, independientemente de la especie.

En comparación con el requerimiento diario de consumo de aminoácidos esenciales en adultos, se observó que las cantidades de Leu, Lys, Thr, Val y Phe + Tyr contenidas en 100 g de proteína de hormiga chicatana son mayores a los recomendados por FAO/OMS/UNU (1985), lo que demuestra que la HHD es una fuente rica de proteínas que aporta las cantidades suficientes de aminoácidos esenciales.

3.6.3 Digestibilidad relativa *in vitro*

El análisis de digestibilidad relativa de las proteínas de HHD reportó un valor de 93.46 ± 0.47 %, lo que determina que es una proteína de alta biodisponibilidad (Kumar, et al., 2022), en comparación con otras investigaciones donde reportan porcentajes de digestibilidad *in vitro* para fuentes vegetales, como lo reportado por Najdi Hejazi, Orsat, Azadi y Kubow (2016) en semillas de amaranto germinadas a diferentes temperaturas, donde los valores oscilaron entre 76.03 y 83.58 %, o los valores reportados para guisante amarillo (*Pisum sativum*) y haba (*Vicia faba*) de 80.9 y 83.7 % (Stone, Tanaka, & Nickerson, 2019), respectivamente. Lo anterior, demuestra que el consumo de HH implica un mejor aprovechamiento de las proteínas de la hormiga chicatana, con respecto a las proteínas vegetales, por su elevado porcentaje de digestibilidad, que inclusive es mayor al reportado para algunas proteínas de origen animal, como la harina de pescado, con una digestibilidad de 84.94 % (Arango, Vergara, & Mejía, 2004)

En insectos, se ha determinado el porcentaje de digestibilidad de proteínas en un rango de 77% a 98 % para diversas especies (Ramos-Elorduy, et al., 1997), siendo menores que el obtenido para la hormiga chicatana. Stone, et al., (2019) reportaron valores de 76.2 ± 0.1 % y 75.7 ± 0.2 % para harinas de grillo (*Grylloides sigillatus*) y gusano (*Tenebrio molitor*), respectivamente. Además, Arango, Vergara y Mejía (2004) reportaron un porcentaje de digestibilidad de 81.57 ± 1.241 % en *Hermetia illucens*.

3.6.4 Solubilidad de las proteínas en función del pH

La solubilidad de las proteínas de la hormiga chicatana en función del pH se muestran en la (Figura 1), donde se puede observar que la mayor concentración de proteínas solubles (18.18 ± 0.39 %) se obtuvo a pH 12. Algunos estudios han reportado la mayor solubilidad de proteínas en valores de pH alcalino. Por ejemplo, Bußler, et al., (2016) muestran la solubilidad para harinas de insectos de dos especies (*Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens*) con una máxima solubilidad en pH 10 y 12, respectivamente.

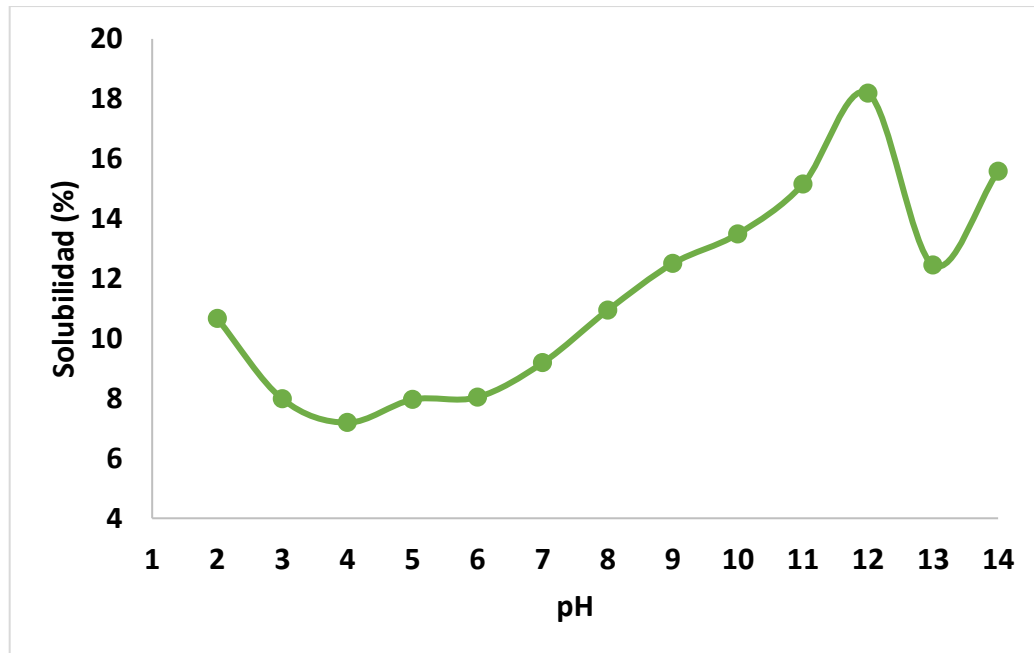


Figura 1. Solubilidad de las proteínas de harina de hormiga chicatana a diferentes valores de pH.

Esto sucede debido a que, a un rango de pH alcalino, las proteínas poseen cargas netas iguales, lo que ocasiona una repulsión entre ellas y una mayor interacción con el medio, aumentando la solubilidad. Conforme el pH disminuye, las cargas netas de las proteínas se van neutralizando, disminuyendo la repulsión entre moléculas, hasta llegar al punto isoeléctrico, en el cual se forman agregados macromoleculares, precipitando y resultando un mínimo porcentaje de solubilidad (Pincirolí, 2010). En la hormiga chicatana se observó este comportamiento, presentando la menor solubilidad (7.19 ± 0.08 %) a un valor de pH de 4. En la mayoría de las matrices alimentarias el punto isoeléctrico se encuentra en valores de pH ácido, entre 4 y 5 (BuBler, Rumpold, Jander, Rawel, & Schlüter, 2016). Mishyna, et al., (2018) reportaron el menor porcentaje de solubilidad a pH 4 y 5 en proteínas de dos especies de insectos, *Shistocerca gregaria* y *Apis mellifera*, respectivamente.

3.6.5 Potencial zeta (ζ)

Los valores de potencial zeta, a diferentes valores de pH, para el aislado de proteína de hormiga chicatana se presentan en la (Figura 2), en esta se puede

observar una carga neta cero a un valor de pH de 3.8, siendo este el punto isoeléctrico de las proteínas, donde el número de cargas positivas y negativas en la molécula es igual, dando una carga neta neutra, lo que ocasiona que las proteínas tiendan a precipitar debido a fuerzas de atracción de Van der Waals y electrostáticas (Amaringo & Hormaza, 2013). Valores por debajo de este punto, negativos, indican un aumento de las cargas negativas por una ionización de los residuos carboxílicos (-COOH) que dan lugar a grupos carboxilato (-COO⁻), mientras que las cargas positivas aumentan cuando el pH está en valores mayores al pI, esto debido a la protonación de los residuos amino (-NH₂) que dan lugar a grupos amonio (-NH₃⁺) (Nelson, Cuchillo Foix, Lehninger, & Cox, 2005).

