



# Universidad Autónoma de Querétaro

## Facultad de Química

### Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Estudio sobre mecanismos y efectos de la aplicación de agua subcrítica empleando ácido cítrico y bicarbonato de sodio como modificadores, para la obtención de péptidos bioactivos a partir de un aislado proteico de chapulín de la milpa *Sphenarium purpurascens*”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ciencias de los Alimentos

**Presenta:**

M. en C. Carlos Isac Rivas Vela

**Dirigido por:**

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Co-dirigido por:

Dr. Gustavo Adolfo Castillo Herrera

Dr. Eduardo Castaño Tostado

Director

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Gustavo Adolfo Castillo Herrera

Co-director

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Asesor

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Maria Anaberta Cardador Martínez

Asesor

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Carlos Regalado González

Asesor

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Estudio sobre mecanismos y efectos de la aplicación  
de agua subcrítica empleando ácido cítrico y  
bicarbonato de sodio como modificadores, para la  
obtención de péptidos bioactivos a partir de un  
aislado proteico de chapulín de la milpa *Sphenarium  
purpurascens*

**por**

Carlos Isac Rivas Vela

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQDCC-264126

**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.



## Resumen

Los insectos han ganado atención como una vía sustentable de alimentación y fuente de compuestos bioactivos, como los péptidos. Los hidrolizados de insectos han sido generados por procesos enzimáticos o fermentaciones; sin embargo, estos pueden resultar largos, costosos y contaminantes. Ante esto, el agua subcrítica (AS) se ha proyectado como una alternativa sustentable para la hidrólisis, donde el estudio de hidrólisis por AS modificada, en particular para la modulación diferencial en la obtención de péptidos resulta relevante. Este proyecto tuvo como objetivo evaluar el uso de bicarbonato de sodio y ácido cítrico (AC) en la hidrólisis de un concentrado proteico de *Sphenarium purpurascens* mediante AS. Se empleó un diseño factorial  $2^3$  (temperatura, presión y concentración de modificador), evaluando el grado de hidrólisis (GH) y las actividades antioxidante y antihipertensiva. Se identificó un tratamiento de AC (130°C/20MPa/1M) como el mejor, con GH de  $39 \pm 0.98\%$  e  $IC_{50}$  de  $4.06 \pm 0.25$ ,  $0.330 \pm 0.03$  y  $0.148 \pm 0.016$  mg/ml para ABTS, DPPH e inhibición de la ECA, respectivamente. Este tratamiento se seleccionó para estudiar su cinética de hidrólisis. Los resultados muestran que el uso de AC mejoró el GH 3 veces al final de la reacción comparado con un tratamiento sin modificador, así como, la mayor proporción de los efectos de hidrólisis se dan en algún punto de la rampa de presión-calentamiento hacia la condición nominal, pues al llegar a ésta, se observan los mayores efectos. Se observó efectividad para hidrolizar la quitina presente en el exoesqueleto, disminuyendo su concentración hasta en un 66%. Es importante mencionar, que el uso de AC tuvo un efecto en la disminución de aminoácidos (principalmente los esenciales) desde los primeros instantes del tratamiento, lo que muestra la severidad del tratamiento. De los datos obtenidos se puede confirmar la efectividad y modulación que puede mostrar el uso adecuado de modificadores en tratamientos de hidrólisis por AS, pues se pueden reducir tiempos o temperaturas de tratamiento para la obtención de resultados similares, y su comparación con tratamientos enzimáticos permite resaltar mejores tiempos, su capacidad de hidrolizar materiales complejos, aunque sin el nivel de especificidad de estos. Con estos resultados, es posible abrir múltiples posibilidades que los insectos tienen para nuestra industria agroalimentaria.

**Palabras clave:** Insectos comestibles, péptidos bioactivos, proteínas de insectos, *Sphenarium purpurascens*, agua subcrítica

## ABSTRACT

Insects have gained attention as a sustainable food way and bioactive compounds source, such as peptides. Insect hydrolysates have been obtained by enzymatic processes or fermentations; however, these can result in long times, costly and polluting. Given this, subcritical water (SW) has been projected as a sustainable alternative for hydrolysis, where the study of protein hydrolysis by modified SW, for the differential modulation in the release of peptides, is relevant. This project aimed to evaluate the use of sodium bicarbonate and citric acid (CA) in the hydrolysis of a *Sphenarium purpurascens* protein concentrate. A  $2^3$  factorial design was used (temperature, pressure and modifier concentration), evaluating the degree of hydrolysis (DH) and the antioxidant and antihypertensive activities. An CA treatment (130°C/20MPa/1M) was identified as the best, with DH of  $39\pm 0.98\%$  and IC50 of  $4.06\pm 0.25$ ,  $0.330\pm 0.03$  and  $0.148\pm 0.016$  mg/ml for ABTS, DPPH and inhibition of the ACE, respectively. This treatment was selected to study its hydrolysis kinetics. The results show that the use of CA improved the DH in 3-fold at the end of the reaction compared to a treatment without modifier, as well as, the greatest proportion of the hydrolysis effects occur at some point of the pressure-heating ramp towards the nominal condition, since upon reaching this, the greatest effects are observed. The effectiveness for hydrolyzing the chitin present in the exoskeleton was demonstrated, reducing its concentration by up to 66%. It is important to mention that the use of CA had an effect on the decrease in amino acids (mainly the essential ones) at the first moments of the treatment, which shows the severity of the treatment. From the data obtained, it is possible to confirm the effectiveness and modulation that the appropriate use of modifiers can show in hydrolysis treatments by SW, since treatment times or temperatures can be reduced to obtain similar results, and its comparison with enzymatic treatments allows us to highlight better times, its ability to hydrolyze complex materials, although without the level of specificity of these. With these results, it is possible to open up multiple possibilities that insects have for our agri-food industry.

**Keywords:** Edible insects, bioactive peptides, subcritical water, *Sphenarium purpurascens*, insect protein

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1 INSECTOS COMESTIBLES	4
2.1.1 Insectos comestibles en México	6
2.1.2 <i>Sphenarium purpurascens</i>	7
2.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS DE INSECTOS COMESTIBLES	10
2.2.1 Péptidos bioactivos	10
2.3 OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS	11
2.3.1 Agua subcrítica	12
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
4.1 DIAGRAMAS CAUSALES DE LA HIDRÓLISIS	21
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL	24
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>25</b>
6.1 CARACTERIZACIÓN DE MATERIAL	25
6.1.1 Acondicionamiento de materia	25
6.1.2 Caracterización proximal	25
6.1.3 Obtención del concentrado proteico	26
6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO CON AGUA SUBCRÍTICA	27
6.2.1 Modelaje de la cinética de la reacción de hidrólisis por agua subcrítica	28
6.2.2 Hidrólisis enzimática	29
6.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS	29
6.3.1 Grado de hidrólisis	30
6.3.2 Electroforesis SDS-PAGE	31
6.3.3 Determinación de aminoácidos	31
6.3.4 Determinación de azúcares reductores	32
6.4 EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS IN VITRO	32
6.4.1 Actividad inhibidora de ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina)	32
6.4.2 Actividad Antioxidante	33
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>36</b>

7.1	CARACTERIZACIÓN PROXIMAL DEL MATERIAL	36
7.2	CONCENTRADO PROTEICO	36
7.3	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL CONCENTRADO PROTEICO EMPLEANDO PAPAÍNA	41
7.4	HIDRÓLISIS POR AGUA SUBCRÍTICA DEL CONCENTRADO	44
7.5	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS HIDROLIZADOS POR AGUA SUBCRÍTICA	51
7.5.1	Actividad antioxidante ABTS <sup>+</sup>	51
7.5.2	Actividad antioxidante DPPH	57
7.6	ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA I (ECA)	62
7.7	CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS DEL TRATAMIENTO SELECCIONADO	72
7.7.1	Grado de hidrólisis	72
7.7.2	Proteína soluble y aminoácidos libres (AL)	73
7.7.3	Quitina y azúcares reductores	76
7.7.4	Actividad antioxidante durante la cinética del tratamiento seleccionado	79
7.7.5	Perfil de aminoácidos durante la cinética	81
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>	<b>Página</b>
1. Perfil de aminoácidos de aislado proteico (promedio en mg/g) de chapulín de la milpa comparado con aislados de suero de leche y soya. (Gunnerud et al., 2012; Melo-Ruíz et al., 2015).....	9
2. Métodos para la caracterización proximal (AOAC, 2012).....	25
3. Caracterización proximal de <i>Sphenarium purpurascens</i> (% base seca). ....	36
4. Caracterización del concentrado proteico elegido.....	40
5. Grado de hidrólisis de los tratamientos empleando agua subcrítica .....	44
6. Análisis de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> ) .....	45
7. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en el grado de hidrólisis .....	47
8. Análisis de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad antioxidante ABTS <sup>+</sup> .....	53
9. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante ABTS <sup>+</sup> .....	54
10. Análisis de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad antioxidante DPPH .....	58
11. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante DPPH .....	59
12. Análisis de los efectos de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad inhibitoria de la ECA.....	64
13. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad inhibitoria de la ECA.....	66

14. Grado de hidrólisis (GH%), concentración IC50 para la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) e inhibidora de la ECA obtenida los tratamientos de ambos modificadores.....	71
15. Concentración de aminoácidos durante la cinética de hidrólisis .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

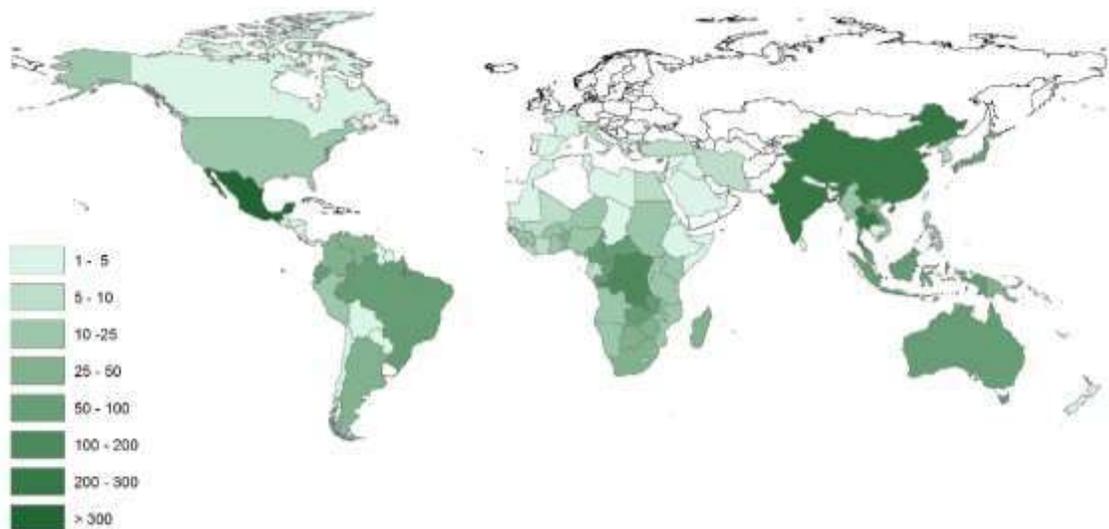
<b>Figura No.</b>	<b>Página</b>
1. Número de especies de insectos comestibles por país. (Jongema, 2017).....	1
2. Contenido nutricional promedio (% base seca) de insectos comestibles categorizada por orden (Rumpold & Schüter, 2013)..	4
3. Número aproximado de especies de insectos comestibles registradas, por estado (Cruz & Peniche, 2018).	7
4. <i>Sphenarium purpurascens</i> Charpentier (CONABIO, 2017)	8
5. Distribución de <i>Sphenarium purpurascens</i> Charpentier en México (Cerritos-Flores <i>et al.</i> , 2014)	8
6. Diagrama de fase de los estados del agua (Thiruvankadam <i>et al.</i> , 2015). FSC: Fase Super Crítica	12
7. Comparación de la variación de la constante dieléctrica del agua sometida a temperatura y presión con las constantes dieléctricas de diferentes solventes a temperatura ambiente (Aldana <i>et al.</i> , 2018)	13
8. Mecanismo de hidrólisis del enlace peptídico	14
9. Diagrama causal de hidrólisis por agua subcrítica	22
10. Diagrama causal de hidrólisis por AS con bicarbonato de sodio	23
11. Diagrama causal de hidrólisis por AS con ácido cítrico	23
12. Equipo de fluidos supercríticos Thar Waters	27
13. Rendimientos de extracción de proteína en los tratamientos.	38
14. Porcentajes de proteína de los concentrados obtenidos en los diferentes tratamientos de extracción.	39
15. Concentrado proteico de chapulín.	41
16. Grado de hidrólisis en el tiempo	42

17. Distribución molecular de las proteínas de chapulín a diferentes tiempos de hidrólisis .....	43
18. Perfil de interacción triple de los factores de los tratamientos por agua subcrítica empleando bicarbonato de sodio sobre el grado de hidrólisis.....	46
19. Proyecciones de superficie de respuesta de GH de los tratamientos con ácido cítrico.....	48
20. Electroforesis SDS-PAGE de hidrolizados de <i>Sphenarium purpurascens</i> con el mayor GH de cada modificador.....	51
21. Actividad antioxidante ABTS <sup>+</sup> de los hidrolizados por agua subcrítica.....	52
22. Proyección de interacción triple de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad de antioxidante de ABTS <sup>+</sup> . ....	54
23. Proyecciones de superficie de respuesta de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante de ABTS <sup>+</sup> .....	55
24. Actividad antioxidante DPPH de los hidrolizados por agua subcrítica.....	57
25. Proyecciones de superficie de respuesta de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad antioxidante de DPPH.....	59
26. Proyecciones de superficie de respuesta de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante de DPPH. ....	61
27. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I de los hidrolizados por agua subcrítica.....	63
28. Proyección de interacción triple de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad de inhibición de la ECA. ....	65
29. Proyección de interacción triple de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad de inhibición de la ECA.....	67
30. Proyección de análisis de componentes principales de los tratamientos de ambos modificadores y control.....	70

31. Cinética de grado de hidrólisis del tratamiento con ácido cítrico 130°C/20 MPa/1M.....	73
32. Cinética de proteína soluble y aminoácidos libres de la condición seleccionada. .....	76
33. Cinética del contenido de quitina (%) y azúcares reductores de la condición seleccionada..	78
34. Composición estructural del exoesqueleto de artrópodos (Imagen tomada y adaptada de Lee et al., 2023).....	79
35. Cinética de la inhibición de los radicales ABTS y DPPH del hidrolizado durante la condición seleccionada. ....	81
36. Líneas de tendencia de degradación de cada aminoácido y aminoácidos totales durante la cinética de hidrólisis .....	84

## 1. Introducción

Actualmente se tienen identificadas alrededor de 2,000 especies de insectos comestibles en el mundo (**Figura 1**), de los cuales se estiman cerca de 2,000 millones de consumidores habituales, con mayor proporción en países posicionados en los trópicos, como India, Tailandia, China o México. El consumo de los insectos puede darse en distintas etapas de desarrollo dependiendo de la especie, pudiendo ser consumidos huevos y larvas, así como, pupas, ninfas y etapas adultas.



**Figura 1. Número de especies de insectos comestibles por país. (Jongema, 2017)**

México es uno de los países con mayor cultura de consumo de insectos o entomofagia y el primero en la cantidad de especies comestibles, con más de 500 identificadas. Dentro de los insectos mayormente consumidos y que cuenta con más popularidad en el país se encuentran los escamoles (*Liometopum apicutalum*), hormigas chicanas (*Atta mexicana, texana y cephalotes*), chinicuiles (*Comadia redtenbacheri*), los gusanos de maguey (*Aegiale hesperiaris*) y el chapulín de la milpa (*Sphenarium purpurascens*). Siendo este último el insecto de mayor consumo de entre ellos.

La distribución de *Sphenarium purpurascens* abarca estados como Oaxaca, Puebla y el estado de México, recolectados de manera informal en campos de alfalfa

y maíz principalmente, donde en ciertas partes son considerados como una plaga. En su contenido nutricional destacan su aporte de proteínas, hasta un 70 % de su peso en seco, con presencia de todos los aminoácidos esenciales y rico en aminoácidos como fenilalanina, leucina, ácido aspártico, glutamina y glicina.

En la última década, la comunidad científica internacional ha puesto especial atención a los insectos comestibles, como alternativa a la solución de los problemas asociados a la alimentación y en la identificación de compuestos bioactivos para la prevención de algunos padecimientos. El interés ha sido fundamentado por algunas de las características intrínsecas que estos presentan, como el aprovechamiento de recursos en su producción, su rápida tasa de crecimiento, su tasa de conversión de alimento y los diversos aportes nutrimentales que estos mantienen entre las diferentes especies y estados de crecimiento.

Aunado a esto, se han asociado algunas actividades biológicas a algunos compuestos presentes en ellos como la quitina, polifenoles, ácidos grasos insaturados y péptidos bioactivos, estos últimos, son los que mayor interés han generado, pues se les han asociado distintas actividades como antioxidantes, antihipertensivas, hipoglucemiantes, antimicrobianos y antiinflamatorios.

Si bien el origen o la obtención de péptidos a partir de otras fuentes ya ha sido ampliamente estudiada, han sido las características presentes en los insectos comestibles anteriormente descritas, lo que ha originado el interés en obtenerlos a partir de ellos. Los métodos usualmente empleados para la generación de péptidos han sido hidrólisis químicas ácida o básica, fermentaciones, hidrólisis enzimática e hidrólisis asistida con tecnologías emergentes, como microondas o ultrasonido. Sin embargo, se trata de procesos prolongados, hacen uso de distintos solventes y se generan considerables cantidades de efluentes.

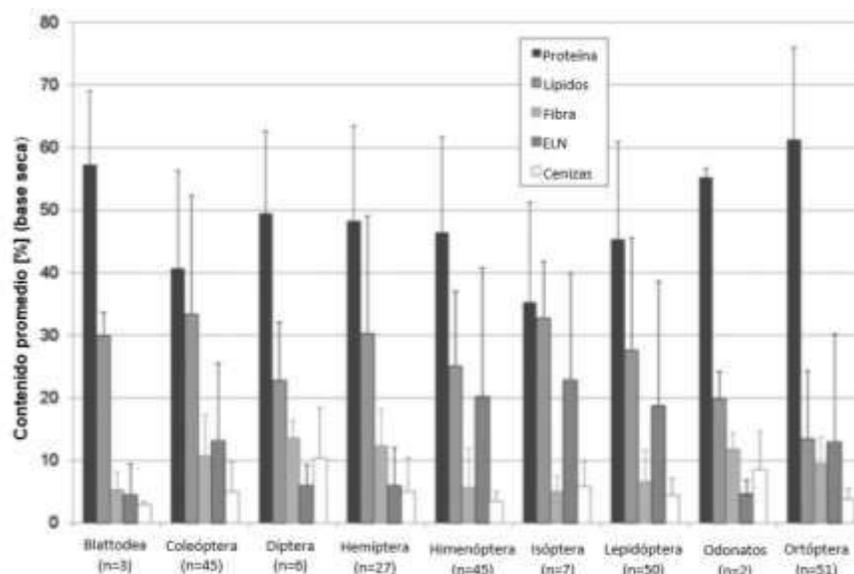
Recientemente, el empleo de la tecnología de fluidos supercríticos ha tomado relevancia para la hidrólisis de distintas materias orgánicas. Esta tecnología se basa en el sometimiento a condiciones de presión y temperatura a un fluido como el CO<sub>2</sub>

o el agua, hasta alcanzar su punto crítico, generando así un estado híbrido con propiedades entre los de su estado líquido y gaseoso. El empleo de agua subcrítica se ha propuesto como una alternativa para la hidrólisis de proteínas para la obtención de péptidos, dadas las características fisicoquímicas de este fluido en este rango y el grado de control de los factores que esta tecnología ofrece. Si bien el uso de esta tecnología para la generación de hidrolizados y péptidos bioactivos ha sido explorado en años recientes, resulta importante el profundizar en los mecanismos y efectos que su aplicación provoca, con énfasis en el entendimiento del uso de compuestos denominados como modificadores y para la generación de alternativas en el aprovechamiento de insectos comestibles mexicanos como el chapulín *Sphenarium purpurascens*. Es por ello que el objetivo de este trabajo es el estudiar los efectos del uso de modificadores como el ácido cítrico y el bicarbonato de sodio en la hidrólisis por agua subcrítica en un concentrado proteico de *Sphenarium purpurascens*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Insectos comestibles

Una de las principales características por las que los insectos han cobrado interés ante la comunidad científica y mundial, es debido a sus aportes nutricionales, aportes que tienen gran variabilidad dependiendo del estado de desarrollo de éstos, desde larvas, huevos o pupas, como ninfas o adultos, como del orden o especie a la cual pertenezcan (**Figura 2**) (Rumpold & Schlüter, 2013). La mayoría de los insectos comestibles proporcionan la energía y proteínas recomendadas para la dieta humana, además de cumplir con los requerimientos de aminoácidos esenciales. Así mismo, los insectos cuentan en su composición, ácidos grasos mono y poliinsaturados principalmente; son ricos en oligoelementos como cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio y zinc, y de vitaminas como riboflavina, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico en algunos casos (Baiano, 2020; Imathiu, 2020; Jantzen da Silva Lucas et al., 2020; Kouřimská & Adámková, 2016).



**Figura 2.** Contenido nutricional promedio (% base seca) de insectos comestibles categorizada por orden (Rumpold & Schüter, 2013). n: número de muestras de insectos obtenidas de la literatura; ELN: Extracto Libre de Nitrógeno. Ordenes de insectos: Blattodea (cucarachas), Coleópteros (escarabajos, larvas), Díptera (moscas), Hemíptera (insectos verdaderos), himenópteros (hormigas, abejas, avispas), Isóptera (termitas), lepidópteros (mariposas, polillas), Odonatos (libélulas, caballitos del diablo), Ortópteros (saltamontes, grillos, langostas).

El aporte energético de los insectos se encuentra en un rango de las 293 kcal a las 762 kcal por cada 100 gramos en peso fresco. En cuanto al contenido de proteínas, este varía dependiendo de la especie de insecto y/o de la etapa de desarrollo en el cual se encuentre, en un intervalo que va de un 18 % llegando hasta un 77 % en base seca (Ramos-Elorduy, 2008). Ramos-Elorduy *et al.*, (1997) reporta el análisis de 87 especies de insectos del estado de Oaxaca, donde además del contenido proteico, analizaron el grado de digestibilidad proteica (característica que evalúa el grado de asimilación de las proteínas consumidas), reportando un alto valor de digestibilidad, entre 76 % a un 96 %, valores ligeramente menores al de algunas proteínas de origen animal como el huevo (95 %) o proteína de origen vacuno (96 %), siendo mayor que la de muchas proteínas de origen vegetal. Aunado a su alta digestibilidad, los insectos presentan aminoácidos esenciales que las proteínas vegetales no contienen, como la fenilalanina, triptófano, lisina o treonina, posicionándolos como una mejor fuente proteica que los vegetales (Rumpold & Schlüter, 2013).

Los insectos presentan un contenido de lípidos que va de un 10 % hasta 60 %, la variación de la cantidad si bien depende de la especie, una concentración más alta comúnmente es encontrada en etapas tempranas de desarrollo, es decir, estados larvarios (Xiaoming *et al.*, 2010). Los lípidos además de ser conformadores de las paredes celulares son reservas energéticas que son empleadas para el vuelo en temporadas de migración o para la metamorfosis. La fracción lipídica de los insectos se conforma en mayor medida por triacilgliceroles (hasta el 80 %), seguido de los fosfolípidos (hasta un 20 %) y colesterol (alrededor del 4 %). La estructura de los compuestos lipídicos en los insectos tiene como característica relevante, estar conformada por ácidos grasos esenciales, con mayor frecuencia el ácido linoleico, ácido palmítico y alfa linolénico (Tzompa-Sosa *et al.*, 2014). Cabe destacar, que las cantidades y tipo de ácidos grasos en la fracción lipídica de los insectos mantienen una relación directa con la alimentación que mantienen (Paoletti, 2005).

Los insectos también tienen en su constitución compuestos considerados como fibra, la cantidad de fibra en promedio se encuentra en intervalos de un 8 % a 25 % en base seca, con mayor concentración en etapas de desarrollo avanzadas como ninfas o insectos adultos. El exoesqueleto que presentan los insectos está principalmente conformado por un polímero denominado quitina, considerado como fibra insoluble (FAO, 2013). En cuanto a vitaminas, los insectos presentan tanto vitaminas hidrosolubles como liposolubles, como la riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B12), retinol o beta-caroteno (Paoletti, 2005). Como contenido de minerales, el hierro, calcio, potasio, zinc, cobre, magnesio y manganeso, son algunos de los que se presentan con mayor incidencia en gran parte de los insectos comestibles caracterizados (Rumpold & Schlüter, 2013).

Adicionalmente al aporte nutricional de los insectos, éstos han presentado otros beneficios que pueden marcar la pauta para su integración a la dieta de una mayor proporción de la sociedad y como una alternativa para solución de problemáticas asociadas a la alimentación. La tasa de conversión de alimento es una de las características por las que algunos insectos se proyectan como una opción para un desarrollo sustentable. En breves palabras, se trata del índice de aprovechamiento con la que los insectos crean biomasa a partir de las cantidades de alimento consumido, la cual ha demostrado ser superior a la de cualquier animal de consumo tradicional (vacas, ovejas, cerdos o pollos) (Ramos-Elorduy, 2008). Otra característica relevante sobre el consumo de insectos es que se trata de un alimento con un proceso de producción amigable con el ambiente, pues resulta ser una actividad que emplea pocas cantidades de agua, recursos, se puede llevar a cabo en espacios reducidos, la cantidad de subproductos es mínimo y niveles bajos de generación de gases de efecto invernadero comparados con los generados por los sistemas de producción de ganado (FAO, 2013; Nijdam et al., 2012).

### 2.1.1 Insectos comestibles en México

México es uno de los países con mayor consumo de insectos, la inserción de dichos organismos data de épocas prehispánicas en la mayoría de las civilizaciones

asentadas en Mesoamérica. Como muestra, el Códice Florentino escrito por Fray Bernardino de Sahagún da indicios de la identificación y amplio conocimiento de por lo menos 96 especies de insectos que estaban ya inmersos en la cultura alimentaria de los grupos étnicos de ese entonces. Actualmente se tienen identificadas más de 500 especies en todo el país, pertenecientes a diferentes familias taxonómicas (**Figura 3**) dentro de las cuales destacan la hormiga chicatana (*Atta mexicana*, *Atta cephalotes*, *Atta texana*), los escamoles (*Liometopum apiculatum*), los gusanos de maguey (*Aegiale hesperiaris*), los chinicuiles (*Comadia redtenbacheri*) y los chapulines (*Sphenarium purpurascens*) (Cruz & Peniche, 2018).



**Figura 3. Número aproximado de especies de insectos comestibles registradas, por estado (Cruz & Peniche, 2018).**

### 2.1.2 *Sphenarium purpurascens*

Identificado como el insecto de mayor consumo y popularidad en nuestro país, el chapulín de la milpa, como se conoce comúnmente a la especie *Sphenarium purpurascens* Charpentier (**Figura 4**), pertenece a la familia Pyrgomorphidae del orden de los ortópteros, con más de 200 especies. Su distribución geográfica abarca

estados como Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Veracruz, Estado de México, Tlaxcala, Puebla y Querétaro (**Figura 5**) (Cuj-Laines et al., 2018)



**Figura 4.** *Sphenarium purpurascens* Charpentier (CONABIO, 2017)



**Figura 5.** Distribución de *Sphenarium purpurascens* Charpentier en México (Cerritos-Flores et al., 2014)

Este insecto, aunque cuenta con valor nutricional reconocido, es considerado como plaga en algunos campos de cultivo como maíz, frijol y alfalfa, principalmente. La obtención de la mayoría de chapulines para consumo se da mediante recolección con uso de redes cónicas, obteniendo entre 200 y 500 kg de biomasa por hectárea al año dependiendo del nivel de extracción, estimando hasta 350,000 toneladas en todo el país. La recolección si bien se da prácticamente durante todo el año, se sugiere dar inicio durante los meses de abril y mayo (en su etapa como ninfa) hasta noviembre cuando alcanzan su etapa adulta, con el fin de propiciar un sistema

sustentable y garantizar que la obtención de esta fuente proteica perdure (Cerritos Flores et al., 2015).

La composición proximal reportada para *Sphenarium purpurascens* consta de un porcentaje de humedad del 39 % al 42 %, la fracción seca está constituida de un 53.1 % a 70 % de proteína, 6.02 a 11 % de grasa y 21 a 30 % de carbohidratos, de los cuales la fibra cruda representa de 10 hasta un 19.5 %, y un aporte calórico de 412 kcal por cada 100 gramos (Melo-Ruíz et al., 2015; Ramos-Elorduy, 2008). La fracción proteica del chapulín cuenta con todos los aminoácidos esenciales, especialmente es rica en glutamato, glutamina, fenilalanina y leucina como se muestra en la **Tabla 1**. Además, la comparación del perfil de aminoácidos del chapulín con el de otras fuentes proteicas como el suero de leche, soya, carne o la proteína de huevo, permite establecer que la calidad proteica obtenida de este insecto puede ser comparable con proteínas de origen animal y de mejor calidad que las de origen vegetal (Rodríguez-Miranda et al., 2019).

**Tabla 1 Perfil de aminoácidos de aislado proteico (promedio en mg/g) de chapulín de la milpa comparado con aislados de suero de leche y soya. (Gunnerud et al., 2012; Melo-Ruíz et al., 2015).**

Aminoácido	Soya	Suero de leche	<i>Sphenarium purpurascens</i>
Isoleucina	-	7.6	4.5
Leucina	9.2	11.4	8.9
Lisina	6.3	10.4	5.7
Metionina	1.3	2.4	2.5
Cisteína	-	2.7	1.8
Fenilalanina	5.7	3.2	10.3
Tirosina	4.0	3.1	6.3
Treonina	3.6	8.1	3.1
Valina	5.0	6.6	5.7
Histidina	2.3	2.0	2.2

<b>Ácido aspártico</b>	11.3	11.9	9.5
<b>Alanina</b>	3.8	5.5	6.4
<b>Arginina</b>	8.1	2.1	6.0
<b>Glutamina</b>	19.2	19.5	9.8
<b>Glicina</b>	3.7	1.8	6.8
<b>Prolina</b>	4.8	7.3	6.2
<b>Serina</b>	4.6	5.7	4.8
<b>Triptófano</b>	-	2.0	0.7
<b>Ácido glutámico</b>	-	17.9	10.7

## 2.2 Compuestos bioactivos de insectos comestibles

Los insectos presentan una amplia biodiversidad, representando hasta el 90 % de la biomasa del reino animal, lo que ofrece, aunado a las características nutrimentales descritas, posibilidades en la identificación y obtención de compuestos bioactivos. Dadas las características conformacionales que presentan, algunas investigaciones han descrito actividades biológicas atribuidas a algunos compuestos presentes en los insectos, como compuestos fenólicos y alcaloides, ácidos grasos insaturados, la quitina o la identificación de secuencias de aminoácidos presentes en sus proteínas, a las que se les ha asociado actividades antioxidantes, antihipertensivas, hipoglucemiantes y antiinflamatorias (de Castro et al., 2018; Di Mattia et al., 2019).

