

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DE ALIMENTOS
(DIPA)

**“Obtención de un extracto proteico a partir del chapulín de la milpa
(*Sphenarium purpurascens*), con la aplicación de ultrasonido de baja
frecuencia para la inhibición de tropomiosina”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

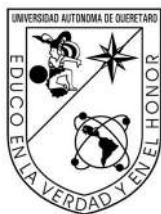
PRESENTA

I.B.Q. Nayeli Alejandra Soria Calderón

DIRIGIDO POR

Dr. Eduardo Castaño Tostado

CENTRO UNIVERSITARIO
QUERÉTARO, QRO.
OCTUBRE 2021
MÉXICO



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Obtención de un concentrado proteico a partir del chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*), con la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia para la inhibición de tropomiosina”

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. Nayeli Alejandra Soria Calderón

Dirigido por:

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Director

Firma

Dra. Silvia L. Amaya Llano
Sinodal

Firma

Dr. Gustavo Adolfo Castillo Herrera
Sinodal

Firma

Dr. Carlos Regalado González
Sinodal

Firma

M. en C. Carlos Isac Rivas Vela
Sinodal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2021

RESUMEN

Los insectos se consideran una fuente de proteínas de buena calidad y alta digestibilidad. Sin embargo, en su consumo, existe una tendencia al rechazo por parte del consumidor por su apariencia y un posible riesgo de alergenicidad. Por tanto, como alternativa a su rechazo por apariencia, se han obtenido ingredientes alimentarios extraídos de sus proteínas. Sin embargo, el riesgo de alergenicidad todavía está presente, donde el principal alérgeno proteico es la tropomiosina. En este estudio se determinaron las condiciones para una extracción alcalina de proteínas de *Sphenarium purpurascens*, obteniendo un rendimiento de $88.78 \pm 1.32\%$ y un contenido de proteína de $67.74 \pm 0.31\%$. El extracto resultante fue sonicado a 20 kHz para la eliminación de tropomiosina explorando, mediante un diseño experimental factorial completo, los factores: tiempo de sonicación (0, 5, 10, 15 y 20 minutos) y potencia de sonicación (400 y 500 W), midiendo el aumento de temperatura como covariable, cuantificando el contenido de tropomiosina, la variable de respuesta, por el método ELISA. Se obtuvo la mayor reducción ($33.65 \pm 0.69\%$) del alérgeno con 500 W de potencia y 20 min de sonicación. Finalmente se determinaron las propiedades funcionales extraídas del insecto, el extracto sin sonicación y el extracto con sonicación, donde el extracto tratado con el ultrasonido presenta una mayor solubilidad proteica ($85 \pm 0.65\%$), una mayor capacidad de retención de agua (4.61 ± 0.12 g/g) y aceite (6.66 ± 0.02 g/g), y una mayor capacidad de formación de emulsión ($75.00 \pm 0.0\%$). Los resultados obtenidos son el primer acercamiento al uso de un tratamiento de ultrasonido de baja frecuencia para la eliminación del efecto alérgeno de la tropomiosina de insectos; además de que refuerzan el potencial de la aplicación de extractos de proteína de insectos en productos alimenticios.

Palabras clave: *Sphenarium purpurascens*, alérgenos, ultrasonido de baja frecuencia, concentrado proteico.

ABSTRACT

Insects are considered a source of protein of good quality and high digestibility. However, in its consumption, there is a tendency to rejection by the consumer due to its appearance and possible risk of allergenicity. Therefore, as an alternative to its rejection by appearance, food ingredients extracted from its proteins have been obtained. However, the allergenicity risk is still present, where the main protein allergen is tropomyosin. In this study, the conditions for an alkaline extraction of *Sphenarium purpurascens* proteins were determined, obtaining a yield of $88.78 \pm 1.32\%$ and a protein content of $67.74 \pm 0.31\%$. The resulting extract was sonicated at 20 kHz for tropomyosin removal, exploring, through a full factorial experimental design, the factors: sonication time (0, 5, 10, 15 and 20 minutes) and sonication power (400 and 500 W), measuring the increase in temperature as a covariate, quantifying the tropomyosin content, the response variable, by the ELISA method. The greatest reduction ($33.65 \pm 0.69\%$) of the allergen was obtained with 500 W of power and 20 min of sonication. Finally, the functional properties extracted from the insect, the extract without sonication and the extract with sonication, were determined, where the extract treated with ultrasound presents a greater protein solubility ($85 \pm 0.65\%$), a greater water retention capacity (4.61 ± 0.12 g / g) and oil (6.66 ± 0.02 g / g), and a higher emulsion formation capacity ($75.00 \pm 0.0\%$). The results obtained are the first approach to the use of a low-frequency ultrasound treatment for the elimination of the allergenic effect of tropomyosin in insects; In addition, they reinforce the potential of the application of insect protein extracts in food products.

Key words: *Sphenarium purpurascens*, allergens, low frequency ultrasound, protein concentrate.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Dirección General de Bibliotecas UAG

Agradecimientos

Primero y como más importante, me gustaría agradecer a mi asesor de tesis, Dr. Eduardo Castaño Tostado por el tiempo y paciencia que dedicó a enseñarme y orientarme.

A mis asesores, Dra. Silvia L. Amaya Llano, Dr. Gustavo A. Castillo Herrera, Dr. Carlos Regalado González y M. en C. Carlos Isac Rivas Vela, por todo lo otorgado en esta trayectoria, tanto observaciones, información y correcciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría CVU: 1002075

Al personal administrativo de la facultad de Química. En especial a Carmelita por su paciencia y guía.

Índice

Contenido	Página
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico y antecedentes.....	3
2.1. Insectos como alimento.....	3
2.1.1. Valor nutricional de los insectos.....	4
2.1.1.1. Contenido de proteína.....	5
2.1.1.2. Contenido de lípidos.....	11
2.1.1.3. Contenido de fibra, minerales y vitaminas.....	12
2.1.2. Insectos comestibles en México.....	13
2.1.2.1 Consumo de ortópteros.....	13
2.1.2.2 Proteína de insectos de la familia acrididae.....	14
2.1.2.3. Chapulín de la milpa (<i>Sphenarium purpurascens</i>).....	14
2.1.3. Impacto económico y ambiental de los insectos como alimento.....	18
2.1.4. Percepción y aceptación por parte del consumidor.....	19
2.1.5. Alergenicidad y toxicidad de los insectos comestibles.....	20
2.2. Concentrados de proteína de insecto.....	23
2.2.1. Propiedades funcionales de la proteína de insectos.....	23
2.2.2. Obtención de concentrados de proteína a partir de insectos.....	25
2.3. Reducción de la alergenidad en insectos comestibles.....	27
2.3.1. Proceso de ultrasonido para la eliminación de alérgenos.....	28
3. Justificación.....	33
4. Objetivos.....	35
5. Metodología.....	36
5.1. Materia prima.....	36
5.2. Determinación de las condiciones de extracción para la obtención de un extracto proteico de <i>S. purpurascens</i>	36
5.2.1. Acondicionamiento de la materia prima.....	36

5.2.2. Determinación de las condiciones de extracción de proteína.....	37
5.3. Diseño de tratamiento ultrasónico para la eliminación de tropomiosina.....	39
5.3.1. ELISA tipo Sandwich para la detección de tropomiosina.....	40
5.3.2. Distribución molecular (SDS-PAGE).....	41
5.4. Composición proximal y determinación de propiedades funcionales del Chapulín y extractos obtenidos.....	42
5.4.1. Composición proximal.....	43
5.4.1.1. Proteína.....	43
5.4.1.2. Lípidos.....	43
5.4.1.3. Cenizas.....	44
5.4.1.4. Fibra dietaría.....	44
5.4.1.5. Quitina.....	45
5.4.2. Propiedades funcionales.....	46
5.4.2.1. Solubilidad.....	46
5.4.2.2. Capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite.....	47
5.4.2.3. Capacidad de formación y estabilidad de emulsiones.....	47
5.4.2.4. Capacidad de formación de geles.....	48
5.4.2.5. Digestibilidad.....	49
5.4.3 Análisis estadístico.....	50
6. Resultados y discusión.....	50
6.1. Determinación de las condiciones de extracción para la obtención de un extracto proteico de <i>S. purpurascens</i>	50
6.2. Efectos del tratamiento ultrasónico.....	55
6.3. Composición proximal y determinación de propiedades funcionales del Chapulín y extractos obtenidos.....	59
6.3.1. Composición proximal.....	59
6.3.2. Propiedades funcionales.....	60
6. Conclusiones.....	67

7. Referencias.....	68
---------------------	----

Índice de figuras

Contenido	Página
Figura 1: Composición nutrimental aproximada (peso seco) de los 4 órdenes de insectos que son consumidos con mayor frecuencia.....	5
Figura 2: Composición de aminoácidos esenciales en diferentes órdenes de insectos.....	10
Figura 3: Composición de ácidos grasos de diferentes órdenes de insectos	11
Figura 4: Número registrado de especies de insectos comestibles, por país.....	13
Figura 5: Morfología externa y dimensiones de <i>Sphenarium purpurascens</i>	15
Figura 6: Uso de agua y suelo necesarios para la producción de proteína de grillo (Ortóptera), pollo, cerdo y res.....	18
Figura 7: Emisiones de gases de efecto invernadero (amoníaco, óxido nitroso y metano) en la producción carne de res y cerdo; y algunos insectos comestibles. .	19
Figura 8: Estructura de la tropomiosina.....	22
Figura 9: Regiones repetidas de aminoácidos en la tropomiosina proveniente del camarón (<i>Penaeus aztecus</i>) y de la cucaracha americana (<i>Penaeus americana</i>).	22
Figura 10: Equipo Cole-Parmer Ultrasonic Cleaner, Heater/Digital Timer con adaptaciones para una re-circulación de agua fría y la medición de temperatura con un sensor termopar tipo K.....	40
Figura 11: Porcentaje de solubilidad de las proteínas de Chapulín a diferentes pH..	52
Figura 12: Rendimiento (A) y contenido de quitina (B) resultante del uso de pH 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8 y 4.0 para la precipitación isoelectrica requerida en el proceso de extracción; y su respectivo diagrama de comparaciones múltiples de Tukey, (B) para el rendimiento y (D) para el contenido de quitina.....	54

Figura 12: Rendimiento (A) y contenido de quitina (B) resultante del uso de pH 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8 y 4.0 para la precipitación isoelectrica requerida en el proceso de extracción; y su respectivo diagrama de comparaciones múltiples de Tukey, (B) para el rendimiento y (D) para el contenido de quitina.....	54
Figura 13: Contenido de tropomiosina de extracto proteico de chapulín y cada uno de los tratamientos de ultrasonido.....	55
Figura 14: Patrón de señales de electroforesis en SDS-PAGE para el extracto sin sonicación y los diferentes tratamientos a una potencia de 500 W. (1) Marcador molecular, (2) Extracto proteico sin sonicación, (3- 6) Tratamiento 5, 10, 15 y 20 min.....	57
Figura 15: Porcentaje de solubilidad de las proteínas de Chapulín (azul), extracto proteico sin sonicación (naranja) y con sonicación (amarillo) a diferentes pH. Los resultados se presentan como promedio de tres réplicas \pm desviación estándar...	61

Índice de tablas

Contenido	Página
Tabla 1: Principales insectos comestibles consumidos.....	4
Tabla 2: Comparación de los niveles de proteína total de insectos y plantas	6
Tabla 3: Efecto de los métodos de procesamiento de los insectos comestibles.....	8
Tabla 4: Tamaño de proteínas de insectos de la familia Acrididae y sus características relevantes.....	14
Tabla 5: Composición química de <i>S. purpurascens</i> de acuerdo diferentes estudios disponibles.....	16
Tabla 6: Composición de aminoácidos de <i>S. purpurascens</i> (diversas fuentes) y su comparación con la carne y el huevo.....	17
Tabla 7: Alérgenos reportados en insectos.....	21
Tabla 8: Propiedades funcionales de las proteínas.....	24
Tabla 9. Etapas clave para la obtención de concentrados y aislados proteicos.....	25
Tabla 10: Metodologías utilizadas para la eliminación de alérgenos en insectos...	28
Tabla 11: Trabajos donde se utiliza el ultrasonido para la reducción de alergenicidad de la tropomiosina.....	30
Tabla 12: Incremento de temperatura en grados Celsius para los tratamientos de ultrasonido aplicados.....	56
Tabla 13: Caracterización de la materia prima.....	59
Tabla 14: Propiedades funcionales de la materia prima y extractos proteicos.....	62
Tabla 15: Capacidad de formación de gel por calor de la materia prima y extractos proteicos.....	65
Tabla 16: Porcentaje de digestibilidad de la materia prima y extractos proteicos...	66

1. Introducción

La entomofagia es el consumo de insectos como alimento, la cual se practica en todo el mundo. En la actualidad se conocen alrededor de 2 000 especies de insectos comestibles a nivel mundial. Los insectos son considerados como una fuente de proteína de calidad, con una alta digestibilidad proteica en comparación a la proteína de origen vegetal; además, los insectos cuentan con diversas ventajas ecológicas y económicas tales como: una alta eficiencia de conversión alimenticia, un menor uso de recursos de agua y tierra; una menor emisión de gases de efecto invernadero y no es necesario el uso de pesticidas (da Rosa Machado & Thys, 2019; Imathiu, 2020; Liu & Zhao, 2018; Patel et al., 2019). Sin embargo, el uso de los insectos como alimento presenta desventajas como el rechazo por parte de la mayoría de los consumidores debido a su apariencia y textura. Una alternativa para evitar el rechazo por parte del consumidor es la obtención de sus componentes en forma de extractos o concentrados para su adicción en alimentos (Delicato et al., 2020). Actualmente no existe una metodología establecida para ello a partir de insectos, ya que debe tener condiciones específicas acuerdo a la especie, hábitat, dieta y etapa de desarrollo del insecto. Con la búsqueda de las condiciones de extracción adecuadas, se puede resolver la problemática de la falta aceptación por parte del consumidor (Gravel & Doyen, 2020).

Por otro lado, otra desventaja que tienen los insectos y que aún no queda resuelta con la obtención de extractos o concentrados, es el riesgo de alergenicidad, donde la tropomiosina es considerada el alérgeno proteico principal. Algunas metodologías que se han utilizado para la eliminación de alérgenos en insectos son: hidrólisis enzimática, hidrólisis enzimática asistida por microondas y los tratamientos térmicos (F. Hall et al., 2018; F. Hall & Liceaga, 2020; Pali-Schöll et al., 2019; Van Broekhoven et al., 2016). Sin embargo, también existen

tratamientos como el ultrasonido de baja frecuencia, que se han utilizado en camarones para la reducción y eliminación de la tropomiosina; aunque éstos no han sido probados en insectos (Z. xing Li et al., 2006; Zhang et al., 2018; Zhenxing et al., 2006). El tratamiento con ultrasonido puede ocasionar cambios en la estructura y funcionalidad de las proteínas, estos cambios estructurales pueden evitar la unión proteína – IgE (anticuerpo relacionado con alergias alimentarias), y por lo tanto inhibir la reacción alérgica (Chizoba Ekezie et al., 2018; Shriver & Yang, 2011; Zhang et al., 2018).

Debido a lo anterior en este proyecto se propone obtener un concentrado de proteína de un insecto comestible de abundancia en México, como lo es el chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*), mismo que presenta un contenido de proteína del 56 % a 75.87 %, además de que contiene todos los aminoácidos esenciales (René Cerritos, 2008; Rodríguez-Miranda et al., 2019), lo que lo hace una fuente alternativa de proteína para su posible uso en alimentos. Además de evaluar un tratamiento de ultrasonido de baja frecuencia eficaz para intentar eliminar la tropomiosina.

2. Marco teórico y antecedentes

2.1. Insectos como alimento

El uso de insectos como alimento para el consumo humano, se conoce con el término de "entomofagia", la cual es practicada en todo el mundo con un mayor consumo en regiones de Asia, África y América Latina (Evans et al., 2015). La FAO (2014) reporta que el consumo de insectos complementa la dieta de aproximadamente 2 000 millones de personas, además menciona que la ingesta de insectos siempre ha constituido un componente importante de la dieta humana.

Actualmente, se tienen identificadas alrededor de 2 000 especies de insectos comestibles en todo el mundo. La ingesta de insectos es considerada como una tradición en 3 071 grupos étnicos en 113 países, donde su consumo y preparación es dependiente de la cultura y la región geográfica. Los insectos son consumidos en diferentes etapas de desarrollo como: huevos, larvas, pupas, ninfas o adultos (Kouřimská & Adámková, 2016; Patel et al., 2019; Yi et al., 2013).

Las principales especies de insectos comestibles (Tabla 1) se encuentran dentro de los órdenes: coleóptera, lepidóptera, himenóptera, ortóptera, hemíptera y díptera. A nivel mundial, las especies de insectos que son consumidos con mayor frecuencia pertenecen a los órdenes de los coleópteros, lepidópteros, himenópteros y ortópteros (Costa-Neto & Dunkel, 2016). Los ortópteros, aunque no se encuentran en el primer lugar de consumo, son un grupo interesante debido a sus características nutricionales mismas que se mencionarán más adelante.

Tabla 1: Principales insectos comestibles consumidos.

Orden	Insectos	Principal etapa de vida para consumo del insecto	Porcentaje de consumo * (%)
Coleóptera	Escarabajos	Larva	31
Lepidóptera	Orugas	Larva	18
Himenóptera	Hormigas, abejas y avispas	Adulto	14
Ortóptera	Grillos, saltamontes y langostas	Adulto	13
Hemíptera	Pulgones y saltahojas	Adulto	10
Isóptera	Termitas	Adulto	3
Diptera	Moscas	Larva	2

* Porcentaje de consumo de los órdenes de insectos respecto al total de insectos comestibles reportados. (Elaboración propia con información de: FAO, 2019; Yi et al., 2013).

En los últimos años los insectos comestibles han tomado importancia; desde el año 2003 la FAO ha fomentado a nivel mundial a los insectos como alimento, debido a sus diferentes ventajas nutricionales, sociales y ambientales.

2.1.1. Valor nutricional de los insectos

Los insectos comestibles son una fuente de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas. Su contenido nutricional es muy variado, debido a la cantidad y diversidad de especies (Figura 1); además de que se pueden encontrar variaciones dentro del mismo grupo de insectos dependiendo de su hábitat, dieta y etapa de vida. Los insectos adultos tienden a tener mayores cantidades de proteínas, mientras que en los estadios de larva y pupa se encuentran en menor cantidad (Costa-Neto & Dunkel, 2016; Finke & Oonincx, 2013).