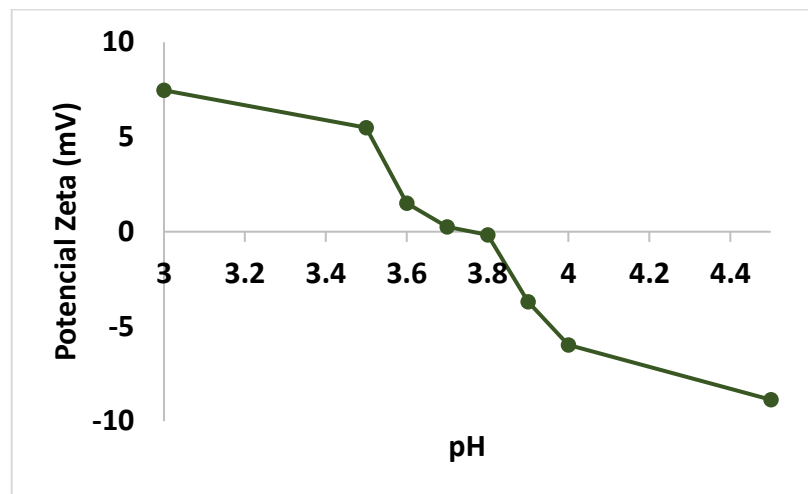


Figura 2. Potencial Z del aislado de proteína de hormiga chicatana (APH) en función del pH.

El valor de punto isoeléctrico por análisis de potencial zeta fue cercano al observado en la curva de solubilidad (Figura 1). Valores similares fueron reportados para proteínas de langosta migratoria (*Locusta migratoria L.*) y mosca soldado negra (*Hermetia illucens*), con valores de 4.0 y 4.5, respectivamente (Mshayisa, Van Wyk, & Zozo, 2022) (Purschke, Meinlschmidt, Horn, Rieder, & Jager, 2018).

3.6.6 Grado de hidrólisis

El GH de se determinó al finalizar el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*, mostrando un porcentaje de hidrólisis de 74.88 ± 0.66 %. Purschke et al. (2018)

reportaron valores, entre 5.1 ± 1.1 y 41.6 ± 0.7 %, en hidrólisis de proteína de langosta migratoria con diversas enzimas a diferentes tiempos y relaciones E/S. En otro estudio, Rivero-Pino et al. (2020) reportaron un GH de 30 % después de una hidrólisis enzimática secuencial con Alcalasa[®] y tripsina en harina de *Tenebrio molitor*. Ambos estudios reportaron valores inferiores a los obtenidos para HH, indicando una mayor hidrólisis de las proteínas de la hormiga chicatana.

El valor de GH es un indicador de la descomposición de las proteínas complejas y estructuradas en péptidos más pequeños debido a escisiones de los enlaces peptídicos, influenciadas por el tipo, la actividad y la concentración de las enzimas, el grado inicial de estructura nativa/desnaturalización de la proteína y las condiciones de proceso (Purschke, Meinschmidt, Horn, Rieder, & Jager, 2018), La diferencia de estos factores en cada investigación, así como la diferencia de proteínas en cada especie ocasiona las diferencias en los valores de GH en cada proceso. Los estudios sobre la hidrólisis enzimática de proteínas de insectos son escasos, y hasta el momento no se tienen reportes específicos sobre el estudio de las características fisicoquímicas, estructurales y biológicas de proteínas de hormiga chicatana.

3.6.7 Caracterización de péptidos

Por medio del software MASCOT se determinaron las secuencias de aminoácidos de los péptidos para las muestras de HH antes (AH) y después (DH) de la simulación gastrointestinal *in vitro*. Posteriormente se analizaron en PeptideRanker, únicamente las secuencias que reportaron un valor mayor a 0.5 encontrándose 17 péptidos (8 en la muestra AH, 5 en la muestra DH y 4 péptidos encontrados en ambas muestras). Las secuencias se analizaron en bases de datos para identificar su actividad antihipertensiva, antiinflamatoria, antioangiogénica y antidiabética, esta última a través de la capacidad inhibidora de la enzima DPP-IV (Cuadro 5), observando que en tres péptidos se predice actividad antihipertensiva y actividad antiinflamatoria, de los cuales LPWL y VPFH presentan capacidad inhibitoria de DPP-IV mientras que CCSGG muestra actividad antiangiogénica. A excepción de las secuencias TF, GAFA, MCK y HPL,

todos los péptidos mostraron actividad antiinflamatoria (entre baja, media y alta probabilidad); en AntiAngioPred, únicamente se analizaron los péptidos con más de 5 residuos, mostrando 5 péptidos con esta actividad inhibitoria.

Las 17 secuencias se analizaron con la herramienta BioPep, y se encontró que 14 péptidos presentaban dipéptidos en sus secuencias con capacidad inhibitoria de ECA-I (Cuadro 5), de los cuales las secuencias HPL, LWPL y AMGFVGMRR reportaron en sus secuencias capacidad antioxidante; sin embargo, BioPep puede determinar también péptidos con otras actividades biológicas como inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) y dipeptidil peptidasa III (DPP-III), neuropéptidos, estimulantes de la captación de glucosa, entre otros.

Las propiedades fisicoquímicas de cada péptido fueron identificadas mediante la base de datos PepDraw (Cuadro 6); la hidrofobicidad varía entre 3.45 – 15.73 kcal * mol⁻¹; el punto isoeléctrico fue de ácido (5.11) a básico (11.18), con masas menores a 1 kDa (266.12 – 909.39 Da) y cargas neutras y positivas (0 a +2).

La bioactividad de los péptidos está determinada por la presencia de ciertos aminoácidos, por la posición, la hidrofobicidad, la carga neta y el peso molecular del péptido. Es por esto que las bases de datos como BioPep y PeptidRanker recopilan información fisicoquímica de varios péptidos derivados de proteínas para predecir sus bioactividades (Shi, et al., 2022).

La inhibición de la ECA-I está determinada por la presencia de tripéptidos C-terminal con aminoácidos hidrofóbicos como Tyr, Trp, Pro, Val, Leu, Ile, Phe y Met, en conjunto con aminoácidos con carga positiva como Arg y Lys; que actúan como inhibidores competitivos, uniéndose a los sitios activos de la ECA-I (S1, S1', S2') (López-Armenta, 2014) (Dai, et al., 2013). Un péptido con mayor hidrofobicidad presentará una mayor capacidad de inhibición al poder interactuar con los subsitios activos de la ECA-I (Ryan, Ross, Bolton, Fitzgerald, & Stanton, 2011) (Hayes, et al., 2007). En las secuencias de péptidos analizados se encontraron al menos uno de los aminoácidos mencionados, lo que podría implicar la presencia de actividad antihipertensiva mencionada por BioPep.

Saiga et al. (2006) demostraron un péptido, Gly-Phe-Hyp-Gly-Thr-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Phe) en un extracto de músculo de pechuga de pollo, que presentó propiedades inhibitorias de la ECA-I, analizando la relación de la actividad inhibitoria con la estructura del péptido determinaron que la presencia del aminoácido Phe en el extremo C-terminal fue el principal factor causante de dicha actividad.