### 2.2.1 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se han definido como pequeños fragmentos provenientes de proteínas que proporcionan algunos beneficios fisiológicos para la salud. A los cuales se les han asociado como interventores potenciales para prevenir o reducir el riesgo que algunas enfermedades crónicas. Los péptidos se encuentran inactivos cuando forman parte de su proteína parental, hasta ser liberados por acción de procesos de hidrólisis, como el uso de solventes

concentrados o enzimas proteolíticas (Bhandari et al., 2020). La actividad de los péptidos se vincula directamente a su composición y secuencia de aminoácidos. El tamaño para ejercer su actividad varía de los 2 a 20 residuos de aminoácidos y se ha encontrado multifuncionalidad en muchos de ellos, es decir, una secuencia específica de aminoácidos puede presentar dos o más actividades biológicas diferentes (Korhonen & Pihlanto, 2007).

Se considera que prácticamente de toda fuente proteica alimentaria se pueden obtener péptidos bioactivos, sin embargo, las proteínas de insectos comestibles han ganado interés como fuente de péptidos por la diversidad en el perfil de aminoácidos que presentan, lo que repercute en las distintas actividades biológicas asociadas como antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, hipoglucemiantes y antiinflamatorias. La obtención de éstos se ha reportado provenientes de distintas especies, etapas de crecimiento y con diferentes niveles de actividad al ser comparados con aquellos obtenidos de fuentes alimentarias tradicionales (de Castro et al., 2018; Nongonierma & FitzGerald, 2017).

### 2.3 Obtención de péptidos bioactivos

Los métodos más utilizados para la obtención de péptidos han sido las hidrólisis químicas, tanto ácidas como básicas e hidrólisis enzimáticas. La primera implica el uso de ácidos o álcalis altamente concentrados a altas temperatura y a menudo resulta en la producción de efluentes contaminantes. Este método genera un hidrolizado con alto contenido de sales como resultado de la neutralización del pH del proceso y el control de la obtención del producto final resulta complicado (Alvarez et al., 2012; Asaduzzaman et al., 2020; Haq et al., 2020). La aplicación de enzimas proteolíticas ha sido la principal vía para la obtención de péptidos bioactivos, usando enzimas de distintas fuentes como microbianas (alcalasa y termolisina), digestivas (pepsina y tripsina) y vegetales (papaína y bromelina) (Benítez et al., 2008; Fan et al., 2020; Wu et al., 2020). El uso de enzimas tiene como ventaja el ser un proceso en el cual los productos pueden ser predichos, el

empleo de complejos enzimáticos y adaptación de tecnologías emergentes para mejorar el proceso, sin embargo, aunque las enzimas tienen una amplia aplicación en la hidrólisis de proteínas, se trata de procesos de alto costo, de tiempos prolongados y requieren del uso de ácidos o bases para el control del pH, por lo que se generan efluentes contaminantes (Marcet et al., 2014; Park et al., 2019; Sarmadi & Ismail, 2010).

### 2.3.1 Agua subcrítica

En los últimos años, la tecnología de fluidos supercríticos se ha proyectado como una alternativa al uso de hidrólisis química y enzimática para la obtención de péptidos y aminoácidos libres, principalmente el agua subcrítica (AS) (Ahmed & Chun, 2018; Koh et al., 2019; Marcet et al., 2016; Powell et al., 2016; Sunphorka et al., 2012). Se denomina agua subcrítica, al estado de agua sobrecalentada por encima de su temperatura de punto de ebullición a 1 atm, a una presión suficiente para mantener el estado líquido ( $>100\text{ °C}$  a 0.1 MPa) y por debajo de su punto crítico ( $374\text{ °C}$  a 22 MPa) (**Figura 6**) (Vardanega et al., 2019; Zhang et al., 2019).

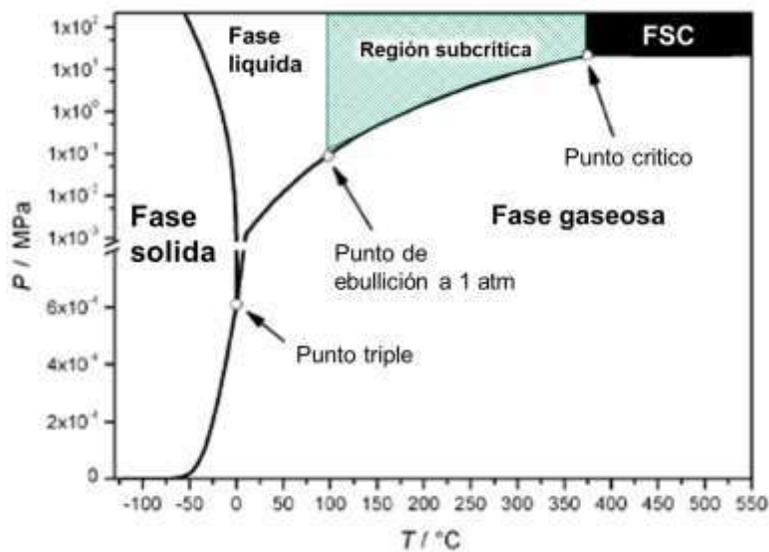
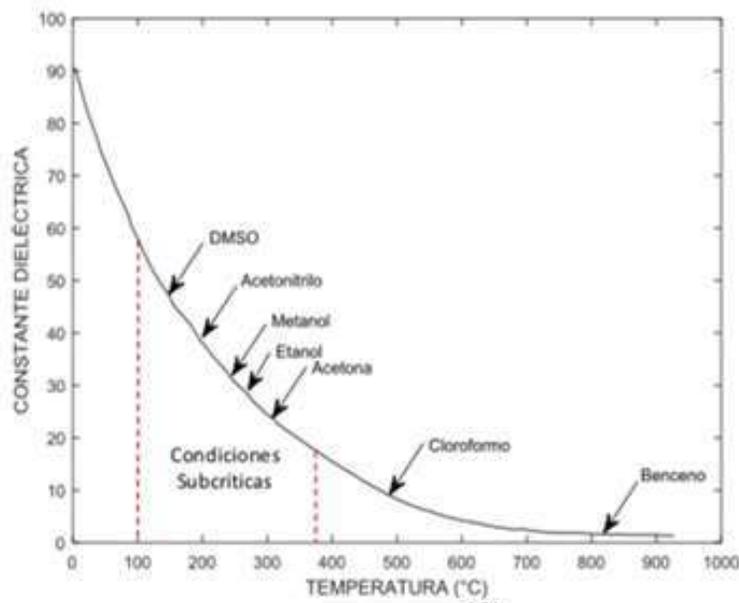


Figura 6. Diagrama de fase de los estados del agua (Thiruvankadam et al., 2015).

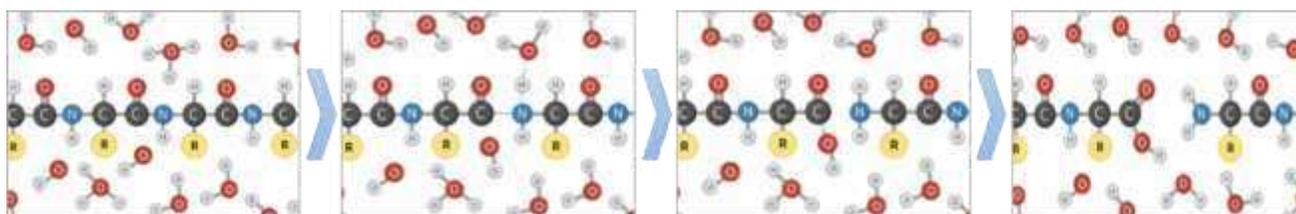
FSC: Fase Super Crítica

Con el incremento de la temperatura en la región subcrítica, las propiedades fisicoquímicas del agua cambian, como la disminución de su tensión superficial, viscosidad y el aumento de su difusividad. La disminución de la constante dieléctrica es otra de las características que se ve modificada cuando la temperatura y la presión mantienen en el rango subcrítico, lo que permite al agua interactuar con compuestos apolares. La constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) parte de un valor de 78 a 25 °C y 0.1 MPa y disminuye a 14.07 a 350 °C y 20 MPa, adoptando propiedades de otros solventes (**Figura 7**). Lo que promueve la interacción con aminoácidos no polares, disminuyendo su fuerza de unión y liberándolos. Además, la constante de ionización ( $K_w$ ) del agua aumenta hasta 3 órdenes de magnitud, teniendo valores de  $10^{-14}$  a 25 °C alcanzando  $10^{-11}$  a 300 °C, sin embargo, por arriba de esta temperatura comienza a descender teniendo  $10^{-20}$  a 380 °C (Möller et al., 2011). Este incremento en la concentración iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{H}_3\text{O}^+$  en el medio aumenta la reactividad del agua y por consiguiente su actividad como un catalizador ácido o básico para reacciones de hidrólisis (Gbashi et al., 2017; Marcet et al., 2016; Powell et al., 2017).



**Figura 7.** Comparación de la variación de la constante dieléctrica del agua sometida a temperatura y presión con las constantes dieléctricas de diferentes solventes a temperatura ambiente (Aldana et al., 2018)

El mecanismo de hidrólisis del enlace peptídico por agua subcrítica se ha asumido, en general, bajo un modelo de reacción de primer orden irreversible (Rogalinski et al., 2008a), identificando como catalizadores de la reacción a los iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{H}_3\text{O}^+$  presentes en el medio, confiriéndole características bicatalíticas al agua, aunque también se ha asumido como un ácido o base débil. La alta presión y temperatura promueven la pérdida de interacciones débiles, como los enlaces de hidrógeno, produciendo la pérdida de estructuras cuaternarias (si las tiene), terciarias y secundarias de las proteínas (Di Domenico Ziero et al., 2020). En el enlace peptídico (Figura 8) al N-terminal, genera la excitación del átomo lo que conduce a la escisión del enlace peptídico, después la presencia del ion  $\text{OH}^-$  al nuevo catión de carbono del C-terminal. La reacción debido a las características bicatalíticas del agua subcrítica podría llevarse a cabo de la misma forma con la unión en primera instancia del ion  $\text{OH}^-$  y después del protón  $\text{H}^+$  (Brunner, 2009).



**Figura 8. Mecanismo de hidrólisis del enlace peptídico**

La mayor parte de las investigaciones donde se emplea agua subcrítica como método de hidrólisis proteica, se han enfocado principalmente en la obtención de aminoácidos libres y no en sus intermediarios, los péptidos. Si se utiliza bajo la apropiada combinación de sus factores como la temperatura, presión y tiempo de reacción (principales factores del proceso), se puede lograr la obtención de hidrolizados o péptidos con potencial biológico, como lo reportan Powell *et al.*, (2016), quienes en su estudio demuestran el efecto de la aplicación de AS para constatar el potencial como alternativa a la hidrólisis enzimática de proteínas para este fin, comparando sus efectos en proteínas estándar como albumina de suero bovino,  $\alpha$ -globulina y  $\beta$ -caseína con los efectos provocados por tripsina.

Concluyendo en que los efectos de la aplicación de agua subcrítica en la obtención de péptidos bioactivos son comparables con el de algunas enzimas. Ahmed & Chun (2018) emplearon AS para el aprovechamiento de un subproducto de la industria pesquera, en su publicación, evalúan esta tecnología para la extracción de colágeno de la piel de atún y subsecuentemente el proceso de hidrólisis para la liberación de péptidos antioxidantes y antimicrobianos. Los hidrolizados obtenidos mostraron mayor actividad biológica, comparada con la de hidrolizados generados mediante un proceso enzimático con Alcalasa a partir del mismo material. Marcet et al., (2014) reportan el uso de agua subcrítica para la hidrólisis de la fracción proteica insoluble de la yema de huevo, implementando el uso flujos de nitrógeno y oxígeno, lograron reducir el tiempo del proceso e incrementar el rendimiento de la recuperación de péptidos que el obtenido por hidrólisis mediada por tripsina. Cho et al., (2019) aplicaron AS a un polvo de camarón tigre empleado como aditivo y saborizante, con la finalidad de mejorar las características organolépticas, tecnológicas (como su capacidad emulsificante y estabilizante) y funcionales, como su actividad antioxidante. Concluyendo en la mejora del producto mediante AS, atribuida a la hidrólisis proteica, confiriendo y mejorando sus características funcionales y la liberación de péptidos antioxidantes.

#### *2.3.1.1 Variables de tratamientos por agua subcrítica*

Los tratamientos con agua subcrítica constan de distintas variables a ser moduladas con la finalidad de obtener resultados del proceso favorables del proceso, algunos estudios reportados para la extracción e hidrólisis por este fluido mencionan que el proceso se guía bajo un modelo termodinámico. Las principales variables involucradas son la temperatura, la presión, el tiempo y el pH (Zhang et al., 2020). Aunado a esto, el estado o composición del material, uso de modificadores o conformación de la muestra, el gas que se emplee para ejercer la presión y el uso o no de cosolventes son otros factores para tomar en cuenta para promover un efecto específico sobre el material de interés y así obtener la variable respuesta deseada.

## Temperatura

Es uno de los factores principales en el proceso de hidrólisis, pues de la modulación en gran parte de ésta, dependerá la velocidad y producto de la reacción. El aumento de la temperatura no solo propicia los cambios en las propiedades fisicoquímicas del agua como su difusividad, tensión superficial, energía o constante dieléctrica, de manera general, el incremento en la temperatura del proceso incrementa las constantes de velocidad de reacción por consiguiente la reducción de los tiempos de esta misma (Watchararужи et al., 2008). Sin embargo, es importante aclarar, que a temperaturas altas o con su incremento, puede dar como resultado, la hidrólisis total a aminoácidos o generar ácidos orgánicos y otros subproductos por la descomposición de estos últimos, por lo que la temperatura está en función de los productos que se quieran obtener.

Un punto más a tomar en cuenta en la modulación de este factor es el origen de la proteína, ya sea animal o vegetal. Basado en los resultados de distintas publicaciones, se ha identificado que, para las proteínas de origen animal, en general, requieren mayor temperatura o tiempos más prolongados que las de origen vegetal (Asaduzzaman et al., 2018; Asaduzzaman & Chun, 2013; Sereewatthanawut et al., 2008). Por ello, para establecer las temperaturas de reacción habrá que tomar en cuenta el origen del material y el producto que se quiera obtener principalmente, sin dejar de lado, la composición o estado de la materia que se pretenda hidrolizar.

## Presión

Factor clave en mantener por debajo del punto de vapor al agua y por ende en su fase líquida a altas temperaturas, permitiendo su estado subcrítico. A diferencia de la temperatura, la modulación de la presión no ha presentado un efecto significativo en el mecanismo de hidrólisis, sin embargo, la elección del gas que genere la presión en el equipo ha demostrado ser un factor a tomar en cuenta, ello en equipos donde la presurización se genera por la presencia de éstos (Kim et al., 2009; Marcet et al., 2014).

### Tiempo

El tiempo del proceso dependerá primordialmente del producto que se pretenda obtener y a su vez, del rango de temperatura a la que se pretenda trabajar; temperaturas altas requerirán menor tiempo y viceversa. El tiempo como factor se ha abordado desde dos puntos principalmente, uno donde este sea fijo para evaluar diferentes temperaturas y variaciones de otros factores y otro donde este pueda ser modificado con la finalidad de explorar los efectos de una misma temperatura o de otros factores fijos o su interacción (Zhang et al., 2020).

### Atmósfera

En algunos equipos, la presión se genera mediante la inserción de un gas específico y en otros mediante un compresor de aire seco. La selección del gas para someter el proceso de agua subcrítica ha demostrado ser una parte importante en los procesos, en los de extracción principalmente. El gas funge como el agente que genera la presión en la atmósfera del equipo durante el proceso, dentro de los gases empleados se encuentran el nitrógeno, CO<sub>2</sub> y oxígeno. Dentro de los efectos asociados a la presencia de un gas en especial están la reducción de los tiempos de reacción o de algunas modificaciones en los aminoácidos o péptidos. Como muestra lo reportado por Marcet *et al.*, (2014), donde evaluaron el efecto de atmosferas puras de nitrógeno y oxígeno en la hidrólisis de un extracto de proteínas insolubles de huevo. Los resultados concluyen, que, comparado al tratamiento con nitrógeno, se obtuvieron péptidos con propiedades funcionales disminuidas cuando se usó la corriente de oxígeno; mencionando que esto pueda deberse, que derivado del uso de oxígeno, se puedan producir cambios estructurales en los aminoácidos de los péptidos recuperados. Zhong & Jin, (2008), observaron un incremento en la tasa de hidrólisis de suero de leche bajo una atmósfera únicamente de CO<sub>2</sub>, atribuyendo este efecto por la promoción de la hidrólisis catalizada por un agente ácido.

### pH

Desde que se tiene entendido, que durante en el proceso de agua subcrítica se ve liberados iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{H}_3\text{O}^+$  derivados de la ionización del agua, se ha especulado que durante el proceso de hidrólisis podría tener un comportamiento catalítico tanto como ácido, base o bicatalítico (Powell *et al.*, 2016). El efecto directo del pH durante el proceso no ha sido del todo explorado, aunque hay reportes del uso fijo de un pH este ha sido principalmente modificado o establecido por la presencia de algún modificador o aditivo en específico al proceso como el hidróxido de sodio, el ácido fórmico, cloruro de sodio o el bicarbonato de sodio (Espinoza & Morawicki, 2012).

#### Estado del material

El estado del material resulta importante tomar en cuenta pues dependiendo de esto los demás factores podrán ser seleccionados en niveles adecuados para la obtención de los resultados buscados. Dentro de éstos se toman en cuenta el tamaño de partícula, si se trata de un aislado o el producto de origen, y la composición de ésta, pues la presencia de otros compuestos podría afectar el rendimiento del proceso de hidrólisis (Wiboonsirikul & Adachi, 2008).

#### Cosolventes

En cuanto al empleo de cosolventes en los procesos de extracción e hidrólisis por agua subcrítica es posible encontrar reportes del uso de etanol y metanol con mayor frecuencia. Porto *et al.*, (2014), evaluaron el rendimiento en un proceso de extracción de proantocianidinas por  $\text{CO}_2$  supercrítico empleando agua, metanol y etanol como cosolventes, obteniendo mejores rendimientos en la extracción de estos compuestos agregando un 15 % de etanol a la mezcla. De manera general, la elección de solvente o de las mezclas de estos ha sido empleado para mejorar el rendimiento de extracción de compuestos, dicho de otro modo, de promover la interacción con los compuestos en base a su polaridad, tomando en cuenta a su vez, de las características reológicas o conformacionales que tenga la materia prima a ser tratada (Marcus, 2018).

#### Modificadores

El empleo de aditivos o modificadores han demostrado tener el potencial de modular la hidrólisis y mejorar algunos parámetros como la disminución de tiempos de reacción o minimizar la temperatura del proceso para obtener el producto deseado. Algunos de los aditivos o compuestos explorados en algunas investigaciones han sido el ácido acético, ácido oleico, ácido láctico, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y cloruro de sodio. Espinoza & Morawicki (2012) exploraron el efecto de 5 modificadores (ácido acético, ácido láctico, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio) en el tiempo, temperatura y grado de hidrólisis en suero de leche. Teniendo como resultados que el aditivo con mayor influencia en el proceso de hidrólisis resultó ser el bicarbonato de sodio, que, en comparación con el agua únicamente, la presencia de este modificador aumentó el grado de hidrólisis cuatro veces y la producción de aminoácidos libres en un 44 %, así como en la disminución del peso molecular de los péptidos producidos, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, además, se observó un efecto positivo en la conservación de algunos aminoácidos como la arginina e histidina. Este efecto directo en la conservación o hidrólisis de algunos aminoácidos también fue reportado por Kang & Chun, (2004) en fibra de seda, por lo que el explorar o emplear aditivos que modulen la hidrólisis en algunos aminoácidos resulta de gran relevancia.

El uso de AS ha generado gran interés pues tiene como beneficios el que su aplicación conlleva periodos cortos de tiempo, el ser un proceso altamente modulable, no se necesitan empleo de solventes y ser considerado una tecnología verde, pues no se producen efluentes (Zhang et al., 2020). Los mecanismos, efectos y procesos involucrados en la aplicación de AS para la hidrólisis de proteína en la obtención de péptidos aun no son del todo bien entendidos, por lo que es necesaria más información para el poder predecir o promover con mayor eficiencia la obtención de productos específicos y de ciertas características.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los insectos comestibles han formado parte de la alimentación de distintas sociedades a través del tiempo, sin embargo, son las problemáticas recientes las que han promovido mayor interés en la investigación e integración como fuente alimentaria y de compuestos bioactivos.

Una de las razones de mayor impulso a la investigación de los insectos comestibles, ha sido la identificación de compuestos con actividades biológicas que puedan traer consigo beneficios a la salud o en la prevención de enfermedades crónicas, como los péptidos bioactivos, a los que se les han asociado múltiples bioactividades como antioxidantes, hipoglucemiantes y antiinflamatorios. México cuenta con el chapulín *Sphenarium purpurascens*, este insecto catalogado como plaga en algunas zonas agrícolas, presenta una cantidad y calidad relevante de proteínas proyectándose como una excelente fuente proteica que resulta importante ser aprovechado. Una alternativa de aprovechamiento podría ser la producción de péptidos bioactivos. La obtención de ellos se ha dado mediante el uso de solventes concentrados o procesos enzimáticos, procesos que resultan caros a la larga, periodos prolongados y que impactan de forma negativa al medio ambiente por la producción de efluentes.

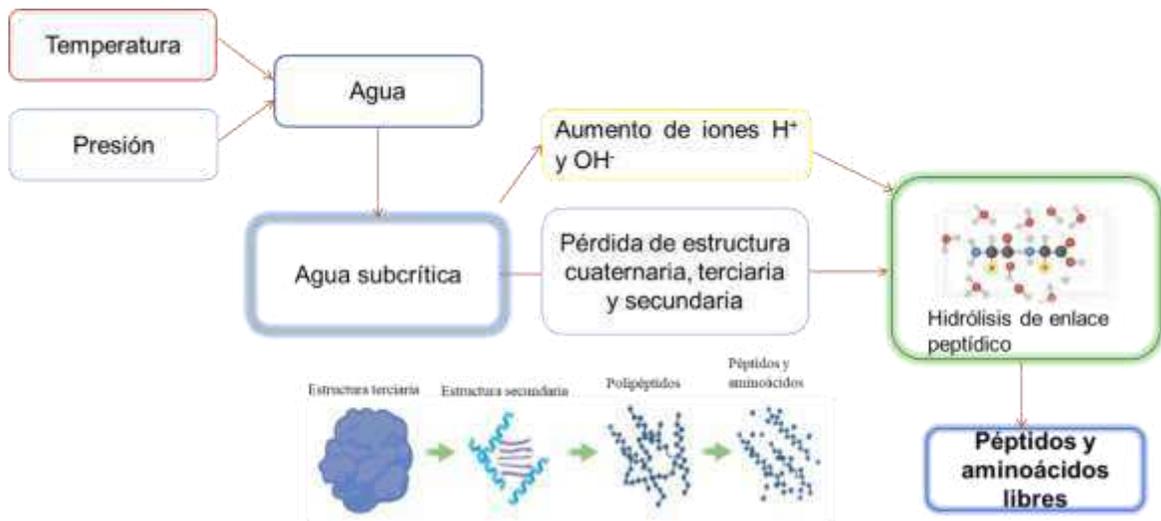
La aplicación de agua subcrítica se ha posicionado como una alternativa verde para la obtención de péptidos y aminoácidos de distintas fuentes proteicas, sin embargo el efecto en la modulación del proceso de hidrólisis utilizando modificadores, aún no está del todo elucidado, por lo que resulta importante el profundizar en los mecanismos para obtener una hidrólisis diferenciada y asociarla al uso de modificadores que permitiendo reducir los niveles de algunos parámetros para la promoviendo de hidrolizados con actividades biológicas. Además, dando con ello la generación de alternativas en el aprovechamiento de los insectos comestibles mexicanos con una tecnología verde.

## 4. HIPÓTESIS

Durante la hidrólisis mediante agua subcrítica de la fracción proteica del chapulín de la milpa *Sphenarium purpurascens*, los cambios de las propiedades fisicoquímicas del agua (tales como disminución de su tensión superficial, el incremento de la energía, aumento de su difusividad, aumento de su constante de ionización), en conjunto a la alta presión y temperatura, provocarán la pérdida de los enlaces intermoleculares de las proteínas. A su vez, en presencia de modificadores, éstos aumentarán la cantidad de iones  $H^+$  y  $OH^-$  dispersos en el medio, que catalizarán la hidrólisis de los enlaces peptídicos y serán directamente dependientes al tipo de modificador empleado. Liberando péptidos con actividad biológica antioxidante y antihipertensiva.

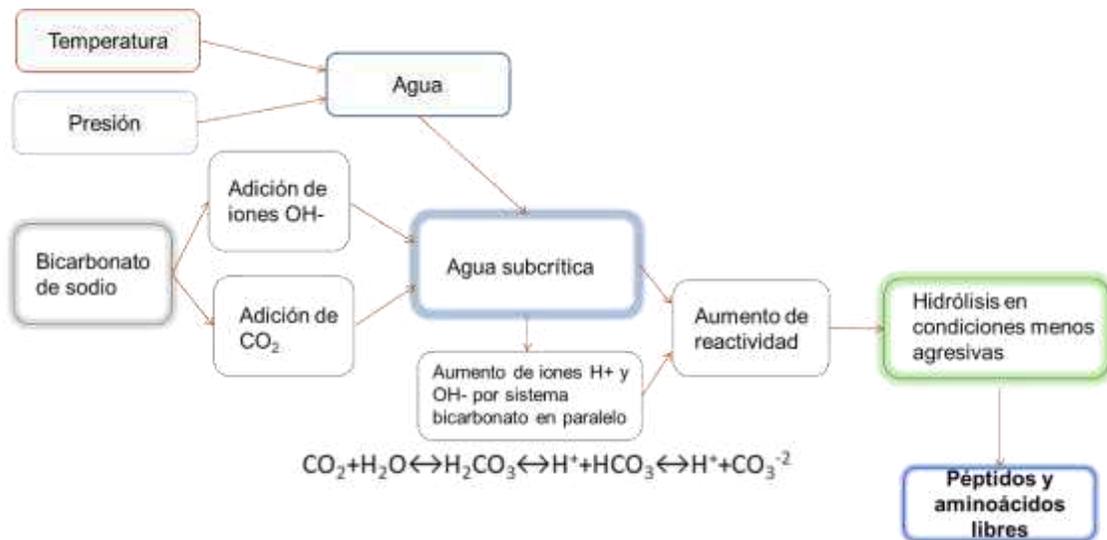
### 4.1 Diagramas causales de la hidrólisis

En la **Figura 9** se presenta la hidrólisis proteica por agua subcrítica. El efecto de la presión ( $> 0.1$  MPa) y temperatura ( $> 100$  °C), sin llegar a sus valores críticos, aplicados al agua provoca la generación de un rango de fase denominada como agua subcrítica, donde la proteína sometida a este fluido pierde las estructuras cuaternarias, terciarias y secundarias en condiciones menos agresivas que las que se necesitan cuando la temperatura o presión es aplicada por separado. Además, por el efecto de ambos factores se genera un aumento en la constante de disociación de las moléculas de agua, lo que aumenta la presencia de iones  $H^+$  (en el agua estarán en forma del ion  $H_3O^+$ ) y  $OH^-$  en el medio acuoso, identificados como los catalizadores de la hidrólisis del enlace peptídico y así la liberación de péptidos y subsecuentemente aminoácidos



**Figura 9. Diagrama causal de hidrólisis por agua subcrítica**

En la **Figura 10** se muestra el diagrama causal de hidrólisis empleando bicarbonato de sodio. El uso del bicarbonato de sodio, como modificador, en el proceso de hidrólisis por agua subcrítica agrega iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{CO}_2$  al medio una vez este es totalmente disuelto en agua. La adición de éstos provoca la generación de iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$ , por un lado, el ion  $\text{OH}^-$  del bicarbonato interacciona con las moléculas de agua en estado subcrítico, aumentando la disociación de las moléculas de agua que interaccionen con él, por otro, el  $\text{CO}_2$  solubilizado en agua genera un mecanismo en paralelo (el sistema de bicarbonato) que provoca la generación de más iones aumentando así la reactividad del medio comparado con el uso del agua únicamente. Dado que la presencia de los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$  son la clave para la aceleración de la hidrólisis del enlace, es posible emplear condiciones de temperatura y presión menos agresivas para la obtención del mismo resultado o en la reducción del tiempo de reacción.



**Figura 10. Diagrama causal de hidrólisis por AS con bicarbonato de sodio**

El diagrama causal de la hidrólisis empleando ácido cítrico como modificador se muestra en la **Figura 11**. La adición de ácidos, en este caso, de ácido cítrico al agua, provocará el aumento de la presencia de iones H<sup>+</sup> derivados de la solubilización del ácido, por cada molécula de ácido son liberados 3 H<sup>+</sup>. El efecto resulta similar al del uso del bicarbonato, pues esta adición al medio provoca un aumento de la reactividad del agua, por ende, la reducción en los niveles de tiempos o temperatura necesarios para la liberación de péptidos. A diferencia del bicarbonato, el uso de este ácido no generaría un mecanismo en paralelo al proceso, así se esperarían una menor cantidad de iones agregados al medio.



**Figura 11. Diagrama causal de hidrólisis por AS con ácido cítrico**

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Diseñar y evaluar el proceso de hidrólisis de un concentrado proteico de *Sphenarium purpurascens* para la liberación eficiente de péptidos bioactivos empleando modificadores en el proceso de agua subcrítica.