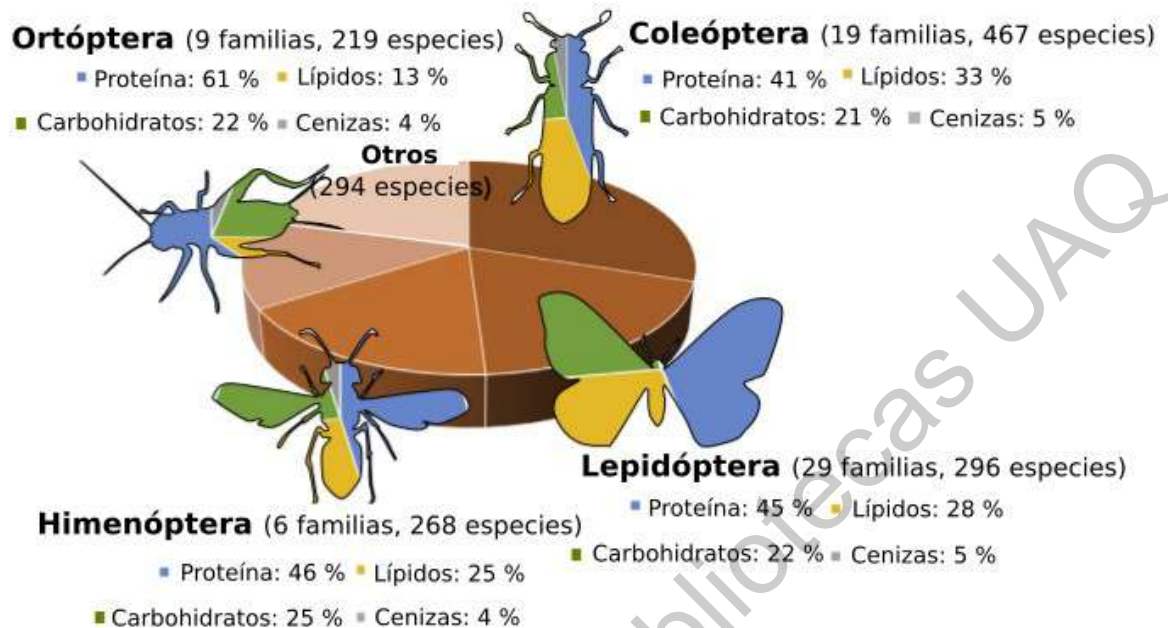


Figura 1: Composición nutrimental aproximada (peso seco) de los 4 órdenes de insectos que son consumidos con mayor frecuencia. No se especifica etapa de vida (Lui & Zhao, 2018).

Como se puede observar en Figura 1, el orden de los ortópteros se distingue por su alto contenido de proteína con un 61 %, el cual es mayor que en otros órdenes de insectos, coleóptera, himenóptera y lepidóptera.

2.1.1.1. Contenido de proteína

Los insectos son una fuente alternativa de proteína con una calidad proteica comparable a la carne y del huevo; y de mejor calidad que la mayoría de las fuentes vegetales. En comparación con estas últimas, la proteína de insecto tiene mayores niveles de proteína total (Tabla 2) y calidad proteica (Akhtar & Isman, 2018).

Tabla 2: Comparación de los niveles de proteína total de insectos y plantas .

Especie	Proteína (%)
Vegetal	
Amaranto (<i>Amaranthus</i> sp.)	12.5–17.6
Lupinus (<i>Lupinus</i> sp.)	38–55
Frijoles (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	26.0
Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd)	12–23
Insectos	
Grillo (<i>Grylloides sigillatus</i>)	56.8 *
Saltamontes (<i>Schistocerca gregaria</i>)	76.0
Abeja (<i>Apis mellifera</i>)	22.1
Gusano de harina (<i>Tenebrio molitor</i>)	51.0*

*Porcentaje estimado por el método Kjeldahl con un factor de conversión = 6.25
Adaptada de: (Fasolin et al., 2019).

Calidad proteica

La calidad proteica hace referencia a las características de la proteína en cuestión en relación con su capacidad para obtener acciones metabólicas definidas, esta calidad es determinada por la composición de aminoácidos y la digestibilidad de la proteína (Akhtar & Isman, 2018).

Digestibilidad de proteína de insecto

La digestibilidad es una manera de medir el grado de digestión o disponibilidad de nutrientes, en el caso de proteínas, se refiere a la fracción proteica que puede ser absorbida por el aparato digestivo y ser utilizada para las funciones de homeostasis del organismo (Aggett, 2010). La digestibilidad de las proteínas de insectos comestibles es de importancia debido, a que si las proteínas no son fácilmente disponibles para su digestión no se obtendría ningún beneficio al consumirlos (Fernández-García et al., 2009).

Las proteínas de insecto tienen en promedio una mayor digestibilidad (75 – 98 %) en comparación con las proteínas de origen vegetal, como la soya (35.8 %), cacahuates y las lentejas (52 %). Además, se considera que la digestibilidad de las proteínas de insectos puede mejorarse mediante la eliminación de la quitina. Otros factores que influyen en la digestibilidad proteica son la especie del insecto, factores antinutricionales y el método de procesamiento (Akhtar & Isman, 2018; de Castro et al., 2018; Imathiu, 2020).

Entre los métodos de procesamiento de insectos comestibles se encuentran: el asado, cocinado al vapor, freído, secado y ebullición. Estos métodos regularmente no son controlados cuando se realizan de manera artesanal; y pueden influir tanto negativamente como positivamente en la digestibilidad de las proteínas (Imathiu, 2020). La Tabla 3, muestra algunos trabajos donde se mencionan cómo influye el método de preparación en la digestibilidad de la proteína de insecto.

Tabla 3: Efecto de los métodos de procesamiento de los insectos comestibles.

Insecto	Etapa de vida utilizada	Métodos de procesamiento	Efectos en la digestibilidad de proteínas	Referencia
Escarabajo ¹ (<i>Eulepida mashona</i>)	Adulto	1) Ebullición, en agua a 100 °C durante 60 min	Reducción de la digestibilidad en 23 % para la ebullición. No se observó un efecto con el asado	(Manditsera et al., 2019)
Grillo ¹ (<i>Henicus whellani</i>)	Adulto	2) Asado en seco, con un sartén de acero inoxidable (Temperatura no reportada)	Reducción de la digestibilidad en 24.2 % para la ebullición y 24.7 % para el asado	
Gusano de la harina ² (<i>Tenebrio molitor</i>)	Larva	1) Cocinado al vacío, el insecto se empaqueta a vacío y se colocó en baño maría (74 °C por 60 min) 2) Freído, con el uso de aceite de oliva por un min (Temperatura no reportada) 3) Ebullición, en agua a 100 °C durante 1 min 4) Cocinado en horno, con una temperatura de 70 °C por 15 y 30 min	Se observó un aumento de la digestibilidad con los tratamientos probados. La digestibilidad del insecto crudo fue de un 85 %, para los tratamientos la digestibilidad fue de: Cocinado en horno (15 min) 91.5 % Cocinado en horno (30 min) 90.4 % Cocinado al vacío 90.5 %, Ebullición 90.1 % Freído de 87.2 % ,	(Caparros Megido et al., 2018)
Grillo ³ (<i>Acheta domesticus</i>)	Adulto	1) Cocción en horno 150 °C por 30 min 2) Cocción en horno 120 °C por 10 min 3) Cocción al vapor 120 °C por 25 min	La digestibilidad para ambos insectos en crudo es de 84 – 92 %, mientras que para los insectos que fueron tratados fue de 84 – 90 %	(Poelaert et al., 2018)
Gusano de la harina ³ (<i>Tenebrio molitor</i>)	Larva			

1: Los insectos fueron recolectados, congelados y lavados. Posterior al tratamiento térmico se realizó una liofilización y una molienda de las muestras para su análisis.

2: Las larvas utilizadas fueron de cría, con dieta controlada. Se utilizó congelación como método de sacrificio. Posterior al tratamiento térmico se realizó una molienda de las muestras para su análisis. 3: Los insectos utilizados fueron de cría, con dieta controlada; como método de sacrificio se usó la congelación. Posterior al tratamiento térmico se realizó una liofilización y homogeneización en licuadora para el análisis de las muestras.

Composición de aminoácidos de proteína de insecto

La cantidad de aminoácidos esenciales que contiene la proteína de insectos es un parámetro clave de su calidad proteica. El análisis de diferentes especies de insectos comestibles ha mostrado que el contenido de aminoácidos esenciales representa del 46 % – 96 % de la cantidad de aminoácidos totales del insecto (Akhtar & Isman, 2018; Kouřimská & Adámková, 2016). De acuerdo con Liu & Zhao (2018), el contenido de aminoácidos esenciales de los insectos se encuentra hasta un 40 % por encima del requerimiento de aminoácidos recomendado por la FAO, OMS y ONU, de acuerdo al informe de requisitos de proteínas y aminoácidos en la nutrición humana, publicado en el 2007.

Al igual que el contenido de proteína, la composición de aminoácidos en los insectos tiene variación de acuerdo a la orden y la especie. La Figura 2, muestra la abundancia de los aminoácidos esenciales encontrados en cada orden de insectos, donde se observa que los ortópteros contienen todos los aminoácidos esenciales. Los valores promedio del contenido de aminoácidos esenciales en este orden en mg / g de proteína son: histidina = 21.2; isoleucina = 39.6; leucina = 74.8; lisina = 53.9; metionina = 19.3; fenilalanina = 46.6; treonina = 35.8; triptófano = 8.1 y valina = 50.3 (Akhtar & Isman, 2018; Rumpold & Schlüter, 2013).

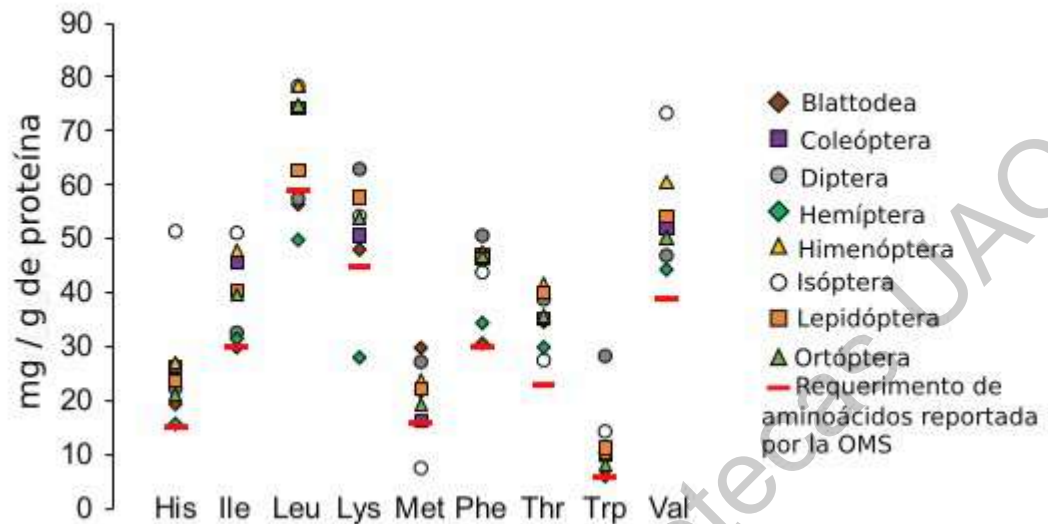


Figura 2: Composición de aminoácidos esenciales en diferentes órdenes de insectos. His: histidina, Ile: isoleucina, Leu: leucina, Met: metionina, Phe: Fenilalanina, Thr: treonina, Trp: triptofano, Val: valina (Lui & Zhao, 2018).

En general, la proteína de insecto contiene todos los aminoácidos esenciales, con niveles altos de lisina, triptófano, treonina y metionina, que son los principales aminoácidos deficientes en proteína de cereales y legumbres. Por lo anterior, se recomienda la combinación de varias proteínas vegetales para una dieta nutritiva y completa, lo que no es necesario con algunas especies de insectos (Akhtar & Isman, 2018; Fasolin et al., 2019; Kouřimská & Adámková, 2016; Sun-Waterhouse et al., 2016). De acuerdo con la revisión de Van Huis (2013) algunos ejemplos de insectos, en lo que se ha mostrado lo anterior, son el gorgojo africano de la palma (*Rhynchophorus phoenicis*), el escarabajo rinoceronte asiático (*Oryctes rhinoceros*) y las termitas (*Macrotermes bellicosus*).

2.1.1.2. Contenido de lípidos

Los lípidos representan el segundo componente mayoritario de la composición nutrimental de los insectos comestibles (Figura 1). Los insectos comestibles contienen de un 10 al 60 % de lípidos (peso seco). La variación del contenido de lípidos depende de la especie y de la etapa de desarrollo del insecto; el contenido de lípidos es mayor en estadios larvarios y pupas en comparación con los insectos adultos (Akhtar & Isman, 2018; Kouřimská & Adámková, 2016; Rumpold & Schlüter, 2013).

Los lípidos de los insectos pueden contribuir a la nutrición humana al proporcionar energía y ácidos grasos esenciales (Julieta Ramos-Elorduy, 2008). La composición de la fracción lipídica de los insectos incluye ácidos grasos saturados, poliinsaturados y monoinsaturados (Figura 3).

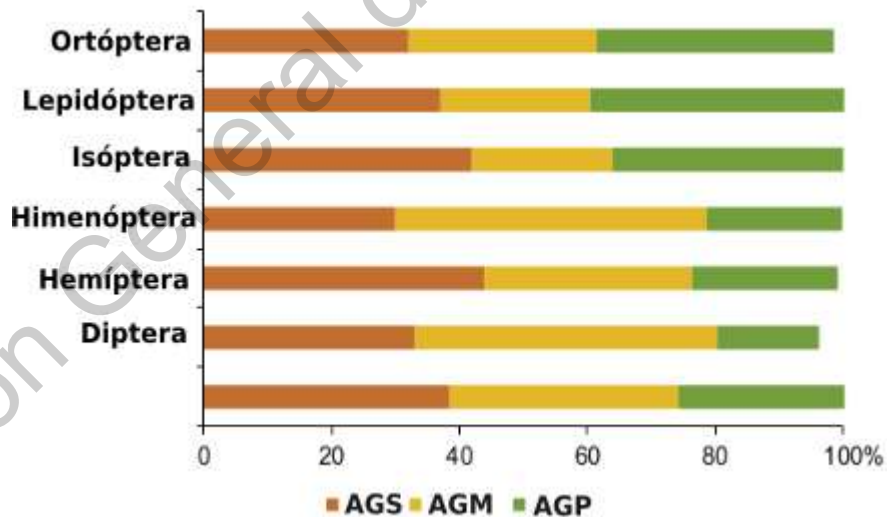


Figura 3: Composición de ácidos grasos de diferentes órdenes de insectos (AGS: ácidos grasos saturados, AGM: ácidos grasos monoinsaturados, AGP: grasas poliinsaturadas) (Lui & Zhao, 2018).

Liu & Zhao (2018) menciona que existe una preferencia nutrimental por los insectos con una composición alta de ácidos grasos poliinsaturados particularmente insectos isópteros (36%), ortópteros (37%) y lepidópteros (40%). Además, diversos insectos tienen una baja proporción de ácidos grasos omega-6 / omega-3, condición deseable para reducir el riesgo de enfermedades crónicas.

2.1.1.3. Contenido de fibra, minerales y vitaminas

Los insectos contienen cantidades significativas de fibra (0.12 % – 29.13 % en peso seco). La forma de fibra más común en los insectos es la quitina; la cual es catalogada como insoluble y es el componente principal del exoesqueleto del insecto. La quitina actúa en el cuerpo humano de manera similar a la celulosa, además se le ha asociado con la defensa contra las infecciones parasitarias y alergias (Akhtar & Isman, 2018; Kouřimská & Adámková, 2016; Liu & Zhao, 2018). La quitina como alérgeno se mencionará más adelante.

Además del contenido de fibra, los insectos comestibles son una fuente de minerales como cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio y zinc; los cuales se encuentran fácilmente disponibles. La mayoría de los insectos comestibles poseen un contenido de hierro igual o mayor que la carne de res; un ejemplo de esto son los grillos (ortópteros) que contienen tres veces más hierro que la carne vacuna y casi 15 veces más magnesio (Akhtar & Isman, 2018; Liu & Zhao, 2018). Los insectos comestibles también contienen vitaminas, especialmente vitaminas B1 (tiamina) y B2 (riboflavina); además de vitamina A, vitamina E, biotina, retinol, β -caroteno y, en algunos casos pueden contener ácido fólico (Kouřimská & Adámková, 2016).

2.1.2. Insectos comestibles en México

El consumo de insectos en México es una tradición de origen prehispánico. Actualmente se estima que entre el 35 % al 45 % de la población mexicana consume insectos de forma regular u ocasional. México es uno de los países con mayor biodiversidad de insectos comestibles con aproximadamente 549 especies (Figura 4), los estados con un mayor consumo de insectos son Oaxaca, Chiapas, Veracruz y México (Lähteenmäki-Uutela et al., 2017).

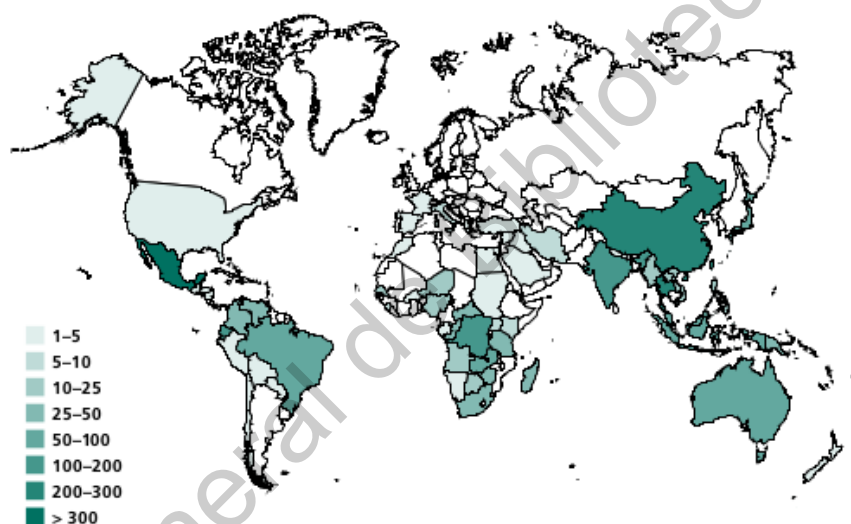


Figura 4: Número registrado de especies de insectos comestibles, por país (Ball, 2014).