En cuanto a la actividad antioxidante, la literatura menciona que los péptidos con mayor capacidad de reacción con radicales son aquellos que presentan en sus secuencias aminoácidos azufrados, metionina y cisteína; así como aromáticos cuyo grupo funcional es el imidazol, como el triptofano, tirosina, fenilalanina y la histidina (Sarmadi & Imail, 2010). De igual manera, se ha reportado la influencia de aminoácidos hidrofóbicos como valina o leucina en la capacidad antioxidante del péptido (Yang, et al., 2021). Se pudo observar la presencia de estos aminoácidos en las secuencias con actividad antioxidante, HLP, LWPL y AMGFVGMR (Cuadro 6). (Tang-Bin, Tai-Ping, Hua-Bin, Huan-Wen, & En-Qin, 2016) mencionan que algunas características de los péptidos antioxidantes son, la presencia de los aminoácidos hidrofóbicos Leu o Val en el extremo N-terminal, en conjunto con Pro, His o Tyr en la secuencia, o dipéptidos como Pro-Leu/ Ser-Leu/Tyr-Leu en algunos de los extremos del péptido; como es el caso de la secuencia HLP (Cuadro 5), que presenta Leu-Pro en un extremo, además de estar acompañados de la histidina; el péptido VPFH presenta Val en el extremo N-terminal y Pro e His en su estructura; además, el péptido LWPL contiene Leu-Pro extremo N-terminal y Leu en el extremo C-terminal; por lo que, acorde a lo mencionado, estas secuencias presentan características antioxidantes.

Cuadro 5. Predicción de actividad biológica en péptidos identificados por MS.

No	Secuencia	Peptide Ranker	AHTpin		PreAIP		iDPPIV-SCM		AntiAngioPred	
		Score	Score	Pred.	Score	Pred.	Score	Pred.	Score	Pred.
1	LWPL	0.9602	1.07	AHT	0.365	LW-AIP	488	I	SN	SN
2	YGFG	0.9368	-0.31	Non-AHT	0.349	LW-AIP	291.75	Non-I	-0.59	Non-AAG
3	WCASGCRK	0.8660	-0.24	Non-AHT	0.528	HC-AIP	152	Non-I	2.92	AAG
4	AMGFVGM	0.8652	-0.73	Non-AHT	0.413	MC-AIP	282.14	Non-I	-2.54	Non-AAG
5	TF	0.8266	SN	SN	0.264	Non-AIP	549	I	SN	SN
6	GCMK	0.7983	-0.64	Non-AHT	0.46	MC-AIP	205	Non-I	SN	SN
7	FLGGLMK	0.7910	-0.15	Non-AHT	0.4	MC-AIP	259.67	Non-I	-0.31	Non-AAG
8	GAFA	0.7626	-0.92	Non-AHT	0.312	Non-AIP	290.33	Non-I	SN	SN
9	VPFH	0.7331	1.23	AHT	0.352	LW-AIP	443.33	I	SN	SN
10	CCSGG	0.7318	0.13	AHT	0.351	LW-AIP	127.75	Non-I	2.94	AAG
11	MCK	0.7125	SN	SN	0.325	Non-AIP	223	Non-I	SN	SN
12	LLGGLL	0.6669	-0.17	Non-AHT	0.525	HC-AIP	292.4	Non-I	0.79	AAG
13	QCCK	0.6222	-0.3	Non-AHT	0.451	MC-AIP	145.33	Non-I	SN	SN
14	HLP	0.5808	SN	SN	0.257	Non-AIP	525	I	SN	SN
15	VGQQCRCG	0.5579	-0.85	Non-AHT	0.57	HC-AIP	209.86	Non-I	1.15	AAG
16	RPIVLGLL	0.5398	-1.35	Non-AHT	0.52	HC-AIP	299.43	I	-0.72	Non-AAG
17	QCGGGCNK	0.5199	-1.22	Non-AHT	0.477	HC-AIP	177	Non-I	2.59	AAG

Pred: Predicción; SN: Sin predicción debido a las limitaciones del servidor (péptidos <5 residuos). PreAIP: los péptidos con una puntuación entre 0,342 y 0.388 se predicen como péptidos antiinflamatorios (AIP) con baja confiabilidad, la puntuación entre 0.388 y 0.468 se predicen como AIP con confiabilidad media y los péptidos con puntuación >0.468 se predicen como AIP con alta confiabilidad; AntiAngioPred: se predice una puntuación positiva como péptido antiangiogénico (AAP); AHTpin: se predice una puntuación positiva como péptido antihipertensivo (AHT); iDPPIV-SCM: los péptidos con una puntuación > 294 se predicen como péptidos inhibidores de la enzima DPP-IV.

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

Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas y biológicas de péptidos identificados por MS.

Muestra	Péptido	PM (Da)	Secuencia inhibidora de ECA-I	Secuencia antioxidante	pl	Hidrofobicidad (Kcal * mol ⁻¹)	Carga neta
AH	YGFGL	555.26	YG, GF, GL, FG	--	5.48	6.53	0
	WCASGCRK	909.39	SG	--	9.03	12.49	+2
	TF	266.12	TF	--	5.37	6.44	0
	GCMK	437.17	--	--	9.0	11.16	+1
	CCSGG	425.10	GG, SG	--	5.11	10.62	0
	QCCK	480.18	--	--	8.21	11.43	+1
	RPIVLGLL	879.58	RP, GL, LG	--	10.73	5.67	+1
	QCGGGCNK	765.28	GG, NK	--	8.21	15.73	+1
AH, DH	FLGGLMK	764.42	GL, GG, LG	--	9.93	8.12	+1
	GAFA	364.17	AF, GA	--	5.60	8.34	0
	MCK	380.15	--	--	8.77	10.01	+1
	HLP	365.20	HL, LP	HL	7.69	9.12	0
DH	LWPL	527.30	LW, PL	WPL, LW	5.58	3.45	0
	AMGFVGMR	867.40	GF, VG, GM, MG	GFVG	11.18	9.00	+1
	VPFH	498.65	VP	--	7.89	8.20	0
	LLGLL	584.38	GL, GG, LG	--	5.58	5.20	0
	VGQQCRCG	849.35	VG, GQ	--	8.28	13.05	+1

ECA-I: Enzima Convertidora de Angiotensina I

DH: Muestra después del proceso de hidrólisis

AH: Muestra antes del proceso de hidrólisis

3.6.8 Compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos son un grupo amplio de moléculas que presentan uno o más grupos hidroxilo (-OH), unidos a un anillo aromático (grupo fenol) estos se pueden encontrar en diversos materiales vegetales (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014)

El principal interés que se ha tenido en los CFT es debido su capacidad antioxidante, dada por la eliminación de radicales libres, reduciendo la tasa de oxidación e inhibiendo la formación o desactivando las especies activas y precursoras de radicales libres (Tsao, 2010). Se ha demostrado que hay una relación positiva y significativa entre el contenido de CFT y la capacidad de inhibición de los radicales ABTS y DPPH (Zenil, y otros, 2014).