### 5.2 Objetivos específicos

- Obtener un concentrado proteico de chapulín de la milpa *Sphenarium purpurascens*
- Evaluar el efecto del uso de modificadores en el proceso de agua subcrítica para la generación de hidrolizados a partir de un concentrado de proteínas de *Sphenarium purpurascens* y su comparación con un tratamiento enzimático con papaína
- Caracterizar y evaluar las actividades antioxidantes y antihipertensivas de los hidrolizados obtenidos
- Evaluar y caracterizar el mejor tratamiento obtenido para la obtención de péptidos bioactivos en una cinética de hidrólisis
- Evaluar el efecto en el perfil de aminoácidos durante el tratamiento seleccionado

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Caracterización de material

#### 6.1.1 Acondicionamiento de materia

La obtención de los chapulines *Sphenarium purpurascens* se obtuvo a través de un proveedor de la empresa Delinsect®. Especificando el mínimo procesamiento de estos, únicamente sometiéndolos a un periodo de ayuno de dos días para limpiar el tracto gastrointestinal de los insectos y un proceso de escaldado (100 °C por 20 minutos) como método de sacrificio. A su recepción, se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su análisis.

#### 6.1.2 Caracterización proximal

Se determinó la composición proximal de los chapulines por los métodos descritos por la AOAC (**Tabla 2**) (2012). Para la determinación de proteínas, se utilizó como factor de conversión 5.60 en el material, pues los compuestos nitrogenados en el exoesqueleto podrían provocar la sobreestimación del contenido de proteínas (Janssen et al., 2017).

**Tabla 2. Métodos para la caracterización proximal (AOAC, 2012)**

<b>Análisis</b>	<b>Métodos</b>
Humedad	A.O.A.C 925.09
Cenizas	A.O.A.C 923.03
Proteína cruda	A.O.A.C 920.87
Grasa cruda	A.O.A.C 920.39C
Fibra cruda	A.O.A.C 962.09
Extracto libre de nitrógeno	A.O.A.C 986.25

#### Determinación de quitina

Se siguió el protocolo descrito por Adámková et al., (2017). Brevemente, se tomaron 4 muestras de 1.6 g (2 para la determinación de quitina y 2 para la

determinación de nitrógeno en quitina). Luego, la muestra se hidrolizó durante 30 min con 100 ml de HCl 1 M a 100 °C. El hidrolizado obtenido se filtró y se lavó con 500 ml de agua destilada a 80 °C hasta que se alcanzó un pH neutro. Debido a que los insectos contienen una cantidad de lípidos considerable, que puede ralentizar o detener por completo la filtración, se agregaron 15 ml de KOH al 5% durante la filtración, lo que provocó la saponificación de las grasas, aumentando así su solubilidad en agua y permitiendo el lavado de la muestra. A cada muestra filtrada se le agregaron 100 ml de NaOH 1 M y se dejaron en agitación durante 24 h a 80 °C. Las muestras fueron filtradas nuevamente y se lavaron con 500 ml de agua a 80 °C. Dos de las muestras se secaron, pesaron, incineraron y pesaron, luego se calculó el contenido de quitina usando la formula descrita a continuación. A las otras dos muestras se les determinó el contenido de nitrógeno mediante el método Kjeldahl.

$$\% \text{ de quitina} = \left( \frac{\text{peso del material seco} - \text{peso del material incinerado}}{\text{peso de la muestra}} \right) \times 100$$

### 6.1.3 Obtención del concentrado proteico

Los insectos fueron liofilizados y molidos empleando un molino de café. Se tamizaron con un tamiz con luz de 0.5 mm y almacenaron a -20 °C. El aislamiento de proteínas se realizó por precipitación por punto isoelectrico, empleando un diseño unifactorial evaluando 4 puntos de pH, (3, 3.5, 4 y 4.5) basado en la metodología descrita por Zielińska et al., (2018), sustentado por la falta de información sobre el punto isoelectrico de las proteínas de esta especie de ortóptero. Primero, los polvos de chapulín se desgrasaron, por medio de agitación con etanol al 97 % en relación 1:10 durante 5 h, para después ser centrifugados a 3500 rpm por 15 min a 20 °C y recuperar la pastilla. Una vez obtenida la pastilla, se mantuvieron en agitación durante 1 h con una solución de NaOH 0.2 % en una proporción de 1:10 (p / v), pH 12, a temperatura ambiente, para ser centrifugados a 8000 g por 20 min. La precipitación por punto isoelectrico en los pH mencionados

se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las proteínas precipitadas se centrifugaron a 4 °C durante 20 min a 8000 g y fueron lavados con agua destilada. Luego, los concentrados proteicos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C.

#### Método de extracción por ultrasonido

A la par del diseño unifactorial para la identificación del punto isoeléctrico de las proteínas de chapulín, se exploró un método de extracción empleando ultrasonido recientemente publicado por Yoon et al., (2019). Brevemente, 10 g de la muestra desgrasada fueron disueltas en 200 ml de agua destilada, después la sonda de ultrasonido se fijó a 20 kHz con una amplitud al 75 %. Se evaluó tanto el efecto del ultrasonido de forma continua durante 15 min, como por pulsos en el mismo lapso, con pulsos cada 3 s entre intervalos de 1 s. Los extractos proteicos se filtraron, liofilizaron y se almacenaron a - 20 °C hasta su análisis.

#### 6.2 Diseño experimental del proceso con agua subcrítica

El proceso de hidrólisis por agua subcrítica se realizó empleando un equipo de diseño en batch, marca Thar Waters modelo SFE 500 (Waters, USA) (**Figura 9**).



**Figura 12. Equipo de fluidos supercríticos Thar Waters**

Para evaluar los efectos de los factores involucrados y sus interacciones durante el proceso de hidrólisis por agua subcrítica. Se utilizaron dos modificadores, bicarbonato de sodio y ácido cítrico. La elección de la adición y concentración de modificadores se basa en la revisión de literatura donde éstos son empleados para la promoción del grado de hidrólisis y liberación de aminoácidos (Espinoza & Morawicki, 2012; Marcet et al., 2016; Srinivas & King, 2010).

Para cada modificador se realizó un diseño factorial  $2^3$  con puntos al centro con 1 réplica, donde los tres factores serán se ubicaron en la siguiente región:

- Temperatura del reactor con dos niveles 100 °C y 130 °C.
- Presión en MPa a 1 y 20 MPa.
- Concentración del modificador de 0.5 y 1 M.

Con lo que los puntos al centro estuvieron ubicados en 115 °C de temperatura y 10 MPa. Estos puntos al centro fueron utilizados para verificar si hay posibilidades de tener un óptimo en esta región experimental.

El tiempo de la reacción fue de 30 minutos, pues resulta ser el promedio de tiempo empleado a las condiciones de temperatura y de uso de modificadores, previamente mencionados.

Se integró un tratamiento control sin la presencia de modificadores, considerado a 115 °C y 10 MPa de presión.

Las variables respuestas que se seleccionaron para evaluar los efectos de los tratamientos fueron el grado de hidrólisis, la distribución molecular y las actividades biológicas de los hidrolizados.

#### 6.2.1 Modelaje de la cinética de la reacción de hidrólisis por agua subcrítica

Una vez identificado la mejor condición e hidrólisis y con la finalidad de generar conocimiento a mayor profundidad sobre el proceso, se estudiaron modelos cinéticos de la reacción, fundamentándose en algunas publicaciones (Lamp et al.,

2020; Rogalinski et al., 2008b; G. Zhu et al., 2011), empleando inicialmente un esquema simplificado basado en reacciones consecutivas (Ecuación 1):



*Ecuación 1*

La obtención de los datos requeridos para estimar velocidades de reacción involucradas, se generarán utilizando la condición óptima de la hidrólisis, midiendo a diferentes tiempos el grado de hidrólisis, proteína soluble, aminoácidos libres, quitina y azúcares reductores. Como se ha mencionado previamente, la hidrólisis por agua subcrítica se ha entendido como una reacción irreversible de primer orden, por lo que el modelo cinético puede ser obtenido y descrito utilizando las correspondientes ecuaciones diferenciales y estimando mediante regresiones no lineales.

### 6.2.2 Hidrólisis enzimática

Para el procedimiento de hidrólisis enzimática, se utilizó el método reportado por Abadía-García et al. (2016). La enzima empleada fue papaína (elección tomada basada en la proporción de liberación de péptidos bioactivos en un análisis *in silico* previo) con relación enzima:sustrato de 2 % (Purschke et al., 2018). En 200 ml de agua destilada se homogenizaron 5.6 gramos de aislado proteico de chapulín, se colocaron en un reactor enchaquetado por el que se recirculó agua a 50 °C procedente de un baño termostático (PolyScience) con la finalidad de mantener constante la temperatura del proceso. La agitación durante la hidrólisis se realizó con un agitador magnético a 180 rpm. La reacción se mantuvo a pH 7.0 con una solución de NaOH 0.1 M durante 180 min. La reacción se detuvo calentando la mezcla en un baño caliente a 90 °C por 15 min. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

### 6.3 Caracterización de los hidrolizados

### 6.3.1 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se determinó por el método OPA, descrito por Nielsen et al., (2001). El reactivo orto-ftalaldehído (OPA), se preparó de la siguiente manera; 7.620 g de tetraborato de sodio decahidratado (Borax) se disolvieron en 140 ml de agua destilada, mientras que 0.2 g de SDS se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Una vez completamente disueltos, se mezclaron y posteriormente, fueron adicionados 0.16 g de OPA 97% previamente disueltos en 4 ml de etanol. Finalmente se añadieron 0.176 g de ditioneitol 99% (DTT) aforando hasta 200 ml de agua destilada.

Todas las lecturas espectrofotométricas se realizaron a 340 nm, utilizando agua destilada como control. Para analizar una muestra, 200 µl de muestra se adicionaron a un tubo Eppendorf de 2 ml con 1.5 ml de reactivo OPA y se mezclaron en vórtex por 5 s. Se dejó incubar por 2 min y se realizó la lectura en el espectrofotómetro. Para la cuantificación se empleó una curva de calibración con L-serina en un rango de concentración de 0.00625 a 0.1 mg/ml.

#### 6.3.1.1 *Proteína soluble*

La determinación de proteína soluble se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bradford (1976) con algunas modificaciones. Brevemente para la preparación del reactivo se pesaron 25 mg de Azul Comassie G-250 (Biorad, USA) y se disolvieron en 12.5 ml de etanol 95 %, al cual se añadieron 25 ml de ácido fosfórico (85 %) y se mantuvo en agitación por 2 horas para homogenizar. Posteriormente, se agregó agua destilada hasta aforar 250 ml, se mantuvo en agitación por 24 horas a temperatura ambiente, protegido de la luz. Para el ensayo se tomaron 20 µl de la muestra a una concentración conocida a la cual se agregó 1 ml del reactivo Bradford y se procedió a leer a 595 nm. Para la cuantificación se empleó una curva de calibración con albumina de suero bovino a un rango de concentración de 0.125 a 2 mg/ml.

#### 6.3.1.2 *Aminoácidos libres*

La determinación de aminoácidos libres se realizó siguiendo el protocolo descrito por Yemm et al., (1955) con modificaciones. 8 g de ninhidrina (Sigma Aldrich, USA) y se disolvieron con acetona hasta alcanzar un volumen de 100 ml. En tubos de ensayo se agregaron 1 ml de la muestra, se aforó a 4 ml y 1 ml de la solución de ninhidrina. Posteriormente, los tubos se taparon y se incubaron a 95 °C en baño María por 15 min. Pasado el tiempo y a temperatura ambiente se agregaron 1 ml de etanol al 50 % y 4 ml de agua destilada. Se procedió a leer a 570 nm. Se utilizó una curva estándar de L-glicina para la cuantificación de las muestras.

### 6.3.2 Electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis en gel SDS-PAGE, se siguió el protocolo descrito por Yi et al., (2013). Brevemente, las muestras se disolvieron en tampones Tris/HCl 20 mM, EDTA 2 mM a pH 8.0 con una concentración de proteína de 1 mg/ml y fueron tratadas en baño ultrasónico durante 10 min. Las soluciones con la muestra fueron mezclados con el tampón de muestra (Tris / HCl 20 mM, EDTA 2 mM pH 8.0, SDS al 5 % (p/v), 0.016 % (p/v) de DTT, 0.02% de azul coomassie) en una proporción de 1:1. Posteriormente, las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min, se centrifugaron durante 2 min y posteriormente fueron depositadas en el gel. Se utilizaron proteínas estándar de 10-250 kDa (Bio-Rad) como patrón de referencia.

### 6.3.3 Determinación de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se realizó siguiendo lo descrito por Henderson et al. (2000) con un sistema HPLC Agilent series 1260 (Palo Alto, California, E.U.A.). Para el análisis se realizó la derivación añadiendo 0.5 µl de la muestra, 2.5 µl de amortiguador de boratos 0.4 N (pH 10.2), 0.5 µl del reactivo orto-ftalaldehído y 32 µl de agua.

Se empleo una columna Zorbax Eclipse-AAA (4.6 x 150 mm, 5 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.U.A.) unida a una precolumna con filtros de 4.6 x 12.5 mm, 5 µm (Zorbax Eclipse-AAA 4 pack, Agilent Technologies, Palo Alto, California, E.U.A.). La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. Para la

separación se utilizó una mezcla de disolventes (flujo de 2 ml min<sup>-1</sup>), la mezcla estaba constituida por 40 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8) (fase móvil A) y acetonitrilo:metanol:agua (45:45:10, v/v/v) (fase móvil B). El gradiente de polaridad fue de: 0 min, 0% B; 0-1.9 min, 0% B; 1.9-21.1 min, 57% B; 21.1-21.6 min, 100% B; 21.6-25 min, 100% B; 25-25.1 min, 0% B; 25.1-26 min, 0% B.

Para la detección de los aminoácidos derivados se empleó un detector de arreglo de diodos (DAD) y se leyó a una longitud de onda de 338 nm y 226 nm.

Para la identificación y cuantificación de aminoácidos se utilizaron estándares de referencia, se realizó el ajuste de curvas con diferentes concentraciones: tirosina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, valina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, metionina de 0.015 a 0.3 mg ml<sup>-1</sup>, histidina de 0.025 a 0.5 mg ml<sup>-1</sup>, glicina de 0.005 a 0.1 mg ml<sup>-1</sup>, treonina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, fenilalanina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, isoleucina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, leucina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, ácido aspártico de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, ácido glutámico de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, serina de 0.015 a 0.3 mg ml<sup>-1</sup>, , arginina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, alanina de 0.02 a 0.4 mg ml<sup>-1</sup>, y lisina de 0.015 a 0.3 mg ml<sup>-1</sup>.

#### 6.3.4 Determinación de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se midió mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Wood et al., 2012). Se disolvieron 0.5 g de DNS en 15 ml de agua destilada a 80 °C, por otro lado, 0.8 g de NaOH fueron disueltos en 20 ml de agua destilada y lentamente 15 g de tartrato de sodio-potasio decahidratado fueron agregados. Se mezclaron ambas soluciones a temperatura ambiente. Para la determinación se añadieron 1 ml de muestra a concentración conocida con 1 ml de reactivo DNS, se calentaron en baño María durante 5 minutos. Luego se tomó la absorbancia a 540 nm. Se preparó una curva estándar usando D-glucosa para la cuantificación en las muestras.

#### 6.4 Evaluación de actividades biológicas *in vitro*

##### 6.4.1 Actividad inhibidora de ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina)

La actividad inhibidora de ECA se determinó siguiendo el método descrito por Cushman & Cheung, (1971) con algunas modificaciones por Wu et al., (2002). En esta prueba la inhibición de la ECA se ve reflejada con una menor formación de ácido hipúrico, debido a que el dipéptido His-Leu se convierte en ácido hipúrico por la eliminación de su carbono terminal por acción de la ECA.

Aproximadamente 0.25 g de los hidrolizados se disolvieron en 3 ml de agua desionizada. Una alícuota (200 µl) de hipuril-histidil-leucina (Hip-His-Leu 5 mM en tampón de borato 0.1 M que contiene NaCl 0.3 M, pH 8.3) se mezcló con 60 µl de tampón de borato de sodio y pre incubado con 20 µl de la muestra inhibidora (agua para el control) durante 5 min a 37 °C. La reacción se inició mediante la adición de 20 µl de solución de ECA (tampón borato de sodio pH 8.3 que contiene ECA a una concentración de 0.1 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo 250 µl de HCl 1 N. El ácido hipúrico formado fue cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución sistema (HPLC) Agilent series 1260 (Palo Alto, California, E.U.A.) con detector de arreglo de diodos UV-VIS. La separación se llevó a cabo a 25 °C con una columna ZORBAX 300SB-C18, usando un sistema de solventes con flujo de 0.8 ml/min. El solvente A fue ácido trifluoroacético al 0.1% en agua y el solvente B fue ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo. Se aplicó un gradiente lineal de 0 a 80% de solvente B por 15 minutos. Se inyectaron 20 µl de muestra y la absorbancia se configuró a 228 nm.

La inhibición de la actividad ECA se expresó por la IC<sub>50</sub>, que es definido como la concentración de muestra (mg/ml) necesaria para inhibir la actividad de una enzima o compuesto en un 50%. La IC<sub>50</sub> se calculó utilizando la extrapolación gráfica de los % de inhibición de la ECA en función de las diferentes concentraciones evaluadas (Donkor et al., 2007).

#### 6.4.2 Actividad Antioxidante

##### Ensayo ORAC

Se siguió el procedimiento descrito por Davalos et al., (2004). La reacción se llevó a cabo en tampón de fosfatos 75 mM (pH 7.4). La solución de la muestra de

interés (20  $\mu$ l) y solución de fluoresceína (120  $\mu$ l) se colocaron en el pozo de la microplaca, se completó hasta 200  $\mu$ L con el tampón fosfato. La mezcla se preincubó durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, la solución de AAPH (60  $\mu$ l) se añadió rápidamente a los pozos. La microplaca se colocó inmediatamente en el lector y la fluorescencia se registró cada minuto durante 151 min. La microplaca se agita automáticamente antes de cada lectura. Se empleó un pozo como blanco (FL + AAPH) con tampón fosfato en lugar de solución antioxidante y ocho soluciones de calibración con Trolox (1-8  $\mu$ M) como antioxidante control, también se llevó a cabo en cada ensayo. Todas las mezclas de reacción se prepararon por duplicado. Cada reacción se realizó por triplicado. Con las curvas normalizadas, el área bajo la curva de fluorescencia (ABC), se calculó con la siguiente ecuación:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} f/f_0$$

Donde  $f_0$  es la lectura de fluorescencia inicial a 0 min y  $f_i$  es lectura de fluorescencia en el tiempo  $i$ . El AUC neto correspondiente a una muestra se calculó, restando la ABS (Absorbancia) correspondiente al espacio en blanco. Los valores de ORAC se expresaron como equivalentes de Trolox utilizando la curva estándar calculada para cada ensayo.

### Ensayo ABTS

Se utilizó la técnica descrita por Nenadis et al., (2004). Este método se basa en la disminución de la absorbancia de la solución del radical ABTS•+, debido a su reducción por parte de compuestos antioxidantes. La técnica implica la producción directa del catión cromóforo ABTS•+ verde-azul a través de la reacción entre el radical ABTS y el persulfato de potasio. La adición de moléculas antioxidantes al radical lo reduce al igual que el grado de decoloración, estando en función de la concentración y el tiempo. Brevemente, se mezclaron 5 ml de una solución acuosa de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) 7mM y 88  $\mu$ l de una solución de persulfato de potasio K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 140 mM, conservándose en un lugar

oscuro durante 12 h, para la generación del radical. Terminado el tiempo, se tomaron 500  $\mu$ l de la solución para ser disueltos en 24 ml de etanol. La absorbancia de esta solución estuvo entre 0.7 y 1, leyéndose a una longitud de onda de 734 nm. Se tomaron 20  $\mu$ l de la muestra de interés, que fueron depositados a una microplaca de 96 pozos, así como etanol (blanco). Finalmente se agregaron 230  $\mu$ l de solución ABTS, y se leyó la microplaca en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados se presentan como el % de inhibición del radical de una concentración conocida de la muestra

#### Ensayo DPPH

Se siguió el método descrito por Fukumoto & Mazza, (2000). Este método se basa en el decremento de la absorbancia del radical DPPH• cuando es reducido por compuestos antioxidantes. Brevemente, el extracto etanólico (20  $\mu$ L) se adicionaron a una microplaca de 96 pozos, así como etanol (blanco). Se les agregaron 200  $\mu$ l de solución DPPH (150  $\mu$ M), y se leyó en un espectrofotómetro MultiSkan Go a una longitud de onda de 520 nm. Los resultados se presentan como el % de inhibición del radical de una concentración conocida de la muestra.

#### 6.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado, los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (DE). Para el análisis de los resultados de los tratamientos de extracción proteica y del diseño experimental con ambos modificadores se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó una comparación de medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey con un  $\alpha=0.05$ , empleando el software estadístico R-project.

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización proximal del material

La composición proximal del chapulín se muestra en la **Tabla 3**. De la caracterización de los insectos por cada 100 g (base seca), destacan su alto contenido de proteína del 63.85 % y su fracción lipídica del 10 %. Respecto al contenido de carbohidratos (23.09 %), alrededor del 8 % fue identificado como fibra dietaria, de la cual, 2.18 % corresponde a fibra soluble y 5.91 % a fibra insoluble, así mismo, el contenido de quitina determinado fue del 5.18 %, la cual es catalogada como fibra insoluble (Adámková et al., 2017), por lo que prácticamente la totalidad de la fibra insoluble presente en esta especie de ortóptero corresponde a este polisacárido. Las concentraciones de los compuestos determinados se encuentran dentro del rango de lo reportado previamente por otros autores (Melo-Ruíz et al., 2015; Rodríguez-Miranda et al., 2019).

**Tabla 3. Caracterización proximal de *Sphenarium purpurascens* (% base seca).**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (%)</b>
Proteína	63.85±0.33
Lípidos	10.06±0.48
Cenizas	3.00±0.06
Carbohidratos	23.09±0.68
<i>Fibra soluble</i>	2.18±0.11
<i>Fibra insoluble</i>	5.91±0.09
Quitina	5.18±0.40

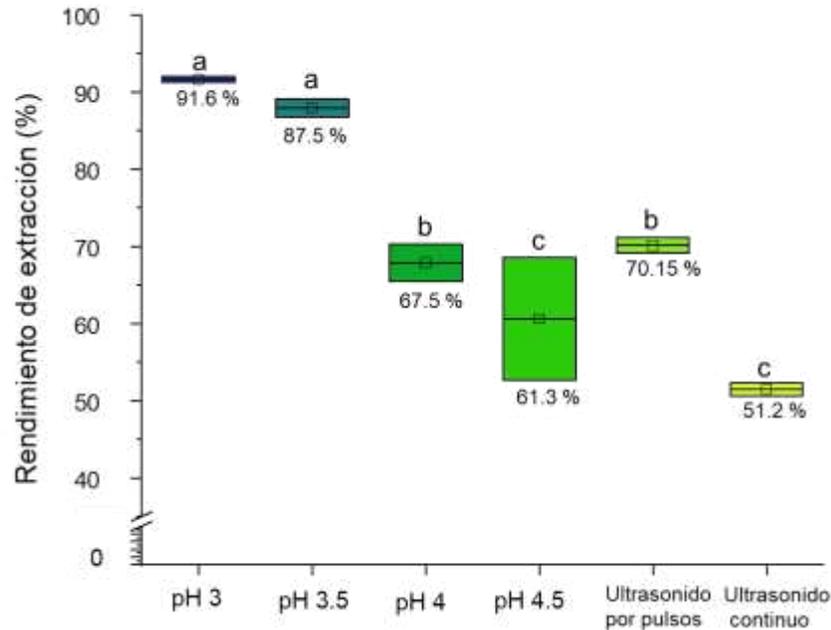
Los datos se presentan como la media de 3 mediciones repetidas ± la DE.

### 7.2 Concentrado proteico

Para la obtención del concentrado proteico de chapulín se exploraron cuatro condiciones de pH para la identificación del punto isoelectrico (PI) de las proteínas,

pues no se encontraron reportes sobre esta especie de insecto. Así mismo, se exploró, a la par, un método de extracción con la aplicación de ultrasonido (pulsado y continuo), reportado recientemente en otra especie de ortóptero, evitando el uso de ácidos y bases (Yoon et al., 2019b); el efecto del ultrasonido sobre la extracción proteica se basa en la escisión de los enlaces intra e intermoleculares, provocando la ruptura celular por el efecto de cavitación generado (Mishyna et al., 2019) .

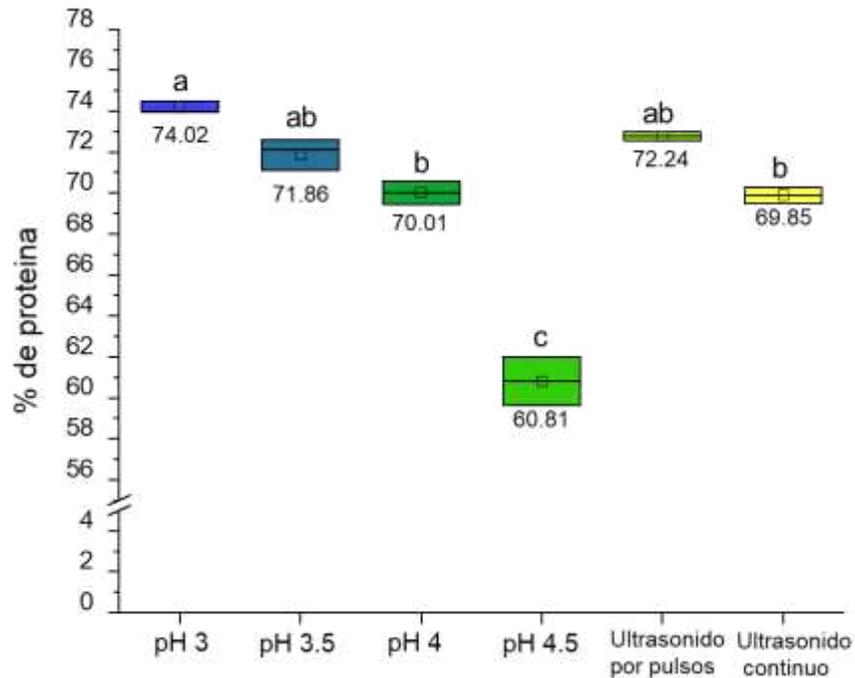
En la **Figura 13** se muestran los rendimientos de extracción proteica para cada tratamiento respecto a la concentración inicial de proteínas en el material (63.85 g/100 g). El análisis de los rendimientos de extracción obtenidos de cada uno de los tratamientos, indican que es sobre un pH 3 donde se obtiene el mejor rendimiento de extracción ( $p < 0.0001$ ) con  $91.6 \pm 0.57$  %, seguido del tratamiento a pH 3.5 ( $87.5 \pm 1.69$  %), ambos tratamientos sin mostrar diferencias significativas. En cuanto al resto de tratamientos, tanto los otros 2 puntos de pH explorados (pH 4=  $67.5 \pm 3.46$  y 4.5=  $61.3 \pm 11.31$  %) como los tratamientos por ultrasonido continuo ( $51.2 \pm 1.20$  %) y pulsado ( $70.15 \pm 1.48$  %) obtuvieron rendimientos menores al 75 %, valores que pueden ser considerados como de bajo rendimiento (Yi et al., 2013). La diferencia notable del rendimiento entre las dos variantes del tratamiento de extracción por ultrasonido pueden deberse principalmente al efecto de cavitación más severo sobre los enlaces intra e intermoleculares de la fracción proteica de la muestra por ultrasonido continuo en el tiempo explorado, lo que explicaría la menor recuperación de proteínas en el material una vez filtrado y supondría obtener mejores rendimientos de extracción a tiempos de tratamiento menores (Choi et al., 2017).



**Figura 13. Rendimientos de extracción de proteína en los tratamientos.** Los resultados representan la media de las concentraciones de proteína en los tratamientos ( $n=3$ )  $\pm$  la DE. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

Los porcentajes de concentración proteica obtenidos de cada uno de los tratamientos se muestran en la **Figura 14**. Dentro de los tratamientos analizados, la mayor concentración se obtuvo a pH 3 con  $74.02 \pm 0.69$  % ( $p < 0.0001$ ), seguido del tratamiento a pH 3.5 ( $71.86 \pm 1.28$  %) e interesantemente el tratamiento con ultrasonido por pulsos con una concentración de  $72.24 \pm 1.05$  %, mientras que la menor concentración se obtuvo a pH 4.5 con  $60.81 \pm 1.66$  %. La identificación del PI de *Sphenarium purpurascens* resulta similar a lo reportado a otras especies de ortópteros, tanto con especies filogenéticamente cercanas como *Schistocerca gregaria* con un PI entre pH 3.5 y 4 (Mishyna et al., 2019) como en especies menos emparentadas como *Gryllodes sigillatus* con un PI a pH 3 (F. G. Hall et al., 2017). Como se mencionó previamente el efecto de cavitación ayuda a mejorar la extracción o la separación de las proteínas de las demás moléculas presentes en el material, dicha separación puede observarse en la concentración proteica similar a las obtenidas a pH 3.5, sin embargo, para estos tratamientos el % de recuperación fue considerablemente menor, dejando la posibilidad de poder mejorar el

rendimiento de extracción con aplicación de un diseño experimental para este fin, aprovechando los beneficios que este método puede brindar. Con los resultados obtenidos, se seleccionó el pH 3 como el pl de las proteínas de este insecto comestible y el elegido para la obtención de los concentrados proteicos para las siguientes fases experimentales.