2.1.2.1 Consumo de ortópteros

En México se consume una gran variedad de ortópteros. En este orden se encuentran los saltamontes, las langostas y los grillos. Los cuales son conocidos en todas las culturas que se alimentan de insectos. A nivel mundial se han registrado 294 especies comestibles, con mayor consumo de las familias acrididae, gryllidae y tettigoniidae, 78 especies se encuentran en México. Los chapulines (familia: acrididae) son los ortópteros posiblemente más conocidos en América latina y de

mayor ingesta en México, los cuales son llamados con nombres distintos dependiendo de su ubicación geográfica (F. Hall & Liceaga, 2020; Lähteenmäki-Uutela et al., 2017).

2.1.2.2 Proteína de insectos de la familia acrididae

Los insectos de la familia acrididae, tienen un contenido de proteína del 43.9 % al 77.1 %. Las proteínas de los insectos tienen diferentes rangos de pesos moleculares (Tabla 4) (Julieta Ramos-Elorduy, 2008).

Tabla 4: Tamaño de proteínas de insectos de la familia Acrididae y sus características relevantes.

Espece	Contenido de proteína (%)	Peso molecular (kDa)	Características relevantes	Referencia
<i>Schistocerca gregaria</i>	38.1	20- 95	Se analizan proteínas solubles. Son abundantes las proteínas de < 20 kDa.	(Mishyna, Martinez, Chen, Davidovich -Pinhas, et al., 2019)
<i>Locusta migratoria</i>	65.9	6 - 100	Se analizan proteínas solubles. Se encuentran bandas características (40, 50 y 100 kDa) de proteínas musculares como la tropomiosina y altas cantidades de tubulina.	(Purschke et al., 2018)

2.1.2.3. Chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*)

Sphenarium purpurascens (orthoptera: pyrgomorphidae) (Figura 5) conocido comúnmente como "Chapulín de la milpa" o "Chapulín comestible", es la especie de chapulín más abundante en México con una distribución geográfica que incluye

estados como Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Veracruz, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, Ciudad de México, Estado de México, Chiapas y Tabasco (Cuj-Laines et al., 2018; Torruco-Uco et al., 2019).

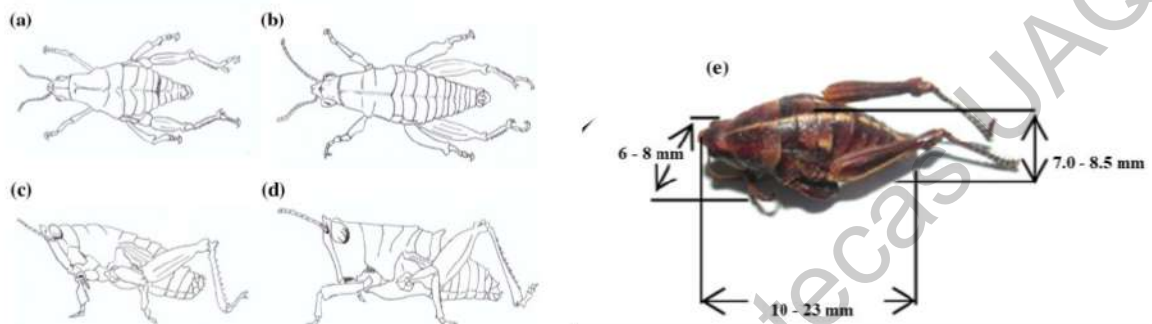


Figura 5: Morfología externa y dimensiones de *Sphenarium purpurascens*. Vista superior de (a) un macho y (b) una hembra, vista lateral de (c) un macho y (d) una hembra, (e) dimensiones promedio del insecto (Rodríguez-Miranda et al., 2019).

El ciclo de vida de *S. purpurascens* tiene una duración de 35 a 37 semanas. Las hembras depositan una o dos ootecas con 15 a 38 huevos en el suelo, donde permanecen durante 17 semanas; después de la eclosión (que se da durante temporada de lluvias), los insectos pasan por 5 estadios ninfales con una duración de 5 a 6 semanas. Por último, tienen una etapa de adulto de una duración de 13 a 14 semanas. El color de *S. purpurascens* puede variar de verde, negro, gris o marrón, lo cual se ha asociado al tipo de vegetación donde los individuos se desarrollan y se alimentan (Castellanos-Vargas & Cano-Santana, 2009; Rodríguez-Miranda et al., 2019).

S. purpurascens es considerado una plaga que afecta a los cultivos de maíz, frijol, alfalfa, calabaza y habas. Sin embargo, este insecto también puede alimentarse de plantas silvestres y matorrales. Por otro lado, los chapulines son un alimento popular en puestos informales y restaurantes de pueblos pequeños, así como mercados de exportación (Cerritos & Cano-Santana, 2008). Para su recolección es recomendado que se realice en las primeras horas del día, debido a actividad

disminuida de los insectos a temperaturas bajas. Las plantas se golpean ligeramente con redes cónicas de aproximadamente 80 cm de diámetro y 90 cm de profundidad, recolectando los chapulines dentro de la red. La recolección natural de *S. purpurascens* solo es posible durante tres meses al año. Sin embargo, es posible tener una recolección durante todo el año si el chapulín se cría en condiciones controladas (Lähteenmäki-Uutela et al., 2017).

Rodríguez-Miranda et al. (2019) mencionan que si la cría de *S. purpurascens* se realiza de manera masiva, es posible alcanzar entre 200 y 500 kg de biomasa por hectárea por año, dependiendo del nivel de extracción.

Composición nutricional de *S. purpurascens*

Los estudios reportados sobre la composición nutrimental de *S. purpurascens* son escasos. Sin embargo, acorde a la sección 2.1.1. de este documento, *S. purpurascens* es una alternativa de proteína de alta calidad. La información reportada del 1997 al 2018 sobre la composición nutrimental de *S. purpurascens* se resume en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición química (g / 100 g de muestra en base seca) de *S. purpurascens* de acuerdo diferentes estudios disponibles (Rodríguez-Miranda et al., 2019).

Proteína (%)	Lípidos (%)	Carbohidratos totales (%)	Cenizas (%)	Referencia
52.74	10.51	33.17	3.58	(Cuj-Laines et al., 2018)
75.87	6.02	15.59	NR	(Melo-Ruiz et al., 2015)
53.57	8.98	26.62	1.42	(Van Huis, 2013)
71.5	7.75	NR	2.5	(Melo et al., 2011)
65.2	10.8	21.04	2.95	(Julieta Ramos-Elorduy, 2006)
56	11	30	3	(J. Ramos-Elorduy, 1997)

NR: No reportado

Como se observa en la Tabla 5 el contenido de proteína de *S. purpurascens* se encuentra entre 56 % a 75.87 %. Diferentes estudios han mostrado que la proteína de *S. purpurascens* cuenta con todos los aminoácidos esenciales con un contenido mayor de isoleucina, leucina, lisina, treonina, valina e histidina, que la carne de res y el huevo (Tabla 6).

Tabla 6: Composición de aminoácidos de *S. purpurascens* (diversas fuentes) y su comparación con la carne y el huevo.

Aminoácido	<i>S. purpurascens</i>			Carne de res	Huevo
Histidina	2.7	NR	2.2	2	1.2
Isoleucina	4.5	4.2	4.2	1.6	2.4
Leucina	8.7	8.5	8.9	4.2	4.1
Lisina	5.7	5.7	5.7	4.5	3.3
Metionina	NR	4.2	2.5	1.6	1.5
Fenilalanina	NR	7.7	10.3	2.4	2.5
Treonina	3.9	3.9	3.1	2.5	2.1
Tirosina	NR	NR	6.3	2.2	2
Triptófano	0.6	0.6	0.7	0.2	0.8
Valina	5.7	5.6	5.7	2	3
Metionina + Cisteína	2.9	NR	NR	2.6	2.6
Fenilalanina + Tirosina	6.3	NR	NR	4.6	4.5
Método de análisis	HPLC	CEC	HPLC*		
Unidades	g/16 g of N	g/16 g of N	g/100 g	g/100 g	
Referencia	(Melo-Ruiz et al., 2015)	(Melo et al., 2011)	(Julieta Ramos-Elorduy, 2006)	(Akhtar & Isman, 2018)	

NR: No reportado, HPLC* con estándar externo, CEC: cromatografía de intercambio catiónico

2.1.3. Impacto económico y ambiental de los insectos como alimento

Además de los beneficios nutricionales, los insectos comestibles también pueden proporcionar ventajas económicas y ambientales, debido a que son relativamente rápidos y fáciles de criar (Gravel & Doyen, 2020). La mayoría de los insectos comestibles tienen una alta eficiencia de conversión alimenticia (cantidad de alimento consumido / unidad de peso de animal producido), en comparación con el ganado convencional. Un ejemplo de lo anterior es el grillo (*Acheta domesticus*) que es dos veces más eficiente que el pollo, 4 veces más que el cerdo y 12 veces más que el ganado bovino. Asimismo, los alimentos para la producción de insectos se pueden obtener de un rango más amplio de plantas en comparación con el ganado convencional (Liu & Zhao, 2018; Patel et al., 2019; Van Huis, 2013). La producción actual de insectos como alimento es más amigable con el medio ambiente en comparación con fuentes de alimentos de origen animal, debido a que se requieren menores cantidades de tierra y agua (Figura 6) además de que las emisiones de gases de efecto invernadero son más bajas (Figura 7) (da Rosa Machado & Thys, 2019; Liu & Zhao, 2018).



Figura 6: Uso de agua y suelo necesarios para la producción de proteína de grillo (Ortóptera), pollo, cerdo y res (Adaptado de: Lui & Zhao, 2018).

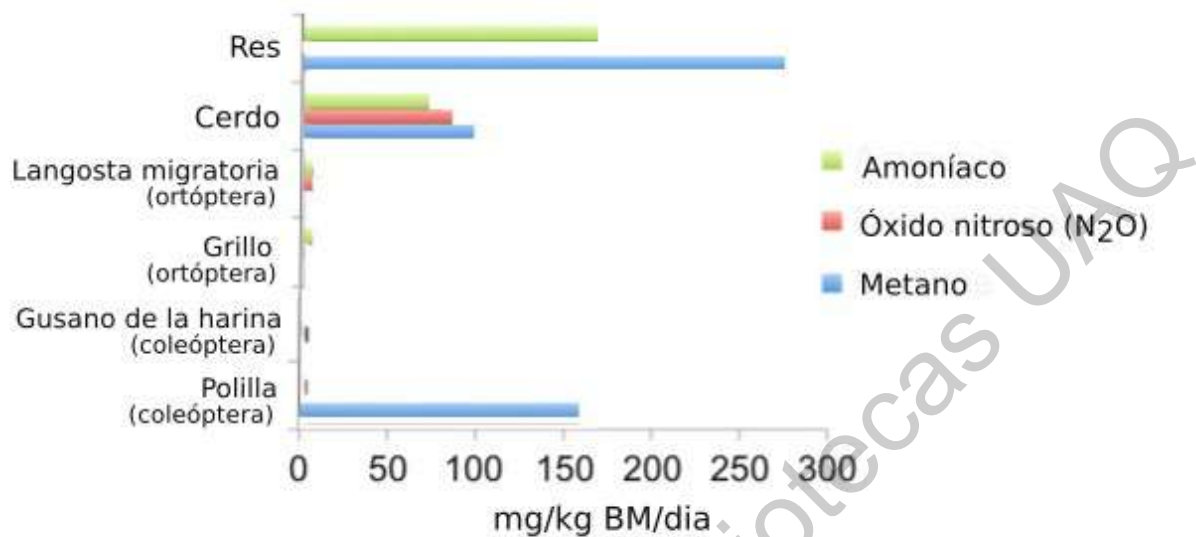


Figura 7: Emisiones de gases de efecto invernadero (amoníaco, óxido nitroso y metano) en la producción carne de res y cerdo; y algunos insectos comestibles. BM = masa corporal; datos de óxido nitroso no disponibles para la producción de carne de res (Akhtar & Isman, 2018).

La producción de insectos comestibles también puede considerarse más amigable con el ambiente que las fuentes de alimento de origen vegetal, debido a que se requiere un menor uso de recursos y no se utilizan pesticidas (Delicato et al., 2020).

2.1.4. Percepción y aceptación por parte del consumidor

Los insectos como alimento han atraído la atención, ya que se han llevado a cabo encuestas, festivales de comida y simposios sobre los insectos comestibles. Aunque, éstos son consumidos en todo el mundo, principalmente se consumen en países de bajos ingresos (Patel et al., 2019). Sin embargo, la FAO (2007) reconoce que es un error común considerar que los insectos solo se consumen en períodos de hambre, ya que, en la mayoría de los casos, los insectos forman parte de la dieta local y son consumidos por su sabor.

La preferencia por un alimento en particular está relacionada con el sabor, apariencia, costo, disponibilidad, cultura, religión y estado emocional. En el caso de los insectos comestibles la tendencia al rechazo de alimentos nuevos o desconocidos (neofobia) es considerablemente alta (Melgar-Lalanne et al., 2019; Patel et al., 2019). Sin embargo, existen alternativas para aumentar la aceptación de insectos como alimento, tales como (1) el uso del turismo culinario; (2) el aumento de productos alimenticios a base de insectos; (3) reducir la visibilidad del insecto en el alimento con sabores y texturas familiares. Por ello, los insectos se pueden usar de manera molida, picada o extraer sus componentes principales a manera de concentrados (Chatsuwan et al., 2018; Delicato et al., 2020).

2.1.5. Alergenicidad y toxicidad de los insectos comestibles

Uno de los inconvenientes de los insectos como alimento es el riesgo de alergenidad. Una alergia alimentaria es una respuesta del sistema inmune adversa a los alimentos, la cual es causada por sustancias denominadas como alérgenos; por lo general los alérgenos presentes en los alimentos son proteínas (Imathiu, 2020; Patel et al., 2019).

Puesto que el componente mayoritario de los insectos comestibles son las proteínas, es posible que algunos insectos y sus alimentos derivados sean fuentes de alérgenos. Además, los insectos se encuentran relacionados taxonómicamente con los crustáceos, por lo que existe la posibilidad de que las personas alérgicas a los crustáceos puedan presentar reacciones alérgicas a las proteínas de insecto y sus derivados (Downs et al., 2016; Imathiu, 2020; Jantzen da Silva Lucas et al., 2020).

Los insectos comestibles son considerados como alimentos novedosos, por ello es importante la determinación de sus posibles peligros y riesgos, incluida su alergenidad. En su revisión Imathiu (2020), menciona que actualmente existen

pocos estudios relacionados con la seguridad alimentaria de los insectos comestibles, lo cual es una limitante para promover el cultivo y el consumo de insectos. Los principales alérgenos que se han reportado en insectos son la quitina y proteínas como la tropomiosina y la arginina quinasa o α -amilasa, como se observa en la Tabla 7 (Francis et al., 2019).

Tabla 7: Alérgenos reportados en insectos (Jantzen da Silva Lucas et al., 2020; Raheem et al., 2019).

Alérgeno	Descripción
Quitina	Polisacárido que se encuentra en el exoesqueleto de los insectos, así como en hongos, parásitos y crustáceos. Los insectos contienen 1-7% de quitina, como esta contiene nitrógeno en su estructura influye en las estimaciones de proteínas basadas en las mediciones de nitrógeno. Desencadena la inflamación del tejido al activar la expresión de las quininas del huésped
Tropomiosina	Proteína que se encuentra en animales vertebrados e invertebrados, con funciones en la contracción muscular y el citoesqueleto de las células no musculares. Es considerado como el alérgeno principal de alergias cruzadas entre crustáceos, moluscos, ácaros y cucarachas; también se ha reportado en el gusano de la harina, grillos y algunos artrópodos.
Arginina quinasa	Enzima que se encuentra en invertebrados, cataliza la fosforilación de residuos de arginina. La enzima está altamente conservada tanto estructural como funcionalmente dentro de artrópodos y es una fuente significativa de alergenicidad cruzada tanto en las especies de crustáceos como entre crustáceos e insectos.

Tropomiosina

La tropomiosina es una proteína fibrosa termoestable e hidrosoluble que es abundante en animales vertebrados como en invertebrados, desempeña funciones esenciales en la contracción muscular y el citoesqueleto de las células no

musculares. La estructura de esta proteína está compuesta por dos hélices alfa polipeptídicas enrolladas entre sí (Figura 8), de aproximadamente de 284 aminoácidos cada una, con un peso molecular por subunidad cercano a los 33 kDa (Downs et al., 2016).



Figura 8: Estructura de la tropomiosina (Brow et al., 2005)

La estructura molecular de la tropomiosina contiene una repetición de aminoácidos única que es responsable de su estructura y función; en la Figura 9 se muestra las regiones repetidas de aminoácidos en la tropomiosina proveniente del camarón (*Penaeus aztecus*) y de la cucaracha americana (*Penaeus americana*). Dentro de cada región repetida se tienen tres aminoácidos con carga negativa global, por ejemplo, ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D) que se encuentran contenidos dentro de un par de residuos hidrofóbicos [isoleucina (I) o leucina (L)] (Downs et al., 2016).

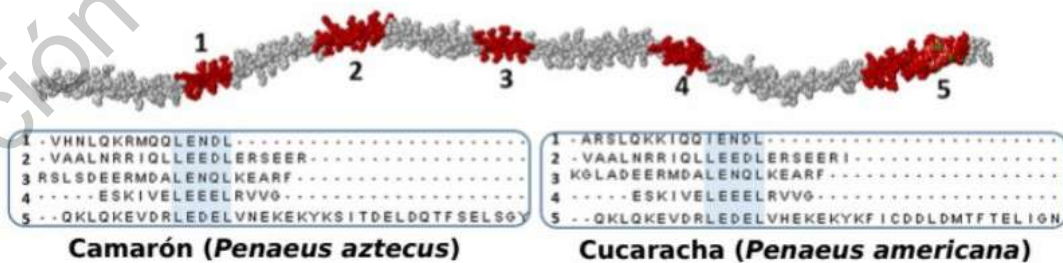


Figura 9: Regiones repetidas de aminoácidos en la tropomiosina proveniente del camarón (*Penaeus aztecus*) y de la cucaracha americana (*Penaeus americana*) (Downs et al., 2016).