Los resultados del contenido de CFT en las muestras de HHD antes y después de la DGIS se muestran en la (Figura 3), en la que se puede observar que los valores para la muestra AH (140.91 ± 2.25) y sus fracciones ($F1_{AH}$: 148.33 ± 2.00 , $F2_{AH}$: 152.87 ± 3.01 y $F3_{AH}$: 33.35 ± 0.87) fueron mayores a los obtenidos con las muestras DH (30.40 ± 0.87) y sus fracciones ($F1_{DH}$: 31.09 ± 1.13 , $F2_{DH}$: 20.43 ± 0.62 y $F3_{DH}$: 49.99 ± 0.88), a excepción de la fracción $F3_{AH}$ que no presentó diferencias significativas con respecto a DH y $F1_{DH}$. Lo anterior, indica que el insecto presentaba una alta concentración de compuestos fenólicos totales, probablemente debido a la alimentación a base de materia vegetal que presenta la hormiga chicatana; esto mismo reportó Di Mattia et al. (2019) quienes reportaron contenidos de polifenoles totales mayores a $100 \text{ mg EAG} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ en extractos hidrosolubles de 11 especies distintas de insectos con hábitos herbívoros.

El contenido de CFT disminuyó notablemente después del proceso de hidrólisis, probablemente debido a la sensibilidad térmica que presentan estos compuestos como lo demuestran Gallegos-Infante et al (2013), al probar que tratamientos con altas temperaturas presentaban un efecto negativo sobre el contenido de polifenoles totales en muestras de pinole. Adicionalmente, Xu, Ye, Chen, & Liu (2007), estudiaron el efecto de las variables tiempo-temperatura sobre la

estabilidad de los fenoles, encontrando una reducción de estos compuestos debido al tratamiento térmico principalmente.

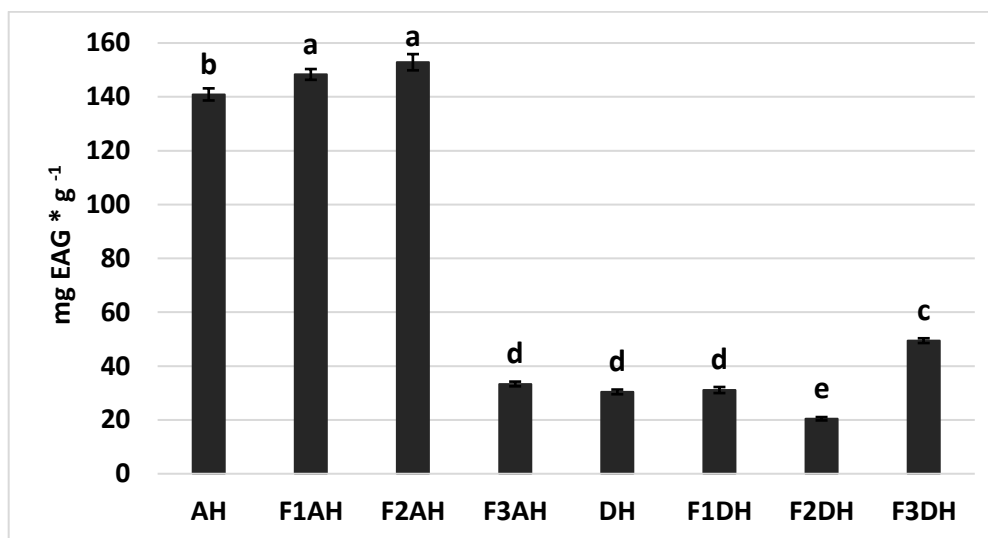


Figura 3. Contenido de compuestos fenólicos totales en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática

Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$). AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F1: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F2: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F3: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa.

3.6.9 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante evaluada con la inhibición del radical libre DPPH fue mayor (93.51 ± 1.15 %) en la muestra antes de la hidrólisis (AH) con respecto a la muestra después de la hidrólisis (DH) (82.76 ± 0.22 %), siendo F2_{AH} la de mayor valor (91.03 ± 0.38 %) mientras que para la muestra DH el valor mayor fue en la fracción F3_{DH} (79.26 ± 0.29 %) (Figura 4). En la inhibición del radical ABTS las muestras no fraccionadas, AH y DH, no presentaron diferencias significativas (99.85 ± 0.00 y 98.94 ± 0.15 %, respectivamente), siendo las fracciones F1_{AH} (94.63 ± 0.18 %) y F2_{AH} (91.38 ± 0.72 %) las que presentaron mayor actividad antioxidante (Figura 5).

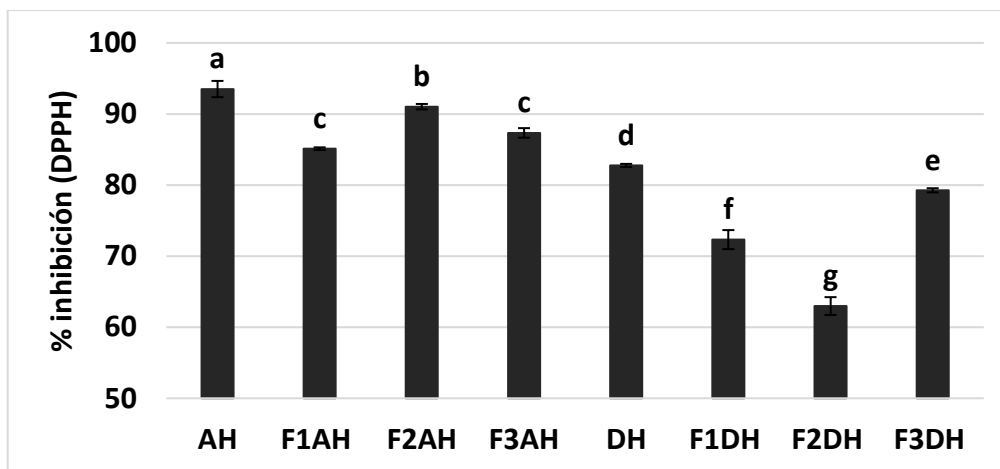


Figura 4. Actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática.

Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$). AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F1: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F2: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F3: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa

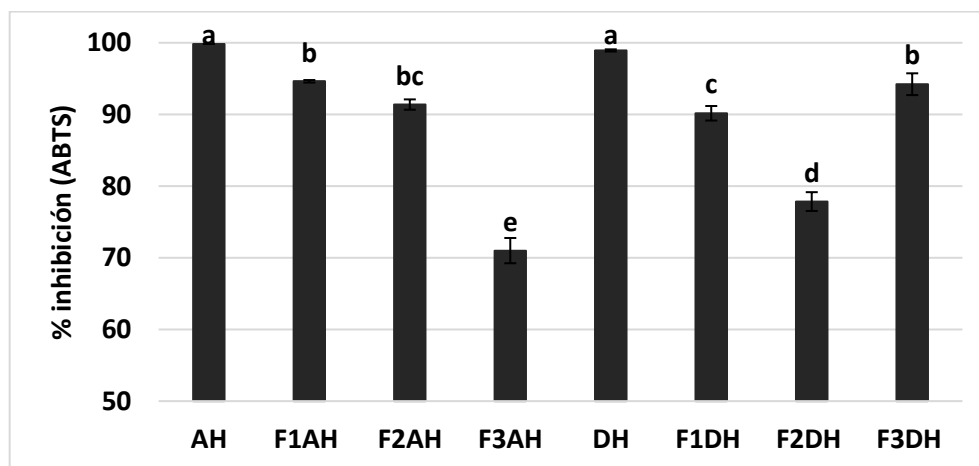


Figura 5. Actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática.

Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$). AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F1: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F2: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F3: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa

Se han publicado investigaciones sobre la capacidad de inhibición de radicales libres por efecto de péptidos obtenidos mediante la hidrólisis de proteína de diferentes especies de insectos. Kumah et al. (2019) reportaron porcentajes menores de inhibición del radical DPPH (26.78 y 48.42 %) por hidrolizados de proteína de harina de larvas de *Hermetia illucens* tratada con ultrasonido. Por otra parte, Montiel-Aguilar et al. (2020) reportaron porcentajes de inhibición del radical ABTS menores para un hidrolizado de aislado de proteína de *Pterophylla beltrani*, tanto del hidrolizado total (53.65 %) como en sus fracciones peptídicas F>10, F 3-10 y F<3 kDa con porcentajes de 60.79, 59.53 y 60.73 %, respectivamente.

Se menciona la hidrólisis de proteínas como un proceso que influye positivamente en la capacidad antioxidante (Montiel-Aguilar, et al., 2020), sin embargo, algunos resultados muestran un comportamiento adverso, observándose una disminución en el porcentaje de inhibición del radical DPPH, lo cual podría atribuirse a la pérdida de actividad antioxidante en consecuencia de la sensibilidad térmica de los compuestos fenólicos totales (Figura 3). Sin embargo, la variación del porcentaje de inhibición posterior a la hidrólisis no fue tan amplia como la disminución del contenido de compuestos fenólicos, por lo que se puede considerar que los péptidos generados por la hidrólisis presentaron una función antioxidante, compensando así la pérdida de los CFT.

Entre los factores que influyen en la formación de péptidos antioxidantes está la especificidad de las enzimas utilizadas en la hidrólisis. La pepsina A tiende a escindir en aminoácidos hidrofóbicos y preferentemente en aromáticos, mientras que la tripsina y la quimotripsina en los aminoácidos Arg, Lys; y Tyr, Trp, Phe, Leu, respectivamente (The Comprehensive Enzyme Information System, 2022). Como se mencionó anteriormente, la presencia de algunos de estos aminoácidos en los extremos de los péptidos formados en el proceso de hidrólisis, demostrarían su importancia en la actividad antioxidante.

Los péptidos encontrados en la muestra DH (Cuadro 6), muestran algunas de las escisiones de las enzimas digestivas utilizadas, además de que se predijo su

actividad antioxidante de las secuencias LWPL y AMGFVGM, lo que demuestra que hubo un incremento del porcentaje de inhibición dada por péptidos bioactivos.

3.6.10 Actividad antihipertensiva

En el análisis de inhibición de la ECA-I no se presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, por lo que puede determinarse que para esta actividad biológica, la hidrólisis enzimática no fue un factor determinante, sin embargo, se presentaron valores de inhibición elevados, entre 72 y 96 %, tanto antes como posterior a la hidrólisis, por lo que puede considerarse la proteína de hormiga chicatana como una fuente importante de péptidos antihipertensivos (Figura 6).

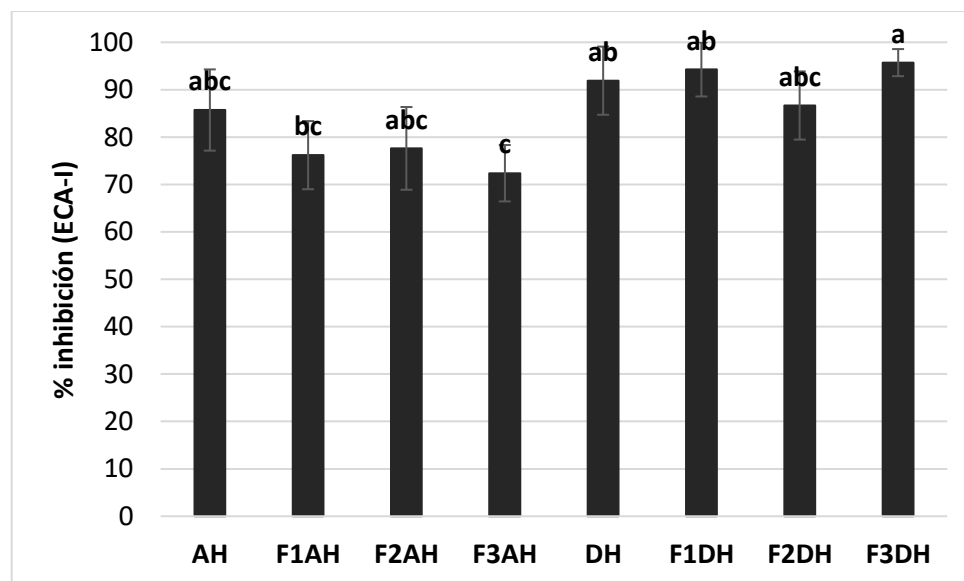


Figura 6. Actividad antihipertensiva por inhibición de ECA-I en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática.

Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$). AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F1: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F2: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F3: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa. ECA-I: Enzima convertidora de angiotensina I.

Dai y colaboradores (2013) reportaron valores bajos de inhibición en proteína nativa de *Tenebrio molitor*, con un porcentaje aproximado de 2 %, el cuál incremento con la hidrólisis multienzimática hasta un 80 %. También reportaron que el tratamiento con mayor actividad antihipertensiva presentaba un 64.8 % de aminoácidos hidrofóbicos (Val,Leu, Ile, Phe y Met), así como Arg y Lys por lo que se consideró eran los principales potenciadores de esta actividad.

En el perfil de aminoácidos de hormiga chicatana, se encontraron Leu, Lys y Val, los cuales podrían ser los principales responsables del alto porcentaje de inhibición de la ECA-I en la harina, ya que se ha demostrado que este grupo de aminoácidos (hidrofóbicos) destaca por ser determinante en la inhibición de la ECA-I (Gangopadhyay, et al., 2016).

Se han reportaron dos tipos de mecanismo de acción de los péptidos inhibidores de la ECA-I, los que compiten con la disponibilidad del sustrato y normalmente conformados por más de cuatro aminoácidos, y los que inhiben el sitio activo de la enzima, conformados generalmente de dos a tres aminoácidos. Siendo así, el tamaño molecular otro factor que juega un papel importante en la actividad inhibitoria, donde la mayor actividad se presenta en péptidos menores a 3 kDa (Huang, Sun, He, Dong, & Li, 2011). Como se pudo observar en la caracterización de los péptidos en las muestras AH y DH (Cuadro 6) en la que se encontraron péptidos menores a 1 kDa con potencial inhibidor de ECA-I.

3.6.11 Actividad antidiabética

Los inhibidores de la enzima α -amilasa presentan su actividad en la saliva y el tracto gastrointestinal, reduciendo la absorción de sustancias amiláceas de los alimentos; generando acciones clave para la reducción de complicaciones en la diabetes mellitus (Montiel-Aguilar, et al., 2020).