**Figura 14. Porcentajes de proteína de los concentrados obtenidos en los diferentes tratamientos de extracción.** Los resultados representan la media de las concentraciones de proteína en los tratamientos ( $n=3$ )  $\pm$  la DE. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ )

La caracterización del concentrado proteico seleccionado (**Figura 15**) se presenta en la **Tabla 4**. El análisis de los datos obtenidos permite interpretar que el aumento de la concentración proteica se asocia principalmente a la separación de la fracción lipídica del material inicial después del proceso de desgrasado, de tener un valor inicial de 10.06 % a 0.65 %, mientras que la variación en otros compuestos parecer ser menos evidente, como el caso de las cenizas o los carbohidratos totales. Sin embargo, en estos últimos cabe destacar que la fracción categorizada como fibra dietaria aumentó aproximadamente 2 veces respecto a su concentración inicial,

tanto la fibra soluble de una concentración de 2.18 a 4.55 %, como la fibra insoluble con 5.91 a 10.15 %. De esta última, como ya se mencionó, esta principalmente conformada por la quitina, cuya concentración también presentó un aumento, de un valor de 5.18 a 8.75 %. Este aumento respecto a la concentración total de carbohidratos puede asociarse a la separación de carbohidratos más simples y pequeños en el proceso de concentración y a la conservación de carbohidratos complejos por las que están conformados las fracciones de fibra dietaria, como la quitina (Adámková et al., 2017; Arrese, Estela & Soulages, Jose, 2010)

**Tabla 4. Caracterización del concentrado proteico elegido.**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (%)</b>
<b>Proteína</b>	74.02±1.28
<b>Lípidos</b>	0.65±0.10
<b>Cenizas</b>	2.61±0.23
<b>Carbohidratos</b>	22.72±0.86
<b><i>Fibra soluble</i></b>	4.55±0.19
<b><i>Fibra insoluble</i></b>	10.15±0.22
<b><i>Quitina</i></b>	8.75±1.02

Los datos se presentan la media (n=3) ± la DE

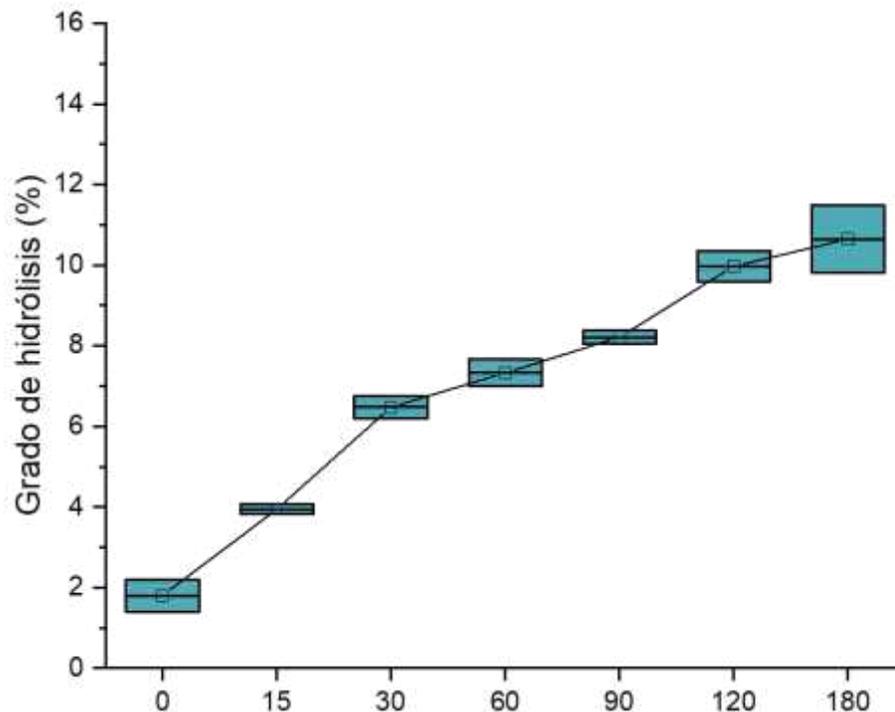


**Figura 15. Concentrado proteico de chapulín**

### 7.3 Hidrólisis enzimática del concentrado proteico empleando papaína

En la **Figura 16** se muestra la evolución del grado de hidrólisis (GH) del concentrado durante los 180 min de duración. El concentrado presentó un grado de hidrólisis inicial de  $1.80 \pm 0.68$  %, el cual puede relacionarse a la acción de proteasas naturales presentes en los insectos tanto en la hemolinfa como en el sistema digestivo (Kanost & Clem, 2012). La **Figura 16** permite observar 3 tasas diferentes a lo largo del proceso de hidrólisis, con un aumento rápido durante los primeros 40 min de un valor inicial de 1.80 a 6.48 %, lo que indica una rápida hidrólisis de los enlaces peptídicos sobre las proteínas más disponibles. En el intervalo de 40 a 120 min, la actividad proteolítica disminuyó ligeramente y disminuir nuevamente a partir de los 120 min, estas disminuciones en las actividades de la enzimas pueden asociarse a 3 principales razones: la disminución de la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a hidrólisis por esta proteasa, la inhibición de la actividad por productos de la hidrólisis o la desnaturalización de la enzima, lo que disminuye su actividad proteolítica (Qi & He, 2006). En ese aspecto, una de las limitantes en la actividad enzimática en este caso, puede deberse a que existe de manera natural una fracción de proteínas enlazadas otros compuestos como a la quitina (Price, 1973) o por la presencia de proteínas resistentes a la hidrólisis (Dion-Poulin et al., 2020), además de los productos de inhibición o de la disminución de enlaces peptídicos más susceptibles a la hidrólisis.

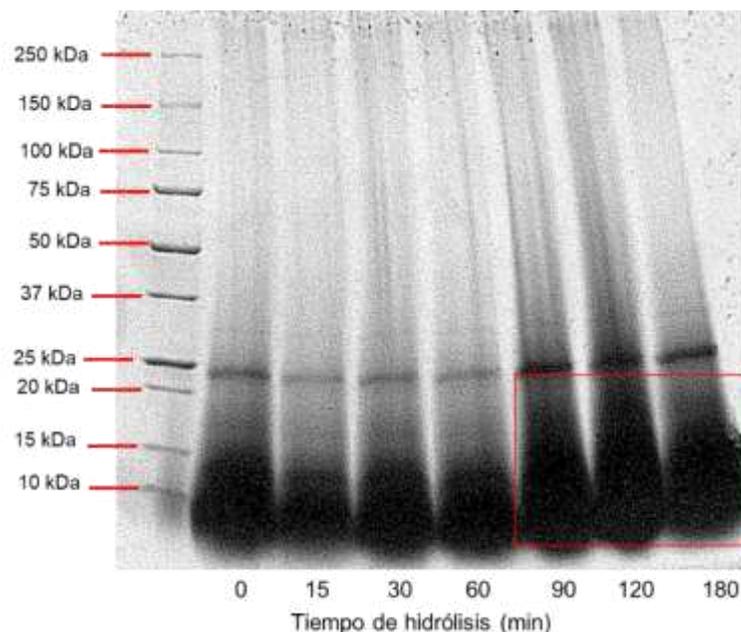
Finalizado el proceso después de 180 min de reacción, el grado de hidrólisis alcanzó el  $10.64 \pm 1.45$  %. Valor que resultó similar en el uso de papaína sobre un concentrado proteico del ortóptero *Locusta migratoria* con 10.3 % a los 120 min de reacción (Purschke et al., 2018); no obstante, al comparar el efecto de esta misma enzima y condiciones similares sobre otra fuentes proteicas resultó ser menor, como 15.34 % a los 120 min en un concentrado proteico de mosca soldado negra *Hermetia illucens* (Batish et al., 2020) o 23.35% a los 180 min en un hidrolizado de esturión chino *Acipenser sinensis* (Noman et al., 2018), aunque valores de GH con mayor similitud también pueden ser encontrados, como 12.7 % en el uso de papaína sobre suero de leche (Abadía-García et al., 2016).



**Figura 16. Grado de hidrólisis en el tiempo**

En la **Figura 17** se muestra la distribución molecular de las proteínas a los diferentes tiempos de la hidrólisis enzimática. En el gel puede observarse la presencia de bandas menores a los 25 kDa desde el tiempo 0, sin ver aumento en la intensidad de las bandas a los 15, 30 y 60 min, pero es hasta los 90 min de

hidrólisis cuando se observan principalmente bandas menores a 20 kDa (GH alcanzado de 8.21 %), esto puede indicar la hidrólisis de proteínas poco solubles o de mayor tamaño, como proteínas musculares o de vuelo, cuyos pesos moleculares es mayor a 400 kDa (Bullard & Leonard, 1996). Interesantemente, en ningún tiempo se observaron bandas entre los 30 kDa y 250 kDa, probablemente por tratarse de proteínas insolubles o de poca solubilidad en el buffer de muestra, por estar enlazadas a otros compuestos o bien, por la actividad limitada de la papaína sobre las proteínas de este insecto. Las bandas menores a 15 kDa que se observan desde el inicio de la reacción pueden corresponder a proteínas presentes en la hemolinfa con pesos moleculares menores a 12 kDa (Yi et al., 2013). Siguiendo, en el rango de 14 a 30 kDa se pueden encontrar principalmente proteínas cuticulares del insecto, mientras que la banda notablemente marcada que se observa alrededor de los 25 kDa en todo los tiempos, puede asociarse a la proteasa similar a quimotripsina con un peso molecular de 24 kDa (Yi et al., 2013), además su conservación en cada tiempo puede relacionarse a su resistencia a la hidrólisis.



**Figura 17. Distribución molecular de las proteínas de chapulín a diferentes tiempos de hidrólisis**

#### 7.4 Hidrólisis por agua subcrítica del concentrado

En la **Tabla 5** se muestran los resultados de la determinación del grado de hidrólisis de los tratamientos utilizando ambos modificadores, así como el tratamiento control.

**Tabla 5. Grado de hidrólisis de los tratamientos empleando agua subcrítica**

Tratamiento	Temperatura (° C)	Presión (MPa)	Concentración del modificador (M)	Grado de hidrólisis (%)	
				Bicarbonato de sodio	Ácido cítrico
1	130	20	1	44.56±0.92 <sup>a</sup>	38.73±0.98 <sup>a</sup>
2	100	20	0.5	12.87±0.12 <sup>de</sup>	19.18±1.63 <sup>c</sup>
3	100	1	1	9.15±1.40 <sup>ef</sup>	34.16±1.38 <sup>ab</sup>
4	130	1	0.5	33.04±0.77 <sup>b</sup>	37.63±2.00 <sup>a</sup>
5	115	10	0.75	19.06±1.47 <sup>cd</sup>	18.34±0.89 <sup>c</sup>
6	100	1	0.5	5.74±0.24 <sup>f</sup>	11.22±2.05 <sup>d</sup>
7	130	20	0.5	20.36±2.88 <sup>c</sup>	29.39±1.83 <sup>b</sup>
8	100	20	1	7.22±0.89 <sup>ef</sup>	21.63±2.18 <sup>c</sup>
9	130	1	1	20.65±1.98 <sup>c</sup>	35.19±1.47 <sup>ab</sup>
Control	115	10	-	15.06±1.26	

Los valores se expresan como la media (n=3) ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) empleando la prueba de Tukey.

Analizando los resultados obtenidos con los tratamientos con bicarbonato de sodio, mediante la prueba de Tukey, se encuentra la mejor respuesta en el tratamiento 1 (130 °C, 20 MPa y 1 M) con un grado de hidrólisis de 44.56 %, diferenciándose completamente del resto de tratamientos, observando tratamientos con grados de hidrólisis incluso menores que el control con 15.06±1.26 %, como el tratamiento 8 y 6.

El análisis de los factores (**Tabla 6**) nos indica un efecto significativo de la temperatura, pero también la presión y la concentración del bicarbonato, la

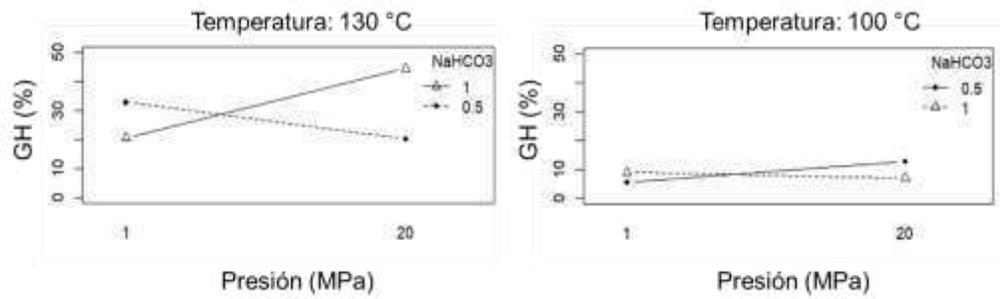
interacción doble Temperatura:NaHCO<sub>3</sub> y Presión:NaHCO<sub>3</sub>, pero siendo destacadamente relevante la interacción triple Temperatura:Presión:NaHCO<sub>3</sub>.

**Tabla 6. Análisis de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>)**

	Df	Suma de cuadrados	Medias de cuadrados	Valor F	Pr(>F)	
<b>Temperatura</b>	1	1748.7	1748.7	843.56	2.14	***
<b>Presión</b>	1	67.4	67.4	32.53	0.0004	***
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	1	23.0	23.0	11.08	0.010	*
<b>Temperatura:presión</b>	1	9.1	9.1	4.378	0.069	.
<b>Temperatura:NaHCO<sub>3</sub></b>	1	49.3	49.3	23.790	0.001	**
<b>Presión:NaHCO<sub>3</sub></b>	1	189.5	189.5	91.43	1.18	***
<b>Temperatura:Presión:NaHCO<sub>3</sub></b>	1	521.1	521.1	251.37	2.51	***
<b>Residuales</b>	8	16.6	2.1			

codificación: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.'' 1

En el análisis de las interacciones de estos mismos tratamientos (**Figura 18**) podemos observar que, a 130 °C con la concentración alta de modificador, el cambio de la presión de 1 a 20 MPa promueve un aumento más notorio en la respuesta que cuando la temperatura esta 100 °C, efecto de la presión que resulta inverso cuanto la concentración está a 0.5 M. Por otro lado, cuando se tiene la temperatura a 100 °C, el cambio de la presión cuando se tiene una concentración de 1 M, el efecto del cambio de la presión de 1 a 20 MPa reduce ligeramente la respuesta, pero cuando se tiene una concentración de 0.5 M, el efecto del cambio de la presión la mejora. En general, se observa que la temperatura tiene una influencia sobre esta respuesta también, pues mejores valores se obtienen cuando esta variable se encuentra a 130 °C.



**Figura 18. Perfil de interacción triple de los factores de los tratamientos por agua subcrítica empleando bicarbonato de sodio sobre el grado de hidrólisis**

Las variaciones sobre los tratamientos observados se pueden asociar a que a la disociación del bicarbonato de sodio al ser disuelto en el agua con mayor velocidad arriba de los 80 °C, en el ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y el ion de sodio ( $\text{Na}^+$ ), y se va acelerando con el aumento de la temperatura. Con base en ello, esto puede explicar los resultados del grado de hidrólisis, pues a mayor temperatura, existe una mayor descomposición del modificador, provocando una mayor concentración de iones en el medio e induciendo entonces la hidrólisis del enlace peptídico. Así mismo, hay que tomar en cuenta el efecto de la presión sobre el comportamiento de solubilidad del mismo, pues una presión de alta de 20 MPa a 130 °C, promueve un comportamiento de descomposición más homogéneo del bicarbonato de sodio y a su vez evita la precipitación del carbonato de sodio, explicando la diferencia entre el tratamiento 1 y 7 con el tratamiento 4 y 9. Mientras que la descomposición del modificador a temperaturas altas (130 °C) y presiones bajas (1 MPa) puede variar, pues con el aumento de la temperatura a presión atmosférica o presiones bajas, existe una disminución en la solubilidad del bicarbonato, el cual precipita, y por ende disminuye la presencia de iones para catalizar la reacción pues no se permite el ciclo del sistema carbonato (Bourcier et al., 2017; Waldeck et al., 1932). Mientras que el efecto que se observa en los gráficos de interacción a 100 °C, asociado al cambio de la concentración del modificador y la presión se puede relacionar a que el efecto a temperaturas bajas (100 °C) con una concentración alta del modificador y presiones altas, puede provocar un efecto adverso, pues la sobresaturación del

medio por el modificador puede verse influenciada por la alta presión, precipitando al carbonato, limitando su solubilidad y por ende su acción como modificador en el medio (Ho et al., 2009; Mahmoudkhani & Keith, 2009).

Siguiendo con los tratamientos con ácido cítrico, el análisis completo de factores (**Tabla 7**) nos muestra que la interacción triple resulta significativa con la temperatura siendo relevante.

**Tabla 7. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en el grado de hidrólisis**

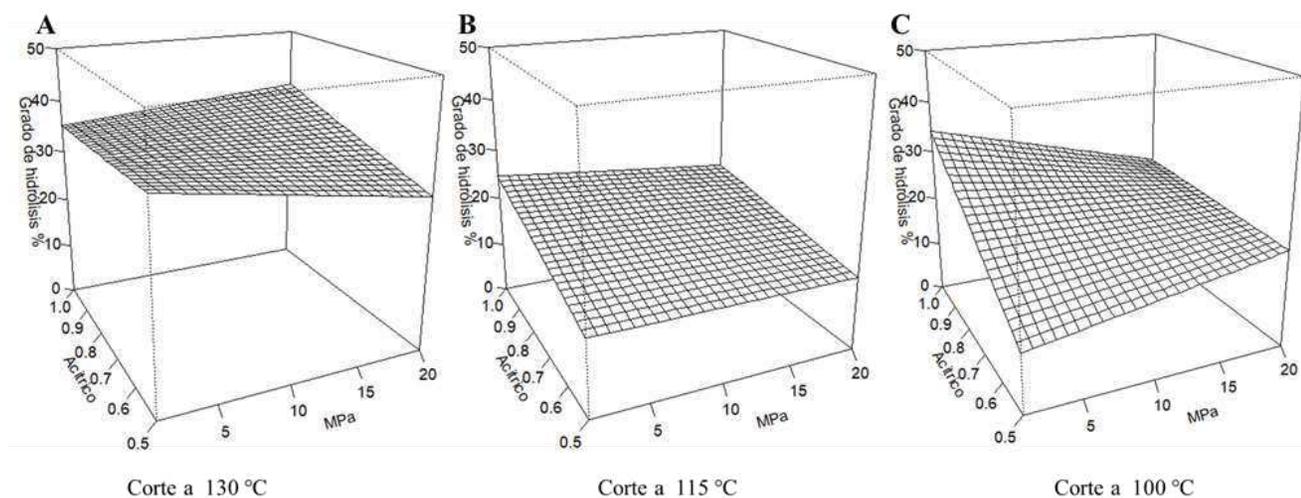
	Estimado	Error estándar	Valor T	Pr (>t)	
(Intercepto)	386.28	73.79	5.23	0.0005	***
Temperatura	-8.46	1.28	-6.60	9.93e-05	***
Presión	9.99	1.07	9.34	6.28e-06	***
Ácido cítrico	228.54	19.17	11.92	8.14e-07	***
I ((Temperatura)^2)	0.04	0.005	8.05	2.10e-05	***
Temperatura: Presión	-0.08	0.009	-9.21	7.05e-06	***
Temperatura:Ácitríco	-1.80	0.16	-10.92	1.71e-06	***
Presión:Ácitríco	-13.47	1.35	-9.95	3.72e-06	***
Temperatura: Presión:Ácitríco	0.11	0.01	9.69	4.62e-06	***

Codificación: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Para ambos modificadores, se realizó una prueba de curvatura para verificar la existencia, para bicarbonato de sodio no se detectó, no obstante, para los resultados con ácido cítrico se obtuvo un valor Delta de -11.19052, confirmando curvatura. Con la identificación de curvatura, se procedió a obtener proyecciones por superficie de respuesta (**Figura 19**) para un mejor análisis de los datos. En proyecciones es posible ver el efecto de curvatura donde se aprecia una disminución general en la respuesta al pasar de 100 °C a 115 °C y nuevamente aumentar al pasar a 130 °C. En estas proyecciones, es observable que la mejor respuesta se encuentra en el tratamiento 1 con condiciones 130 °C, 20 MPa y 1 M, con un grado de hidrólisis de 38.63 %. Observando los tratamientos a 130 °C, se aprecia un efecto del cambio de la presión de 1 a 20 MPa sobre la concentración del modificador, donde este cambio en 1 M, incrementa ligeramente la respuesta y un efecto contrario cuando la concentración es de 0.5 M. Al cambiar a 100 °C, los

efectos de la presión anteriormente mencionados resultan más notorios, donde el aumento en el nivel de este factor disminuye la respuesta cuando la concentración es de 1 M y la aumenta cuando la concentración es de 0.5 M.

Los efectos que se observan en la **Tabla 5**, sobre la variación en el grado de hidrólisis, así como en la proyecciones de superficie de respuesta a 130 °C, se puede explicar debido a que con el aumento de la temperatura, el agua se comportaría como líquido “ordinario”, donde el ácido cítrico a temperaturas altas tiende a perder su hidratación, pudiendo conformar cristales de menor disolución y por ende, a menor concentración de éste en el medio, menor será la cantidad de iones libres para la hidrólisis del enlace peptídico (Apelblat, 2014). Mientras que a 100 °C, basándose en el mismo fenómeno, la presión sobre la concentración del



**Figura 19. Proyecciones de superficie de respuesta de GH de los tratamientos con ácido cítrico.**  
A: Proyección de tratamiento a 130 °C, B: Proyección de tratamiento a 115 °C, C: Proyección de tratamiento a 100 °C

modificador tiene un efecto en la dinámica de comportamiento del modificador y el agua, al estar cercano al cambio de fase y por diferencia de densidad, podría verse modificado el comportamiento, pues a una menor presión del medio (el ácido cítrico junto con el agua), disminuye de densidad para un mayor efecto de penetración sobre la proteína y mejorar la hidrólisis a dicha condición, además cabe mencionar

que a presión atmosférica (0.1 MPa) la solubilidad del ácido cítrico aumenta conforme al aumento de la temperatura (Daneshfar et al., 2012; Nemdili et al., 2016).

Al comparar los efectos en general de la presencia de ambos modificadores en esta respuesta, en ácido cítrico específicamente se obtiene resultados similares en 4 tratamientos con niveles de factores distintos, 3 de ellos asociados directamente a la alta temperatura del tratamiento, situación que para bicarbonato de sodio no se observa, diferenciándose de manera evidente el tratamiento 1 (130 °C, 20 MPa, 1 M) del resto, mostrando una GH mayor que con ácido cítrico, mostrando una clara diferencia en el comportamiento de ambos modificadores en esta respuesta.

Comparando los tratamientos con el control (solo agua), el cual alcanzó un grado de hidrólisis de  $15,06 \pm 1,26\%$ , se observa un mejor grado de hidrólisis, hasta 3 veces utilizando bicarbonato y de 2.5 veces con ácido cítrico como modificadores, este comportamiento es similar a lo reportado por Espinoza & Morawicki (2012) donde observó un aumento de hasta 4 veces en el grado de hidrólisis en un hidrolizado de suero de leche usando bicarbonato de sodio en comparación con agua sola. Este efecto en el grado de hidrólisis también se ha observado cuando se utilizan otros modificadores como el dióxido de carbono y el nitrógeno en los subproductos de la industria pesquera (X. Zhu et al., 2008), o el ácido acético, ácido fórmico, dióxido de carbono y el bicarbonato de sodio en proteínas de sardina (Asaduzzaman et al., 2018).

Es importante mencionar que la eficiencia de la hidrólisis por agua subcrítica en comparación con distintas enzimas proteolíticas podría estar ligada a la fracción de proteína de insecto asociada a la quitina o su configuración, dificultando la hidrólisis por parte de estas últimas, esto puede observarse al comparar el grado de hidrólisis obtenido (10.64 %) utilizando papaína después de 3 horas de reacción. Lo reportado en la literatura respecto al uso de enzimas, sugiere que para alcanzar valores similares que los obtenidos por los experimentos con agua subcrítica, ha se

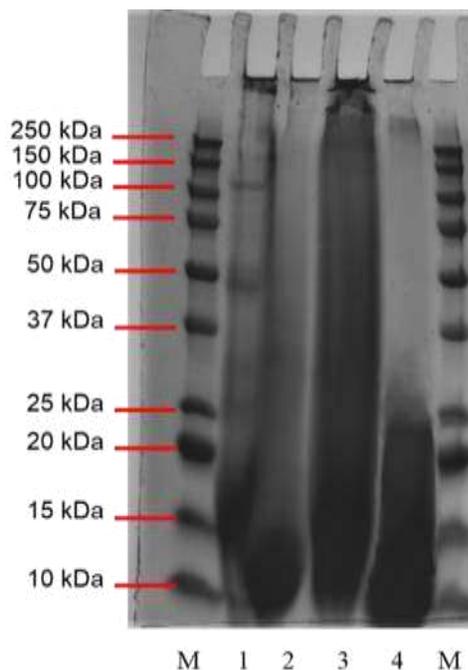
requieren de tiempos largos de reacción o el uso de múltiples enzimas como lo reportan Yoon et al., (2019a) y Wang et al., (2013), respectivamente. Purschke et al., (2018) reportaron un GH de hasta 41.6% en un hidrolizado de *Locusta migratoria* usando una mezcla de diferentes proteasas (Alcalasa, Neutrasa, papaína, y Flavourzyme), con un tiempo de reacción de hasta 1440 min o lo reportado por Batish et al., (2020) quienes hidrolizaron un polvo de *Hermetia illucens* usando Alcalasa, papaína y pepsina por 120 min, obteniendo un DH de 18.34%, siendo Alcalasa el mejor resultado.

Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE para determinar la distribución molecular de los hidrolizados por agua subcrítica, los cuales se muestran en la **Figura 20**. Se usó como referencia un marcador proteico en un rango de 10 a 250 kDa en el primer carril, en el segundo carril el concentrado de proteína, en el tercero el tratamiento control sin modificador, el cuarto y quinto, a los hidrolizados con mayor grado de hidrólisis de cada modificador, el cuarto carril correspondiente al tratamiento 1 (130 °C, 20 MPa, 1 M) con bicarbonato de sodio y el quinto carril al tratamiento 1 con ácido cítrico.

En cuanto al concentrado proteico, como en la electroforesis del hidrolizado por papaína, podemos observar bandas débilmente marcadas entre 150 y 25 kDa, correspondientes a algunas proteínas específicas, como la proteína inhibidora de la melanización de 49 kDa, así como algunas proteínas cuticulares (14-30 kDa) y proteínas de la hemolinfa (<12 kDa) (Yi et al., 2013).

El control muestra una distribución molecular mayoritariamente menor a 15 kDa, lo que puede asociarse a la generación de fragmentos proteicos de bajo peso molecular durante el proceso de hidrólisis por agua subcrítica. En cuanto al tratamiento con bicarbonato de sodio, en su carril se observa una amplia distribución molecular de 10 a 250 kDa, mientras que el tratamiento con ácido cítrico, se observa una distribución molecular mayoritariamente menor a 25 kDa, estas diferencias nos brindan información sobre la modulación que el uso de diferentes modificadores

puede tener en la hidrólisis, con el uso de bicarbonato de sodio generando fragmentos de diferentes tamaños y el uso de ácido cítrico, especialmente con fragmentos de bajo peso molecular.

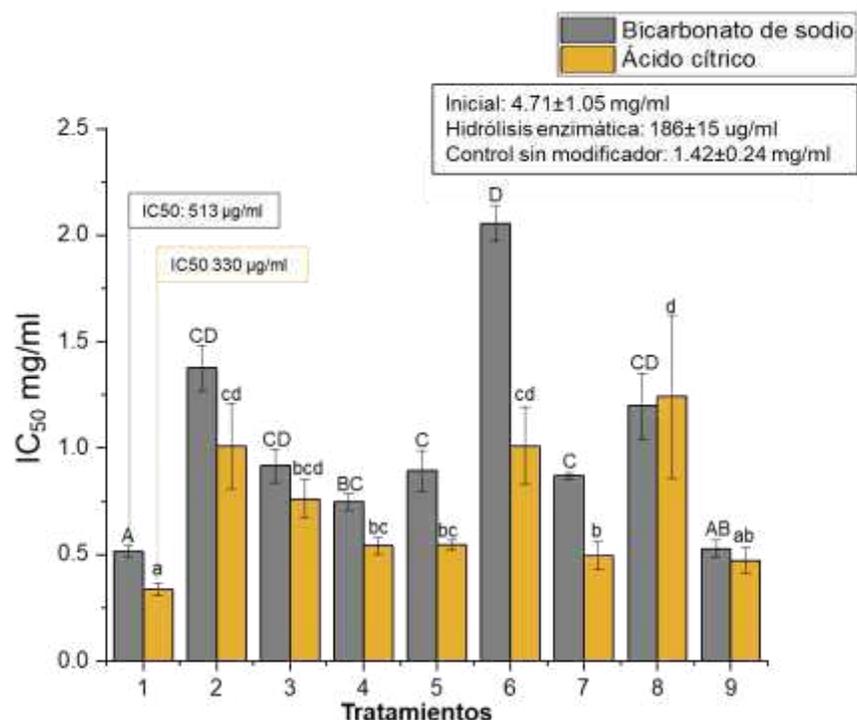


**Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE de hidrolizados de *Sphenarium purpurascens* con el mayor GH de cada modificador.** (M: Marcador, 1: Concentrado proteico, 2: Tratamiento control, 3: Tratamiento con bicarbonato de sodio 1, 4: Tratamiento con ácido cítrico 1)

## 7.5 Actividad antioxidante de los hidrolizados por agua subcrítica

### 7.5.1 Actividad antioxidante ABTS<sup>+</sup>

En la **Figura 21** se muestran los resultados de la determinación de la actividad antioxidante de los tratamientos por agua subcrítica utilizando ambos modificadores, así como el tratamiento control y de la hidrólisis enzimática con papaína después de 180 min.



**Figura 21. Actividad antioxidante ABTS<sup>+</sup> de los hidrolizados por agua subcrítica.** Los resultados representan los promedios de la IC<sub>50</sub> del radical (n=3) ± la desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), letras diferentes indican diferencias significativas.

Comenzando con los tratamientos con bicarbonato de sodio, empleando la prueba de Tukey la mejor respuesta se encuentra en el tratamiento 1 (130 °C, 20 MPa, 1 M) con una IC<sub>50</sub> de 513 µg/ml. El análisis de los factores (**Tabla 8**) nos muestra que la temperatura y la concentración del modificador, resultan ser factores significativos para la modulación de esta respuesta. También se muestra con significancia estadística la interacción Temperatura:NaHCO<sub>3</sub> y una interacción triple de los factores. No se detectó curvatura en los tratamientos (delta 0.1685259).