2.2. Concentrados de proteína de insecto

La extracción de proteínas de insectos para aumentar el contenido proteico de un producto alimenticio puede ser una forma útil de lograr la aceptabilidad de los insectos como alimento. La introducción gradual del uso de concentrados proteicos de insectos puede permitir a los consumidores habituarse a nuevos productos que aparentemente sean similares a los que ya conocen. Para lograr lo anterior es necesario investigar las propiedades de las proteínas de insectos, debido a que estas son las que permiten una aplicación específica en la producción de alimentos (Zielińska et al., 2019).

2.2.1. Propiedades funcionales de la proteína de insectos

Las propiedades funcionales de las proteínas se definen como "aquellas propiedades fisicoquímicas que afectan el comportamiento de las proteínas en los sistemas alimentarios durante el almacenamiento, la cocción y el consumo". La determinación de estas propiedades es necesaria para determinar la aplicación de concentrados de proteínas de insectos. Estas propiedades incluyen: (1) solubilidad; (2) capacidad de retención de agua; (3) capacidad de retención de aceite; (4) capacidad de formación de geles; (5) capacidad de formación de espumas y (6) capacidad de formación de emulsiones (F. G. Hall et al., 2017; Mirmoghtadaie et al., 2016; Zielińska et al., 2019). La Tabla 8 muestra de manera general la importancia de las propiedades mencionadas anteriormente en alimentos.

Tabla 8: Propiedades funcionales de las proteínas (Badui, 2006).

Propiedad funcional	Importancia
Solubilidad	Una buena solubilidad de las proteínas es importante para la formación de emulsiones, espumas y geles en productos alimenticios. Las proteínas insolubles tienen un uso limitado en alimentos.
Capacidad de retención de agua	Es la capacidad de las proteínas para embeber agua y retenerla. Esta capacidad se asocia con la jugosidad, suavidad y textura de productos cárnicos.
Capacidad de retención de aceite	Es la capacidad de las proteínas para retener lípidos. Esta capacidad es de importancia en los sustitutos de carnes y extensores, debido a que mejora la retención de sabor y mejora la sensación al paladar; además la retención de aceites es deseable en productos de planificación.
Capacidad de formación de geles	Esta capacidad es el resultado de las interacciones proteína-proteína y proteína-agua, lo cual provee una matriz estructural para la retención de agua, sabor, azúcares e ingredientes. Lo anterior es de utilidad en el desarrollo de nuevos productos.
Capacidad de formación de espuma	Las espumas consisten de una fase continua acuosa y una fase dispersa gaseosa (aire). Las proteínas participan en la distribución uniforme de las burbujas de aire, lo que contribuye en la textura, suavidad y ligereza. Diversos alimentos procesados son productos tipo espuma, tales como crema batida, helados de crema, pasteles, merengues, pan, soufflés, mousses y malvaviscos.
Capacidad de formación de emulsiones	Las emulsiones son una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera homogénea. Para su formulación se requiere aceite, agua, un emulsificante y energía mecánica. Las proteínas son consideradas como buenos emulsificantes para alimentos, debido a su superficie activa de naturaleza anfipática.

2.2.2. Obtención de concentrados de proteína a partir de insectos

No existe una metodología establecida para la obtención de concentrados y aislados proteicos de insectos. Los concentrados de proteínas en general se obtienen a partir de diferentes técnicas que dependen del material que se requiere procesar. Gravel & Doyen (2020) recopilaron las metodologías y técnicas que se utilizan para la obtención de concentrados de proteína de diferentes fuentes para su uso en alimentos, con énfasis en las técnicas que son y pueden ser aplicados para la extracción de proteínas de insectos.

El procedimiento general consta de 5 etapas clave: (1) pretratamiento (2) desgrasado, (3) solubilización y recuperación de proteínas, (4) purificación de proteínas y (5) secado; estas etapas son opcionales de acuerdo al tipo de materia prima y requerimientos del producto final. La Tabla 9 describe de manera general estas etapas clave.

Tabla 9. Etapas clave para la obtención de concentrados y aislados proteicos (Gravel & Doyen, 2020).

Etapas	Descripción
Pretratamiento	Esta etapa depende del producto crudo que se tenga, en el caso de los insectos adultos enteros normalmente se secan (en horno, comal o liofilización), posteriormente se muelen y se tamizan, con la finalidad de obtener un polvo fino para promover el contacto proteína – solvente en los pasos siguientes.
Desgrasado	Este paso puede ser omitido si el material de partida tiene un bajo contenido de grasas. La eliminación de la grasa es un paso importante ya que tiene afecta directamente a la recuperación y pureza de las proteínas, debido a que las interacciones proteína - lípidos limitan la solubilidad de las proteínas. Para los insectos se utilizan solventes como: el hexano, etanol, mezclas de hexano – isopropanol, agua. Y además, pueden ser utilizadas tecnologías de desgrasamiento por CO ₂ supercrítico.

Tabla 9 (continuación)

Etapa	Descripción
<p>Solubilización y recuperación de proteínas</p>	<p>Generalmente las proteínas se extraen por pH y precipitación por sales.</p> <p>Los métodos utilizados para la solubilización y recuperación de proteínas son: extracción acuosa, el método alcalino y la precipitación isoeléctrica; estos dos últimos son los que se han reportado con mayor frecuencia. En el caso de los insectos se han utilizado tanto la solubilización acuosa como la alcalina.</p>
<p>Purificación de proteínas</p>	<p>Los métodos cromatográficos son utilizados para la purificación de proteínas específicas de un concentrado o aislado de proteínas, estos métodos incluyen la cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, fase inversa y filtración en gel.</p> <p>En el caso de insectos los métodos de purificación por cromatografía no han sido usados para concentrados con fines alimentarios. Sin embargo, estos métodos ya han sido utilizados para aislar enzimas a partir de insectos.</p>
<p>Secado</p>	<p>Los métodos usados para el secado final de concentrados de proteína el secado en horno, secado por aspersion, secado por microondas, liofilización.</p> <p>En el caso de proteína de insectos la técnica más utilizada a nivel laboratorio es la liofilización. Debido a las bajas temperaturas y la sublimación del agua resultante del proceso, la degradación microbiológica y oxidativa se detienen en gran medida.</p>

2.3. Reducción de la alergenicidad en insectos comestibles

Como se menciona en la sección de “alergenicidad y toxicidad de los insectos comestibles”, las proteínas de insectos pueden presentar riesgo de alergenicidad en personas alérgicas a los crustáceos, donde la tropomiosina es considerada el alérgeno principal de alergias cruzadas en algunos insectos (grillos y el gusano de la harina). Además de que se señala la alergenicidad como un inconveniente de inclusión de insectos como alimentos e ingredientes.

Sin embargo, existen diversos métodos que pueden reducir o eliminar la alergenicidad de las proteínas en los alimentos no basados en insectos, que pueden ser aplicados para reducir la alergenicidad en alimentos o ingredientes derivados de insectos. Estos métodos de procesamiento pueden inducir cambios en la estructura de las proteínas, la desnaturalización de proteínas y/o reducir la capacidad de unión de las proteínas a inmunoglobulinas E (anticuerpos asociados con alergias alimentarias) (Fu et al., 2019; Sun-Waterhouse et al., 2016).

Los métodos para la eliminación de alérgenos pueden ser químicos como el tratamiento con iones metálicos o ácidos; métodos biológicos, como la digestión enzimática; o físicos como los tratamientos térmicos, extrusión, altas presiones, microondas, luz ultravioleta pulsada, ultrasonido y ultra filtración (F. Hall & Liceaga, 2020; Sun-Waterhouse et al., 2016).

Actualmente se tienen pocos estudios que utilicen las metodologías anteriores para eliminar los alérgenos en insectos. La Tabla 10 muestra algunos trabajos enfocados en la eliminación de alérgenos en insectos.

Tabla 10: Metodologías utilizadas para la eliminación de alérgenos en insectos.

Método	Especies utilizadas	Resultados relevantes	Referencia
Hidrólisis enzimática e hidrólisis enzimática asistida por microondas	Grillo (<i>Grylloides sigillatus</i> : ortóptera)	Se encuentra que el uso de la hidrólisis asistida por microondas tiene una disminución más efectiva de tropomiosina el uso de la hidrólisis enzimática convencional.	(F. Hall & Liceaga, 2020)
Hidrólisis y procesos térmicos (Cocinado: 80°C, 10 min y autoclave: 121 °C, 20 min)	Langosta del desierto (<i>Schistocerca gregaria</i> : ortóptera)	Se elimina la reactividad de la tropomiosina IgE.	(Pali-Schöll et al., 2019)
Hidrólisis enzimática	Grillo domestico tropical (<i>Grylloides sigillatus</i> : ortóptera)	La reactividad de IgE a la tropomiosina disminuyó en los hidrolizados con un 60-85% de grado de hidrólisis	(F. Hall et al., 2018)
Proceso térmico (Ebullición: 100 °C, 5 min y Freído: 180 °C, 5 min)	Tres especies de gusano de la harina (<i>Tenebrio molitor</i> , <i>Zophobas atratus</i> y <i>Alphitobius diaperinus</i>)	Los procesamientos utilizados disminuyeron, pero no eliminaron, la reactividad de tropomiosina IgE.	(Van Broekhoven et al., 2016)

2.3.1. Proceso de ultrasonido para la eliminación de alérgenos

El ultrasonido es una tecnología de generación de ondas mecánicas a una frecuencia por encima del umbral de la audición humana (> 16 kHz), ha mostrado tener diversas aplicaciones alimentarias como en el secado, esterilización,

inactivación enzimática, extracción, filtración o la homogeneización (Mirmoghadaie et al., 2016; Onwude et al., 2017).

El ultrasonido se puede clasificar en dos grandes grupos: (1) ultrasonido de alta frecuencia (baja energía, baja intensidad) con frecuencias mayores a 100 kHz; y (2) ultrasonido de baja frecuencia (alta energía, alta intensidad) con un rango de frecuencias de 16–100 kHz). El ultrasonido de baja frecuencia que es conocido también como “ultrasonido de potencia” se utiliza para inducir cambios en las propiedades físicas y químicas de los alimentos. Estos efectos son consecuencia de la cavitación (Onwude et al., 2017).

La cavitación se refiere a la formación y explosión de burbujas de gas. Estas burbujas se generan a partir de los ciclos alternos de presión positiva y negativa, que se producen al aplicar el ultrasonido en un medio líquido. Las burbujas de cavitación oscilan, crecen y explotan, lo que produce puntos de calor de hasta 5000 K de temperatura y 50 MPa de presión en cortos tiempos. Además de la producción de puntos de calor, otros efectos de la cavitación son las ondas de choque y microjets (efectos físicos), así como la formación de radicales hidroxilo mediante la ruptura de moléculas de agua que pueden causar modificaciones químicas como causar o acelerar reacciones (efectos químicos) (Chen et al., 2020; W. Li et al., 2021; Onwude et al., 2017).

Los efectos físicos de la cavitación fuerzan a las moléculas a chocar con una fuerza mayor que conduce a la ruptura de enlaces hidrofóbicos y de van der Waals. Por otro lado, los radicales hidroxilo pueden oxidar a las proteínas (W. Li et al., 2021).

Lo anterior ocasiona cambios en la estructura y funcionalidad de las proteínas. En el caso específico de la tropomiosina, se ha reportado que los tratamientos con ultrasonido oxidan a las proteínas en las cisteínas, metioninas y lisinas; degradan la proteína generando fragmentos proteicos, desdoblamiento la conformación alfa-hélice

y aumentan las conformaciones de lámina beta. Estos cambios estructurales y de degradación pueden evitar la unión proteína – IgE (anticuerpos asociados con alergias alimentarias) y por lo tanto, inhibir la reacción alérgica (Chizoba Ekezie et al., 2018; W. Li et al., 2021; Shriver & Yang, 2011; Soria & Villamiel, 2010; Zhang et al., 2018).

Diferentes estudios han utilizado el ultrasonido para inhibir la alergenicidad de la tropomiosina en alimentos, la Tabla 11 muestra algunos estudios que utilizan el ultrasonido para la reducción de la capacidad de unión de tropomiosina – IgE.

Tabla 11: Trabajos donde se utiliza el ultrasonido para la reducción de alergenicidad de la tropomiosina.

Especie utilizada	Condiciones de tratamiento	Resultados relevantes	Referencia
Camarón (<i>Exopalaemon modestus</i>)	Muestras tratadas a diferentes potencias (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 W) y 20 Hz durante 15 minutos	Se encontró una mayor reducción de alérgenos con potencias mayores y en la potencia de 800 W se encuentra ausencia de alérgenos. Sin embargo los autores sugieren el uso de la técnica ELISA como método de confirmación de los resultados	(Zhang et al., 2018)
Camarones (<i>Penaeus vannamei</i>)	Tratamiento de ultrasonido de alta intensidad (30 Hz, 800 W) durante 30 – 180 min	Se encontró una disminución del contenido de alérgenos directamente proporcional al tiempo del tratamiento. Se encuentra una reducción del 12.9 para un tiempo de 30 min y de 81.3 % para 180 min	(Z. xing Li et al., 2006)

Tabla 11 (Continuación)

Especie utilizada	Condiciones de tratamiento	Resultados relevantes	Referencia
Camarón (<i>Penaeus vannamei</i>)	Tratamiento de ultrasonido de alta intensidad (30 Hz, 800 W) durante 180 min con la variación de temperatura (0 y 50 °C)	Se encuentra una reducción de 2.5 veces de la reactividad con IgE en comparación al control	(Zhenxing et al., 2006)

En la Tabla 11 se observa que los trabajos realizados se han enfocado en camarones. Es importante mencionar que, en la revisión de literatura, el ultrasonido para la reducción de alérgenos aún no se ha utilizado en insectos y sus derivados. Se ha encontrado que los insectos contienen tropomiosina, y que este alérgeno se considera como el principal en alergias cruzadas. Por lo tanto, se propone el uso de ultrasonido para la eliminación de este alérgeno en un extracto de proteína de insecto.

El tratamiento con ultrasonido también puede proporcionar mejoras en las características tecnofuncionales de las proteínas del concentrado, como lo son la solubilidad y propiedades emulsionantes (Mishyna, Martinez, Chen, Davidovich-Pinhas, et al., 2019). La solubilidad de las proteínas aumenta después de la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia, debido diferentes aspectos: (1) el cambio de la estructura de las proteínas produce la exposición las partes hidrofóbicas de los aminoácidos, lo que mejora las interacciones proteína – agua; (2) la reducción del peso molecular de la proteína proporciona un área de contacto más grande para la interacción proteína – agua (Jiang *et al.*, 2014; Jambrak *et al.*, 2008). Como se mencionó en la Tabla 8, una buena solubilidad de la proteína es importante para la formación de emulsiones, espumas y geles en productos

alimenticios, además de que las proteínas solubles tienen una mayor aplicación en alimentos.

Se ha mostrado que el tratamiento con ultrasonido mejora la capacidad de formación de emulaciones y la capacidad de formación de espuma. La capacidad de formación de emulsión mejora debido a que la proteína presenta una mejor absorción en la interfaz aceite – agua, ocasionada por la disminución del tamaño de gota y el cambio de estructura de las proteínas después del tratamiento. Mientras que la capacidad de formación de espuma mejora debido al efecto de homogenización del ultrasonido que induce a las proteínas y grasas a dispersarse de una manera uniforme, así como al cambio de estructura de la proteína (Mishyna, Martinez, Chen, Davidovich-Pinhas, et al., 2019).

3. Justificación

Los insectos comestibles han adquirido interés como alimento debido a sus ventajas nutricionales, sociales y ambientales. Desde el año 2003 la FAO ha promovido a nivel mundial su consumo como una fuente de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas. Actualmente existen más de 2 000 especies de insectos comestibles en el mundo consumidos en distintas etapas de desarrollo (huevos, larvas, pupas, ninfas o adultos). La ingesta de estos insectos es considerada una tradición en diferentes países, con un consumo dependiente de la cultura y región geográfica.

Los insectos son una fuente alternativa de proteína con una calidad proteica comparable a la carne y el huevo; además de que tienen una calidad y digestibilidad mayor en comparación con la mayoría de las fuentes de proteína vegetal. Los insectos como alimento también son considerados como amigables con el medio ambiente, ya que se requieren menor cantidad de recursos y generan una emisión menor de gases de efecto invernadero en comparación con fuentes de alimento animal; lo anterior, más la alta eficiencia de conversión alimenticia, también puede proporcionar ventajas económicas.

A pesar de esto, existe una tendencia alta al rechazo de los insectos como alimentos, debido a la naturaleza humana de rechazar alimentos nuevos o desconocidos, denominado como “neofobia”. Otra desventaja de los insectos como alimento es el riesgo de alergenidad. Debido a que el componente principal de los insectos son proteínas, es posible que algunos insectos sean fuentes de alérgenos; además es posible que personas alérgicas a los crustáceos sean alérgicas a los insectos ya que éstos se encuentran taxonómicamente relacionados. El principal alérgeno proteico encontrado en insectos es la tropomiosina.

Una de las alternativas para el aumento de la aceptación de los insectos como alimento es la extracción de las proteínas, para su uso en alimentos. Por otro lado, la alergenicidad puede ser reducida o eliminada a partir de métodos de procesamiento que modifiquen la estructura de las proteínas, desnaturalicen las proteínas y/o reduzcan la capacidad de unión de las proteínas a la inmunoglobulina E (anticuerpo relacionado con alergias alimentarias).

En cuanto a la alergenicidad de los insectos, una de las tecnologías prometedoras para la eliminación de estos en insectos es el uso de ultrasonido de alta intensidad, que puede ocasionar cambios en la estructura de las proteínas a partir de los efectos químicos y físicos de la cavitación producida, lo que ocasiona cambios en la estructura de la proteína y como consecuencia de estos se puede evitar la unión proteína – IgE, y por lo tanto también la reacción alérgica. Es de importancia mencionar que México es uno de los países con mayor biodiversidad de insectos comestibles, donde se encuentran los chapulines de la milpa (*Sphenarium purpurascens*) pertenecientes a los ortópteros, los cuales son posiblemente los insectos comestibles más conocidos en América Latina y de mayor abundancia en México. Esta especie contiene de 56 % - 75.87 % de proteína de alta calidad, que contiene todos los aminoácidos esenciales y algunos de estos en contenidos mayores que la carne de res o el huevo.

Por lo anterior el presente proyecto propone la obtención de un concentrado de proteína a partir de *S. purpurascens*, además de evaluar el efecto del ultrasonido como método en la reducción y eliminación de alérgenos, lo que permitirá la diversificación de su uso.

4. Objetivos

General

Obtener un extracto proteico a partir del chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*) sin efectos alergénicos causados por la tropomiosina mediante el uso de ultrasonido de baja frecuencia.