La actividad antidiabética evaluada por medio de la inhibición de la enzima α -amilasa, presentada en la Figura 7, fue mayor después del proceso de hidrólisis (DH) siendo F1_{DH} y F3_{DH} las fracciones peptídicas que presentaron mayor porcentaje de inhibición (92.74 ± 4.89 y 92.86 ± 2.28 , respectivamente) sin

diferencias significativas con las fracciones F1_{AH} y F2_{AH} (92.10 ± 1.75 y 92.22 ± 1.65 , respectivamente). Un comportamiento similar fue reportado por Montiel-Aguilar et al. (2020) donde las fracciones <3 y > 10 kDa, de una muestra hidrolizada de *P. beltrani*, presentaron los porcentajes de inhibición más altos (54.3 y 41.4 %) aunque estos fueron menores al hidrolizado de la hormiga chicatana.

Los resultados mostraron un incremento en el porcentaje de inhibición con la hidrólisis de 77.12% (AH) a 92.86% (DH), lo mismo se observó en el estudio publicado por DeMatos et al. (2022) en el cual, que reportó un valor de 2.14 ± 1.02 % para proteína de grillo negro, e incrementó hasta un 55.40 ± 2.93 % posterior a una hidrólisis multienzimática (pH 7, 50 ± 1 °C) con Flavourzyme™ Alcalasa™, y Neutrasa™.

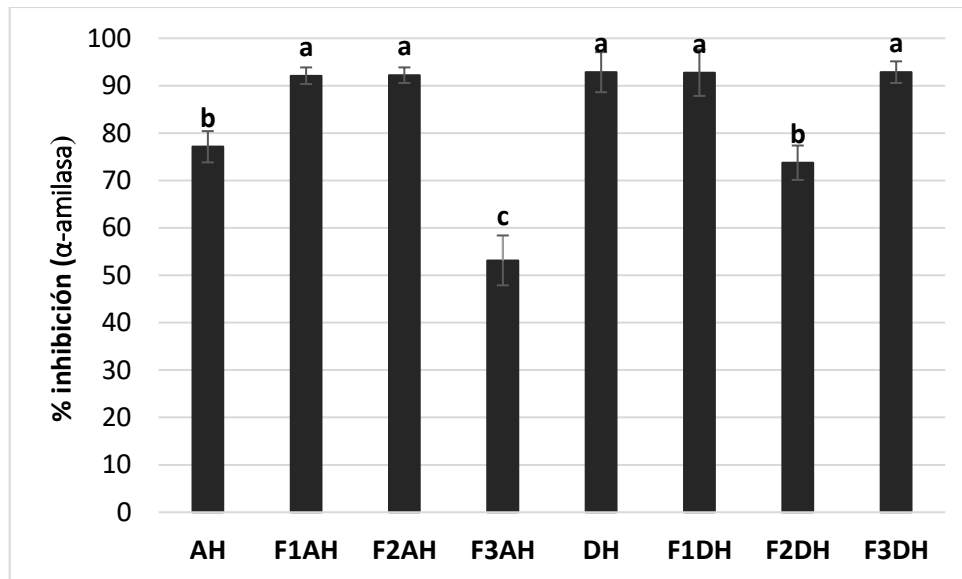


Figura 7. Actividad antidiabética por inhibición de la enzima α-amilasa en muestras de harina de hormiga chicatana antes (AH) y después (DH) de la hidrólisis enzimática

Medias con letras distintas fueron significativamente distintas ($p < 0.05$). AH: Muestra total antes de la hidrólisis; DH: Muestra total después de la hidrólisis; F1: Fracción permeada de la membrana de 3 kDa; F2: Fracción retenida en la membrana de 3 kDa y posteriormente permeada en la membrana de 10 kDa; F3: Fracción retenida en la membrana de 10 kDa.

Ramadhan, et al. (2018) encontraron péptidos con actividad inhibitoria de α -amilasa en hidrolizados con tripsina de proteína salamandra gigante china (*Andrias davidianus*) y en los cuales, el péptido Leu-Gly-Gly-Gly-Asn se reconoció como la secuencia con mayor bioactividad, seguido del péptido Pro-Gly-Gly-Pro, aminoácidos que fueron encontrados en cantidades importantes en las proteínas de hormiga chicatana, a excepción de la asparagina (Cuadro 4), junto con otros aminoácidos como el ácido glutámico, leucina, serina, valina y alanina que están asociados con la regulación y secreción de insulina, mostrando así actividad antidiabética.

3.7 CONCLUSIONES

La harina de hormiga chicatana (*Atta mexicana*) presentó un alto contenido de proteína, compuesta de aminoácidos esenciales, principalmente leucina y lisina; y aminoácidos no esenciales como ácido glutámico y prolina, los cuales presentaron un efecto en las propiedades biológicas de los péptidos presentes en la harina, y en los generados por el proceso de hidrólisis enzimática.

El proceso de simulación gastrointestinal originó un porcentaje de grado hidrólisis en las proteínas de hormiga chicatana presentes en la harina, de 74.88 ± 0.66 %, lo que generó péptidos con pesos moleculares menores a 1 kDa que exhibieron en diversas actividades biológicas, como la actividad antioxidante, la cual se modificó principalmente por la pérdida del contenido de compuestos fenólicos totales. La actividad antihipertensiva, indicó que la harina de hormiga chicatana (previo a la hidrólisis enzimática) contiene péptidos endógenos con alta capacidad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I), y que mantuvieron su potencial aún después de la hidrólisis; mientras que, en la actividad antidiabética, los péptidos presentes en la harina, previo a la hidrólisis enzimática presentaron altos porcentajes de inhibición de la enzima α -amilasa, mismos que aumentaron con la digestión gastrointestinal simulada.

La identificación de secuencias peptídicas permitió demostrar la presencia de péptidos bioactivos, YGFGL, TF, WCASGCRK, entre otros; con diversas actividades biológicas, así también como las secuencias FLGGLMK, GAFA y HLP que resistieron al proceso de hidrólisis y mostraron, principalmente, actividad antihipertensiva. También se identificaron secuencias generadas por el proceso de digestión como LWPL y AMGFVGMR, los cuales demostraron poseer actividad antioxidante.

De manera general, el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* generó secuencias de péptidos con potencial bioactivo, sin embargo, la harina de hormiga chicatana demostró tener calidad nutricional y biológica incluso antes del proceso de hidrólisis, lo cual la posiciona como fuente rica de proteínas y péptidos con potenciales benéficos a la salud.