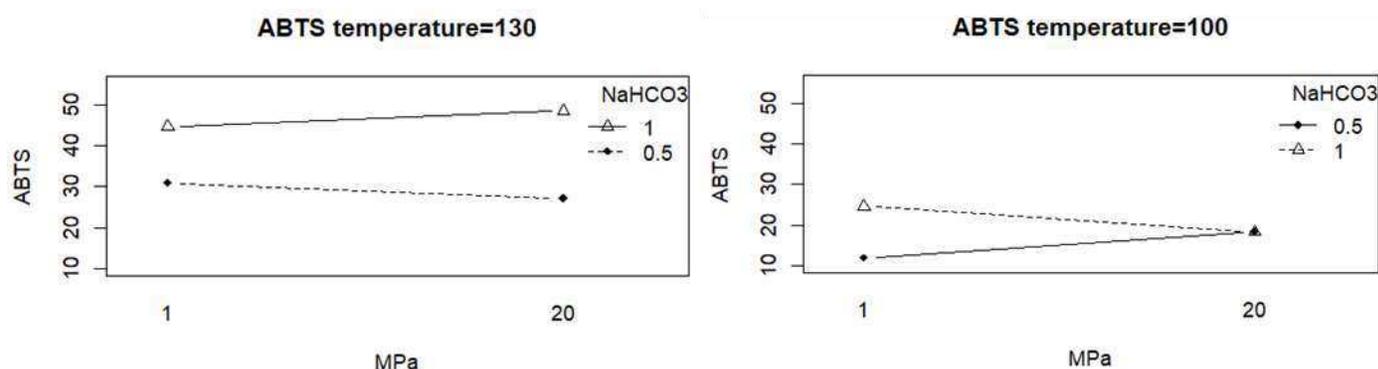
**Tabla 8. Análisis de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad antioxidante ABTS<sup>+</sup>**

	Df	Suma de cuadrados	Medias de cuadrados	Valor F	Pr(>F)	
<b>Temperatura</b>	1	1512.9	1512.9	130.50	3.12x10 <sup>-3</sup>	***
<b>Presión</b>	1	0.0	0.0	0.001	0.97	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	1	563.9	563.9	48.64	1x10 <sup>-3</sup>	***
<b>Temperatura: Presión</b>	1	0.0	0.0	0.00	0.99	
<b>Temperatura:NaHCO<sub>3</sub></b>	1	125.6	125.6	10.83	0.01	*
<b>Presión :NaHCO<sub>3</sub></b>	1	6.8	6.8	0.58	0.46	
<b>Temperatura:Presión:NaHCO<sub>3</sub></b>	1	103.2	103.2	8.90	0.17	*
<b>Residuales</b>	8	92.7	11.6			

Codificación: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En las proyecciones de las interacciones de los factores (**Figura 22**), destaca el efecto de la temperatura, donde de manera general, a 130 °C, se obtiene mejores resultados. De los tratamientos con el nivel de temperatura alta (1, 4, 7 y 9), es observable que una mayor concentración del modificador mejora la respuesta. Fijándose en los tratamientos con niveles altos de temperatura y de la concentración del modificador, es posible observar que hay un efecto al cambio de la presión de 1 a 20 MPa, que si bien, no es significativo, el aumento de este factor si mejora la respuesta ligeramente. Efecto que resulta similar, pero de manera inversa, en los tratamientos con temperatura alta y baja concentración de modificador (4 y 7), donde el aumento de la presión disminuye la respuesta.

Pasando a observar los resultados de los tratamientos con temperaturas bajas, de estos tratamientos, se puede observar que el cambio de la presión tanto a la concentración de 0.5 y 1 M, tiene un efecto en la modulación de esta variable (como se observó a 130 °C) respuesta pues se puede observar claramente la diferencia entre los tratamientos con concentración baja de modificador (T2 y T6, aumentando hasta un 8 % en la inhibición aproximadamente). Efecto que se observa de manera inversa cuando la concentración está a 1 M, pues el aumento de la presión disminuye la respuesta.



**Figura 22. Proyección de interacción triple de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad de antioxidante de ABTS<sup>+</sup>.**

Respecto a los tratamientos con ácido cítrico, la mejor respuesta se obtuvo en el tratamiento 1 (130 °C, 20 MPa y 1 M) con una IC<sub>50</sub> de 330 µg/ml, seguido del tratamiento 9 diferenciándose por el nivel de la presión (**Figura 21**)

El análisis de los factores de los tratamientos (**Tabla 9**), nos muestra como significativa la interacción Presión:Ácitríco, no obstante, la interacción triple resulta más relevante. El análisis de curvatura arroja un valor delta de 2.274, mostrando una ligera curvatura positiva.

**Tabla 9. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante ABTS<sup>+</sup>**

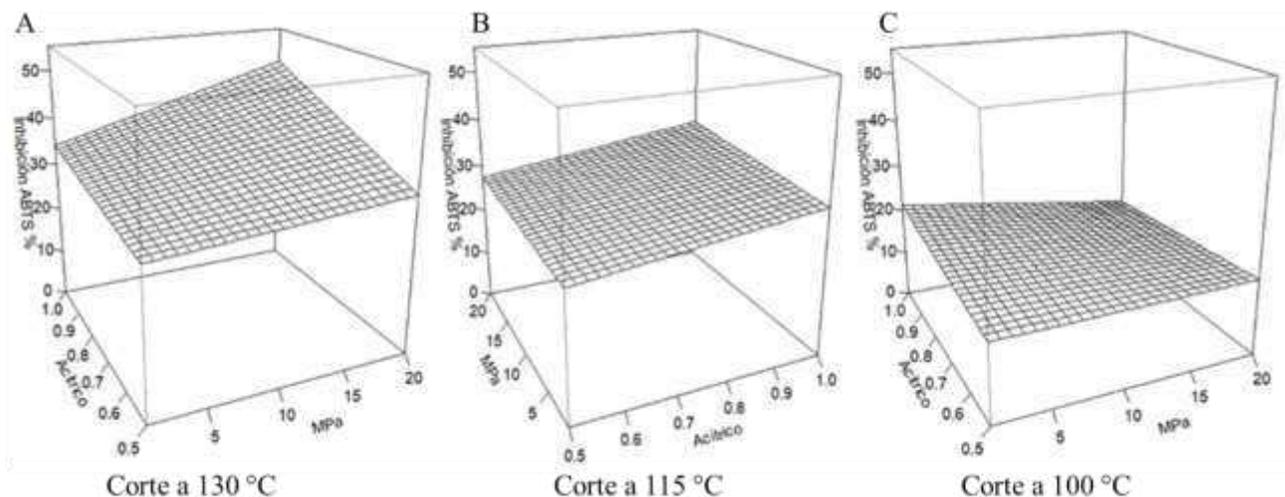
	Estimado	Error estándar	Valor T	Pr (>t)
(Intercepto)	-211.48	151.37	-1.39	0.19
Temperatura	3.54	2.62	1.34	0.21
Presión	3.07	2.19	1.40	0.19
Ácitríco	21.37	39.32	0.54	0.59
I ((Temperatura) <sup>2</sup> )	-0.013	0.011	-1.16	0.27
Temperatura: Presión	-0.026	0.018	-1.41	0.19
Temperatura:Ácitríco	-0.104	0.33	-0.30	0.76
Presión:Ácitríco	-7.17	2.77	-2.58	0.029 *
Temperatura:Presión:Ácitríco	0.063	0.02	2.65	0.026 *

Codificación: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 . 0.1 ' 1

En la proyección por superficie de respuesta (**Figura 20**) se puede observar el efecto relevante de la temperatura, pues los tratamientos con el nivel alto de este factor son los que muestran mejores resultados en general. Observando los tratamientos a 130°C, es notorio que una mayor concentración del modificador mejora la respuesta y en ambas concentraciones (0.5 y 1) la presión ejerce un efecto similar, con el cambio de 1 a 20 MPa mejorando la inhibición, no obstante, el efecto es más notable cuando la concentración es de 1 M.

En los tratamientos con el nivel de bajo de temperatura (100 °C), el efecto del cambio de la presión se hace relevante, ya que al tener una concentración de modificador alta (Tratamientos 3 y 8), entonces el cambio de presión de 1 a 20 MPa reduce la respuesta casi en un 40 %. Mientras que, en el nivel bajo de concentración del modificador, el cambio de la presión no muestra efecto.

Esta diferencia entre los tratamientos por el efecto de la presión se podría asociar a un mayor comportamiento del agua como líquido ordinario, lo que podría dar un comportamiento más homogéneo del ácido, como se observó previamente en el GH.



**Figura 23. Proyecciones de superficie de respuesta de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante de ABTS<sup>•+</sup>.** A: Proyección de tratamiento a 130 °C, B: Proyección de tratamiento a 115 °C, C: Proyección de tratamiento a 100 °C

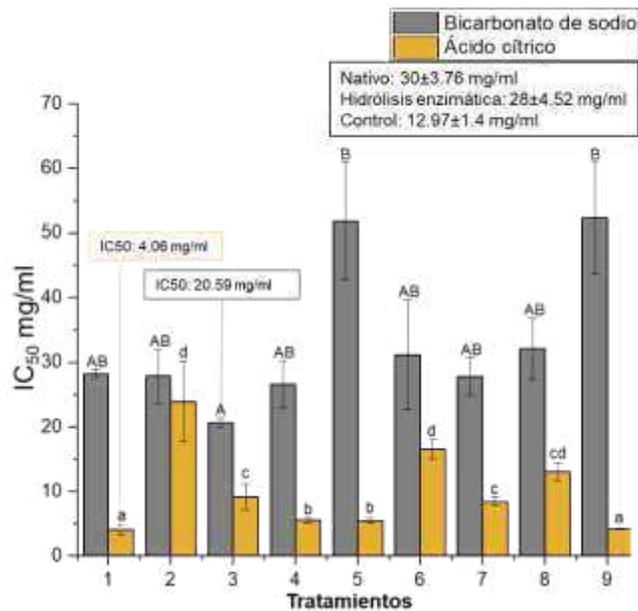
El tratamiento con la mejor actividad antioxidante en ambos modificadores fue a 130 °C, 20 MPa y 1M con 330 µg/ml y 513 µg/ml para ácido cítrico y bicarbonato de sodio, respectivamente. Al comparar los tratamientos entre modificadores, si bien muestran resultados similares, los tratamientos con ácido cítrico muestran mejores respuestas en general, que podrían estar asociadas a la distribución molecular de los hidrolizados obtenidos dependiente del modificador, así como la carga y el pKa en la cual se encuentren los aminoácidos con la capacidad de donar protones o electrones, características que mide el método empleado (Londoño Londoño, 2012). Los aumentos observados en la inhibición de este radical en ambos modificadores como ya se mencionó, están relacionados con el aumento de la temperatura, similar a lo observado por Jeong et al., (2021) en hidrolizados por agua subcrítica de *Mytilus edulis* y lo reportado por Cho et al., (2020) en un hidrolizado de *Achatina fulica*. Por otro lado al observar lo publicado por Asaduzzaman et al., (2018), donde el uso modificadores en la hidrólisis de músculo de caballa, son los tratamientos empleando bicarbonato de sodio e incluso el agua sola las que resultan mostrar mejores resultados en la inhibición de este radical que el uso de ácidos, como el ácido acético y el fórmico en la reacción, no obstante, cabe aclarar que estos tratamientos fueron realizados a temperaturas mayores (220 y 260 °C) y presiones diferentes, lo podría promover una dinámica diferente en el uso de estos catalizadores en la reacción y por ende los productos de la hidrólisis, explicando estas diferencias.

La mayor parte de los tratamientos con uso de modificadores mostraron una mejor actividad ante el radical ABTS que el agua sola (IC<sub>50</sub> 1.42±0.24 mg/ml) pero menores que lo obtenido del hidrolizado con papaína después de 180 min con una IC<sub>50</sub> de 186 µg/ml, asociándolo a la especificidad de corte que puede ejercer la papaína y a la producción de fragmentos de bajo peso molecular con mayor actividad antirradicalaria. Las actividades obtenidas con los mejores tratamientos fueron similares a las reportadas para un hidrolizado de *Ulomoides dermestoides* con un IC<sub>50</sub> de 400 ug/ml utilizando proteasas de *A. Oryzae* (Flores et al., 2020),

pero menores al compararlos con lo obtenido en un hidrolizado de *Schitocerca gregaria* ( $IC_{50}$  95.16  $\mu$ g/ml) empleando enzimas digestivas (Zielińska et al., 2017) y en *Liza klunzingeri* ( $IC_{50}$  120  $\mu$ g/ml) empleando papaína (Rabiei et al., 2019).

### 7.5.2 Actividad antioxidante DPPH

Los resultados de la determinación de la actividad antioxidante DPPH de los tratamientos por agua subcrítica utilizando ambos modificadores, así como el tratamiento control y el de la hidrólisis enzimática con papaína después de 180 min, se pueden observar en la **Figura 21**.



**Figura 24. Actividad antioxidante DPPH de los hidrolizados por agua subcrítica.** Los resultados representan los promedios de la  $IC_{50}$  del radical ( $n=3$ )  $\pm$  la desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), letras diferentes indican diferencias significativas.

De los tratamientos con bicarbonato de sodio, la prueba de Tukey nos indica la mejor respuesta en el tratamiento 3 (100 °C, 0.5 M y 1 MPa) con una  $IC_{50}$  de 20.60 mg/ml. El análisis completo de factores (**Tabla 10**) nos muestra el efecto significativo de la interacción triple con una importante influencia de la temperatura. No obstante, también es observable la significancia de las interacciones dobles. Se detectó curvatura en los tratamientos (delta -4.46).

**Tabla 10. Análisis de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad antioxidante DPPH**

	Estimado	Error estándar	Valor T	Pr (>t)	
<b>(Intercepto)</b>	468.82	126.26	3.71	0.004	**
<b>Temperatura</b>	-8.68	2.19	-3.96	0.003	**
<b>Presión</b>	4.96	1.83	2.71	0.024	*
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	156.49	32.79	4.77	0.001	**
<b>I ((Temperatura)^2)</b>	0.04	0.009	4.33	0.001	**
<b>Temperatura: Presión</b>	-0.04	0.015	-2.71	0.02	*
<b>Temperatura:NaHCO<sub>3</sub></b>	-1.37	0.28	-4.87	8x10 <sup>-4</sup>	***
<b>Presión:NaHCO<sub>3</sub></b>	-8.97	2.31	-3.87	0.003	**
<b>Temperatura:Presión:NaHCO<sub>3</sub></b>	0.07	0.01	3.88	0.003	**

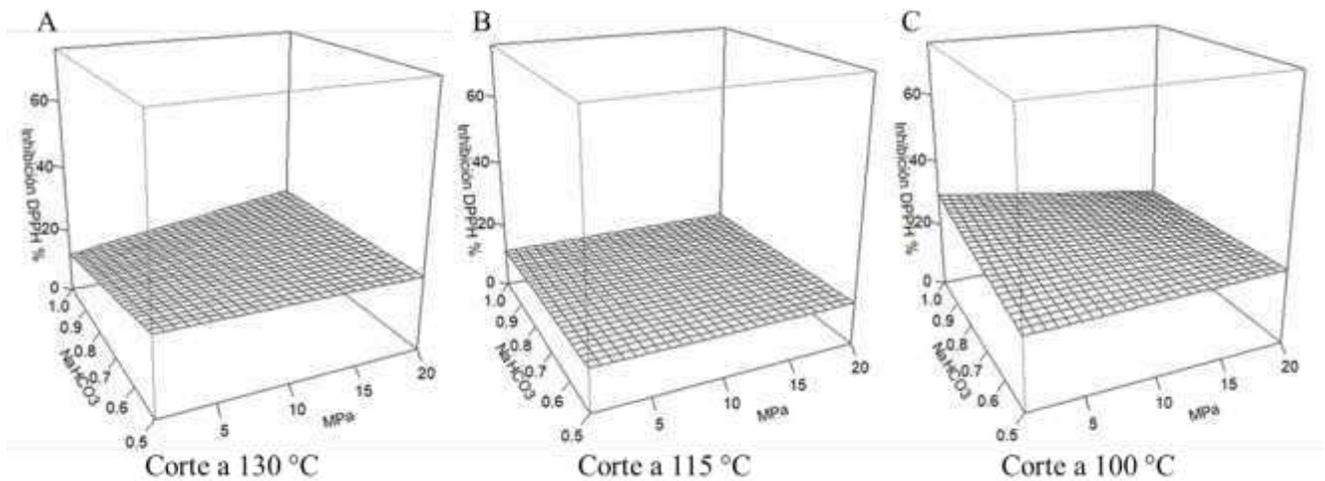
Codificación: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se obtuvieron proyecciones de superficie de respuesta para observar los efectos de los tratamientos (**Figura 22**). En esta ocasión se observa ligeramente mejores resultados cuando la temperatura está a 100 °C. Con los tratamientos con temperatura de 130 °C con concentración a 1 M, el efecto del aumento de la presión mejora la respuesta, efecto que no se observa cuando la concentración del modificador está a 0.5 M. En los tratamientos con 100 °C, también se observa que cuando la concentración está a 0.5 M, el cambio de la presión no tiene un efecto evidente, pero cuando la concentración está a 1 M, este cambio de 1 a 20 MPa, disminuye notablemente la respuesta. Resulta interesante observar que el tratamiento con el nivel de temperatura y presión bajos y la mayor concentración de bicarbonato sea el que mayor inhibición al radical DPPH presenta, respuesta que disminuye cuando la concentración cambia a 0.5 M.

La comparación de los tratamientos no indica similitudes entre ellos, diferenciándose de manera marcada únicamente el 3 y el 9. La menor inhibición lo muestran los tratamientos 9 y 5.

Los resultados obtenidos en el tratamiento 3, podrían asociarse a que a 100 °C y 0.5 MPa, el agua presenta ligeramente una menor densidad y la presencia del bicarbonato aumenta la hidrólisis del enlace peptídico, como puede observarse en

el GH, que si bien no resulta el mejor valor de GH alcanzado, el efecto de mayores presiones o temperaturas promueve una mayor generación de iones carbonato en el medio y de su precipitación, lo que podría disminuir la capacidad de inhibir el radical DPPH, asociado a los fundamentos del procedimiento por la presencia de iones inorgánicos (Kedare & Singh, 2011).



**Figura 25. Proyecciones de superficie de respuesta de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad antioxidante de DPPH.** A: Proyección de tratamiento a 130 °C, B: Proyección de tratamiento a 115 °C, C: Proyección de tratamiento a 100 °C.

Respecto a los tratamientos con ácido cítrico la prueba de Tukey nos indica la mejor respuesta en el tratamiento 1 con 130 °C, 20 MPa y 1 M con una IC<sub>50</sub> de 4.06 mg/ml. El análisis completo de factores (**Tabla 11**) nos muestra el efecto significativo de la interacción triple con una importante influencia de la temperatura. Con la identificación de interacciones dobles como Temperatura:Presión y Presión:Acítrico. El análisis de curvatura nos da un valor delta de 9.39, confirmando curvatura.

**Tabla 11. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante DPPH**

	Estimado	Error estándar	Valor T	Pr (>t)	
(Intercepto)	-924.59	171.46	-5.39	4x10 <sup>-4</sup>	***
Temperatura	15.46	2.97	5.19	5x10 <sup>-4</sup>	***
Presión	7.17	2.48	2.88	0.01	*

<b>Ácido cítrico</b>	28.60	44.54	0.64	0.53	
<b>I ((Temperatura)^2)</b>	-0.06	0.01	-4.80	9x10 <sup>-4</sup>	***
<b>Temperatura: Presión</b>	-0.07	0.02	-3.32	0.008	**
<b>Temperatura:Ácido cítrico</b>	-0.02	0.38	0.07	0.94	
<b>Presión:Ácido cítrico</b>	-9.94	3.14	-3.16	0.01	*
<b>Temperatura:Presión:Ácido cítrico</b>	0.09	0.02	3.44	0.007	**

Codificación: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

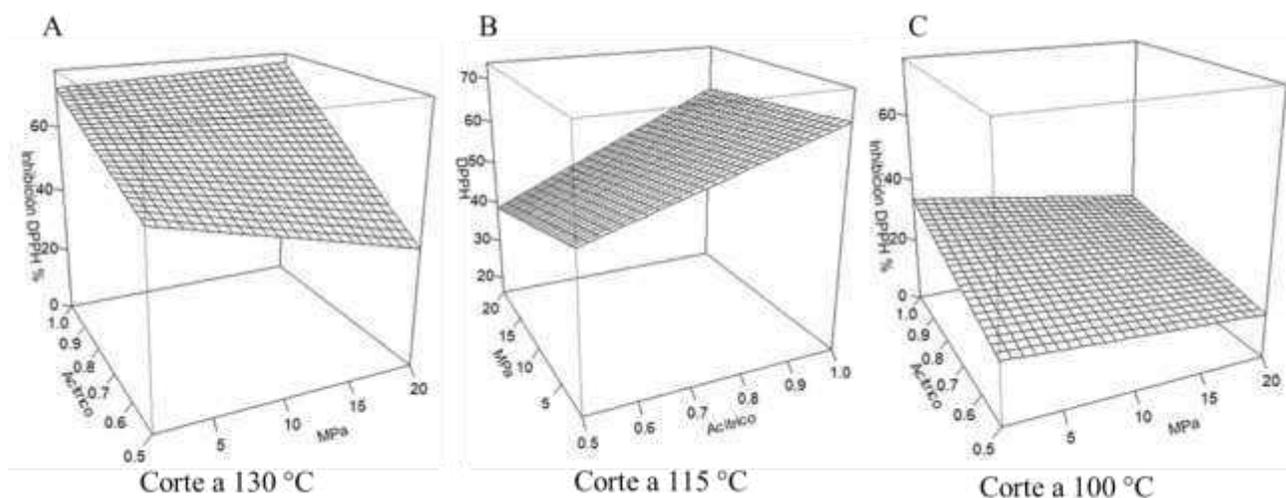
Se obtuvieron proyecciones de superficie de respuesta para observar los efectos de los tratamientos (**Figura 23**). Al observar las proyecciones de los factores de los tratamientos, puede verse que, a altas temperaturas y concentraciones del modificador a 1 M, el efecto en el cambio de la presión no ejerce un cambio significativo en la respuesta (observando tratamientos 1 y 9 resultan similares), no así cuando la temperatura alta y la concentración es baja (tratamientos 7 y 4), el cambio en la presión si ejerce una modulación notable en la respuesta, disminuyendo la respuesta al aumentar la presión. Siguiendo con los tratamientos a altas temperaturas, el cambio de la concentración en los tratamientos con presión alta (1 y 7) es posible observar una disminución de hasta un 50 % aproximadamente en la respuesta (tratamiento 7).

Al cambiar a los tratamientos con temperatura baja y una concentración alta del modificador (8 y 3) nuevamente es posible ver el efecto del cambio de la presión, donde a una menor presión se obtiene una mejor respuesta en ambas concentraciones del modificador. Observando también los tratamientos con temperatura baja y una presión fija, ya sea a 20 MPa (2 y 8) o 1 MPa (3 y 6), el cambio de la concentración tiene un efecto en la respuesta, donde los tratamientos con la mayor concentración del modificador muestran una mejor respuesta (**Figura 23**).

Los tratamientos con ácido cítrico en general muestran mejores rendimientos de inhibición que los tratamientos por bicarbonato de sodio. Observando los efectos de los factores a detalle, se observa el efecto de la hidrólisis asociada principalmente por la temperatura y la concentración del modificador, donde la inhibición del radical se puede estar dando por los aminoácidos terminales de los

péptidos donde la hidrólisis fue efectuada aunado al pKa que se encuentren debido al pH promovido por la presencia del ácido cítrico.

Si bien, observando el resultado previo de grado de hidrólisis del T1 el resultado en la inhibición del radical no fue tan buena, esto nos podría a dar indicios sobre ciertas diferencias o la modulación diferencial entre cada condición probada. Siendo los tratamientos a mayor temperatura promoviendo hidrólisis en residuos con mayor potencial para la donación de electrones y H<sup>+</sup> o bien, en la generación de fragmentos más pequeños que tengan una mejor habilidad para esta misma inhibición, esto pudiéndose corroborar con la electroforesis en gel.



**Figura 26. Proyecciones de superficie de respuesta de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad antioxidante de DPPH.** A: Proyección de tratamiento a 130 °C, B: Proyección de tratamiento a 115 °C, C: Proyección de tratamiento a 100 °C

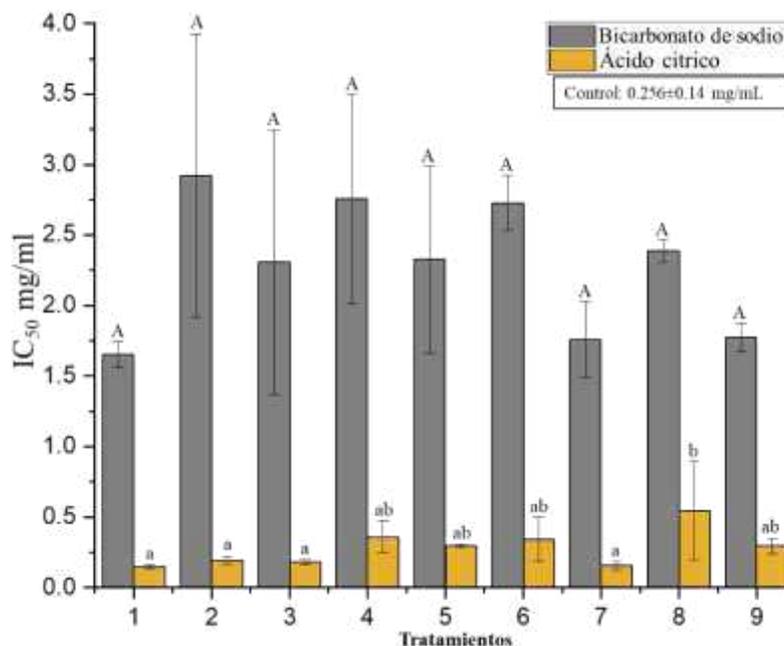
El tratamiento con la mejor actividad antioxidante fue a 130 °C, 20 MPa y 1M para ácido cítrico con 4.06 mg/ml y para bicarbonato de sodio a 100 °C, 1 MPa y 1M con una IC<sub>50</sub> de 20.59 mg/ml. Los hidrolizados donde se implementó bicarbonato de sodio mostraron menor actividad de captación de radicales libres DPPH que todos los tratamientos con ácido cítrico y el control (12.97±1.4 mg/ml), no obstante, mostró en algunos tratamientos una mejor IC<sub>50</sub> que la hidrólisis enzimática, la cual alcanza una IC<sub>50</sub> de 28 mg/ml. El uso de bicarbonato de sodio como modificador parece reducir la actividad de inhibición cuando se compara con los resultados

obtenidos por el tratamiento utilizando ácido cítrico, esto podría asociarse también al pH al cual el medio se encuentra por la adición de este compuesto, disminuyendo la capacidad de donación de electrones y H<sup>+</sup> por el pKa en el cual se encuentren las proteínas o bien, secuestrándolos por los iones derivados de la descomposición del bicarbonato de sodio, disminuyendo dicha actividad (Gunner et al., 2006).

Lo observado para ambos modificadores resulta a las concentraciones IC<sub>50</sub> reportadas por Melgosa et al., (2020) en hidrolizados de subproductos de la pesca de sardina, determinando concentraciones de hasta 0.81 mg/ml con material previamente desgrasado y de 3.18 mg/ml en material sin desgrasar a 140 °C, destacando que con el aumento de la temperatura fueron observadas concentraciones más altas de hasta 3.56 mg/ml a 250 °C, en su material sin desgrasar. Así mismo, comparando con hidrolizados enzimáticos, el mejor tratamiento de ambos modificadores tuvo una actividad contra DPPH similar a la de un hidrolizado de larva de *Musca domestica* con un IC<sub>50</sub> de 2.5 mg/ml, usando Flavorzyme y Alcalasa (Wang et al., 2013), pero inferior a los resultados de un hidrolizado de otro ortóptero (*Gryllus assimilis*) con una IC<sub>50</sub> de 455 ug/ml, usando Flavorzyme (de Matos et al., 2021).

#### 7.6 Actividad de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA)

En la **Figura 24**, se muestran los resultados de la determinación de la actividad inhibitoria de la ECA de los tratamientos por agua subcrítica utilizando ambos modificadores.



**Figura 27. Actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I de los hidrolizados por agua subcrítica.** Los resultados representan los promedios de la IC<sub>50</sub> de la actividad de la enzima (n=3) ± la desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), letras diferentes indican diferencias significativas

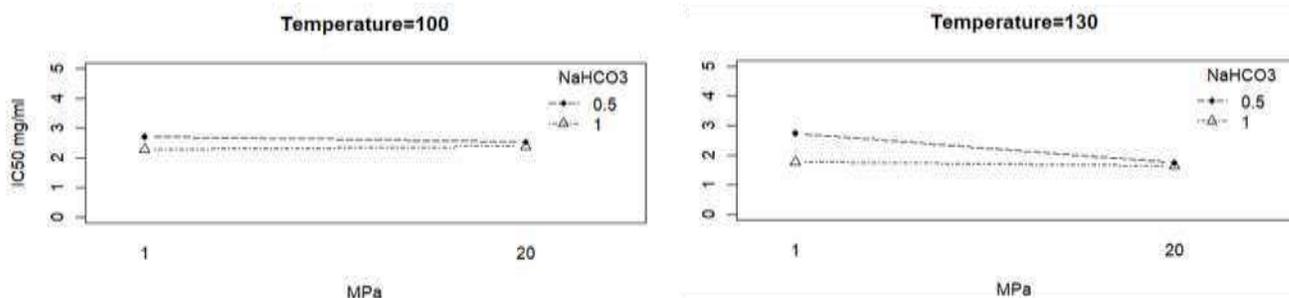
De los tratamientos con bicarbonato de sodio, si bien la prueba de Tukey no nos indica diferencias significativas, en promedio, la mejor respuesta se obtiene en el tratamiento 1 (130 °C, 1 M y 20 MPa) con una IC<sub>50</sub> de 1.72 mg/ml. El análisis completo de factores (**Tabla 12**) nos indica a la temperatura como una variable ligeramente significativa. No se detectó curvatura en los tratamientos (delta: 0.13).

**Tabla 12. Análisis de los efectos de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad inhibitoria de la ECA**

	Df	Suma de cuadrados	Medias de cuadrados	Valor F	Pr(>F)
Temperatura	1	1.01	1.01	3.21	0.11
Presión	1	0.37	0.37	1.18	0.30
NaHCO <sub>3</sub>	1	0.68	0.68	2.17	0.17
Temperatura: Presión	1	0.25	0.25	0.80	0.39
Temperatura:NaHCO <sub>3</sub>	1	0.06	0.06	0.21	0.65
Presión :NaHCO <sub>3</sub>	1	0.32	0.32	1.03	0.33
Temperatura:Presión:NaHCO <sub>3</sub>	1	0.09	0.09	0.29	0.60
Residuales	8	2.53	0.31		

Codificación: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En las proyecciones de las interacciones de los factores (**Figura 25**), no se observa interacción destacable, aunque si ligeramente el efecto de la alta temperatura a una concentración de 1 M. De los tratamientos a 100 °C, se observa una mejor respuesta en los tratamientos a una concentración 1 M sin ver un efecto en la variación de la respuesta al cambiar la presión. A 130 °C, nuevamente se observa una mejor respuesta cuando la concentración del bicarbonato está a 1 M, en la cual el cambio de presión no tiene efecto de la variación de la respuesta, mas no así, cuando la concentración es de 0.5 M, mejorando la respuesta al cambiar la presión de 1 a 20 MPa. Las ligeras diferencias observadas en los tratamientos pueden asociarse al mayor grado de hidrólisis que presentan los tratamientos con mayor temperatura, que pudiesen estar generando ligeramente una mayor cantidad de fragmentos de bajo peso molecular con las características apropiadas para la inhibición de la enzima, aun cuando ya ha sido observado que el uso de este modificador promueve la principalmente generación de péptidos de alto peso molecular.