Específicos:

- Determinar las condiciones de extracción para la obtención de un extracto de proteínas a partir de *S. purpurascens*.
- Eliminar la tropomiosina mediante un diseño del tratamiento ultrasónico de baja frecuencia para el extracto de *S. Purpuracens*.
- Describir las propiedades tecnofuncionales del extracto de proteína de *S. purpurascens*.

5. Metodología

5.1. Materia prima

En el presente estudio se utilizó chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*) en su estadio de adulto, perteneciente a los ortópteros. Los chapulines fueron proporcionados por la empresa Delinsect ubicada en Av. Paseo del Bosque lote 8, Bosques de Morelos, Cuautitlán Izcalli, Ciudad de México.

Delinsect obtiene los chapulines de campos libres de herbicidas y pesticidas, ubicados en Oaxaca y Puebla. La materia prima proporcionada cuenta con el siguiente procesamiento: ayuno, sacrificio por escaldado y almacenamiento en congelación.

5.2. Determinación de las condiciones de extracción para la obtención de un extracto proteico de *S. purpurascens*.

Para la obtención del extracto proteico se utilizó como base el método de extracción alcalina reportado por Zielińska et al., (2020), que consiste en la solubilización de las proteínas en una solución de NaOH en el pH de mayor solubilidad de las mismas, seguido de una centrifugación y posteriormente una precipitación isoeléctrica, para finalmente recuperar las proteínas precipitadas por medio de una centrifugación. Para la aplicación de este método de extracción primeramente se realizó un acondicionamiento de la materia prima para facilitar su manejo en los pasos siguientes de extracción.

5.2.1. Acondicionamiento de la materia prima

Los insectos se descongelaron a temperatura ambiente y secaron en horno de convección a una temperatura de 40°C durante 48 h, para su posterior molienda con un molino de cuchillas y tamizado en una malla #50, el polvo de insecto se desgrasó colocandolo con etanol. Para lo cual, se colocó el polvo de insecto en

etanol al 96 % con una proporción 1:10 (p/v), se dejó en agitación durante 24 h, posteriormente la mezcla se centrifugó a 3 500 xg por 20 min a temperatura ambiente, recuperándose el precipitado para su posterior secado en horno de convección a 40 °C durante 48 h. Finalmente se determinó el contenido de proteína (AOAC 32.1.22.) y lípidos (AOAC 30.10.) antes y después del acondicionamiento de la materia prima.

5.2.2. Determinación de las condiciones de extracción de proteína

El polvo de insecto se utilizó para determinar la solubilidad de las proteínas presentes, para encontrar el pH con menor y mayor solubilidad, datos necesarios en la búsqueda del punto isoeléctrico de las proteínas y el proceso de extracción.

Curva de solubilidad del polvo de Chapulín

La solubilidad se determinó mediante la metodología de Mishyna et al. (2019) con modificaciones. Las muestras (0.8 g) se dispersaron en agua destilada (40 ml) y se ajustó el pH en un rango de 3 a 12 mediante la adición de 1 M NaOH o 1 M HCl. La dispersión se agitó con vórtex durante 30 s a temperatura ambiente. Posteriormente, las dispersiones se centrifugaron a 3 000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteína del sobrenadante mediante el método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-Rad). La solubilidad de la proteína se calculó como una relación entre la proteína soluble en el sobrenadante y el contenido de proteína total.

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{\text{Proteína en el sobrenadante (g)}}{\text{Proteína inicial (g)}} * 100$$

Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas

Después de que se encontraron los valores de pH donde se obtiene una máxima y una mínima solubilidad de las proteínas presentes, se prosiguió a buscar el punto isoeléctrico de las proteínas del polvo de chapulín. Para lo que se utilizaron 5 g de polvo, y se colocaron en 50 ml de NaOH al 0.2 %, el pH se ajustó al pH de máxima solubilidad a temperatura ambiente, y posteriormente se colocó en agitación durante 1 h. Pasado el tiempo, la mezcla se centrifugó a 8 000 *g* durante 20 min, para la recuperación de la fase proteica. Posteriormente se utilizó un diseño unifactorial, con la variación del pH en el rango de menor solubilidad proteica, para obtener diferentes precipitaciones de proteínas; seguido de una centrifugación a 8 000 *g* durante 20 min y una temperatura de 4 °C para la recuperación del precipitado, el cual se secó en horno a 40 °C durante 24 h. Finalmente se determinó el rendimiento de extracción y el contenido de quitina como variables respuesta.

La determinación del rendimiento de extracción se calculó como una relación entre el contenido de proteína en el extracto final y el contenido de proteína inicial determinados por el método de Kjeldalh, el cual será explicado con mayor detalle más adelante (sección 5.4.1.1.).

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{Proteína final (g)}}{\text{Proteína inicial (g)}} * 100$$

Por otro lado, el contenido de quitina, se determinó con la metodología de Adámková et al. (2017). La cantidad de muestra utilizada fue de 1.0 g, a la cual se le adicionó 100 mL de HCl 1 M; la mezcla se colocó a 100 °C por 1 h. Posteriormente se filtro al vacío con papel filtro Whatman N. 1. Se realizaron lavados con agua caliente al residuo y adicionalmente se realizó un lavado con KOH al 5 % lo que provocó la saponificación de las grasas, aumentando así su

solubilidad en agua y permitiendo el lavado de la muestra con agua caliente hasta obtener un pH neutro. El residuo fue recuperado en un matraz, al cual se le añadió 100 mL de NaOH 1 M; la mezcla se colocó a 80 °C por 20 h; pasado este tiempo la muestra se filtró al vacío con papel filtro Whatman N. 1 llevado previamente a peso constante. Los filtros con los sólidos recuperados se secaron en horno a 40 °C durante 24 horas. Finalmente se determinó cenizas al residuo sólido. La determinación se realizó por triplicado. El contenido de quitina se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{Quitina} = \frac{(\text{PesoResiduo} - \text{Pesocenizas}) * 100}{\text{Pesodelamuestra}}$$

5.3. Diseño de tratamiento ultrasónico para la eliminación de tropomiosina

Los tratamientos de ultrasonido se realizaron con el uso de un procesador Cole Palmer de 500 vatios, con una frecuencia fija de 20 kHz. Para la sonicación de 100 mL de muestra se emplearon recipientes de vidrio con una re - circulación de agua fría como se muestra en la Figura 10. Se utilizó un diseño factorial completo con tres réplicas, donde los factores a evaluar fueron tiempo (0, 5, 10, 15 y 20 min) y potencia (400 y 500 W). Además, se monitoreó el aumento de temperatura como una covariable, utilizando un sensor tipo K sumergido en la muestra, usando el software DMM view para registrarla, en grados centígrados. La variable respuesta fue la concentración del alérgeno.

Las unidades experimentales se prepararon en una proporción de 1:20 (p/v) de proteína de insecto y agua destilada. Después del tratamiento, las muestras se liofilizaron con un equipo freeze dry system labconco, durante 4 días y se almacenaron a -20 °C hasta su uso para la detección del alérgeno a través el método ELISA.



Figura 10: Equipo Cole-Parmer Ultrasonic Cleaner, Heater/Digital Timer con adaptaciones para una re-circulación de agua fría y la medición de temperatura con un sensor termopar tipo K.

5.3.1. ELISA tipo Sandwich para la detección de tropomiosina

Se utilizó el kit de ELISA Sandwich (Shrimp Tropomyosin ELISA 2.0, Indoor Biotechnologies, EE. UU.) para determinar el contenido de tropomiosina de las muestras, el cual ya ha sido utilizado con anterioridad para la determinación de tropomiosina grillo rayado (*Grylodes sigillatus*), perteneciente al orden ortóptera por F. Hall & Liceaga (2020).

El kit ELISA contiene una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-tropomiosina y reactivos que incluyen: (1) estándares del alérgeno para una concentración de 20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 ng / ml; (2) diluyente de muestra (concentrado 10X); (4) IgG de cabra anti-conejo conjugada con

peroxidasa, (5) solución de lavado (concentrado 20X), (6) Solución de ácido sulfúrico 0,5 N (para detener la reacción), (7) Solución de cromógeno A y B

De acuerdo con el protocolo proporcionado por el kit, a cada pocillo de la placa de microtulación se le agregaron 50 ml del estándar o 50 ml de una solución de la muestra con un contenido de 5 mg de proteína total a un pH de 7, y a cada uno de estos se le añadió 100 ml de la solución de IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa, mezclando suavemente evitando la formación de espuma. Para su posterior incubación durante 60 min a 37 °C.

Después del tiempo de incubación, la placa fue lavada cuatro veces con la solución de lavado y colocada boca abajo en una servilleta de papel para eliminar el exceso de líquido, evitando dejar la placa descubierta por un tiempo prolongado. Posteriormente se añadieron 50 ml del cromógeno A, seguido de 50 ml del cromógeno B mezclando suavemente y evitando la formación de espuma, para su posterior incubación durante 15 minutos a 37 °C en obscuridad. Después de este tiempo, se añadió 50 ml de la solución de ácido sulfúrico 0.5 N para detener la reacción y se utilizó un lector de microplacas para el registro de la densidad óptica a 450 nm dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución de ácido sulfúrico. La concentración de tropomiosina se calculó según la curva estándar obtenida con las soluciones estándar. La determinación se informa como el promedio de tres repeticiones.

5.3.2. Distribución molecular (SDS-PAGE)

La determinación de la distribución del peso molecular de las proteínas del extracto sin sonicación y los diferentes tratamientos de sonicación se realizó por una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) mediante el método de Laemmli (1970). Se utilizó 10 mg de proteína de cada una de las muestras, las cuales se mezclaron en proporción 1:1 con buffer de carga Laemmli 2x con 5 % de β -mercaptoetanol, posteriormente se incubaron a 100 °C

durante 5 min y se dejaron enfriar en hielo, antes de aplicarse al gel de acrilamida al 12 %. El marcador molecular utilizado fue Precision Plus Protein™ (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 90 min. Las proteínas se tiñeron por 1 hora con azul Coomassie, posteriormente el gel se lavó con agua destilada y con una solución de lavado (preparada con 100 mL de metanol, 25 mL de ácido acético y 125 mL de agua) para remover el exceso de colorante.

5.4. Composición proximal y determinación de propiedades funcionales del Chapulín y extractos obtenidos.

El chapulín, el extracto proteico y el extracto con el tratamiento de ultrasonido que proporcionó una mayor disminución del alérgeno fueron analizados en cuanto a su composición proximal en base seca, de acuerdo a las metodologías de: (1) AOAC para el contenido de proteína, grasas y cenizas; (2) kit de ensayo de fibra dietética (zigma) para el contenido de fibra soluble e insoluble; (3) metodología reportada por Adámková et al. (2017) para el contenido de quitina.

Por otro lado también se le determinó al chapulín y a los extractos con y sin sonicación las siguientes propiedades funcionales: (1) solubilidad (Mishyna, Martinez, Chen, & Benjamin, 2019), (2) capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite (Ahmedna *et al.*, 1999), (3) capacidad de formación y estabilidad de emulsiones (Zielińska et al., 2018), (4) capacidad de formación de gel (Mishyna, Martinez, Chen, & Benjamin, 2019) (5) distribución molecular por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), y (6) digestibilidad de las proteínas (Ndiritu *et al.*, 2017).

5.4.1. Composición proximal

5.4.1.1. Proteína

La cantidad de proteína fue determinada por el método de Kjeldahl (32.1.22.), con el uso de un equipo digestor Kjeldigester K-446/K-449 y un una unidad de destilación K-350 (Buchi). La cantidad de muestra utilizada fue de 0.5 g, a la cual se le adicionó 1 pastilla catalizadora Kjeldahl y 15 mL de H₂SO₄ concentrado para la digestión de la muestra. Posteriormente se realizó la destilación de la muestra y titulación con 0.1 N de HCl. La determinación se realizó por triplicado. El porcentaje de nitrógeno y de proteína se calculó por las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ de nitrógeno} = \frac{(mL \text{ ácido valorante} - mL \text{ blanco}) \times (N \text{ del ácido}) \times (P_{eqN}) \times (100)}{\text{Peso de la muestra en gramos}}$$

donde:

N del ácido: Normalidad de la disolución de HCl (0.1N)

P_{eqN}: Peso equivalente del nitrógeno (0.014007)

$$\% \text{ de Proteína} = (\% \text{ de nitrógeno}) \times (\text{Factor de conversión})$$

Donde el factor de conversión es de 5.60 reportado previamente por Janssen et al. (2017).

5.4.1.2. Lípidos

El contenido de lípidos fue determinado por el método de Soxhelt (30.10.), con el uso de equipo Soxhelt. Se pesaron 2 g de muestra en un filtro de papel Whatman N. 4, de la cual se extrajo el contenido de grasas con éter de petróleo. La determinación se realizó por triplicado. El contenido de grasa se reportó como el porcentaje en masa de los lípidos extraídos con el uso de la ecuación:

$$\% \text{Grasa} = \frac{(\text{Pesodelvaso} + \text{grasa (g)} - \text{pesodelvasovacio (g)}) * (100)}{\text{Pesodelamuestra (g)}}$$

5.4.1.3. Cenizas

El contenido de cenizas fue determinado por el método de la AOAC (954.46). Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un crisol previamente llevado a peso constante, se incineró la muestra en una mufla a 550 °C durante 6 h, hasta que el contenido del crisol mostró un color blanco. Posteriormente los crisoles se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron. La determinación se realizó por triplicado. El contenido de cenizas se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{(\text{Pesodelcrisol} + \text{cenizas (g)} - \text{pesodelcrisolvacio (g)}) * (100)}{\text{Pesodelamuestra (g)}}$$

5.4.1.4. Fibra dietaría

El contenido de fibra soluble e insoluble se determinó con un kit de ensayo de fibra dietética (zigma). Se peso 1 g de muestra en un matraz de 125 mL y en forma paralela se utilizó un blanco para la medición de la contribución de los reactivos al resultado final.

Fibra insoluble:

A la muestra se le adicionó 50 mL de amortiguador de fosfatos 0.08 M pH 6 y 100 µL de α-amilasa termoestable, la mezcla se incubó a ebullición por 30 minutos con agitación cada 5 minutos. Posteriormente la muestra se enfrió a temperatura ambiente y el pH se ajustó a 7.5 con la adición de NaOH 0.275 M para la adición de 100 µL de proteasa (5 mg/mL de amortiguador de fosfatos). Las muestras se

incubaron en baño maría a 60 °C con agitación constante durante 30 min, pasado el tiempo se enfrió a temperatura ambiente y se ajustó el pH a 4.5 con HCl 0.325 M para la adicción de 300 µL de amiloglucosidasa, después de ello las muestras se incubaron nuevamente en baño maría a 60 °C por 30 min. Al terminar el tiempo de incubación, se retiró el matraz del baño de agua, se enfriaron a temperatura ambiente y se filtraron en papel Whatman N 4 llevado previamente a peso constante, finalmente secado en estufa a 40 °C por 24 h.

Fibra soluble:

Al líquido de filtración recuperado de la fibra insoluble se le adicionó el mismo volumen de etanol al 80 % y se dejó en refrigeración durante 48 h. Después de este tiempo se filtró al vacío con papel filtro Whatman N 42. EL papel filtro se secó en estufa a 40 °C por 24 h.

A los residuos de fibra soluble e insoluble, así como los blancos se les determinó proteína por el método de Kjeldahl y cenizas (AOAC 954.46). La determinación se realizó por triplicado. El contenido de fibra dietaría se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{Fibra dietaría} = \frac{(\text{Peso Residuo} - \text{Peso Proteína} - \text{Peso cenizas} - B) * (100)}{\text{Peso de la muestra}}$$

donde

$$B = \text{Peso residuo del blanco} - \text{peso proteína del blanco} - \text{Peso cenizas del blanco}$$

5.4.1.5. Quitina

El contenido de quitina se determinó con la metodología de Adámková *et al.* (2017). La cantidad de muestra utilizada fue de 1.0 g, a la cual se le adicionó 100

mL de HCl 1 M; la mezcla se colocó a 100 °C por 1 h. Posteriormente se filtró al vacío con papel filtro Whatman N. 1. Se realizaron lavados con agua caliente al residuo y adicionalmente se realizó un lavado con KOH al 5 % lo que provocó la saponificación de las grasas, aumentando así su solubilidad en agua y permitiendo el lavado de la muestra con agua caliente hasta obtener un pH neutro. El residuo fue recuperado en un matraz, al cual se le añadió 100 mL de NaOH 1 M; la mezcla se colocó a 80 °C por 20 h; pasado este tiempo la muestra se filtró al vacío con papel filtro Whatman N. 1 llevado previamente a peso constante. Los filtros con los sólidos recuperados se secaron en horno a 40 °C durante 24 horas. Finalmente se determinó cenizas al residuo sólido. La determinación se realizó por triplicado. El contenido de quitina se determinó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{Quitina} = \frac{(\text{PesoResiduo} - \text{Pesocenizas}) * (100)}{\text{Pesodelamuestra}}$$

5.4.2. Propiedades funcionales

5.4.2.1. Solubilidad

La solubilidad se determinó mediante la metodología de Mishyna et al. (2019) descrita en la sección 5.2.2. de este documento. Con el uso de 0.4 g de muestra y 20 ml de agua destilada. El pH de la disolución se ajustó en un rango de de 3 a 12 mediante la adición de 1 M NaOH o 1 M HCl. La dispersión se agitó con vórtex durante 30 s a temperatura ambiente. Posteriormente, las dispersiones se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó la concentración de proteína del sobrenadante mediante el método de Bradford. La solubilidad de la proteína se calculó como una relación entre la proteína soluble en el sobrenadante y el contenido de proteína total.

$$\% \text{ solubilidad} = \frac{\text{Proteína en el sobrenadante (g)}}{\text{Proteína inicial (g)}} * 100$$

5.4.2.2. Capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite

La capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite se determinó por el método utilizado por Ahmedna *et al.* (1999) con modificaciones. La cantidad de muestra utilizada fue de 0.5 g, a la cual se le adicionó 5 mL de agua destilada o 5 ml de aceite vegetal comercial, según sea el caso, en tubos Falcon de 50 mL previamente pesados. La mezcla se agitó con vórtex durante 30 s a temperatura ambiente. Posteriormente, las dispersiones se centrifugaron a 3000 *g* durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado y se registró el peso del tubo con el precipitado. La determinación se realizó por triplicado y la capacidad de retención de agua y capacidad de retención de aceite se reportan en gramo de agua o gramo de aceite absorbido por gramo de muestra, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de retención de agua o aceite} = \frac{\text{Peso del tubo con el precipitado} - \text{Peso del tubo}}{\text{Peso de la muestra}}$$