3.8 LITERATURA CITADA

- Abián, J.; Carrascal, M.; Gay, M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*. (2). 16-35. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/60886376.pdf>
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. DOI:10.1021/jf60226a042
- Albarracín, Sonia Luz, Baldeón, Manuel E, Sangronis, Elba, Cucufate Petruschina, Alexandra, & Reyes, Felix G. R. (2016). L-Glutamato: un aminoácido clave para las funciones sensoriales y metabólicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 101-112. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222016000200002&lng=es&nrm=iso
- Amarender, R. V., Giannouli, P., & Morris, E. R. (2020). Lipid and protein extraction from edible insects – Crickets (*Gryllidae*). *LWT-Food Science and Technology*(125), 1-4. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109222
- Amaringo, V., & Hormaza, A. (2013). Determinación del punto de carga cero y punto isoeléctrico de dos residuos agrícolas y su aplicación en la remoción de colorantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2), 27-36. DOI: 10.22490/21456453.982
- AOAC. (2002). *Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists*. Washington D.C., USA.
- Arango Gutiérrez, Gloria Patricia; Vergara Ruiz, Rodrigo Antonio; Mejía Vélez, Humberto. (2004). Análisis composicional, microbiológico y digestibilidad de la proteína de la harina de larvas de *hermetia illuscens* L (diptera: stratiomyiidae) en Angelópolisantioquia, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía – Medellín*. 57 (2). Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472004000200009
- Bodwell, C., Satterlee, L., & Hackler, L. (1980). Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymic digestion methods. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, 33(3), 677-686. DOI: 10.1093/ajcn/33.3.677
- Boland, M.J.; Rae, A.N.; Vereijken, J.M.; Meuwissen, M.P.M.; Fischer, A.R.H.; van Boekel, M.A.J.S.; Hendriks, W.H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*. 29, 62–73. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.07.002
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound

- (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198–1205. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.10.075
- Brogan, E., Park, Y.-L., Matak, K., & Jaczynski, J. (2021). Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silk worm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. *LWT- Food Science and Technology*(152), 112314. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112314
- BuBler, S., Rumpold, B., Jander, E., Rawel, H., & Schlüter, O. (2016). Recovery and technofunctionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae *Heliyon*, 1-24. DOI: 10.1016/j.heliyon.2016.e00218
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Nicoli, S., Lucarini, M., & Carnovale, E. (1997). Solubility–digestibility relationship of legume proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 45(9), 3387-3394. DOI: 10.1021/jf970070y
- Castro-López, C., Santiago-López, L., Vallejo-Cordoba, B., González-Cordova, A. F., Liceaga, A., García, H., & Hernández-Mendoza, A. (2020). An insight to fermented edible insects: A global perspective and prospective. *Food Research International*(137), 1-11. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109750
- Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. Y. (2007). Preparation of Whey Protein Hydrolysates Using a Single- and Two-Stage Enzymatic Membrane Reactor and Their Immunological and Antioxidant Properties: Characterization by Multivariate Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3896-3904. DOI: 10.1021/jf062936i
- Cito, A., Botta, M., Francardi, V., Dreassi, E., , & . (2017). Insects as source of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides. *J. Insects Food Feed*, 3, 231-240. DOI: 10.3920/JIFF2017.0017
- Dai, C., Ma, H., Luo, L., Yin, X., , & . (2013). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate. *European Food Research and Technology.*, 236(4), 681-689. DOI: 10.1007/s00217-013-1923-z
- de Matos, F. M., de Lacerda, J., Zanetti, G., & de Castro, R. (2022). Production of black cricket protein hydrolysates with α -amylase, α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities using a mixture of proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 39(102276), 1-12. DOI: 10.1016/j.bcab.2022.102276
- Di Mattia, C., Battista, N., Sacchetti, G., & Serafini, M. (2019). Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates. *Frontiers in Nutrition*, 6(106), 1-7. DOI: 10.3389/fnut.2019.00106

- FAO/OMS/UNU. (1985). *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. Disponible en: <https://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>
- Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzman, N. E., Gonzales-Laredo, R. F., & Garcia-Casas, M. A. (2013). Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *CyTA. Journal of Food*, 11(2), 162-170. DOI: 10.1080/19476337.2012.712057
- Gallegos-Pérez, J. L. (2009). Aplicación de la espectrometría de masas en proteómica para la búsqueda de biomarcadores. *Mensaje Bioquímico*. 23. 130-146. Disponible en: https://www.academia.edu/20996889/Aplicaci%C3%B3n_de_la_Espectrometr%C3%ADa_de_Masas_en_Prote%C3%B3mica_para_la_B%C3%BAsqueda_de_Biomarcadores_Application_of_Mass_Spectrometry_for_Biomarkers_Searching_
- Gangopadhyay, N., Wynne, K., Connor, P. O., Gallagher, E., Brunton, N. P., Rai, D. K., & Hayes, M. (2016). In silico and in vitro analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 203, 367–374. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.097
- Garlick, Peter J. (2005). The Role of Leucine in the Regulation of Protein Metabolism. *The Journal of Nutrition*. 135 (6), 1553S–1556S. DOI: 10.1093/jn/135.6.1553S
- Ghosh, S., Choi, K., Kim, S., & Jung, C. (2017). Body Compositional Changes of Fatty Acid and Amino Acid from the Queen of Bumblebee, *Bombus terrestris* during Overwintering. *Journal of Apiculture*, 32(1), 11-18. DOI:10.17519/apiculture.2017.04.32.1.11
- Gómez-Maldonado, D., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Leyva-Mir, S. G., Robles-Yerena, L., & Vernon-Carter, E. J. (2020). Antifungal activity of mango kernel polyphenols on mango fruit infected by anthracnose. *LWT*, 126, 109337. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109337
- Hayes, M., Stanton., C., Slattery, H., O’Sullivan, O., Hil, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007). Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4658–4667. DOI: 10.1128/aem.00096-07
- Huang, W. H., Sun, J., He, H., Dong, H. W., & Li, J. T. (2011). Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 128(4), 968–973. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.127

- Jeong, H., Kim, J. M., Kim, B., Nam, J.-O., Hahn, D., & Choi, M. B. (2020). Nutritional Value of the Larvae of the Alien Invasive Wasp *Vespa velutina nigrithorax* and Amino Acid Composition of the Larval Saliva. *Foods*, 9(7), 885. DOI:10.3390/foods9070885
- Jozefiak, A., & Engberg, R. M. (2017). Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 25, 1-14. DOI: 10.22358/jafs/69998/2017
- Kara's, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Zlotek, U., Zielńska, E., & . (2017). The influence of heat treatment of chickpea seeds on antioxidant and fibroblast growth-stimulating activity of peptide fractions obtained from proteins digested under simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science & Technology*, 52, 291-305. DOI: 10.1111/ijfs.12872
- Kumah Mintah, B., He, R., Dabbour, M., Kwaku Golly, M., Akomeah Agyekum, A., & Ma, H. (2019). Effect of sonication pretreatment parameters and their optimization on the antioxidant activity of *Hermitia illucens* arvae meal protein hydrolysates. *Jorunal of Food Processing and Preservation*, e14093, 1-12. DOI: 10.1111/jfpp.14093
- Kumar, M.; Tomar, M.; Potkule, J.; Reetu; Punia, S.; Dhakane-Lad, J.; Singh, S.; Dhumal, S.; Pradhan, P. C.; Bhushan, B.; Anitha, T.; Alajil, O.; Alhariri, A.; Amarowicz, R.; Kennedy, J. F. (2022). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*, 123, 106986. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106986
- López-Armenta, T. (2014). Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y antioxidante de péptidos bioactivos sometidos a digestión gastrointestinal simulada. (Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C.). Disponible en: <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/351/1/LOPEZ-ARMENTA-T14.pdf>
- Melo-Ruíz, V., Vilchis-Pérez, A., & Sánchez-Herrera, K. (2018). Macronutrient composition of the Chicatana ant (*Atta mexicana*), Edible Insect during the rainy season in Mexico. *J. Nutr. Health Food Eng.*, 8(6), 437-440. DOI: 10.15406/jnhfe.2018.08.00306
- Mishyna, M., Martínez, J.-J., Chen, J., & Benjamin, O. (2018). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). *Food Research International*, 1-44. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.098
- Montiel-Aguilar, L. J., Torres-Castillo, J. A., Rodríguez-Servin, R., López-Flores, A. B., Aguirre-Arzola, V. E., Méndez-Zamora, G., & Sinagawa-García, S. R. (2020). Nutraceutical effects of bioactive peptides obtained from