**Figura 28. Proyección de interacción triple de los factores de los tratamientos con bicarbonato de sodio en la actividad de inhibición de la ECA.**

Respecto a los tratamientos con ácido cítrico, el análisis de las diferencias entre tratamientos por la prueba de Tukey, como mejor tratamiento aquel con condiciones 130 °C, 20 MPa y 1 M con una IC<sub>50</sub> de 0.142 mg/ml, no obstante, es importante destacar a los tratamientos 2 y 3 con una IC<sub>50</sub> de 0.195 y 0.180 mg/ml respectivamente, considerando que resultan en buenas respuestas, pero con condiciones bajas de temperatura.

El análisis de factores (**Tabla 13**) nos muestra el efecto significativo de la interacción triple. Si bien el análisis de curvatura nos confirma la existencia de ella, el valor de la R<sup>2</sup> ajustada del modelo resulta ser de 0.34, por lo que la proyección de la superficie de respuesta que se pueda obtener no resulta confiable.

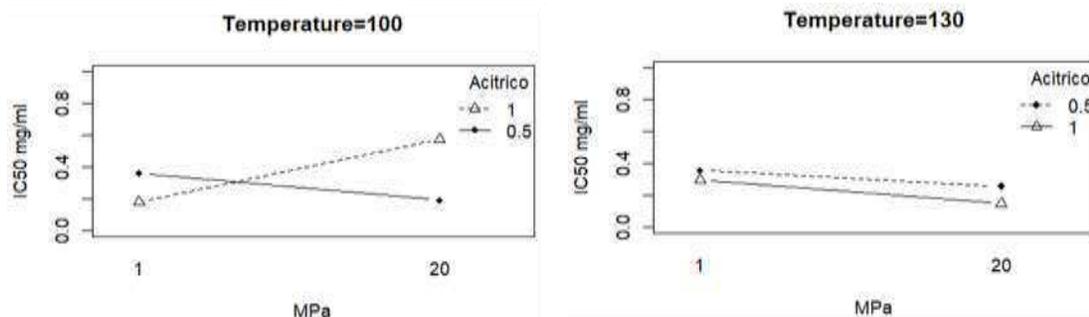
**Tabla 13. Análisis de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad inhibitoria de la ECA**

	Df	Suma de cuadrados	Medias de cuadrados	Valor F	Pr(>F)
<b>Temperatura</b>	1	0.01	0.01	0.75	0.41
<b>Presión</b>	1	1x10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>-4</sup>	0.006	0.94
<b>Acítrico</b>	1	2x10 <sup>-4</sup>	2x10 <sup>-4</sup>	0.01	0.91
<b>Temperatura:Presión</b>	1	0.05	0.05	2.63	0.14
<b>Temperatura:Acítrico</b>	1	0.03	0.03	1.62	0.23
<b>Presión:Acítrico</b>	1	0.06	0.06	3.15	0.11
<b>Temperatura:Presión:Acítrico</b>	1	0.09	0.09	4.44	0.06
<b>Residuales</b>	8	0.16	0.02		

Codificación: 0 (\*\*\*\*) 0.001 (\*\*\*) 0.01 (\*\*) 0.05 (\*) 0.1 (.) 1

En la proyección de las interacciones de los factores (**Figura 26**), se observa de manera general, que una mayor temperatura genera mejores una mayor inhibición de ECA. De forma más detallada, los tratamientos a 130 °C con una mayor concentración del modificador tienen concentraciones IC<sub>50</sub> menores, mejorando ligeramente la respuesta con el cambio de presión de 1 a 20 MPa para ambas concentraciones.

Ahora bien, analizando la gráfica de interacción de los factores en los tratamientos a 100 °C, se puede observar el efecto del cambio de la presión en ambas concentraciones, mejorando la respuesta el aumento de la presión a 0.5 M y disminuyéndola cuando ésta se encuentra a 1 M. A 100 °C, es perceptible la eficiencia o ventajas del uso del modificador y el efecto del uso del ácido cítrico en la generación de fragmentos de bajo peso molecular por la capacidad de inhibir la actividad de la ECA, permitiendo obtener buenas respuestas en esta variable con un menor gasto energético o en la cantidad del modificador.



**Figura 29. Proyección de interacción triple de los factores de los tratamientos con ácido cítrico en la actividad de inhibición de la ECA.**

Al analizar en conjunto las actividades inhibitorias de la ECA de los tratamientos en ambos modificadores, se observa que las mejores respuestas obtenidas son donde se emplea ácido cítrico en todos los tratamientos, que puede atribuirse a los fragmentos de bajo peso molecular aun en tratamientos con bajo grado de hidrólisis y probablemente a la modulación diferenciada en el corte de aminoácidos específicos de los péptidos que pueda inhibir el sitio activo de la enzima.

Solamente los tratamientos con ácido cítrico mostraron una mejor inhibición de la actividad de la ECA, comparado con el tratamiento control ( $IC_{50} 0.38 \pm 0.09$  mg/ml), este último generando principalmente fragmentos de bajo peso molecular que pueden estar asociados a su mejor actividad. En los tratamientos 1, 2, 3 y 7 se obtuvieron las mejores concentraciones de inhibición, estas resultan similares a tratamientos a mayor temperatura empleando agua subcrítica (sin modificadores) como lo reportado por Jeong et al., (2021) para un hidrolizado de *Mytilus edulis* obtenido a 180 °C durante 30 min con concentraciones  $IC_{50}$  de 150  $\mu$ g/ml, no obstante, la eficiencia en la generación de péptidos con las características adecuadas para la inhibición de la ECA está influenciada también por el origen y/o composición del material a ser hidrolizado, pudiendo obtener concentraciones  $IC_{50}$  bajas sin el empleo de altas temperaturas o modificadores como lo reportado por Cho et al., (2020), para hidrolizados de *Achatina fulica* con  $IC_{50}$  de 34.50  $\mu$ g/ml a 100 °C y de hasta 7.91  $\mu$ g/ml a 200 °C. Los tratamientos con bicarbonato de sodio

obtuvieron actividades de inhibición de la ECA similares a los obtenidos por Asaduzzaman et al., (2018) en hidrolizados de macarela empleando este modificador a 0.6 M por 3 min, con concentraciones de 2.5 mg/ml a 220 y 260 °C, aun cuando estos hidrolizados alcanzan GH de 99.5 %, pudiendo asociar esta baja eficiencia en la inhibición de la actividad o de la presencia de péptidos adecuados para su inhibición, a la generación de aminoácidos libres y de compuestos de degradación asociado a la alta temperatura, por lo que seleccionar las condiciones adecuadas del uso de los modificadores de acuerdo al objetivo que se quiera lograr resulta de gran relevancia. Para ambos modificadores es destacable el uso adecuado de estos para mejorar las condiciones hidrolíticas del medio sin recurrir a temperaturas que puedan generar la degradación de aminoácidos, así como un ahorro energético para la obtención de hidrolizados con diferentes bioactividades y características y de su efecto sobre la matriz a ser implementados.

Comparando los resultados obtenidos con hidrolizados enzimático, las mejores actividades inhibitorias fueron similares a las reportadas para un hidrolizado de *Alphitobius diaperinus* usando Corolase PP después de 6 horas de reacción (Sousa et al., 2020) o las reportadas por Hall & Liceaga (2020) para un hidrolizado de otra especie de ortóptero *Gryllodes sigillatus* usando Alcalasa asistida con microondas con una IC<sub>50</sub> de 0.2 mg/ml.

Para un análisis de datos integrados, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) (**Figura 27**). Para facilitar el análisis e identificación, cada tratamiento fue codificado y se muestran en la tabla adjunta con las respuestas obtenidas para cada variable (**Tabla 14**).

La proyección ACP recupera el 87.3% de la información, por lo que puede considerarse confiable. La primera dimensión recupera el 61.7% de la información, este eje nos permite diferenciar en su lado positivo aquellos tratamientos que se caracterizan por un bajo grado de hidrólisis y una concentración de IC<sub>50</sub>

relativamente alta, mientras que, en su lado negativo, aquellos tratamientos con alto GH y baja  $IC_{50}$  para la inhibición de todas las actividades biológicas *in vitro*.

La segunda dimensión recupera el 25.6% de la información. Este eje nos permite diferenciar relativamente, en su lado positivo, aquellos tratamientos con una GH que se podría considerar alta y con concentraciones altas de  $IC_{50}$  para DPPH y ECA, pero con una  $IC_{50}$  baja para ABTS.

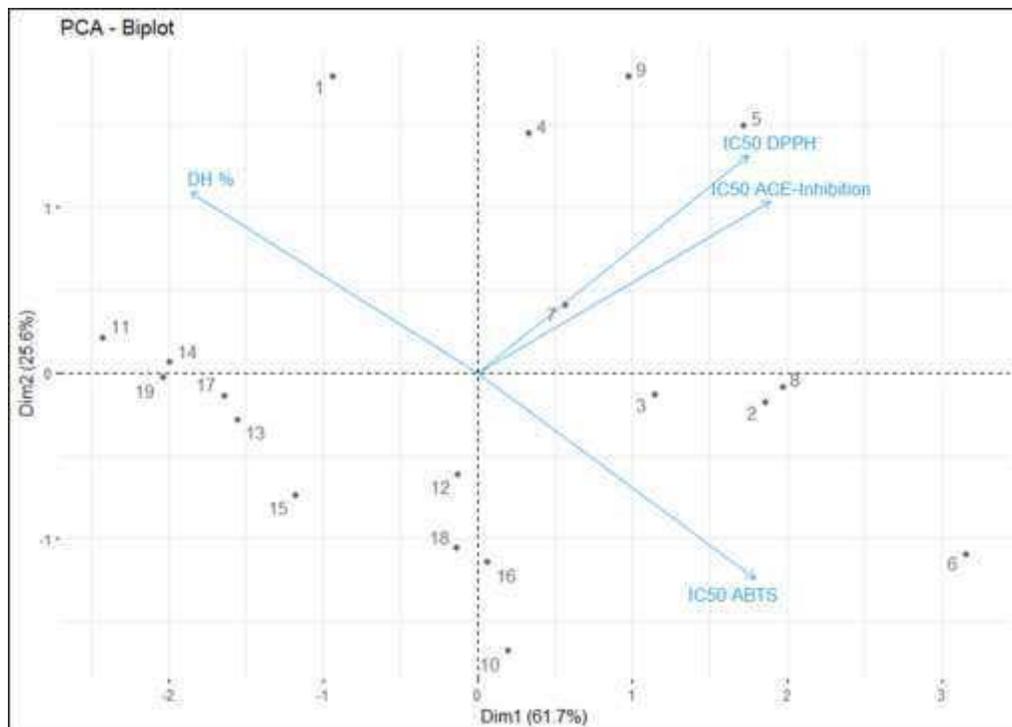
En la proyección ACP se puede observar la diferenciación de los tratamientos con ácido cítrico y los de bicarbonato de sodio, pues mientras los primeros se posicionan mayoritariamente como tratamientos con mejores capacidades de inhibición en general con diferentes GH, los segundos presentan GH más dispersos con las actividades biológicas son menores. Estas diferencias entre ambos modificadores como ya se observó en el gel de electroforesis, el uso de ácido cítrico genera principalmente fragmentos de bajo peso molecular con una mayor capacidad para ejercer una actividad biológica (Bhandari et al., 2020), incluso en tratamientos con bajo GH.

Lo anterior permite mencionar que los GH elevados no son determinantes para mejores actividades biológicas con los tratamientos realizados y el impacto de la modulación de los 3 factores para la efectividad de la hidrólisis y el uso del modificador adecuado.

En la proyección se pueden ver grupos de tratamientos como el 11, 13, 14, 17 y 19, que se caracterizan por tener alta GH y baja  $IC_{50}$ , todos ellos usando ácido cítrico como modificador, y a pesar de la dependencia de temperatura (donde cuatro de los tratamientos son de alta temperatura), la modulación de los 3 factores es relevante para mejorar la respuesta, al observar las diferencias entre ellos y especialmente al ver el tratamiento 13. Entre todos los tratamientos proyectados, destaca el tratamiento 11 siendo el tratamiento con mejores respuestas relativas, seguido del tratamiento 14 y 19.

Los tratamientos 1, 4 y 9 son tratamientos que usan bicarbonato de sodio y se caracterizan por tener GH considerada relativamente buena y con  $IC_{50}$  alta para DPPH y ECA pero  $IC_{50}$  baja para ABTS. Con ellos, se puede mencionar que el efecto positivo en la hidrólisis por el uso de bicarbonato de sodio es más dependiente de la temperatura (en comparación con los tratamientos con ácido cítrico), sin embargo, la generación de fragmentos de alto peso molecular limita la actividad en la inhibición de la ECA, así como la interferencia que pueden ejercer los iones inorgánicos en la metodología DPPH, pero no limitando su capacidad para la inhibición del radical ABTS.

Los tratamientos 12, 18, 19 y 10 (siendo este último el control), no se destacan en ninguna variable. Los tratamientos 2, 3 y 8 como tratamientos con baja GH y altas  $IC_{50}$ , que, si bien resultan tener bajas respuestas, el tratamiento 6, es el que se destaca principalmente por tener bajas respuestas en las cuatro variables.



**Figura 30. Proyección de análisis de componentes principales de los tratamientos de ambos modificadores y control**

**Tabla 14. Grado de hidrólisis (GH%), concentración IC50 para la actividad antioxidante (DPPH y ABTS) e inhibidora de la ECA obtenida los tratamientos de ambos modificadores.**

Código	Tratamiento (T °C/MPa/M)	GH %	IC <sub>50</sub> DPPH	IC <sub>50</sub> ABTS	IC <sub>50</sub> ECA
1	BS 130/20/1	44.56±1.45 <sup>A</sup>	28.19±0.69 <sup>AB</sup>	0.51±0.02 <sup>A</sup>	1.72±0.24 <sup>A</sup>
2	BS 100/20/0.5	12.87±0.12 <sup>DE</sup>	27.83±4.13 <sup>AB</sup>	1.37±0.10 <sup>CD</sup>	2.43±0.85 <sup>A</sup>
3	BS 100/1/1	9.15±1.40 <sup>EF</sup>	20.60±0.67 <sup>A</sup>	0.91±0.07 <sup>C</sup>	2.30±0.93 <sup>A</sup>
4	BS 130/1/0.5	33.04±0.77 <sup>B</sup>	26.61±3.60 <sup>AB</sup>	0.74±0.03 <sup>BC</sup>	2.75±0.74 <sup>A</sup>
5	BS 115/10/.75	19.06±1.47 <sup>CD</sup>	51.80±9.12 <sup>B</sup>	0.89±0.09 <sup>C</sup>	2.32±0.65 <sup>A</sup>
6	BS 100/1/0.5	5.74±0.24 <sup>F</sup>	31.17±8.46 <sup>AB</sup>	2.05±0.08 <sup>D</sup>	2.77±0.16 <sup>A</sup>
7	BS 130/20/0.5	20.36±2.88 <sup>C</sup>	27.74±2.92 <sup>AB</sup>	0.86±0.01 <sup>C</sup>	1.75±0.26 <sup>A</sup>
8	BS 100/20/1	7.22±0.89 <sup>EF</sup>	32.07±4.70 <sup>AB</sup>	1.19±0.15 <sup>CD</sup>	2.28±0.21 <sup>A</sup>
9	BS 130/1/1	20.65±1.98 <sup>C</sup>	52.30±8.57 <sup>B</sup>	0.52±0.04 <sup>AB</sup>	1.76±0.15 <sup>A</sup>
10	Ctrl 115/10	15.06±1.26	12.97±1.40	1.42±0.24	0.38±0.09
11	AC 130/20/1	38.73±0.98 <sup>a</sup>	4.06±0.65 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>	0.14±0.03 <sup>a</sup>
12	AC 100/20/0.5	19.18±1.63 <sup>c</sup>	23.84±6.21 <sup>d</sup>	1.00±0.19 <sup>cd</sup>	0.19±0.01 <sup>a</sup>
13	AC 100/1/1	34.16±1.38 <sup>ab</sup>	9.15±1.98 <sup>c</sup>	0.76±0.09 <sup>bcd</sup>	0.18±0.009 <sup>a</sup>
14	AC 130/1/0.5	37.63±2.00 <sup>a</sup>	5.51±0.42 <sup>b</sup>	0.58±0.03 <sup>bc</sup>	0.35±0.11 <sup>ab</sup>
15	AC 115/10/.75	18.34±0.89 <sup>c</sup>	5.68±0.45 <sup>b</sup>	0.54±0.02 <sup>bc</sup>	0.26±0.05 <sup>ab</sup>
16	AC 100/1/0.5	11.22±2.05 <sup>d</sup>	16.52±1.51 <sup>d</sup>	1.01±0.18 <sup>cd</sup>	0.46±0.16 <sup>ab</sup>
17	AC 130/20/0.5	29.39±1.83 <sup>b</sup>	8.41±0.62 <sup>c</sup>	0.49±0.06 <sup>b</sup>	0.20±0.07 <sup>a</sup>
18	AC 100/20/1	21.63±2.18 <sup>c</sup>	13.04±1.31 <sup>cd</sup>	1.24±0.38 <sup>ab</sup>	0.57±0.35 <sup>b</sup>

19	AC 130/1/1	35.19±1.47 <sup>ab</sup>	4.18±0.10 <sup>a</sup>	0.47±0.05	0.33±0.05 <sup>ab</sup>
----	------------	--------------------------	------------------------	-----------	-------------------------

Los valores se expresan como media ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) según la prueba de Tukey. BS: Bicarbonato de sodio, AC: Ácido cítrico, Ctrl: Control.

Con el análisis de los datos obtenidos, se seleccionó al tratamiento con condiciones de 130 °C, 20 MPa y 1 M de concentración de ácido cítrico para la siguiente fase experimental, que consistirá en profundizar el estudio de la hidrólisis con una cinética de la misma, con puntos a cada 5 min hasta los 30 min de reacción, donde se incluyó un tratamiento control sin uso del modificador.

## 7.7 Caracterización de la cinética de hidrólisis del tratamiento seleccionado

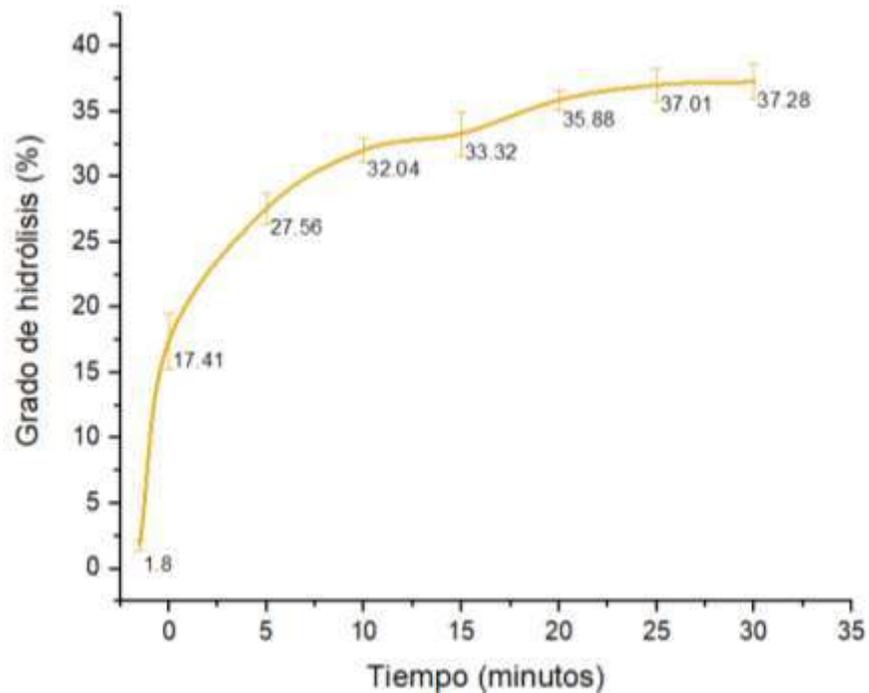
### 7.7.1 Grado de hidrólisis

En la **Figura 28** se muestra la evolución del grado de hidrólisis del concentrado durante los 30 min de la reacción, cabe mencionar que se toma como minuto 0, aquel donde se alcanza la condición diseñada y seleccionada a 130 °C y 20 MPa.

Se observa que el concentrado presentó un GH inicial de  $1.80\pm 0.68\%$ , que se puede asociar a los aminoácidos libres y péptidos presentes de manera natural en la hemolinfa de los insectos, como a la acción de proteasas presentes en la hemolinfa y en el sistema digestivo durante el proceso de ayuno de los chapulines (Kanost & Clem, 2012). La **Figura 28** permite observar 3 tasas diferentes a lo largo del proceso de hidrólisis, con un aumento relevante durante la rampa de temperatura/presión, pasando de un valor inicial de 1.80 a 17.41 %, lo que indica la hidrólisis de los enlaces peptídicos más disponibles de las proteínas. En el intervalo de 0 a 10 min, la tasa de hidrólisis disminuyó ligeramente alcanzando  $27.56\pm 2.11\%$  a los 5 min de la reacción y  $32.04\pm 0.91\%$  a los 10 minutos. Posteriormente, se observa un descenso en la tasa de hidrólisis, de los 10 a los 20 min para alcanzar  $35.88\pm 0.077\%$  y finalmente observar una última reducción al ver una tendencia casi horizontal de la hidrólisis y alcanzar  $37.28\pm 1.37\%$  a los 30 min de la reacción. Estas disminuciones en la tasa de hidrólisis pueden asociarse principalmente a la disminución de la concentración de enlaces peptídicos susceptibles, pues de

manera natural una fracción relevante de proteínas se encuentran enlazadas a otros compuestos como la quitina y conforman estructuras complejas como la presente en el exoesqueleto, limitando así la interacción entre los iones del medio y los átomos que conforman el enlace peptídico (Henriques et al., 2020; Merzendorfer & Zimoch, 2003).

Respecto al tratamiento sin ácido cítrico, este alcanzó  $19.09 \pm 0.014$  % pasados los 30 min de la reacción, evidenciando la efectividad que tiene el uso del modificador para mejorar el GH en 2 veces de lo que se alcanzaría sin su uso o bien de obtener respuestas similares en menor tiempo con el uso de este modificador. Es importante señalar que es la interacción triple de los factores lo que resulta efectivo para la mejora de la respuesta, pues se evaluó también la efectividad de una hidrólisis de ácido cítrico a punto de ebullición a presión atmosférica y ésta solamente alcanzó un  $6.03 \pm 0.01$  % después de 30 min de reacción.



**Figura 31. Cinética de grado de hidrólisis del tratamiento con ácido cítrico 130°C/20 MPa/1M**

#### 7.7.2 Proteína soluble y aminoácidos libres (AL)

En la **Figura 29** se muestra las concentraciones de proteína soluble y aminoácidos libres del hidrolizado durante los 30 min de la reacción. Comenzando con la concentración de proteína soluble, en similitud a lo observado con el GH, podemos observar al menos 4 tasas de incremento en la concentración. Partiendo con un contenido inicial de  $34.8 \pm 3.31$  mg/g de concentrado proteico, durante la rampa de temperatura/presión para llegar a la condición nominal, aumentó a  $105.45 \pm 10.29$  mg/g de hidrolizado, después se observó un aumento a los 10 min a  $151.35 \pm 10.2$  mg/g de hidrolizado y ver una disminución en la tasa de aumento hasta los 25 min de la reacción con  $169.51 \pm 5.13$  mg/g de hidrolizado, pues de los 25 a los 30 min se observó nuevamente un incremento marcado en la concentración para terminar con  $211.65 \pm 4.35$  mg/g de hidrolizado. El amplio aumento inicial durante la rampa de calentamiento/presión podría asociarse a la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas que se encuentran más disponibles o susceptibles a ser hidrolizadas, principalmente aquellas que no se encuentran unidas a otros compuestos, como las unidas a la quitina y minerales que conforman todo el exoesqueleto (Muthukrishnan et al., 2020). Este primer incremento en la concentración resulta relevante pues representa el 41.77 % del aumento total y que se reduce conforme avanza el tratamiento debido a la disminución de enlaces disponibles y que se ve reflejado en la tasa de liberación de este componente. No obstante, el aumento observado entre los 25 y 30 min de reacción, se asociaría a la liberación de proteínas procedentes de las capas de la que está conformado el exoesqueleto y en consecuencia podría estar indicando la hidrólisis de este mismo (Sviben et al., 2020). Esto último resulta de gran relevancia pues lo reportado por Yang et al., (2018), quienes estudiaron la cinética de hidrólisis de quitina pura de camarón, ésta comienza a ser hidrolizada hasta los 283 °C bajo el mismo mecanismo de iones por el cual se hidroliza el enlace peptídico, mencionando la dificultad de su hidrólisis debido principalmente a su conformación tanto amorfa como cristalina.

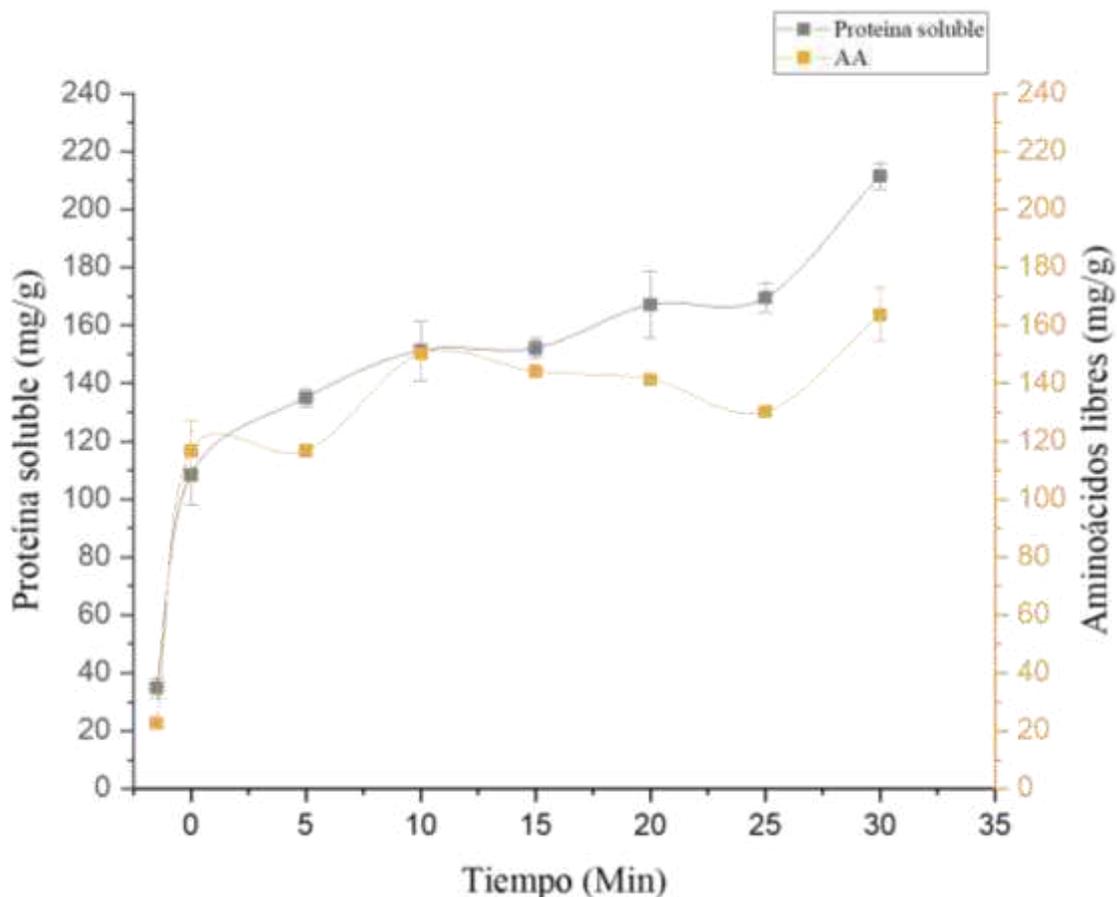
Respecto al tratamiento sin ácido cítrico, éste alcanzó un contenido de  $52.05 \pm 2.61$  mg/g de hidrolizado después de 30 min de reacción, alcanzando apenas el 50 % de lo que se alcanza al minuto 0 con el uso del modificador.

Continuando con la **Figura 29**, en ella podemos observar diferentes tendencias respecto a la concentración de AL, donde el contenido inicial en el concentrado proteico era de  $22.65 \pm 1.71$  mg/g que aumentó a  $116.67 \pm 10.54$  mg/g de hidrolizado durante la rampa para al llegar a la condición seleccionada, después se observó un aumento a  $150.18 \pm 1.09$  mg/g de hidrolizado en los primeros 10 min del tratamiento. Seguido a esto vemos una tendencia a disminuir la concentración de los AA hasta los 25 min con  $130.14 \pm 1.78$  mg/g de hidrolizado y nuevamente aumentar a partir de los 25 min de reacción y finalizar con una concentración de  $163.65 \pm 9.24$  mg/g de hidrolizado.

Como también se observó en el contenido de proteína soluble, el aumento que se da en la rampa de calentamiento resulta significativo nuevamente y representa un 66.53 % del aumento total en esta respuesta y que se asocia a la hidrólisis de las proteínas más disponibles y de la hidrólisis de los nuevos fragmentos liberados. Sobre la disminución que se da después de los 10 hasta los 25 min de reacción, ésta podría tener respuesta, por la generación de compuestos de reacción de Maillard (Cho et al., 2020). Durante los últimos 5 min de la reacción el aumento podría asociarse de igual forma a la liberación de proteínas que se encuentran asociadas al exoesqueleto que permitan su hidrólisis para la liberación de más AA.

El tratamiento control obtuvo una concentración de proteína soluble final de  $94.2 \pm 1.35$  mg/g, siendo nuevamente menor que la concentración obtenida al tiempo 0 del tratamiento con ácido cítrico. Interesantemente, la concentración final de AL fue mayor que la concentración final de proteína soluble, esto aporta más evidencia para lo visto en la electroforesis y las actividades biológicas de la etapa anterior, donde se observó que el uso de AS como medio hidrolítico tiende a generar

fragmentos de bajo peso molecular y dicha tendencia puede verse modulada con el uso adecuado de modificadores.



**Figura 32. Cinética de proteína soluble y aminoácidos libres de la condición seleccionada.**

Los resultados se muestran como la media (n=3)  $\pm$  la desviación estándar.

### 7.7.3 Quitina y azúcares reductores

En la **Figura 30** se muestra el porcentaje de quitina y azúcares reductores en el hidrolizado durante los 30 min de la cinética del tratamiento.