5.4.2.3. Capacidad de formación y estabilidad de emulsiones

La capacidad de formación y estabilidad de emulsión se determinó por el método utilizado por Zielińska *et al.* (2018). El peso de muestra fue de 0.5 g, la cual se colocó en agua destilada para obtener una solución al 1 % (p/v). Se mezclaron 10 mL de la solución y 10 mL de aceite vegetal en un tubo falcon de 50 mL. Posteriormente se homogenizó la dispersión a una velocidad de 20 000 rpm durante 1 minuto. El homogenizado se centrifuga a 3000 *g* durante 5 min a

temperatura ambiente y se registró el volumen de las capas formadas. Para la medición de la estabilidad de la emulsión, se calentó la emulsión formada durante 30 min a 80 °C en baño maría. Después del tiempo de incubación, la emulsión se centrifugó a 3 000 g por 5 min a temperatura ambiente y se registró el volumen de las capas formadas. La determinación se realizó por triplicado. La capacidad de formación y estabilidad de emulsión se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Capacidad de formación de emulsión (\%)} = \frac{V_e}{V} * 100$$

$$\text{Estabilidad de la emulsión (\%)} = \frac{V_{30}}{V_e} * 100$$

Donde:

V: Volumen total del contenido del tubo

V_e: Volumen de la capa emulsionada

V₃₀: Volumen de la capa emulsionada después del calentamiento

5.4.2.4. Capacidad de formación de geles

La capacidad de formación de gel se determinó por el método utilizado por Mishyna et al. (2019) Mishyna et al. (2018). La cantidad de muestra utilizada fue de 0.1 g, la cual se colocó en agua destilada para obtener una solución al 2 % (p/v), a un pH de 7, 10 y 3.6. Las suspensiones se colocaron en agitación durante una hora y posteriormente se centrifugó a 3 000 g por 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado y se dividió en dos porciones. Se mezcló 1 mL de la primera porción ("antes de calentar") con reactivo de Biuret (4 mL) y se almacenó en un lugar oscuro durante 30 min, después del tiempo de reposo, se midió la absorbancia a 540 nm. La segunda porción ("después de

calentar") se calentó a 86 °C en baño maría durante 30 min, después de este tiempo se colocó en un baño de hielo. Y posteriormente se centrifugó a 3 000 g por 20 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se utilizó un mL del sobrenadante para la medición de la absorbancia con las mismas condiciones para la primera porción. La determinación se realizó por triplicado y la capacidad de formación de gel se reporta en porcentaje de proteínas gelificadas, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de formación de gel (\%)} = \frac{(A_1 - A_2)}{A_1} * 100$$

Donde:

A₁: Absorbancia antes de calentar

A₂: Absorbancia después de calentar

5.4.2.5. Digestibilidad

La digestibilidad proteica se determinó *in vitro* por el método utilizado por Ndiritu *et al.*, (2017) con modificaciones. La muestra utilizada fue de 0.5 g, la cual se expuso a condiciones gástricas simuladas agregando 10 mL de saliva artificial y 80 mL de jugo gástrico simulado. Las muestras se homogenizaron manualmente por 1 minuto y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Después del tiempo de incubación, la muestra fue expuesta a condiciones intestinales simuladas, para lo cual la muestra se centrifugó 6000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se recuperó el precipitado al cual se le agregaron 27 mL de jugo intestinal simulado, para su posterior incubación a 37 °C durante 4 horas. Después del tiempo de incubación la muestra se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones y se recuperó el precipitado, el cual se secó en horno a 40 °C durante 24 horas. Finalmente se

determinó el contenido de proteína por el método de Kjeldahl. La determinación se realizó por triplicado y la digestibilidad proteica se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{P_i(g) - P_f(g)}{P_i(g)} * 100$$

Donde:

Pi: Proteína antes del proceso de digestión (g)

Pf: Proteína después del proceso de digestión (g)

5.4.3 Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de extracción de proteínas y el tratamiento de ultrasonido para la eliminación de tropomiosina se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando el software R studio (Versión 1.4.1103). En el caso de la determinación de las condiciones de extracción se aplicó una prueba de Tukey para la comparación de medias, mientras que en el caso del contenido de tropomiosina se aplicó la prueba de Dunnett para la comparación de medias entre las muestras y la proteína del insecto sin tratamiento ultrasónico.

6. Resultados y discusión

6.1. Determinación de las condiciones de extracción para la obtención de un extracto proteico de *S. purpurascens*.

Acondicionamiento de la materia prima

La cantidad de polvo de insecto obtenido después del proceso de acondicionamiento de la materia prima fue en promedio de 221.91 ± 10 g por cada

kilogramo de insecto congelado. Además, el proceso de desgrasado aplicado al polvo de insecto redujo el contenido de lípidos en un 76.99 %. Lo anterior es considerado un paso importante en para los procesos de extracción proteica de acuerdo a Gravel & Doyen (2019), debido a que al obtener un polvo fino a partir de la molida y tamizado se promueve el contacto proteína – solvente en los pasos siguientes. Por otro lado, la eliminación de lípidos impacta directamente en la recuperación y pureza proteica del producto final, debido a la naturaleza hidrofóbica de los lípidos, las interacciones proteína-lípido pueden limitar la solubilidad de las proteínas del insecto.

Curva de solubilidad del polvo de Chapulín

El polvo del insecto fue utilizado para la determinación de la solubilidad de las proteínas del insecto. La Figura 11 muestra la solubilidad de las proteínas en porcentaje de acuerdo al pH. La solubilidad aumentó a medida que el pH aumentaba, hasta alcanzar la mayor solubilidad a un pH de 12 ($70.68 \pm 1.70\%$), mientras que la menor solubilidad se encontró en el pH de 3.0 – 4.0. Esto se debió a que los cambios de pH afectan la carga neta general de las proteínas lo que influye en las interacciones electrostáticas entre las proteínas; lo que provoca que éstas permanezcan en solución o se aglomeren y precipiten (Chatsuwan *et al.*, 2018). La curva de solubilidad no muestra el perfil típico en forma de U, y se observa que, aunque pareciera que la solubilidad tiende a aumentar conforme aumenta el pH, los valores de solubilidad en el rango de pH de 9 – 10 son muy similares. Lo cual puede deberse a la cantidad y variabilidad de proteínas presentes, ya que patrones irregulares en las curvas de solubilidad, como la curva obtenida, se suelen observar en extractos proteicos donde se tiene una mezcla de proteínas heterogéneas como lo menciona Purschke *et al.* (2018).

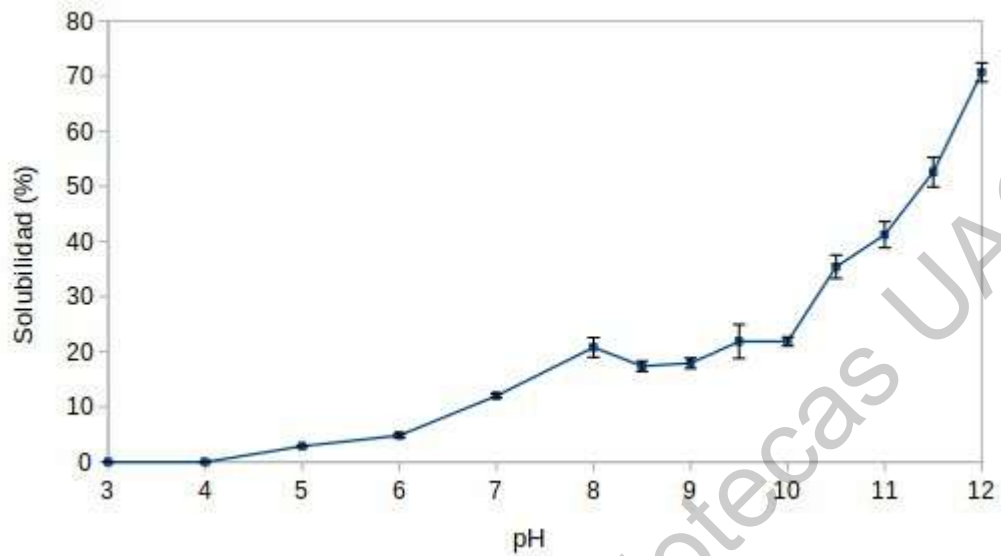


Figura 11: Porcentaje de solubilidad de las proteínas de Chapulín a diferentes pH. Los resultados se presentan como promedio de tres réplicas \pm desviación estándar.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados para las proteínas de otras especies de insectos; donde los pH alcalinos suelen ser aquellos en los que existe una mayor solubilidad, como es el caso de *Schistocerca gregaria*, *Apis mellifera*, *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens* que presentan una solubilidad máxima en un pH de 10 y la *Locusta migratoria* en un pH de 9; mientras que los rangos de una menor solubilidad se presentan a pH ácido. En el caso de las especies mencionadas anteriormente la menor solubilidad se reporta en un pH 4 excepto para *Apis mellifera* con una menor solubilidad en pH 5 (Gravel & Doyen, 2019; Mishyna *et al.*, 2018; Purschke *et al.*, 2018; Bubler *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

Determinación del punto isoeléctrico de las proteínas

Una vez establecidos el pH de mayor y de menor solubilidad, se prosiguió con la búsqueda del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas del insecto. El cual se seleccionó de acuerdo con el rendimiento y contenido de quitina, resultante del uso de pH 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8 y 4.0 (rango de menor solubilidad) para la precipitación isoeléctrica requerida en el proceso de extracción.

Los rendimientos obtenidos se encuentran en un rango de 85.92 ± 1.59 a 88.78 ± 1.32 % (Figura 12A), y las comparaciones múltiples de Tukey no fueron estadísticamente significativas (Figura 12B). Por otro lado, al evaluar el contenido de quitina (Figura 12C), el contenido de quitina más bajo fue de 8.77 ± 0.28 % a un pH de 3.6, mientras que el contenido de quitina más alto fue de 10.77 ± 0.76 % a un pH de 4.0. Sin embargo, la prueba de Tukey para el contenido de quitina (Figura 12D) no detectó diferencias significativas con el cambio de pH. Por lo tanto, de acuerdo con estos resultados, se identificó un pH = 3.6 como el de mayor rendimiento (88.78 ± 1.32 %) y menor cantidad de quitina (8.77 ± 0.28 %); el cual se seleccionó como punto isoeléctrico de las proteínas presentes en el insecto.

El punto isoeléctrico obtenido, se encuentra dentro del rango mencionado por Gravel & Doyen (2019) de 3.0 – 6.5, para las proteínas de los alimentos; además de ser similar a los reportados para otras especies de insectos del orden ortóptera, como *Schistocerca gregaria* (pI= 4), *Patanga succincta* (pI = 4), *Chondracris rosea* (pI= 4) y *Gryllodes sigillatus* (pI= 3) (Chatsuwan et al., 2018; Hall et al., 2017).

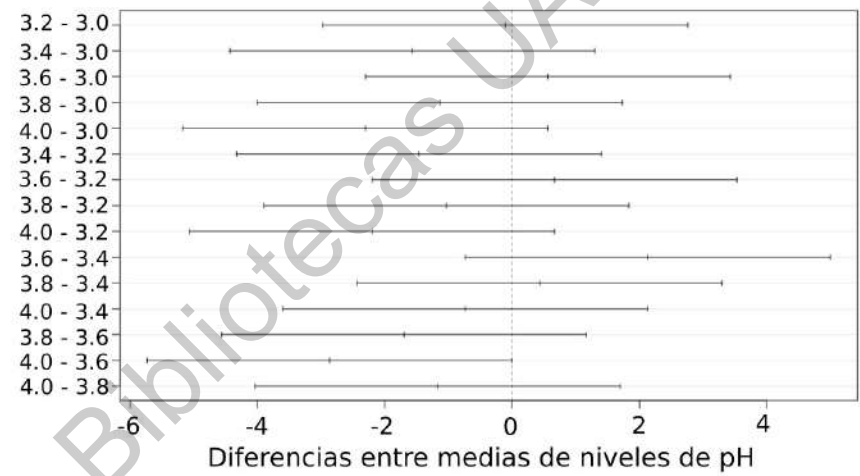
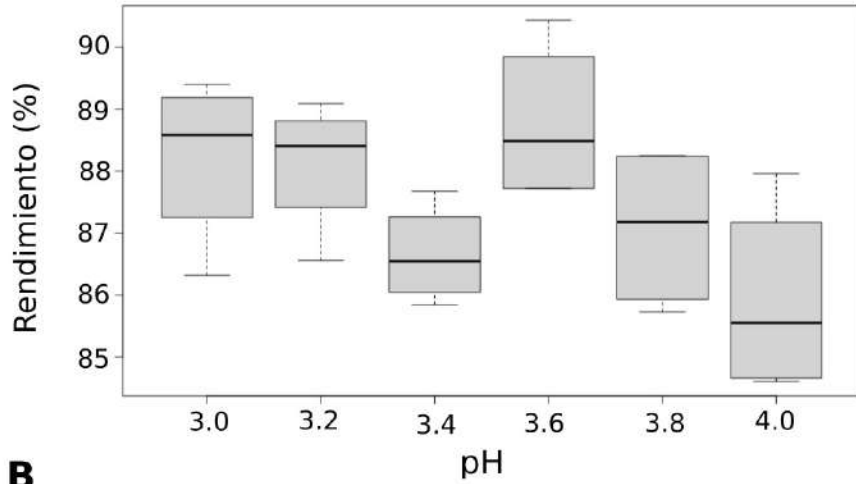
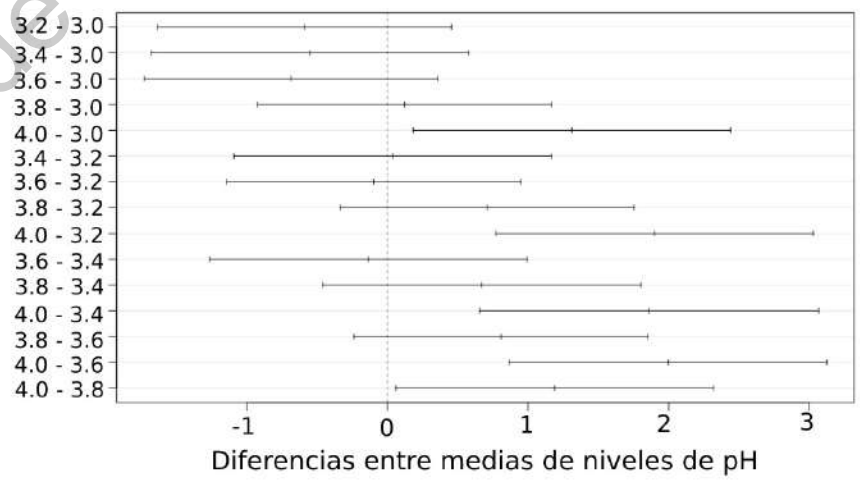
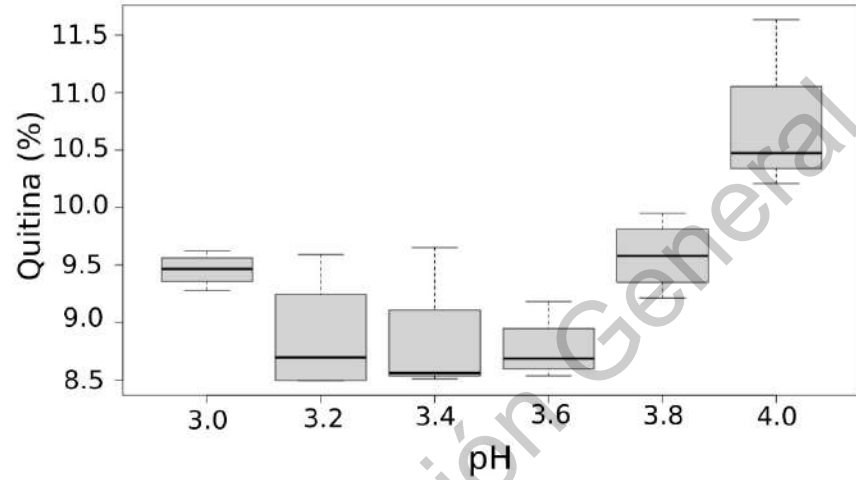
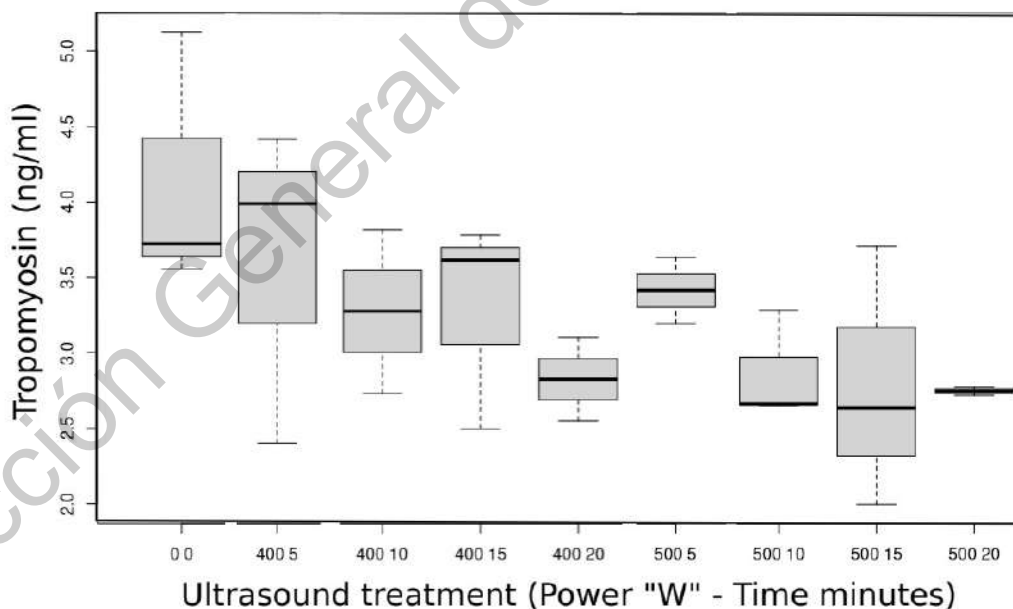
A**B**

Figura 12: Rendimiento (A) y contenido de quitina (B) resultante del uso de pH 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8 y 4.0 para la precipitación isoelectrica requerida en el proceso de extracción; y su respectivo diagrama de comparaciones múltiples de Tukey, (B) para el rendimiento y (D) para el contenido de quitina.