- Pterophylla beltrani. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(3), 1-17. DOI: 10.1016/j.aspen.2020.06.006
- Mooney, C., Haslam, N., Pollastri, G., & Shields, D. (2012). Towards the Improved Discovery and Design of Functional Peptides: Common Features of Diverse Classes Permit Generalized Prediction of Bioactivity. *PLoS ONE*, 7(10), e45012. DOI: 10.1371/journal.pone.0045012
- Mshayisa, V., Van Wyk, J., & Zozo, B. (2022). Nutritional, Techno-Functional and Structural Properties of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Flours and Protein Concentrates. *Foods*, 11, 724-744. DOI: 10.3390/foods11050724
- Najdi Hejazi, S., Orsat, V., Azadi, B., & Kubow, S. (2016). Improvement of the in vitro protein digestibility of amaranth grain through optimization of the malting process. *Journal of Cereal Science*, 59–65. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.11.007
- Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de bioquímica*. Barcelona. España: Omega.
- Paniagua-Martínez, I., Morales-Trejo, F., Rendón-Martínez, A., Gallardo-López, F., & Ramírez-Martínez, A. (2021). Acceptance and physicochemical properties of raw and roasted ants (*Atta mexicana*). *Journal of Insects as Food and Feed*, 8(1). DOI: 10.3920/JIFF2020.0168
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4263/426339682006.pdf>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et. al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-350. DOI:10.1016/0003-2697(77)90043-4
- Pinciroli, María. (2010). Proteínas de arroz. Propiedades estructurales y funcionales. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de la Plata. Argentina. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/1828>
- Purschke, B., Meinlschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., & Jager, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 244, 999-1013. DOI: 10.1007/s00217-017-3017-9
- Ramadhan, A., Nawas, T., Zhang, X., Pembe, W., Xia, W., & Xu, Y. (2018). Purification and identification of a novel antidiabetic peptide from Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) protein hydrolysate against α -amylase and α -glucosidase. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 3360-3372. DOI: 10.1080/10942912.2017.1354885

- Ramos-Elorduy, J. (1997). Insects: a sustainable source of food. *Ecology of Food and Nutrition*, 36, 247-276. DOI: 10.1080/03670244.1997.9991519
- Re, R., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(9-10), 1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rendón-Martínez, A., Paniagua-Martínez, I., Gallardo-López, F., & Ramírez-Martínez, A. (2022). ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE MUESTRAS DE CHICATANA (*Atta mexicana* L) PROVENIENTES DE PUENTE JULA, VERACRUZ. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7, 343-348. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume7/7/11/56.pdf>
- Reyes-Prado, H., Pino, J. M., García, A., Angeles, S. C., Varela, F., & . (2016). Determinación del valor nutritivo de las hormigas 'chicatanas' *Atta mexicana* S. (Hymenoptera-Formicidae) en el estado de Morelos. *Ent. Mex.*, 2, 749-755. Disponible en: <https://docplayer.es/112710944-Determinacion-del-valor-nutritivo-de-las-hormigas-chicatanas-atta-mexicana-s-hymenoptera-formicidae-en-el-estado-de-morelos-mexico.html>
- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F. J., Pérez-Galvéz, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2020). Effect of ultrasound pretreatment and sequential hydrolysis on the production of *Tenebrio molitor* antidiabetic peptides. *Food and Bioproducts Processing*, 123, 217-224. DOI: 10.1016/j.fbp.2020.07.003
- Ryan, J., Ross, R., Bolton, D., Fitzgerald, G., & Stanton, C. (2011). Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients*, 3(9), 765-791. DOI: 10.3390%2Fnu3090765
- Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F., & Manzano-Agugliaro, F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16-27. DOI: 10.1016/j.jclepro.2013.11.068
- Sarmadi, B. H., & Imail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides.*, 31(10), 1949-1956. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.020
- Shi, C., Liu, M., Zhao, H., Lv, Z., Liang, L., & Zhang, B. (2022). A Novel Insight into Screening for Antioxidant Peptides from Hazelnut Protein: Based on the Properties of Amino Acid Residues. *Antioxidants.*, 11, 127. DOI: 10.3390/antiox11010127
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. Disponible en: <https://www.ajevonline.org/content/16/3/144>

- Stone, A., Tanaka, T., & Nickerson, M. (2019). Protein quality and physicochemical properties of commercial cricket and mealworm powders. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3355-3363. DOI: 10.1007/s13197-019-03818-
- Tang-Bin, Z., Tai-Ping, H., Hua-Bin, L., Huan-Wen, T., & En-Qin, X. (2016). The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. *Molecules*, 21(1), 72. DOI: 10.3390/molecules21010072
- Taufek, N., Muin, H., Raji, A., Razak, S., Yusof, H., & Alias, Z. (2016). Digestibility Coefficients and Amino Acid Availability of Cricket Meal, *Gryllus bimaculatus*, and Fishmeal in African Catfish, *Clarias gariepinus*, Diet. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(6), 798-805. DOI: 10.1111/jwas.12302
- The Comprehensive Enzyme Information System*. (18 de 09 de 2022). Obtenido de <http://www.brenda-enzymes.org/>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. DOI: 10.3390/nu2121231
- Wang, W. W., Qiao, S. Y., & Li, D. F. (2008). Amino acids and gut function. *Amino Acids*, 37(1), 105-110. DOI: 10.1007/s00726-008-0152-4
- Williams, J. P., Williams, J. R., Kirabo, A., Chester, D., & Peterson, M. (2016). Nutrient Content and Health Benefits of Insects. *Insects as Sustainable Food Ingredients*, 61–84. DOI:10.1016/b978-0-12-802856-8.00003-x
- Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(1), 330-335. DOI: 10.1021/jf062517l
- Yang, F.-j., Chen, X., Huang, M.-C., Yang, Q., Cai, X.-X., Chen, X., . . . Wang, S.-y. (2021). Molecular characteristics and structure-activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313-2332. DOI. 10.1016/S2095-3119(20)63463-3
- Zenil, N., Colinas, M., Bautista, C., Vázquez, T., Lozoya, H., & Martínez, M. (2014). Fenoles totales y capacidad antioxidante estimada con los ensayos DPPH/ABTS en rosas en soluciones preservantes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(6), 1029-1039. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000600010
- Zielinska, E., Kara's, M., & Jakubczyk, A. (2017). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, 52, 306-312. DOI: 10.1111/ijfs.13282