Respecto al contenido de quitina, este presentó una concentración inicial de  $10.61 \pm 0.24$  %, en la **Figura 30** se observan hasta 3 tasas de disminución a lo largo del proceso, notando una disminución relevante durante la rampa de calentamiento a  $7.56 \pm 0.73$  % y  $5.86 \pm 0.51$  a los 5 min de la reacción, para después ver disminuida

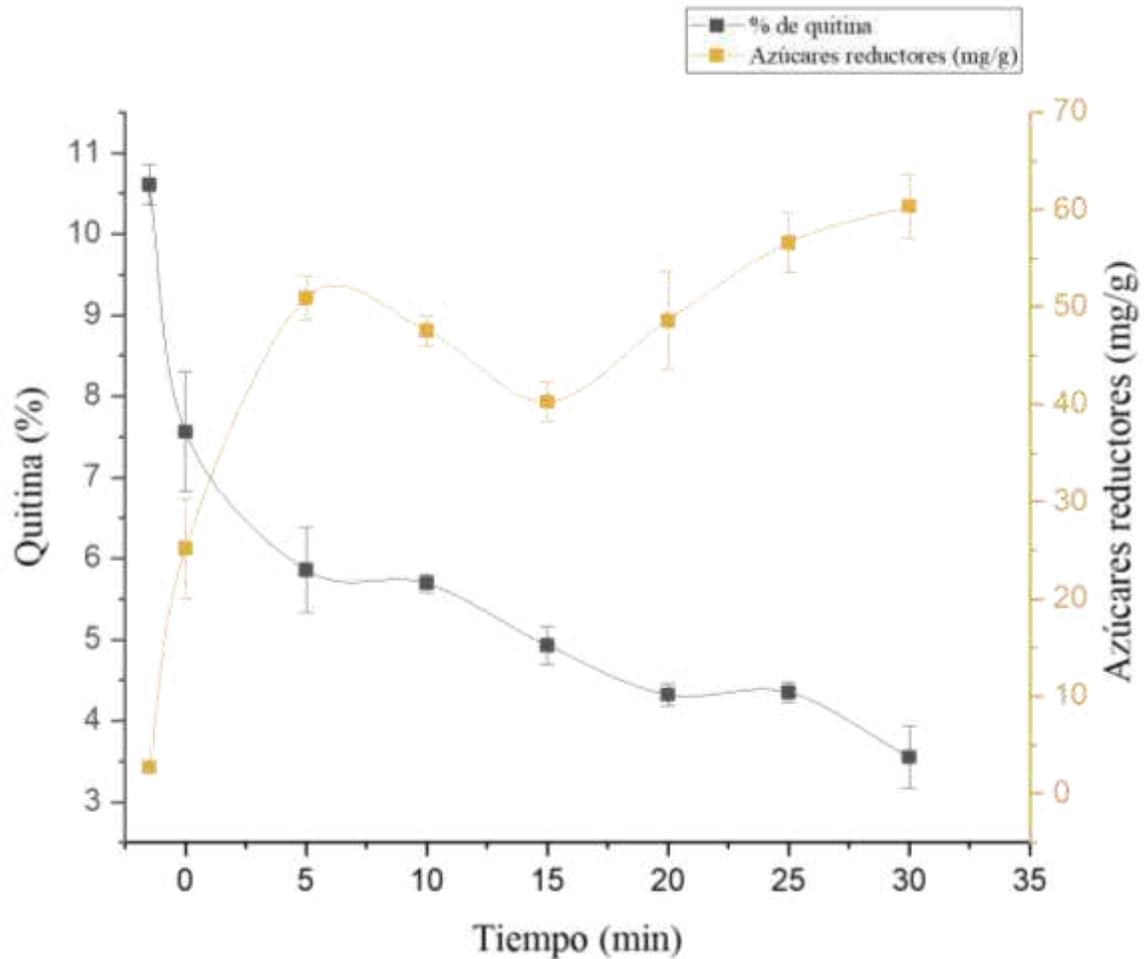
la tasa de hidrólisis de este compuesto y finalizar con una concentración de  $3.55 \pm 0.38$  %.

La hidrólisis de quitina se puede evidenciar también con la determinación de azúcares reductores, puesto que la quitina está conformada por cadenas poliméricas de N-acetil-glucosamina que al ser hidrolizadas pueden derivar en glucosa y glucosamina, pues se ha observado que este compuesto puede sufrir de des-acetilación y desaminación en tratamientos por agua subcrítica (Yang et al., 2018). En la **figura 30**, en amarillo vemos la cinética referente al contenido azúcares reductores, donde se dio un incremento relevante hasta los 5 minutos de la reacción posterior a la rampa de calentamiento, pasando de un contenido base de  $2.73 \pm 0.45$  mg/g a  $50.92 \pm 2.21$  mg/g, para después ver una disminución hasta los 15 min de reacción y nuevamente verse incrementada la concentración de estos compuestos alcanzando  $60.36 \pm 3.25$  mg/g al finalizar el tratamiento.

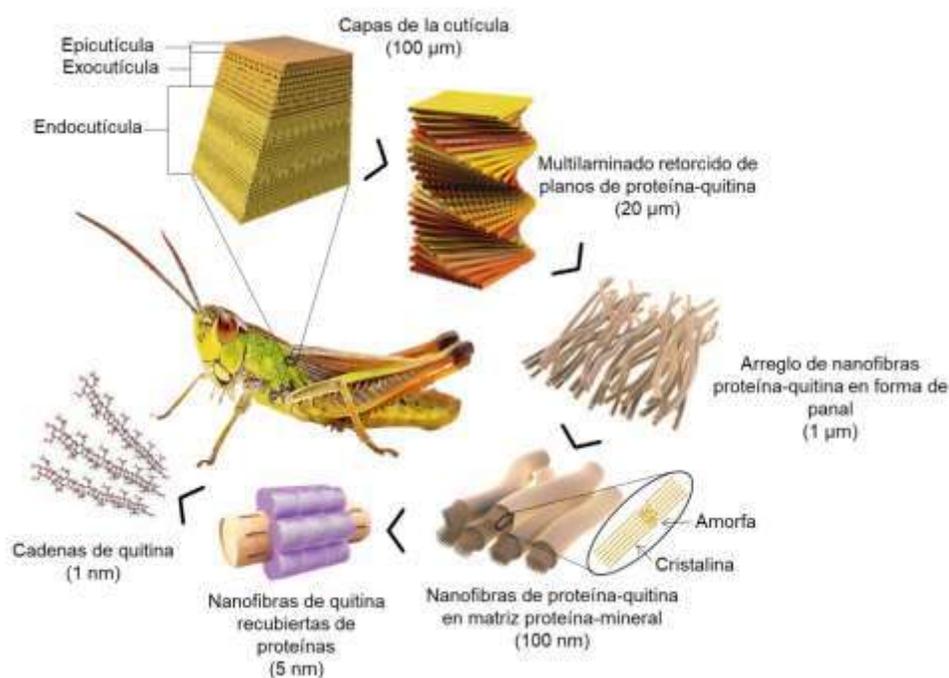
Respecto al control, el tratamiento después de 30 min de reacción tuvo una concentración de quitina de  $9.13 \pm 1.27$  % y  $36.26 \pm 2.61$  mg/g para azúcares reductores, constatando la efectividad del uso del ácido cítrico como modificador para la hidrólisis de este tipo de concentrados proteicos.

Las variaciones observadas se pueden atribuir a la hidrólisis inicial y mayoritaria de la quitina amorfa que se encuentre principalmente en la endocutícula, pues la información disponible apunta a que este tipo de conformación de quitina es hidrolizada con mayor facilidad debido a su arreglo y progresivamente ir siendo hidrolizada la quitina cristalina. Dado que el mecanismo por el cual se hidrolizan ambas conformaciones es el mismo (al igual que en las proteínas) y se debe a la interacción de los iones en el medio con los átomos que conforman los enlaces  $\beta$ -1,4 (Hou et al., 2021; Yang et al., 2018). Por otro lado, la disminución en la concentración de azúcares reductores después de los 5 minutos de la reacción puede estar relacionado a su vez con la disminución de aminoácidos libres, debido a la reacción de Maillard donde estos compuestos son precursores.

Cabe destacar que en la endocutícula el grado de condensación de la estructura de Bouligand es menor y presentan una menor cantidad total de proteína asociada, en comparación con la exocutícula como se observa en la **Figura 31** (Raabe et al., 2005). Lo que podría dar respuesta del aumento de la proteína soluble y AL, debido a una mayor hidrólisis de la exocutícula liberando proteínas asociadas.



**Figura 33. Cinética del contenido de quitina (%) y azúcares reductores de la condición seleccionada.** Los resultados se muestran como la media (3)  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 34. Composición estructural del exoesqueleto de artrópodos (Imagen tomada y adaptada de Lee et al., 2023)**

#### 7.7.4 Actividad antioxidante durante la cinética del tratamiento seleccionado

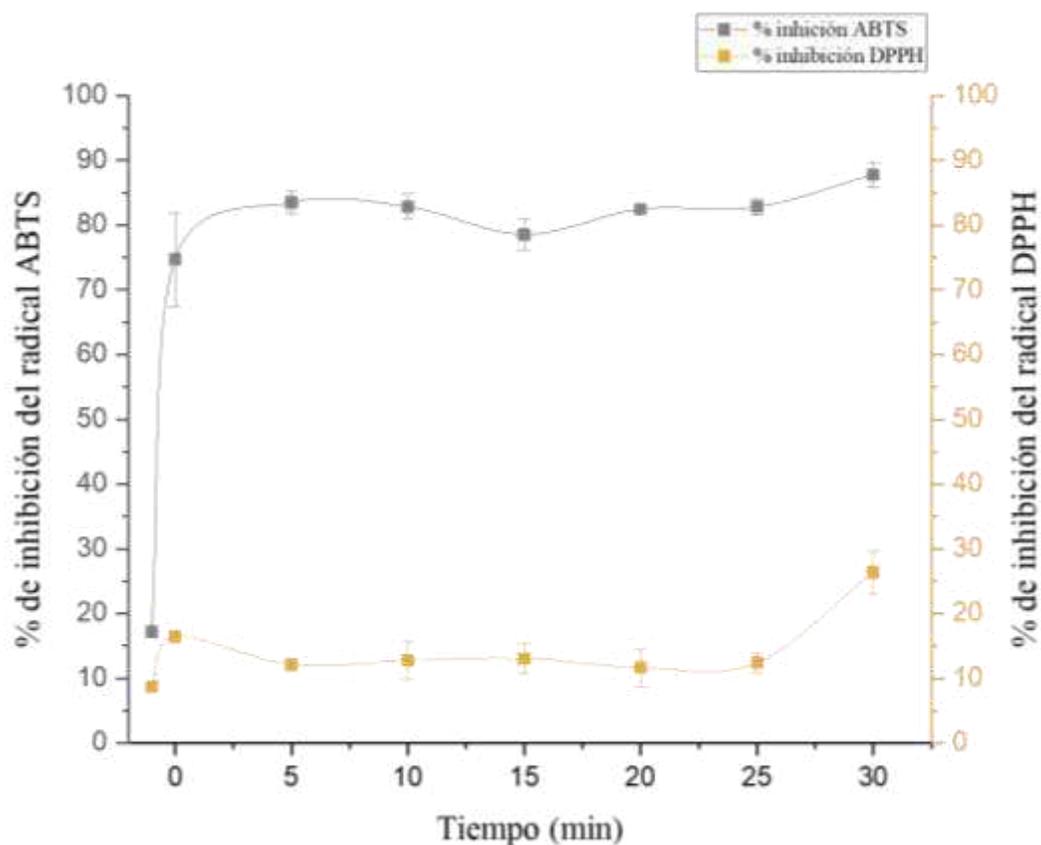
En la **Figura 32** se muestra la cinética de los porcentajes de inhibición de los radicales ABTS y DPPH del hidrolizado a una concentración de 890 μg/ml de hidrolizado.

De forma inicial, el concentrado proteico mostró una inhibición del radical ABTS de  $17.23 \pm 0.95\%$  asociado a los compuestos antioxidantes naturales presentes en los insectos (Felton & Summers, 1995) y que la hidrólisis que sucede durante la rampa de calentamiento, como ya se ha observado, resulta relevante en el incremento de la inhibición alcanzado  $74.72 \pm 7.25\%$ , para después tener un incremento más lento y gradual con el paso del tiempo, concluyendo con una inhibición de  $87.74 \pm 1.88\%$ . El proceso de hidrólisis durante el tratamiento, puede estar generando péptidos con aminoácidos capaces de  $H^+$  como tirosina, triptófano, glicina, glutamato o histidina, aumentando así el % de inhibición del radical (Esfandi

et al., 2019). Cabe mencionar que los compuestos derivados de la reacción de Maillard y de los derivados de la hidrólisis de la quitina pueden mostrar también efecto en la inhibición del radical ABTS, lo que podría explicar las pequeñas variaciones que se observan durante la cinética, tanto por la hidrólisis misma de los péptidos que presentan actividad, de la transformación de aminoácidos hacia compuestos de reacción de Maillard, como de la liberación de azúcares reductores y oligosacáridos derivados de la quitina (Casadidio et al., 2019; Cho et al., 2020).

Respecto a la inhibición del radical DPPH, el hidrolizado mostró menor efectividad, asociado principalmente al tipo de amino terminal que presentan los péptidos o bien de la menor habilidad que tiene el hidrolizado para la donación de electrones de manera global. El material presentó una inhibición inicial de  $8.70 \pm 0.79$  % que se ve aumentada al doble después de la rampa de calentamiento con  $16.45 \pm 0.56$  %, para ver disminuido el % de inhibición en los minutos siguientes y observar nuevamente un aumento final de  $26.39 \pm 3.25$  %.

La disminución del porcentaje de inhibición del tratamiento puede asociarse al mismo proceso de hidrólisis, donde en un inicio podrían liberarse péptidos con residuos de aminoácidos con la capacidad de donar electrones, como aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos (Chatsuwan et al., 2018), y posteriormente fuesen hidrolizados por la acción de los iones (reduciendo la actividad de inhibición), y al llegar al min 30 se liberen nuevamente péptidos o compuestos con dicha actividad (Sarmadi & Ismail, 2010).



**Figura 35. Cinética de la inhibición de los radicales ABTS y DPPH del hidrolizado durante la condición seleccionada.** Los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar

#### 7.7.5 Perfil de aminoácidos durante la cinética

Se identificaron y cuantificaron dieciocho aminoácidos tanto en el concentrado proteico como en los hidrolizados a cada uno de los tiempos analizados, los datos se muestran en la **Tabla 15**, divididos a su vez en aminoácidos esenciales (AE) y no esenciales (ANE). Las concentraciones de aminoácidos obtenidas resultan similares a lo reportado por otros autores para esta especie de ortóptero, no obstante, las variaciones en las mismas podrían asociarse a la etapa de crecimiento, alimentación o ecosistema en el que se desarrolla (Melo-Ruíz et al., 2015; Rodríguez-Miranda et al., 2019; Rumpold & Schlüter, 2013). El ácido glutámico, glicina, fenilalanina, glutamina, alanina y leucina fueron los aminoácidos más abundantes en el concentrado proteico. En la **Tabla 15**, se puede observar la

degradación paulatina de todos los AA comenzando con una concentración de  $677.88 \pm 119.54$  mg/g y finalizando con  $336.03 \pm 36.08$  mg/g, una reducción del 51 %. La reducción está estrechamente relacionada con el tiempo de residencia o temperatura del reactor, lo que conlleva a la modificación de sus cadenas laterales o degradación hacia aminas o ácidos orgánicos (Powell et al., 2017; Sato et al., 2004). Los aminoácidos esenciales son los AA que, en conjunto, cuentan con una mayor tasa de degradación. Kang & Chun (2004) reportan que cuanto mayor es el peso molecular de los aminoácidos, mayor sensibilidad térmica, en ellos se puede encontrar AA como la fenilalanina, triptófano, ácido glutámico, metionina, histidina, leucina o la tirosina, pudiendo encontrar en ellos varios AE. El ácido glutámico resulta ser el AA con la mayor tasa de degradación, lo cual podría deberse debido a su papel en la reacción de Maillard a altas temperaturas (Chun et al., 2022), sumado a que los AA hidrofílicos como el ácido aspártico, histidina y lisina, los cuales también tuvieron reducciones relevantes durante el tratamiento, son AA que dado su carácter, tienden a tener mayor interacción con el medio acuoso, lo que conlleva a una mayor disponibilidad para ser hidrolizados o modificados por los iones presentes en el medio (Espinoza et al., 2012).

Se ha reportado que los aminoácidos de menor peso molecular como la glicina y la alanina tienden a ser más termo-resistentes a tratamientos severos de AS, lo que se observa en los resultados debido a que son estos los que presentan menor degradación en el tiempo a diferencia de los aminoácidos de mayor tamaño como la fenilalanina o la histidina (Marcet et al., 2016). Otros autores mencionan que los AA hidrofóbicos tienden a repeler el ambiente acuoso y generalmente se encuentran o se conforman al interior de proteínas, protegidos del contacto directo con el agua en el reactor, encontrado en este grupo a la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina (Abdelmoez & Yoshida, 2013). Si bien los resultados obtenidos muestran una mayor estabilidad térmica de la glicina y alanina durante el tratamiento, no sucede lo mismo con el resto de AA hidrofóbicos, los cuales si se ven disminuidos en el tiempo.

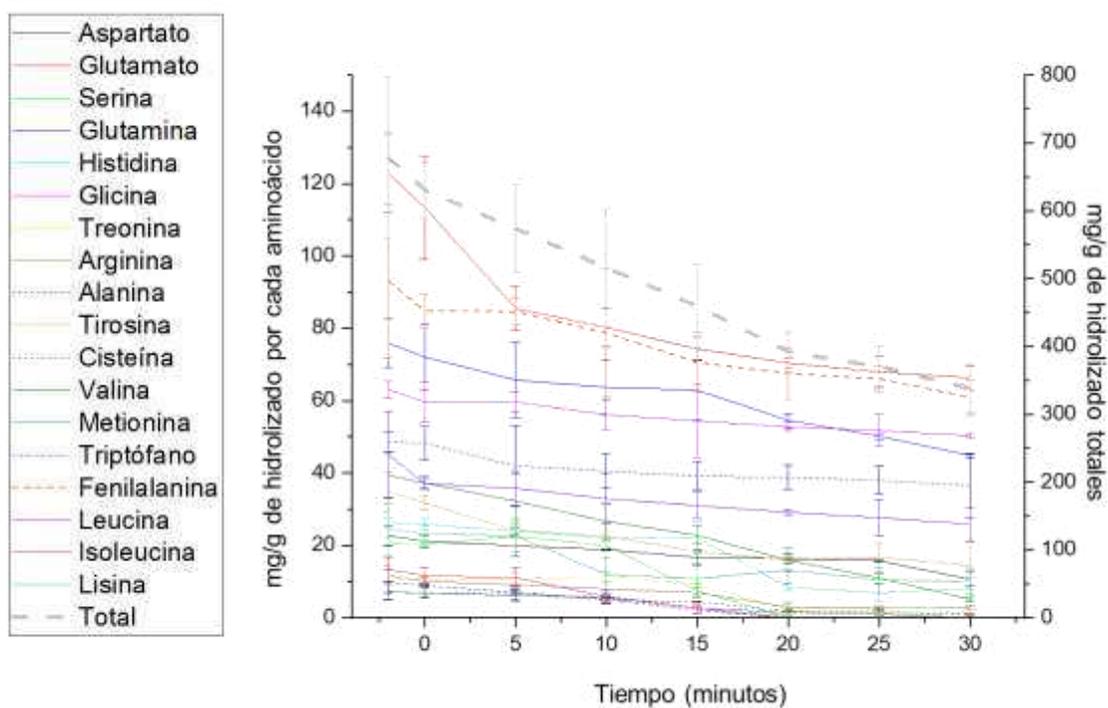
Con apoyo de la **Figura 33** es posible observar de mejor forma las tasas de degradación de los AA en el tiempo, en ella se observa que la concentración total de aminoácidos comienza a disminuir de forma importante una vez alcanzada la condición nominal del tratamiento para luego disminuir a los 20 minutos. Hablando de los AA en específico, son notorias las distintas tasas de degradación, como el ácido glutámico (rojo), el cual presenta una rápida degradación en los primeros instantes y después ver disminuido el ritmo a los 5 minutos, a la glicina (fucsia) la cual presenta un ritmo más estable durante todo el tratamiento, la fenilalanina cuenta con 3 tasas de degradación durante la reacción o la serina (verde) que resulta ser resistente al tratamiento en los primeros minutos de la reacción y después ver una rápida degradación después del minuto 10, por solo mencionar algunos.

**Tabla 15. Concentración de aminoácidos durante la cinética de hidrólisis**

Aminoácidos	Nativo	Minutos						
		0	5	10	15	20	25	30
<b>No esenciales</b>								
Aspartato	22.80±2.79	19.94±3.05	21.13±1.49	18.84±0.23	16.64±1.99	16.38±1.47	15.78±0.35	10.66±1.91
Glutamato	122.79±10.92	113.39±14.24	85.51±6.09	80.21±5.44	74.36±3.27	70.40±1.28	67.97±4.10	63.39±3.27
Serina	20.88±0.97	20.18±0.89	22.53±4.29	19.94±6.78	7.49±2.01	ND	ND	ND
Glutamina	75.91±6.67	72.09±8.97	68.69±10.31	62.51±7.64	60.97±8.36	54.52±1.95	50.17±0.79	44.83±0.62
Glicina	63.08±2.42	60.70±5.44	59.58±2.78	56.13±4.13	54.39±9.96	52.79±1.19	51.80±4.37	50.31±5.61
Arginina	11.74±2.63	10.06±1.01	9.10±0.07	7.97±2.09	7.97±1.12	2.92±1.38	2.80±0.33	2.98±0.54
Alanina	48.49±3.00	48.29±4.56	41.92±11.25	34.71±4.87	39.13±3.83	34.19±3.40	37.98±3.99	36.50±8.70
Tirosina	34.85±5.57	31.68±2.015	24.17±2.03	22.52±1.64	18.39±0.48	15.98 ±0.53	16.73±4.02	14.50±6.88
Cisteína	7.32±2.45	6.69±1.35	6.97±0.51	4.91±0.57	4.41±0.20	1.78±0.24	1.62±0.52	0.00±0.00
Total mg/g	407.90±38.46	383.08±27.07	339.65±32.86	315.75±37.15	285.79±37.26	253.62±11.47	244.88±14.47	223.14±32.05
<b>Esenciales</b>								
Treonina	11.17±4.37	10.58±1.00	10.66±1.91	11.19±2.03	9.21±0.56	2.38±0.18	2.02±0.72	ND
Histidina	26.29±1.50	25.91±1.51	23.85±1.75	22.02±9.20	22.03±4.52	8.43±0.96	6.90±2.38	8.13±2.86
Valina	39.38±6.40	37.23±1.81	32.28±7.39	26.66±4.90	18.15±2.52	15.95±3.21	10.96±1.39	5.11±0.74

Metionina	7.12±2.08	6.90±1.15	6.15±1.81	5.69±0.42	2.65±0.58	1.40±0.46	1.11±0.49	ND
Triptófano	10.00±3.11	8.87±0.38	7.07±1.86	5.07±1.42	2.01±0.74	ND	ND	ND
Fenilalanina	93.03±21.17	84.80±4.55	84.61±3.76	78.68±17.67	70.55±8.22	67.53±7.07	66.02±3.68	63.96±4.95
Leucina	45.18±12.00	37.10±1.28	35.77±4.83	32.90±6.93	30.98±3.58	29.19±0.66	27.61±4.96	25.86±4.75
Isoleucina	13.37±3.38	11.63±2.21	11.02±2.85	5.90±1.99	2.66±0.06	ND	ND	ND
Lisina	24.39±7.02	23.27±1.95	22.70±4.60	11.96±4.48	10.84±3.95	13.23±3.69	10.46±3.54	10.03±3.45
Total mg/g	269.97±61.03	247.27±13.44	234.15±30.01	200.10±49.09	173.78±23.89	138.13±16.38	125.11±17.20	114.29±18.90
<b>mg/g de totales (ANE + AE)</b>	<b>677.88±119.54</b>	<b>630.35±40.52</b>	<b>573.80±63.67</b>	<b>504.67±86.24</b>	<b>459.58±61.16</b>	<b>391.76±29.73</b>	<b>370.67±31.67</b>	<b>336.03±36.08</b>

Los resultados representan los promedios (n=2) ± la desviación estándar en mg/g. ND: No detectado



**Figura 36. Líneas de tendencia de degradación de cada aminoácido y aminoácidos totales durante la cinética de hidrólisis**

## 8. Conclusiones

- *Sphenarium purpurascens* confirma ser una importante fuente de proteínas, así como de lípidos y fibra dietaria, principalmente insoluble.
- La aplicación de ultrasonido por pulsos como método alternativo para la extracción de proteínas en *Sphenarium purpurascens*, parece ser un proceso interesante a explorar.
- La actividad proteolítica de la papaína, como otras enzimas, resulta tener una actividad limitada sobre las proteínas de algunas especies de ortópteros.
- La actividad antioxidante que presenta el hidrolizado obtenido por papaína, ejerce principalmente su acción por la donación de H<sup>+</sup>.
- El uso de modificadores químicos en el proceso de hidrólisis por agua subcrítica mejora la reactividad del medio al aumentar la hidrólisis de proteica de *Sphenarium purpurascens*, mostrando ser un proceso más eficiente que el uso de papaína y de otras enzimas reportadas en la obtención de hidrolizados de concentrados proteicos de otras especies de insectos.
- El efecto de modificadores depende de una interacción triple, ya que, si bien el efecto sobre la GH sigue siendo dependiente de la temperatura, la variación en la concentración del modificador y la presión puede tener efectos diferenciales, permitiendo conseguir resultados similares a aquellos tratamientos a altas temperaturas con o sin modificadores o mayor concentración de los mismos.
- Un tratamiento con bicarbonato de sodio alcanzó el mayor grado de hidrólisis. Mientras que la mejor condición para la eliminación de radicales y las actividades antihipertensivas fue empleando ácido cítrico a 130 °C/20MPa/1M y una menor distribución molecular menor a 30 kDa.
- La mayor proporción de las modificaciones o efectos observados en el hidrolizado se dan durante la rampa de calentamiento, después de llegar al “meta estado” subcrítico existe un punto donde se da ese aumento significativo en las variables respuestas.

- El uso de modificadores, como el ácido cítrico, modifica el perfil de AA, principalmente en los AE. Por lo que resulta importante considerar las diferentes variables a modular como la temperatura, presión y tiempo del tratamiento; las características del material y modificador a emplear en un tratamiento por AS como el tamaño de partícula de la muestra, la cantidad de iones que se agregan por molécula del compuesto, la conformación o distribución en la que se encuentran las proteínas a ser hidrolizadas o el perfil de AA reportado al momento del diseño experimental.
- Se confirma modulación y efectividad que tiene el uso de modificadores en tratamientos con agua subcrítica, en especial el uso de ácido cítrico, tanto para la hidrólisis proteica como la de quitina. Los hidrolizados de *Sphenarium purpurascens* por agua subcrítica pueden utilizarse como una buena fuente de productos o ingredientes bioactivos de alta calidad para la industria agroalimentaria.

Como perspectivas a este trabajo se podría enunciar lo siguiente:

- Escritura de un segundo artículo original derivado de esta investigación.
- Caracterizar la rampa de temperatura/presión a la condición nominal e identificar el punto donde se den los cambios relevantes en las respuestas de interés.
- Caracterización de las proteínas y quitina presentes en esta especie de ortóptero
- Evaluar a una digestión *in-vitro* los hidrolizados y sus actividades biológicas.
- Evaluar las características tecno-funcionales y la reducción en la alergenicidad de la tropomiosina de los hidrolizados.

## 9. Referencias

- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
- Abdelmoez, W., & Yoshida, H. (2013). Production of amino and organic acids from protein using sub-critical water technology. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 11(1), 369–384. <https://doi.org/10.1515/ijcre-2013-0017>
- 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>
- Ahmed, R., & Chun, B. S. (2018). Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen. *Journal of Supercritical Fluids*, 141(October 2017), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.006>
- Alvarez, C., Rendueles, M., & Diaz, M. (2012). The yield of peptides and amino acids following acid hydrolysis of haemoglobin from porcine blood. *Animal Production Science*, 52(5), 313–320. <https://doi.org/10.1071/AN11218>
- Apelblat, A. (2014). Properties of citric acid and its solutions. In *Citric Acid*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-11233-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11233-6_2)
- Arrese, Estela, L., & Soulages, Jose, L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Asaduzzaman, A. K. M., & Chun, B. S. (2013). Recovery of functional materials with

thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolyzates by subcritical water. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 793–802. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1107-7>

Asaduzzaman, A. K. M., Getachew, A. T., Cho, Y. J., Park, J. S., Haq, M., & Chun, B. S. (2020). Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomber japonicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1290–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.104>

Asaduzzaman, A. K. M., Haq, M., & Chun, B. S. (2018). Reduction of histamine and heavy metals in mackerel hydrolyzates produced by catalysts associated-subcritical water hydrolysis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 68, 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.08.001>

Baiano, A. (2020). Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. *Trends in Food Science and Technology*, 100(March 2019), 35–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.040>

Batish, I., Brits, D., Valencia, P., Miyai, C., Rafeeq, S., Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., & Ovissipour, R. (2020). Effects of enzymatic hydrolysis on the functional properties, antioxidant activity, and protein structure of black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein. *Insects*, 11(876), 195–212. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-32952-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-32952-5_13)

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–236.

Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>

- Botella-Martínez, C., Lucas-González, R., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2020). Assessment of chemical composition and antioxidant properties of defatted flours obtained from several edible insects. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/1082013220958854>
- Bourcier, W. L., Stolaroff, J. K., Smith, M. M., & Aines, R. D. (2017). Achieving supercritical fluid CO<sub>2</sub> pressures directly from thermal decomposition of solid sodium bicarbonate. *Energy Procedia*, 114(November 2016), 2545–2551. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.1412>
- Brunner, G. (2009). *The journal of supercritical fluids near critical and supercritical water . Part I: hydrolytic and hydrothermal processes*. 47, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.09.002>
- Bullard, B., & Leonard, K. (1996). Modular proteins of insect muscle. *Advances in Biophysics*, 33, 211–221. [https://doi.org/10.1016/0065-227X\(96\)81676-5](https://doi.org/10.1016/0065-227X(96)81676-5)
- Casadidio, C., Peregrina, D. V., Gigliobianco, M. R., Deng, S., Censi, R., & Di Martino, P. (2019). Chitin and chitosans: Characteristics, eco-friendly processes, and applications in cosmetic science. *Marine Drugs*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060369>
- Cerritos Flores, R., Ponce-Reyes, R., & Rojas-García, F. (2015). Exploiting a pest insect species *Sphenarium purpurascens* for human consumption: Ecological, social, and economic repercussions. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(1), 75–84. <https://doi.org/10.3920/JIFF2014.0013>
- Chakrabarti, S., Guha, S., & Majumder, K. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*, 10(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nu10111738>
- Chatsuwan, N., Nalinanon, S., Puechkamut, Y., Lamsal, B. P., & Pinsirodom, P.