6.2. Efectos del tratamiento ultrasónico

La alergenicidad del extracto proteico del chapulín y la determinación del cambio en la alergenicidad con el tratamiento de ultrasonido se realizaron por medio de una prueba ELISA tipo sándwich. El contenido de tropomiosina inicial en el extracto proteico fue de 4.13 ± 0.86 ng/ml. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias (Figura 13), se aprecia variabilidad alta dentro de cada tratamiento, lo que no nos permite encontrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, al realizar una comparación de los tratamientos con el tiempo cero (sin tratamiento), se observa una disminución de la alergenicidad al ser tratado por ultrasonido, entre los tratamientos aunque los valores son dispersos, son más destacadas las condiciones de 400 W, 20min y 500 W 15 min.



Fig

ura 13: Contenido de tropomiosina (ng/ml) de extracto proteico de chapulín y cada uno de los tratamientos de ultrasonido. El primer número representa la potencia aplicada y el segundo número representa el tiempo del tratamiento en minutos.

En cuanto a los datos del aumento de temperatura durante los tratamientos de ultrasonido (Tabla 12), se realizó un análisis de correlación donde se encontró un coeficiente de correlación de 0.9215, lo cual indica que el incremento de temperatura está altamente correlacionada con la potencia utilizada (W). Lo cual indica que a medida que aumenta la potencia también aumenta el incremento de temperatura durante el tratamiento.

Tabla 12: Incremento de temperatura en grados Celsius para los tratamientos de ultrasonido aplicados. Los resultados se muestran como el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar.

Tratamiento a 400 W		Tratamiento a 500 W	
Tiempo (min)	Incremento de temperatura (°C)	Tiempo (min)	Incremento de temperatura (°C)
5	11 \pm 1.0	5	14.33 \pm 1.52
10	12 \pm 2.0	10	16.66 \pm 1.15
15	12.66 \pm 0.57	15	16.33 \pm 1.52
20	16.66 \pm 1.52	20	18.66 \pm 1.52

Al realizar un análisis del efecto global de las variables sobre el contenido de tropomiosina, se encuentra que el efecto del tiempo es estadísticamente significativo ($P = 0.0587$) y mayor que el efecto de la potencia ($P = 0.1420$), lo cual concuerda con lo reportado para tropomiosina de camarón por Li et al. (2006) donde encuentra una reducción de la tropomiosina directamente proporcional al tiempo del tratamiento. Sin embargo, la reducción para un tiempo de 30 minutos y una potencia de 800 W es del 12.9 %, la cual es menor para la obtenida en este trabajo para un tiempo de 20 minutos, el cual fue el tiempo máximo probado.

La distribución molecular de las proteínas del extracto sin sonicación y los diferentes tratamientos a una potencia de 500 W se muestran en la Figura 14, en la cual se observa que el extracto proteico (carril 2) presenta proteínas de 150 – 15 kDa. También se observa una banda de aproximadamente de 37 kDa (carriles

2- 6) que puede corresponder a la tropomiosina, debido a que se ha reportado un peso de 37 kDa para esta proteína en grillo (*G. sigillatus*) de la orden ortóptera; esta banda de 37 kDa que se observa en el gel se va desvaneciendo conforme el tiempo del tratamiento ultrasónico aumenta. Finalmente se observa un aumento de proteínas con tamaño menor a 10 kDa en los tratamientos con tiempos de 15 y 20 min.

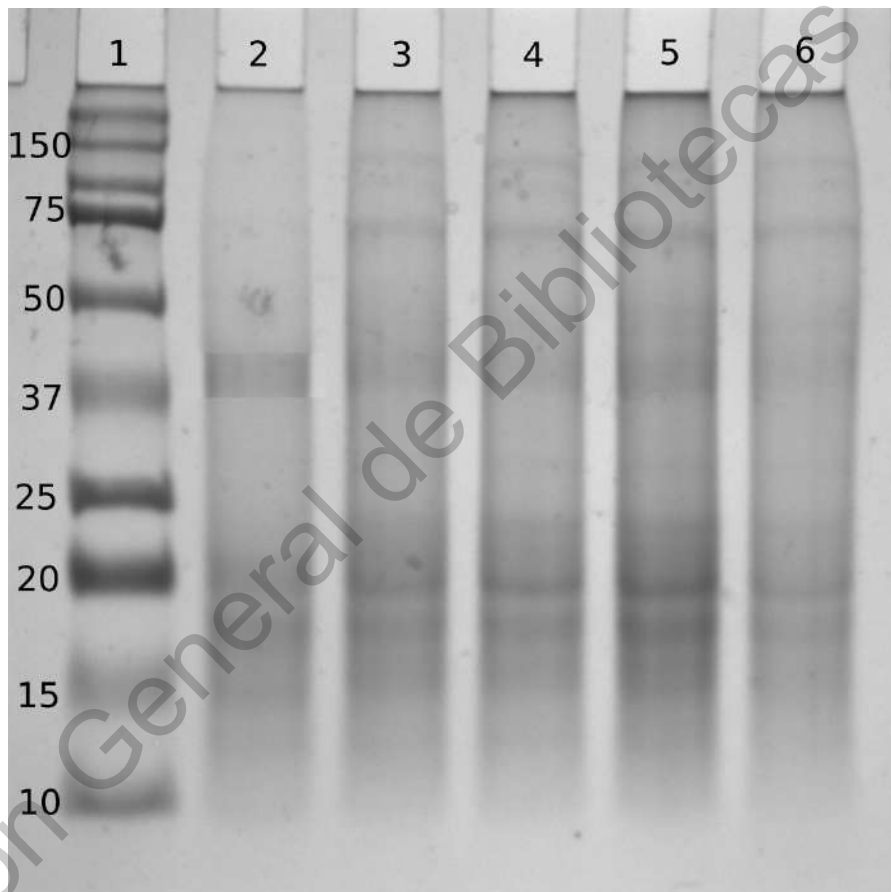


Figura 14: Patrón de señales de electroforesis en SDS-PAGE para el extracto sin sonicación y los diferentes tratamientos a una potencia de 500 W. (1) Marcador molecular, (2) Extracto proteico sin sonicación, (3- 6) Tratamiento 5, 10, 15 y 20 min.

Los resultados obtenidos muestran que el ultrasonido es de utilidad para la reducción de la tropomiosina, proteína considerada como principal alérgeno proteico en insectos. Esto puede ser debido a la degradación de la proteína, lo cual se puede observar en el SDS-PAGE; así como a los cambios en la estructura secundaria; en la literatura se ha documentado que el ultrasonido tiene el efecto de desdoblarse la conformación alfa-hélice de la tropomiosina y aumentar las conformaciones de lámina beta, estos cambios en la estructura de la proteína evitan la unión proteína – anticuerpo (Dong *et al.*, 2020; Ekezie *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Shriver & Yang, 2011).

El porcentaje de reducción de la alergenicidad en el extracto proteico de chapulín es menor a los reportados para camarones bajo un tratamiento de ultrasonido similar. Mientras que en este trabajo el porcentaje de reducción de la tropomiosina obtenido fue del 33.65 %, Dong *et al.* (2020) reportaron una reducción del 76% en el contenido de tropomiosina del camarón (*Litopenaeus vannamei*).

6.3. Composición proximal y determinación de propiedades funcionales del Chapulín y extractos obtenidos

6.3.1. Composición proximal

El porcentaje de proteína, lípidos, cenizas, fibra (soluble e insoluble) y quitina del insecto (materia prima) y el extracto proteico se presentan en la Tabla 12, estos resultados son presentados en base seca. El componente mayoritario en el insecto es la proteína con un 58.90 ± 0.56 %; seguido de los carbohidratos totales con un 24.88 ± 0.82 % de los cuales un 4.37 ± 0.94 % es fibra soluble, mientras que el 17.08 ± 0.82 % es fibra insoluble, de esta ultima el 7.18 ± 0.87 % se atribuye al contenido de quitina. El contenido de grasas es de 13.32 ± 0.28 % y las cenizas son el componente en menor porcentaje con un 2.91 ± 0.02 %.

Tabla 13: Caracterización de la materia prima.

Componente	Porcentaje obtenido para <i>S. purpurascens</i> (%)	Rango reportado en la literatura (%) para <i>S. purpurascens</i>	Porcentaje obtenido para el extracto proteico (%)
Proteína	58.90 ± 0.56	56.00 – 75.87*	67.74 ± 0.31
Lípidos	13.32 ± 0.28	6.02 – 13.00*	1.67 ± 0.11
Cenizas	2.91 ± 0.02	1.42 – 4.00*	1.97 ± 0.23
Carbohidratos	24.88 ± 0.82	15.59 – 33.17*	28.62 ± 0.62
Fibra insoluble	17.08 ± 0.82	7.08 – 11.15***	$17.10 \pm .49$
Quitina	7.18 ± 0.87	5.3 – 8.9 **	8.77 ± 0.28
Fibra soluble	4.37 ± 0.94	4.84 - 8.51***	

Los resultados se presentan en porcentaje en base seca, como el promedio de tres replicas \pm desviación estándar.

*Datos reportados para *S. purpurascens* (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2019).

**Datos reportados para diversas especies del orden orthoptera (Kaya *et al.*, 2015).

***Datos reportados para dos especies del género *Sphenarium* (Melo-Ruiz *et al.*, 2015)

Los resultados obtenidos de proteína, lípidos, cenizas, fibra y quitina se encuentran dentro del rango reportado para la especie y orden del insecto (Rodríguez-Miranda *et al.*, 2019; Kaya *et al.*, 2015; Melo-Ruiz *et al.*, 2015). El contenido nutricional de *S. purpurascens* puede ser variable debido al hábitat, sexo, dieta y periodo de recolección del insecto (Lui & Zhao, 2019).

Por otro lado, el contenido de proteína aumenta de 58.90 ± 0.56 % a un 67.74 ± 0.31 % en el extracto proteico y el contenido de lípidos se reduce en un 87 % con el proceso de desgrasado y extracción. El porcentaje de proteína encostrado para el extracto proteico es mayor a el porcentaje de proteína en extracto proteicos obtenido para otras especies que han sido obtenidas por el mismo método de extracción como *S. gregaria* (52.9%), *A. mellifera* (39.6%) y *T. molitor* (52.35%) (Mishyna *et al.* al, 2012; Zeelinska *et al*, 2018).

6.3.2. Propiedades funcionales

Solubilidad

La curva de solubilidad para el insecto, el extracto proteico sin sonicación y el extracto con sonicación se muestra en la Figura 15, todas las muestras mostraron valores mínimo de solubilidad en el rango de pH de 3 – 4, y un máximo de solubilidad en pH 12, al realizar una comparación entre las tres curvas de solubilidad de las muestras se observa que el porcentaje de solubilidad es mayor para el extracto tratado con el ultrasonido con un máximo de solubilidad del 85 %.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Mishyna *et al.*, (2019), donde se reporta la solubilidad de *S. gregaria* y *A. mellifera*; así como sus extractos proteicos, donde obtiene un mayor porcentaje de solubilidad para los extractos en comparación con la solubilidad de los insectos. Esto se puede deber a que el contenido de lípidos en el extracto proteico es menor al encontrado en el

insecto, por lo que se eliminan las interacciones lípido – proteína y se promueven las internaciones proteína – agua (Gravel & Doyen, 2019).

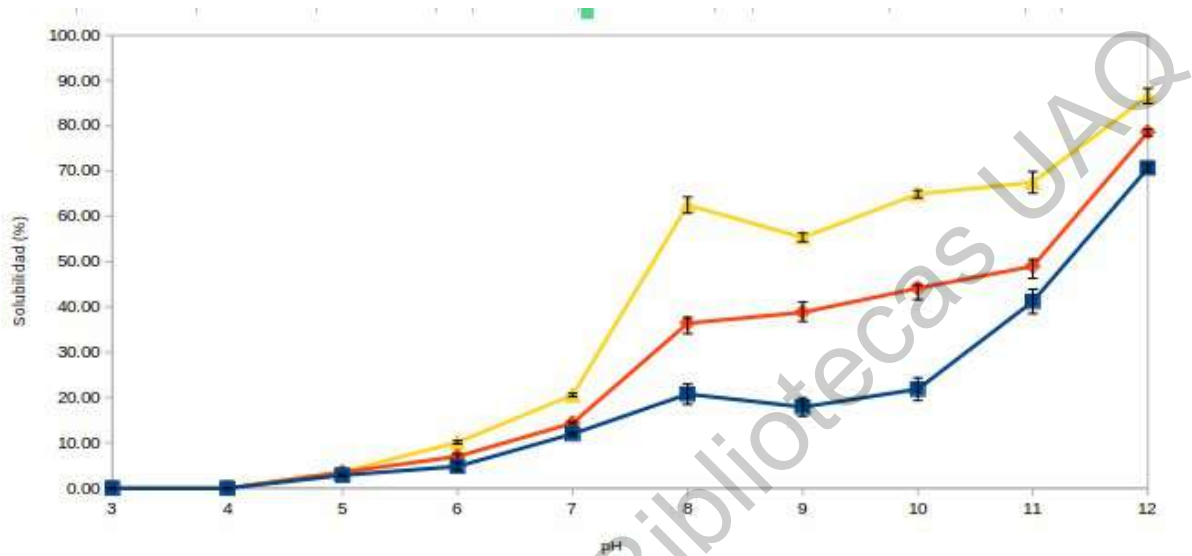


Figura 15: Porcentaje de solubilidad de las proteínas de Chapulín (azul), extracto proteico sin sonicación (naranja) y con sonicación (amarillo) a diferentes pH. Los resultados se presentan como promedio de tres réplicas \pm desviación estándar.

Por otro lado, la curva para el extracto tratado con el ultrasonido, presenta una mayor solubilidad que la curva para el extracto sin tratamiento, lo cual puede ser debido a que uno de los efectos del ultrasonido es la degradación de las proteínas y generación de fragmentos proteicos. La hidrólisis proteica aumenta las fuerzas repulsivas y la hidratación entre proteínas a medida que se liberan fragmentos de péptidos más pequeños con grupos más ionizables (amino y carboxilo), por lo que aumenta la solubilidad (Li et al., 2019; Gould & Wolf, 2018; Sathe et al., 2018). De acuerdo con la revisión de Gravel & Doyen (2019), el efecto de la generación de fragmentos proteicos sobre la solubilidad, se ha observado para extractos de proteína de insectos de *Locusta migratoria* (Purschke et al., 2018) y *Grylloides sigillatus* (Hall et al., 2017), donde una hidrólisis proteica mejoró la solubilidad de las proteínas de estos insectos.

Capacidad de retención de agua y aceite; capacidad de formación y estabilidad de la emulsión

Los resultados de las determinaciones de la capacidad de retención de agua y aceite; así como la capacidad de formación de emulsión y estabilidad de la emulsión se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Propiedades funcionales de la materia prima y extractos proteicos.

Muestra	Capacidad de retención de agua (g/g)*	Capacidad de retención de aceite (g/g)*	Capacidad de formación de emulsión (%)	Estabilidad de la emulsión (%)
Chapulín	3.84 ± 0.05 ^a	3.16 ± 0.04 ^a	58.33 ± 1.44 ^a	74.28 ± 0.63 ^a
Extracto sin sonicación	4.19 ± 0.03 ^b	2.74 ± 0.04 ^b	62.50 ± 0.02 ^b	86.64 ± 2.91 ^b
Extracto con sonicación	4.61 ± 0.12 ^c	6.66 ± 0.02 ^c	75.00 ± 0.00 ^c	69.42 ± 2.39 ^c

Los resultados se presentan como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras en superíndice en la misma columna indican diferencias significativas.

*Resultados en gramo de agua o gramo de aceite absorbido por gramo de muestra

Las siguientes secciones describen con más detalle los resultados presentados en la Tabla 14.

Capacidad de retención de agua:

La capacidad de retención de agua, del insecto fue de 3.84 ± 0.05 gramos de agua por cada gramo de muestra, éste es mayor al reportado por Torruco-Uco *et al.* (2018) de 1.75 g/g; además de ser mayor para insectos del mismo orden, como *A. domesticus* (2.03 g/g), *Gryllidae* sp. (2.38 g/g), *G. sigillatus* (3.44 g/g) y *S. gregaria* (2.18 g/ g) (Mishyna *et al.*, 2019; Omotoso *et al.*, 2015; Ndiritu *et al.*, 2017). Las diferencias encontradas entre el valor obtenido y los reportados en la literatura para la especie y otras especies del mismo orden pueden ser atribuidas a

diferencias en el perfil de aminoácidos, conformación, hidrofiliidad, concentración de proteína, característica de carga y conformación de los insectos (Torruco-Uco *et al.*, 2018).

Además la capacidad de retención de agua aumenta para los extractos obtenidos, donde la mayor capacidad obtenida es para el para el extracto tratado con ultrasonido (4.61 ± 0.12 g/g); aún no se encuentran valores de esta propiedad en la bibliografía para extractos de insectos con un tratamiento de ultrasonido. Una buena capacidad de retención de agua de los concentrados y extractos proteicos es deseable en procesos en los que se prefiere la retención de agua, como en la industria de la carne y la panificación (Ndiritu *et al.*, 2017).

Capacidad de retención de aceite:

La capacidad de retención de aceite obtenida para el insecto fue de 3.16 ± 0.04 g/g, la cual es mayor a la reportada para la especie (2.79 g/g); además de ser mayor que valores reportados para *G. sigillatus* (2.82 g/g) y *S. gregaria* (1.98 g/g) y similar al valor reportado para *A. domesticus* (3.37 g/g) (Mishyna *et al.*, 2019; Zielinska *et al.*, 2018; Ndiritu *et al.*, 2017). Esta capacidad es el atrapamiento físico del aceite. Las proteínas hidrofóbicas juegan el papel principal en la absorción de aceite. De acuerdo con Sathe *et al.*, (1982), la capacidad de retención de aceite puede estar relacionada con el contenido de proteínas, los tipos de proteínas y la composición de aminoácidos de las proteínas, en particular con los residuos hidrófobos que interactúan con las cadenas de hidrocarburos en las moléculas de grasa, lo cual puede explicar las diferencias encontradas entre el valor obtenido y los reportados para la especie y otras especies de la orden ortóptera.

Capacidad de formación de emulsión y estabilidad de la emulsión:

La capacidad de formación de emulsión obtenida para el insecto fue de 58.33 ± 1.44 % con una estabilidad del 74.28 ± 0.63 %, la cual es mayor en comparación con la reportada para la especie por Torruco-Uco *et al.* (2018) de 20.33 % sin un valor reportado para la estabilidad de la emulsión; además el valor obtenido se encuentra en el rango reportado para otras especies de ortópteros (20.33 – 69.17%) (Mishyna *et al.*, 2019; Zielinska *et al.*, 2018; Ndiritu *et al.*, 2017).

Por otro lado, la capacidad de formación de emulsión aumenta para los extractos en comparación con el valor obtenido para el insecto, con un 62.50 ± 0.02 % y una estabilidad del 86.64 ± 2.91 % para el extracto sin tratamiento de ultrasonido; y un 75.00 ± 0.00 % con una estabilidad del 69.42 ± 2.39 % para el extracto tratado con ultrasonido. Los resultados son similares a los obtenidos por Zielinska *et al.* (2018), donde encuentran un aumento de la capacidad de formación de emulsión para los extractos proteicos de *T. molitor*, *G. sigillatus* y *S. gregaria*, en comparación con la determinación para el insecto entero. Las diferencias entre las capacidades de formación de emulsión pueden estar relacionadas el contenido de proteína, así como con la anfifilicidad de la superficie de la proteína (Zielinska *et al.*, 2018). Y en el caso del extracto con el tratamiento de ultrasonido, la diferencia con el extracto no tratado puede deberse al tamaño de proteína, debido a la generación de fragmentos proteicos durante el tratamiento ultrasónico, ya que proteínas pequeñas favorecen la difusión y generalmente muestran buenas capacidades de formación de emulsión pero generan una baja estabilidad, ya que cuando los péptidos son más cortos y menos globulares, forman capas de proteínas menos estables alrededor de las gotas de aceite generando una menor resistencia. Lo anterior, coincide con los resultados obtenidos ya que el extracto con sonicación presenta la menor estabilidad de emulsión encontrada.

Capacidad de formación de gel

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos para la determinación de la capacidad de formación de gel por calor de las proteínas del insecto, el extracto proteico sin sonicación y el extracto con sonicación. Es importante mencionar que a un pH de 3.6 (punto isoeléctrico), no se encontró la formación de gel en las muestras, lo cual coincide con lo reportado por Mishyna *et al.* (2019), donde los autores reportan una ausencia de formación de gel bajo las mismas condiciones para el insecto *S. gregaria* (ortóptera) con el uso del pH correspondiente al punto isoeléctrico. La diferencia entre la capacidad de formación de gel entre el extracto con sonicación y el extracto sin tratamiento, puede ser debido a cambios de conformación de las proteínas durante la sonicación (Yagoub *et al.*, 2017).

Tabla 15: Capacidad de formación de gel por calor de la materia prima y extractos proteicos.

Muestra	pH 12
Chapulín	9.19 ± 0.03 ^a
Extracto sin sonicación	8.30 ± 0.24 ^a
Extracto con sonicación	11.30 ± 1.52 ^b

Los resultados se presentan como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras en superíndice en la misma columna indican diferencias significativas.

Digestibilidad proteica

Los resultados de la determinación de digestibilidad proteica se muestran en la Tabla 16; donde no se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad del insecto, el extracto proteico sin sonicación y el extracto con sonicación.

Tabla 16: Porcentaje de digestibilidad de la materia prima y extractos proteicos.

Muestra	Digestibilidad (%)
Chapulín	81.86 ± 0.23 ^a
Extracto sin sonicación	81.30 ± 0.35 ^a
Extracto son sonicación	80.18 ± 0.61 ^a

Los resultados se presentan como promedio de tres réplicas ± desviación estándar. Diferentes letras en superíndice en la misma columna indican diferencias significativas.

Los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango de digestibilidad promedio de los insectos (75 – 98 %) y son similares a los reportados para un concentrado proteico de grillo (*Acheta domesticus*: ortóptera), con un porcentaje de digestibilidad del 84.23 ± 0.74 % y 85.28 ± 0.20 % para el insecto entero y su concentrado proteico respectivamente. Además de que la digestibilidad encontrada para las muestras fue superior para proteínas de origen vegetal, como la soya (35.8 %), cacahuates y las lentejas (52 %); y fue cercana al 85% reportada para el salmón y al 89% para la carne de vacuno, y superior (Imathiu, 2019; Ndiritu *et al.*, 2017).

La digestibilidad proteica es un factor clave para determinar la calidad de las proteínas, ya que, en la formulación de alimentos, así como en la adición de extractos proteicos a alimentos, se debe considerar la cantidad de proteínas que se pueden digerir y absorber en el sistema digestivo (Lee *et al.*, 2021; Fernández-García *et al.*, 2009). La digestibilidad proteica del chapulín de la milpa y el extracto proteico refuerzan el potencial de la aplicación de extractos de proteína de insecto en productos alimenticios.

6. Conclusiones

Las condiciones para el proceso de extracción de proteínas por el método de extracción alcalina a partir del *S. purpurascens* son una solubilización de las proteínas en una solución de NaOH en el pH seguido de una precipitación a un pH de 3.6, el cual es el punto isoeléctrico encontrado para la especie. Condiciones que permitieron obtener un extracto con $67.74 \pm 0.31\%$ de proteína y un rendimiento del $88.78 \pm 1.32\%$. El extracto proteico obtenido contiene proteínas de diversos pesos moleculares que se encuentran dentro del rango de 150 – 10 kDa.

Se encontró un contenido de tropomiosina en el extracto de *S. purpurascens* de 4.13 ± 0.86 ng/ml. Aplicar el tratamiento de ultrasonido puede disminuir el contenido de la tropomiosina. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, al realizar la comparación descriptiva con el tratamiento con control (sin sonicación), se observa una disminución general de la alergenicidad.

El tratamiento de ultrasonido tiene un efecto sobre las propiedades funcionales de las proteínas del extracto, como lo es el aumento de solubilidad, la capacidad de retención de aceite y la capacidad de formación de emulsión. La diferencia encontrada sobre estas propiedades funcionales puede deberse a la formación de generación de fragmentos proteicos como consecuencia del uso del ultrasonido.

7. Referencias

- Adámková, A., Mlček, J., Kouřimská, L., Borkovcová, M., Bušina, T., Adámek, M., Bednářová, M., & Krajsa, J. (2017). Nutritional potential of selected insect species reared on the island of Sumatra. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(5), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijerph14050521>
- Aggett, P. J. (2010). Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1433S–1437S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28674C>
- Akhtar, Y., & Isman, M. B. (2018). Insects as an Alternative Protein Source. In *Proteins in Food Processing* (pp. 263–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00011-5>
- Badui, S. (2006). Salvador Badui Dergal. In *Química de los alimentos*.
- Caparros Megido, R., Poelaert, C., Ernens, M., Liotta, M., Blecker, C., Danthine, S., Tyteca, E., Haubruge, É., Alabi, T., Bindelle, J., & Francis, F. (2018). Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms (*Tenebrio molitor* L. 1758). *Food Research International*, 106(December 2017), 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.002>
- Castellanos-Vargas, I., & Cano-Santana, Z. (2009). Historia natural y ecología de *Sphenarium purpurascens* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *Biodiversidad Del Ecosistema Del Pedregal de San Ángel*, 337–346.
- Cerritos, R., & Cano-Santana, Z. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection*, 27(3–5), 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.08.001>
- Chatsuwan, N., Nalinanon, S., Puechkamut, Y., Lamsal, B. P., & Pinsiroadom, P. (2018). Characteristics, Functional Properties, and Antioxidant Activities of Water-Soluble Proteins Extracted from Grasshoppers, *Patanga succincta* and

- Chondracris roseapbrunner. *Journal of Chemistry*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/6528312>
- Chen, F., Zhang, M., & Yang, C. hui. (2020). Application of ultrasound technology in processing of ready-to-eat fresh food: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63(September 2019), 104953. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104953>
- Chizoba Ekezie, F. G., Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2018). Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends in Food Science and Technology*, 74(October 2017), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.01.007>
- Costa-Neto, E. M., & Dunkel, F. V. (2016). Insects as Food: History, Culture, and Modern Use around the World. In *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802856-8.00002-8>
- Cuj-Laines, R., Hernández-Santos, B., Reyes-Jaquez, D., Delgado-Licon, E., Juárez-Barrientos, J. M., & Rodríguez-Miranda, J. (2018). Physicochemical properties of ready-to-eat extruded nixtamalized maize-based snacks enriched with grasshopper. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(8), 1889–1895. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13774>
- da Rosa Machado, C., & Thys, R. C. S. (2019). Cricket powder (*Gryllus assimilis*) as a new alternative protein source for gluten-free breads. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56, 102180. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102180>
- de Castro, R. J. S., Ohara, A., Aguilar, J. G. dos S., & Domingues, M. A. F. (2018). Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science and Technology*, 76(October 2017), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.006>
- Delicato, C., Schouteten, J. J., Dewettinck, K., Gellynck, X., & Tzompa-Sosa, D. A. (2020). Consumers' perception of bakery products with insect fat as partial butter replacement. *Food Quality and Preference*, 79(August 2019), 103755. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103755>
- Downs, M., Johnson, P., & Zeece, M. (2016). Chapter 9 - Insects and Their Connection to Food Allergy A2 - Dossey, Aaron T. In *Insects as Sustainable*

Food Ingredients. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802856-8/00009-0>

Evans, J., Alemu, M. H., Flore, R., Frøst, M. B., Halloran, A., Jensen, A. B., Maciel-Vergara, G., Meyer-Rochow, V. B., Münke-Svendsen, C., Olsen, S. B., Payne, C., Roos, N., Rozin, P., Tan, H. S. G., van Huis, A., Vantomme, P., & Eilenberg, J. (2015). “Entomophagy”: An evolving terminology in need of review. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(4), 293–305. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.0074>

Fasolin, L. H., Pereira, R. N., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Andrade, C. C. P., Ramos, O. L., & Vicente, A. A. (2019). Emergent food proteins – Towards sustainability, health and innovation. *Food Research International*, 125(July), 108586. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108586>

Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>

Finke, M. D., & Oonincx, D. (2013). Insects as Food for Insectivores. In *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00017-0>

Francis, F., Doyen, V., Debaugnies, F., Mazzucchelli, G., Caparros, R., Alabi, T., Blecker, C., Haubruge, E., & Corazza, F. (2019). Limited cross reactivity among arginine kinase allergens from mealworm and cricket edible insects. *Food Chemistry*, 276(October 2018), 714–718. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.082>

Fu, L., Wang, C., Zhu, Y., & Wang, Y. (2019). Seafood allergy: Occurrence, mechanisms and measures. *Trends in Food Science and Technology*, 88(February), 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.025>

Gravel, A., & Doyen, A. (2020). The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. In *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (Vol. 59, p. 102272). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102272>

- Hall, F. G., Jones, O. G., O'Haire, M. E., & Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobes sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.138>
- Hall, F., Johnson, P. E., & Liceaga, A. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllobes sigillatus*) protein. *Food Chemistry*, 262, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.058>
- Hall, F., & Liceaga, A. (2020). Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllobes sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and tropomyosin-IgG binding. *Journal of Functional Foods*, 64(June 2019), 103634. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103634>
- Imathiu, S. (2020). Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal*, 18(August 2019), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.11.002>
- Janssen, R. H., Vincken, J. P., Van Den Broek, L. A. M., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. M. (2017). Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2275–2278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>
- Jantzen da Silva Lucas, A., Menegon de Oliveira, L., da Rocha, M., & Prentice, C. (2020). Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry*, 311(November 2019), 126022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126022>
- Kouřimská, L., & Adámková, A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal*, 4, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.07.001>
- Lähteenmäki-Uutela, A., Grmelová, N., Hénault-Ethier, L., Deschamps, M. H., Vandenberg, G. W., Zhao, A., Zhang, Y., Yang, B., & Neman, V. (2017). Insects as food and feed: Laws of the European union, United States, Canada, Mexico, Australia, and China. *European Food and Feed Law Review*, 12(1), 22–36. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.x002.2>
- Li, W., Gamlath, C. J., Pathak, R., Martin, G. J. O., & Ashokkumar, M. (2021). Ultrasound – The Physical and Chemical Effects Integral to Food Processing.

Innovative Food Processing Technologies, 329–358.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22679-6>

- Li, Z. xing, Lin, H., Cao, L. min, & Jameel, K. (2006). Effect of high intensity ultrasound on the allergenicity of shrimp. *Journal of Zhejiang University. Science. B.*, 7(4), 251–256. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0251>
- Liu, C., & Zhao, J. (2018). Insects as a novel food. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21782-4>
- Manditsera, F. A., Luning, P. A., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. M. (2019). Effect of domestic cooking methods on protein digestibility and mineral bioaccessibility of wild harvested adult edible insects. *Food Research International*, 121(March), 404–411.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.052>
- Melgar-Lalanne, G., Hernández-Álvarez, A. J., & Salinas-Castro, A. (2019). Edible Insects Processing: Traditional and Innovative Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1166–1191.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12463>
- Melo-Ruiz, V., Sandoval-Trujillo, H., Quirino-Barreda, T., Sánchez-Herrera, K., Díaz-García, R., & Calvo-Carrillo, C. (2015). Chemical composition and amino acids content of five species of edible Grasshoppers from Mexico. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27(8), 654–658.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2015.04.093>
- Melo, V., Garcia, 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(3), 283–289.
- Mirmoghtadaie, L., Shojaee Aliabadi, S., & Hosseini, S. M. (2016). Recent approaches in physical modification of protein functionality. *Food Chemistry*, 199, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.067>
- Mishyna, M., Martinez, J. J. I., Chen, J., & Benjamin, O. (2019). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honey bee (*Apis mellifera*). *Food Research International*, 116, 697–706.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.098>

- Mishyna, M., Martinez, J. J. I., Chen, J., Davidovich-Pinhas, M., & Benjamin, O. (2019). Heat-induced aggregation and gelation of proteins from edible honey bee brood (*Apis mellifera*) as a function of temperature and pH. *Food Hydrocolloids*, *91*(September 2018), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.017>
- Onwude, D. I., Hashim, N., Janius, R., Abdan, K., Chen, G., & Oladejo, A. O. (2017). Non-thermal hybrid drying of fruits and vegetables: A review of current technologies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *43*(August), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.010>
- Pali-Schöll, I., Meinlschmidt, P., Larenas-Linnemann, D., Purschke, B., Hofstetter, G., Rodríguez-Monroy, F. A., Einhorn, L., Mothes-Luksch, N., Jensen-Jarolim, E., & Jäger, H. (2019). Edible insects: Cross-recognition of IgE from crustacean- and house dust mite allergic patients, and reduction of allergenicity by food processing. *World Allergy Organization Journal*, *12*(1). <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2018.10.001>
- Patel, S., Suleria, H. A. R., & Rauf, A. (2019). Edible insects as innovative foods: Nutritional and functional assessments. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 86, pp. 352–359). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.033>
- Poelaert, C., Francis, F., Alabi, T., Caparros Megido, R., Crahay, B., Bindelle, J., & Beckers, Y. (2018). Protein value of two insects, subjected to various heat treatments, using growing rats and the protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Insects as Food and Feed*, *4*(2), 77–87. <https://doi.org/10.3920/JIFF2017.0003>
- Purschke, B., Tanzmeister, H., Meinlschmidt, P., Baumgartner, S., Lauter, K., & Jäger, H. (2018). Recovery of soluble proteins from migratory locust (*Locusta migratoria*) and characterisation of their compositional and techno-functional properties. *Food Research International*, *106*, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.067>
- Raheem, D., Raposo, A., Oluwole, O. B., Nieuwland, M., Saraiva, A., & Carrascosa, C. (2019). Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. *Food Research International*, *126*(September), 108672. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108672>

- Ramos-Elorduy, J. (1997). Insects: A sustainable source of food? *Ecology of Food Nutrition*, 36(2–4), 247–276. <https://doi.org/10.1080/03670244.1997.9991519>
- Ramos-Elorduy, Julieta. (2006). Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-51>
- Ramos-Elorduy, Julieta. (2008). Energy supplied by edible insects from Mexico and their nutritional and ecological importance. *Ecology of Food and Nutrition*, 47(3), 280–297. <https://doi.org/10.1080/03670240701805074>
- René Cerritos, Z. C.-S. (2008). Harvesting grasshoppers *Sphenarium purpurascens* in Mexico for human consumption: A comparison with insecticidal control for managing pest outbreaks. *Crop Protection*, 27(3–5), 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.08.001>
- Rodríguez-Miranda, J., Alcántar-Vázquez, J. P., Zúñiga-Marroquín, T., & Juárez-Barrientos, J. M. (2019). Insects as an alternative source of protein: a review of the potential use of grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.) as a food ingredient. In *European Food Research and Technology* (Vol. 245, Issue 12, pp. 2613–2620). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03383-0>
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57(5), 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>
- Shriver, S. K., & Yang, W. W. (2011). Thermal and Nonthermal Methods for Food Allergen Control. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 26–43. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9033-9>
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I. N., You, L., Zhang, J., Liu, Y., Ma, L., Gao, J., & Dong, Y. (2016). Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International*, 89, 129–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.001>
- Torruco-Uco, J. G., Hernández-Santos, B., Herman-Lara, E., Martínez-Sánchez, C. E., Juárez-Barrientos, J. M., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Chemical,

- functional and thermal characterization, and fatty acid profile of the edible grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.). *European Food Research and Technology*, 245(2), 285–292. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3160-y>
- Van Broekhoven, S., Bastiaan-Net, S., De Jong, N. W., & Wichers, H. J. (2016). Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. *Food Chemistry*, 196, 1075–1083. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.033>
- Van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58, 563–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>
- Yi, L., Lakemond, C. M. M., Sagis, L. M. C., Eisner-Schadler, V., Huis, A. Van, & Boekel, M. A. J. S. V. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*, 141(4), 3341–3348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.115>
- Zhang, Z., Zhang, X., Chen, W., & Zhou, P. (2018). Conformation stability, in vitro digestibility and allergenicity of tropomyosin from shrimp (*Exopalaemon modestus*) as affected by high intensity ultrasound. *Food Chemistry*, 245(November 2017), 997–1009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.072>
- Zhenxing, L., Caolimin, L., & Jamil, K. (2006). Reduction of allergenic properties of shrimp (*Penaeus Vannamei*) allergens by high intensity ultrasound. *European Food Research and Technology*, 223(5), 639–644. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0246-0>
- Zielińska, E., Karaś, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT - Food Science and Technology*, 91(January), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.058>
- Zielińska, E., Karaś, 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(7), 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03495-y>
- Zielińska, E., Karaś, M., Jakubczyk, A., Zieliński, D., & Baraniak, B. (2019). Edible Insects as Source of Proteins. In *Reference Series in Phytochemistry*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_67