- (2018). Characteristics, functional properties, and antioxidant activities of water-soluble proteins extracted from Grasshoppers, *Patanga succincta* and *Chondracris rosea* brunner. *Journal of Chemistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6528312>
- Cho, Y. J., Getachew, A. T., Park, J. S., Lim, C. T., Lee, H. J., & Chun, B. S. (2020). Influence of temperature on decomposition reaction of compressed hot water to valorize *Achatina fulica* as a functional material. *Food and Bioprocess Technology*, 122, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.03.008>
- Cho, Y. J., Haq, M., Park, J. S., Lee, H. J., & Chun, B. S. (2019). Physicochemical and biofunctional properties of shrimp (*Penaeus japonicus*) hydrolysates obtained from hot-compressed water treatment. *Journal of Supercritical Fluids*, 147(November 2018), 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.11.021>
- Choi, B. D., Wong, N. A. K., & Auh, J.-H. (2017). Defatting and sonication enhances protein extraction from edible insects. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(6), 955–961. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.6.955>
- Chun, B. S., Lee, S. C., Ho, T. C., Micomyiza, J. B., Park, J. S., & Lee, H. J. (2022). Subcritical Water Hydrolysis of Comb Pen Shell (*Atrina pectinata*) Edible Parts to Produce High-Value Amino Acid Products. *Marine Drugs*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/md20060357>
- Cruz, P., & Peniche, C. (2018). La domesticación y crianza de insectos comestibles: una línea de investigación poco explorada y con gran potencial para el desarrollo sostenible y la seguridad alimentaria en México. *Folia Entomológica Mexicana*, 4(2), 66–79. [http://www.folia.socmexent.org/revista/Num\\_2018\\_2/FEM\\_4\(2\)\\_66-79\\_2018.pdf](http://www.folia.socmexent.org/revista/Num_2018_2/FEM_4(2)_66-79_2018.pdf)
- 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>

Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20(7), 1637–1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)

Daneshfar, A., Baghlani, M., Sarabi, R. S., Sahraei, R., Abassi, S., Kaviyan, H., & Khezeli, T. (2012). Solubility of citric, malonic, and malic acids in different solvents from 303.2 to 333.2K. *Fluid Phase Equilibria*, 313(November 2017), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.09.033>

Davalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48–54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>

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>

de Matos, F. M., Novelli, P. K., & de Castro, R. J. S. (2021). Enzymatic hydrolysis of black cricket (*Gryllus assimilis*) proteins positively affects their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 86(2), 571–578. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15576>

Di Domenico Ziero, H., Buller, L. S., Mudhoo, A., Ampese, L. C., Mussatto, S. I., & Carneiro, T. F. (2020). An overview of subcritical and supercritical water treatment of different biomasses for protein and amino acids production and

- recovery. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5).  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104406>
- Di Mattia, C., Battista, N., Sacchetti, G., & Serafini, M. (2019). Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates. *Frontiers in Nutrition*, 6(July), 1–7.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00106>
- Dion-Poulin, A., Laroche, M., Doyen, A., & Turgeon, S. L. (2020). Functionality of cricket and mealworm hydrolysates generated after pretreatment of meals with high hydrostatic pressures. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22).  
<https://doi.org/10.3390/molecules25225366>
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Singh, T. K., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17(11), 1321–1331. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.02.009>
- Esfandi, R., Walters, M. E., & Tsopmo, A. (2019). Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon*, 5(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01538>
- Espinoza, A. D., & Morawicki, R. O. (2012). Effect of additives on subcritical water hydrolysis of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(20), 5250–5256. <https://doi.org/10.1021/jf300581r>
- Espinoza, A. D., Morawicki, R. O., & Hager, T. (2012). Hydrolysis of whey protein isolate using subcritical water. *Journal of Food Science*, 77(1), 20–26. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02462.x>
- Fan, X., Hu, S., Wang, K., Yang, R., & Zhang, X. (2020). Coupling of ultrasound and subcritical water for peptides production from *Spirulina platensis*. *Food and Bioprocess Processing*, 121, 105–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.012>

- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187–197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- Flores, D. R., Casados, L. E., Velasco, S. F., Ramírez, A. C., & Velázquez, G. (2020). Comparative study of composition, antioxidant and antimicrobial activity of two adult edible insects from Tenebrionidae family. *BMC Chemistry*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00707-0>
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Gbashi, S., Adebo, O. A., Piater, L., Madala, N. E., & Njobeh, P. B. (2017). Subcritical water extraction of biological materials. *Separation and Purification Reviews*, 46(1), 21–34. <https://doi.org/10.1080/15422119.2016.1170035>
- Gunner, M. R., Mao, J., Song, Y., & Kim, J. (2006). Factors influencing the energetics of electron and proton transfers in proteins. What can be learned from calculations. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(8), 942–968. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.005>
- Gunnerud, U. J., Heinzle, C., Holst, J. J., Östman, E. M., & Björck, I. M. E. (2012). Effects of Pre-Meal Drinks with Protein and Amino Acids on Glycemic and Metabolic Responses at a Subsequent Composite Meal. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044731>
- Hall, F. G., Jones, O. G., O’Haire, M. E., & Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein hydrolysates. In *Food Chemistry* (Vol. 224). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.138>
- Hall, F., & Liceaga, A. (2020). Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and

- tropomyosin-IgG binding. *Journal of Functional Foods*, 64(October), 103634.  
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103634>
- Haq, M., Ho, T. C., Ahmed, R., Getachew, A. T., Cho, Y. J., Park, J. S., & Chun, B. S. (2020). Biofunctional properties of bacterial collagenolytic protease-extracted collagen hydrolysates obtained using catalysts-assisted subcritical water hydrolysis. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 81, 332–339.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.09.023>
- Henriques, B. S., Garcia, E. S., Azambuja, P., & Genta, F. A. (2020). Determination of Chitin Content in Insects: An Alternate Method Based on Calcofluor Staining. *Frontiers in Physiology*, 11(February), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00117>
- Ho, T.-L., Fieser, M., & Fieser, L. (2009). Sodium carbonate. *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*.  
<https://doi.org/10.1002/9780471264194.fos09109.pub2>
- Hou, J., Aydemir, B. E., & Dumanli, A. G. (2021). Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 379(2206).  
<https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0331>
- Huis, A. Van. (2013). Edible insects. Future prospects for food and feed security. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 171).
- Imathiu, S. (2020). Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal*, 18(November 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, 126022.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126022>

Jeong, Y. R., Park, J. S., Nkurunziza, D., Cho, Y. J., & Chun, B. S. (2021). Valorization of blue mussel for the recovery of free amino acids rich products by subcritical water hydrolysis. *Journal of Supercritical Fluids*, 169(December), 105135. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105135>

Kang, K., & Chun, B. (2004). Behavior of hydrothermal decomposition of silk fibroin to amino acids in near-critical water. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 21(3), 654–659. <https://doi.org/doi:10.1007/bf02705501>

Kang, K. Y., & Chun, B. S. (2004). Behavior of hydrothermal decomposition of silk fibroin to amino acids in near-critical water. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 21(3), 654–659. <https://doi.org/10.1007/BF02705501>

Kanost, M. R., & Clem, R. J. (2012). Insect Proteases. In *Insect molecular biology and biochemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10010-8>

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

Kim, W. J., Kim, J., Veriansyah, B., Kim, J. D., Lee, Y. W., Oh, S. G., & Tjandrawinata, R. R. (2009). Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 48(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.11.007>

- Koh, B. B., Lee, E. J., Ramachandraiah, K., & Hong, G. P. (2019). Characterization of bovine serum albumin hydrolysates prepared by subcritical water processing. *Food Chemistry*, 278(July 2018), 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.069>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2007). Bioactive peptides from food proteins. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food products manufacturing—Health, meat, milk, poultry, seafood, and vegetables*. (2nd ed., pp. 5–37).
- 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>
- Lamp, A., Kaltschmitt, M., & Lüdtke, O. (2020). Protein recovery from bioethanol stillage by liquid hot water treatment. *Journal of Supercritical Fluids*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104624>
- Lee, S., Hao, L. T., Park, J., Oh, D. X., & Hwang, D. S. (2023). Nanochitin and Nanochitosan: Chitin Nanostructure Engineering with Multiscale Properties for Biomedical and Environmental Applications. *Advanced Materials*, 35(4). <https://doi.org/10.1002/adma.202203325>
- Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., & Ding, C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5681–5690. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1693-z>
- Liao, X., Zhu, Z., Wu, S., Chen, M., Huang, R., Wang, J., Wu, Q., & Ding, Y. (2020). Preparation of antioxidant protein hydrolysates from *Pleurotus geesteranus* and their protective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damaged PC12 Cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(22). <https://doi.org/10.3390/molecules25225408>
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In *En Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista*

*Investigación y Ciencia* (1st ed., pp. 129–162). Corporación Universitaria Lasallista.

- Mahmoudkhani, M., & Keith, D. W. (2009). Low-energy sodium hydroxide recovery for CO<sub>2</sub> capture from atmospheric air-thermodynamic analysis. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 3(4), 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2009.02.003>
- Marcet, I., Álvarez, C., Paredes, B., & Díaz, M. (2014). Inert and oxidative subcritical water hydrolysis of insoluble egg yolk granular protein, functional properties, and comparison to enzymatic hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32), 8179–8186. <https://doi.org/10.1021/jf405575c>
- Marcet, I., Álvarez, C., Paredes, B., & Díaz, M. (2016). The use of sub-critical water hydrolysis for the recovery of peptides and free amino acids from food processing wastes. Review of sources and main parameters. *Waste Management*, 49, 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.009>
- Marcus, Y. (2018). Extraction by subcritical and supercritical water, methanol, ethanol and their mixtures. *Separations*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/separations5010004>
- Melgosa, R., Trigueros, E., Sanz, M. T., Cardeira, M., Rodrigues, L., Fernández, N., Matias, A. A., Bronze, M. R., Marques, M., Paiva, A., & Simões, P. (2020). Supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical water technologies for the production of bioactive extracts from sardine (*Sardina pilchardus*) waste. *Journal of Supercritical Fluids*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104943>
- Melo-Ruíz, V., Quirino-Barreda, T., García-Núñez, M., Díaz-García, R., Sánchez-Herrera, K., & Schettino-Bermudez, B. (2015). Grasshoppers *Sphenarium purpurascens* Ch source of proteins and essential amino acids. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 9(7). <https://doi.org/10.17265/1934-7375/2015.07.008>

- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393–4412. <https://doi.org/10.1242/jeb.00709>
- 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>
- Möller, M., Nilges, P., Harnisch, F., & Schröder, U. (2011). Subcritical water as reaction environment: Fundamentals of hydrothermal biomass transformation. *ChemSusChem*, 4(5), 566–579. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000341>
- Mutamimah, D., Ibrahim, B., & Trilaksani, W. (2018). Antioxidant activity of protein hydrolysate from tuna eye (*Thunnus* sp.) by enzymatic hydrolysis. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(3), 522. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i3.24736>
- Muthukrishnan, S., Mun, S., Young Noh, M., Gelabrecht, E. R., & Arakane, Y. (2020). Insect cuticular chitin contributes to form and function. *Current Pharmaceutical Design*, 26(29), 3530–3545. <https://doi.org/doi:10.2174/1381612826666200523175409>
- Nemdili, L., Koutchoukali, O., Bouhelassa, M., Seidel, J., Mameri, F., & Ulrich, J. (2016). Crystallization kinetics of citric acid anhydrate. *Journal of Crystal Growth*, 451(July), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.07.008>
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS+ assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674. <https://doi.org/10.1021/jf0400056>

- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*(5), 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nijdam, D., Rood, T., & Westhoek, H. (2012). The price of protein: Review of land use and carbon footprints from life cycle assessments of animal food products and their substitutes. *Food Policy*, *37*(6), 760–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.08.002>
- Noman, A., Xu, Y., AL-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, *67*(September 2017), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *43*, 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.014>
- Paoletti, M. G. (2005). Insects in the human diet: Nutritional aspects. In S. Bukkems (Ed.), *Ecological Implications of Minilivestock* (1st ed., pp. 545–577).
- Park, J. S., Jeong, Y. R., & Chun, B. S. (2019). Physiological activities and bioactive compound from laver (*Pyropia yezoensis*) hydrolysates by using subcritical water hydrolysis. *Journal of Supercritical Fluids*, *148*(March), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.03.004>
- Porto, C. Da, Decorti, D., & Natolino, A. (2014). *The journal of supercritical fluids water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc : A comparison and a proposal*. *87*, 1–3.

- Powell, T., Bowra, S., & Cooper, H. J. (2016). Subcritical water processing of proteins: An alternative to enzymatic digestion? *Analytical Chemistry*, *88*(12), 6425–6432. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01013>
- Powell, T., Bowra, S., & Cooper, H. J. (2017). Subcritical water hydrolysis of peptides: Amino acid side-chain modifications. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *28*(9), 1775–1786. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1676-1>
- Price, G. M. (1973). Protein and nucleic acid metabolism in insect fat body. *Biological Reviews*, *48*(3), 333–372. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1973.tb01006.x>
- Purschke, B., Meinlschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., & Jäger, H. (2018). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, *244*(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3017-9>
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, *1*(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Raabe, D., Sachs, C., & Romano, P. (2005). The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia*, *53*, 4281–4292. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2005.05.027>
- Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M., & Rafieia-Kopai, M. (2019). Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *55*, 1–10. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000218304>
- Ramos-Elorduy, J. (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>

Rodríguez-Miranda, J., Alcántar-Vázquez, J. P., Zúñiga-Marroquín, T., & Juárez-Barrientos, J. M. (2019). Insects as an alternative source of protein: a review of the potential use of grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.) as a food ingredient. *European Food Research and Technology*, 245(12), 2613–2620. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03383-0>

Rogalinski, T., Liu, K., Albrecht, T., & Brunner, G. (2008a). Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water. 46, 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.09.037>

Rogalinski, T., Liu, K., Albrecht, T., & Brunner, G. (2008b). Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 46(3), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.09.037>

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>

Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>

Sato, N., Quitain, A. T., Kang, K., Daimon, H., & Fujie, K. (2004). Reaction kinetics of amino acid decomposition in high-temperature and high-pressure water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43(13), 3217–3222. <https://doi.org/10.1021/ie020733n>

Sereewatthanawut, I., Prapintip, S., Watchirarujji, K., Goto, M., Sasaki, M., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99(3), 555–561.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.030>

- Sousa, P., Borges, S., & Pintado, M. (2020). Enzymatic hydrolysis of insect: *Alphitobius diaperinus* towards the development of bioactive peptide hydrolysates. *Food and Function*, *11*(4), 3539–3548. <https://doi.org/10.1039/d0fo00188k>
- Srinivas, K., & King, J. W. (2010). Supercritical carbon dioxide and subcritical water: Complementary agents in the processing of functional foods. In *Functional Food Product Development*. <https://doi.org/10.1002/9781444323351.ch3>
- Sunphorka, S., Chavasiri, W., Oshima, Y., & Ngamprasertsith, S. (2012). Kinetic studies on rice bran protein hydrolysis in subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, *65*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.02.017>
- Sviben, S., Spaeker, O., Bennet, M., Albéric, M., Dirks, J.-H., Moussian, B., Fratzl, P., Bertinetti, L., & Politi, Y. (2020). Epidermal cell surface structure and chitin–protein co-assembly determine fiber architecture in the locust cuticle. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*, 25581–25590. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c04572>
- Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., van Valenberg, H. J. F., van Boekel, M. A. J. S., & Lakemond, C. M. M. (2014). Insect lipid profile: Aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, *62*(August), 1087–1094. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.052>
- Vardanega, R., Nathia-Nevez, G., Veggi, P. C., & Meireles, M. A. (2019). *Supercritical fluid processing and extraction of food. Green food processing techniques: preservation, transformation and extraction* (Avignon University (ed.); 1st ed.).
- Waldeck, W., Lynn, G., & Hill, A. (1932). Aqueous solubility of salts at high temperatures. Solubility of sodium carbonate from 50 to 348°. *Journal of*

*American Chemistry Society*, 54(3), 928–936.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ja01342a012>

Wang, J., Wang, Y., Dang, X., Zheng, X., & Zhang, W. (2013). Housefly larvae hydrolysate: Orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition, and functional properties. *BMC Research Notes*, 6(1), 197. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-197>

Watchararuj, K., Goto, M., Sasaki, M., & Shotipruk, A. (2008). Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology*, 99(14), 6207–6213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.021>

Wiboonsirikul, J., & Adachi, S. (2008). Extraction of functional substances from agricultural products or by-products by subcritical water treatment. *Food Science and Technology Research*, 14(4), 319–328. <https://doi.org/10.3136/fstr.14.319>

Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44(0), 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>

Wu, D., Tu, M., Wang, Z., Wu, C., Yu, C., Battino, M., El-Seedi, H. R., & Du, M. (2020). Biological and conventional food processing modifications on food proteins: Structure, functionality, and bioactivity. In *Biotechnology Advances* (Vol. 40). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107491>

Xiaoming, C., Ying, F., & Hong, Z. (2010). Review of the nutritive value of edible insects. Edible insects and other invertebrates in Australia: future prospects. *Proceedings of a Workshop on Asia-Pacific Resources and Their Potential for Development*, 89–92.

Yang, W., Wang, H., Zhou, J., & Wu, S. (2018). Hydrolysis kinetics and mechanism

- of chitin in subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 135, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.01.029>
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., & Ricketts, R. E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *The Analyst*, 80(948), 209–214. <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>
- 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>
- Yoon, S., Wong, N. A. K., Chae, M., & Auh, J.-H. (2019a). Comparative characterization of protein hydrolysates from three edible insects: mealworm larvae, adult crickets, and silkworm pupae. *Foods*, 8, 563. <https://doi.org/doi:10.3390/foods8110563>
- Yoon, S., Wong, N. A. K., Chae, M., & Auh, J. H. (2019b). Comparative characterization of protein hydrolysates from three edible insects: Mealworm larvae, adult crickets, and silkworm pupae. *Foods*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/foods8110563>
- Zanutto-Elgui, M. R., Vieira, J. C. S., Prado, D. Z. do, Buzalaf, M. A. R., Padilha, P. de M., Elgui de Oliveira, D., & Fleuri, L. F. (2019). Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*, 278, 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.119>
- Zhang, J., Wen, C., Chen, M., Gu, J., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). Antioxidant activities of *Sagittaria sagittifolia* L. polysaccharides with subcritical water extraction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.047>
- Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Recent advances in the

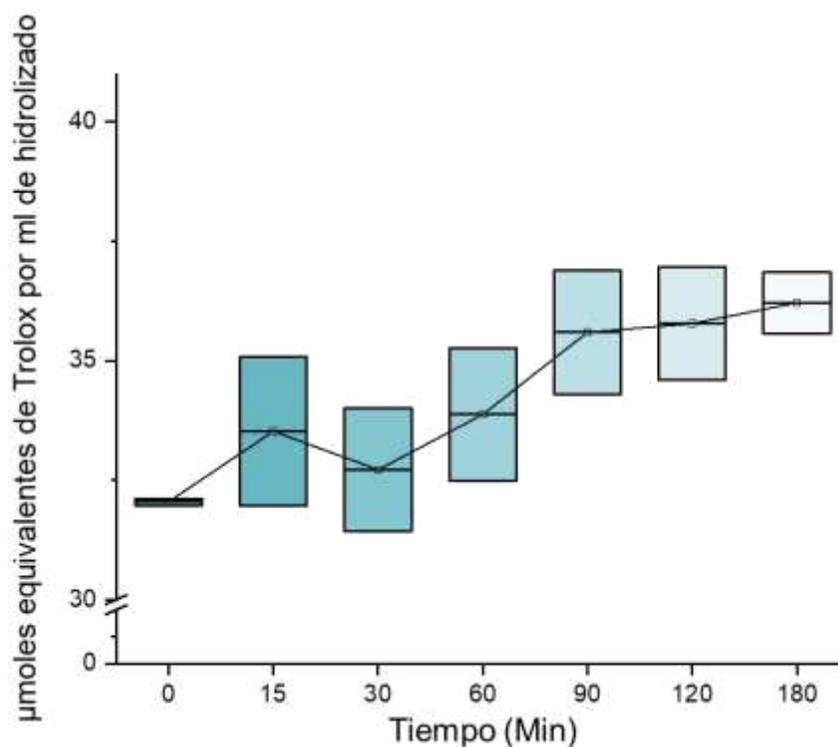
- extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 95(November 2019), 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>
- Zhong, Q., & Jin, M. (2008). Enhanced functionalities of whey proteins treated with supercritical carbon dioxide. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 490–499. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0663>
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., & Wan, X. (2011). Kinetics of amino acid production from bean dregs by hydrolysis in sub-critical water. *Amino Acids*, 40(4), 1107–1113. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0734-9>
- Zhu, X., Zhu, C., Zhao, L., & Cheng, H. (2008). Amino acids production from fish proteins hydrolysis in subcritical water. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(3), 456–460. [https://doi.org/10.1016/s1004-9541\(08\)60105-6](https://doi.org/10.1016/s1004-9541(08)60105-6)
- Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients*, 9(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu9090970>
- Zielińska, E., Karaś, M., & Baraniak, B. (2018). Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT - Food Science and Technology*, 91(February), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.058>

## **Anexos**

## **Discusión a detalle de la actividad antioxidante durante la cinética de hidrólisis por papaína**

La actividad antioxidante de los hidrolizados o péptidos bioactivos puede llevarse a cabo a través de distintos mecanismos, por ello se evaluaron diferentes metodologías (ORAC, ABTS y DPPH) para su evaluación.

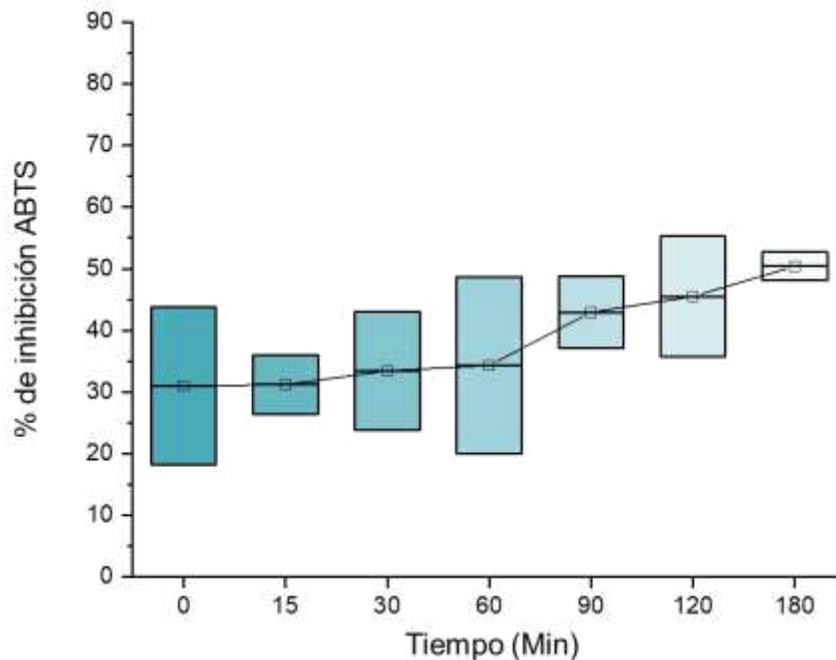
En la **Figura A.1** se presenta la actividad antioxidante evaluada por el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) en los diferentes tiempos. De forma inicial, al tiempo 0, se observó una equivalencia de  $\mu\text{moles}$  de Trolox/ml de muestra de  $32.04 \pm 0.10$  que puede asociarse a los compuestos antioxidantes naturales presentes en los insectos (Felton & Summers, 1995), y que con el proceso de hidrólisis se exponen péptidos con aminoácidos capaces de donar  $\text{H}^+$  como tirosina, triptófano, glicina, glutamato o histidina (Esfandi et al., 2019), aumentando así, hasta alcanzar  $36.21 \pm 1.12$   $\mu\text{moles}$  equivalentes de Trolox (ET) a los 180 min. Esto último puede verse contrastado con el aumento en el grado de hidrólisis alcanzado desde los 90 min y el aumento en la intensidad de bandas menores a 25 kDa, pues es a partir de este tiempo donde las ET comienzan a diferenciarse de los tiempos anteriores. Las equivalencias obtenidas fueron similares a las generadas por péptidos bioactivos de leche empleando proteasas fúngicas con ET entre 29.8 a 52.5  $\mu\text{moles}$  (Zanutto-Elgui et al., 2019). Sin embargo, comparado con otros tratamientos enzimáticos y fuentes proteicas, el aumento en esta actividad fue reducido, constandingo las limitaciones proteolíticas de la enzima (Liao et al., 2020; Sousa et al., 2020)



**Figura A1. Actividad antioxidante por ORAC. Los resultados representan los promedios de las concentraciones equivalentes de Trolox por ml de muestra (n=3)  $\pm$  la DE.**

La actividad antioxidante evaluando la inhibición del radical ABTS de las muestras se muestra en la **Figura A2**. Al tiempo 0, el porcentaje de inhibición del radical fue de  $30.98 \pm 18.05$  %, porcentaje que con el paso del tiempo fue en aumento, observando al minuto 90, un incremento poco más diferenciado en la actividad antioxidante lo que podría indicar la liberación de péptidos antioxidantes de sus proteínas parentales (Chakrabarti et al., 2018), péptidos que podrían correlacionarse, nuevamente, con el aumento de la intensidad de las bandas en el gel de electroforesis y el grado de hidrólisis alcanzado a este tiempo. Al final de la hidrólisis, transcurridos los 180 min se alcanzó la IC50 (IC50 se define como la concentración de inhibidor necesaria para inhibir el 50% de actividad del radical) con una concentración de  $15.5 \mu\text{g/ml}$ , este aumento puede asociarse al aumento tanto de péptidos con aminoácidos con la capacidad de donación de  $\text{H}^+$ , aumento también visto en la evaluación por ORAC, como de aminoácidos hidrofóbicos con

capacidad de donar electrones (Botella-Martínez et al., 2020; Sarmadi & Ismail, 2010). La concentración para la IC50 obtenida resulto similar a la de la langosta del desierto *Schistocerca gregaria* después de una hidrólisis gastrointestinal, la cual presentó una IC50 con 16.6 µg/ml, sin embargo, comparado con la concentración de otro insecto *Tenebrio molitor* con 5.3 µg/ml (Zielińska et al., 2017), esta diferencia podría estar relacionada a las limitaciones de algunas enzimas proteolíticas para hidrolizar las fracciones proteicas de algunos ortópteros, como *Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria* o *Sphenarium purpurascens*, aunque no hay información suficiente referente a la hidrólisis de proteínas de insectos y aun menos en ortópteros que pueda constatar esto (Purschke et al., 2018).



**Figura A2. Actividad de inhibición del radical ABTS. Los resultados representan los promedios del % de inhibición del radical (n=3) ± la DE.**

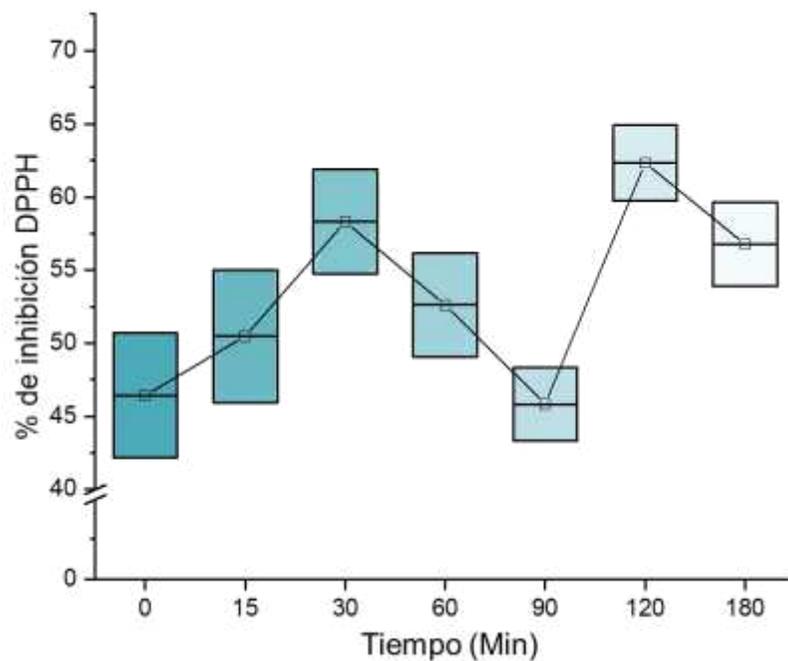
En la **Figura A3** se muestra la actividad antioxidante en la inhibición del radical DPPH. En la evaluación de esta actividad, además de los incrementos y

descensos a lo largo del proceso de hidrólisis, la concentración para alcanzar la IC50 fue elevada. A tiempo 0, el % de inhibición fue de  $46.43 \pm 6.03$ , alcanzando la IC50 a los 15 min con una concentración de 1.73 mg/ml pero una mayor actividad de inhibición a los 30 min con 1.93 mg/ml, sin embargo, después de 30 minutos de reacción, se observa un decremento notable en la inhibición del radical hasta los 90 min, y para posteriormente incrementarse nuevamente hasta alcanzar su mayor inhibición ( $62.33 \pm 4.47$  %) a los 120 min.

La IC50 en este caso tuvo una concentración notablemente mayor que los hidrolizados obtenidos con otros insectos, como 28.5  $\mu\text{g/ml}$  para un hidrolizado de *Schistocerca gregaria* (Zielińska et al., 2017) o de la fracción de proteínas solubles de *Chondracris rosea* con una IC50 a concentraciones de 176.31  $\mu\text{g/ml}$  (Chatsuwan et al., 2018), sin embargo, respecto los hidrolizados en específico de la papaína, reportes indican en algunos casos IC50 con concentraciones altas como 3.85 mg/ml en un hidrolizado de *Camellia oleifera* (Li et al., 2015) y 1.08 mg/ml para un hidrolizado de atún (*Thunus* sp.) (Mutamimah et al., 2018).

La variación del porcentaje de inhibición en el tiempo puede asociarse al mismo proceso de hidrólisis, donde en un inicio podrían liberarse debido a la hidrólisis de enlaces más susceptibles, péptidos con residuos de aminoácidos con la capacidad de donar electrones, como aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos (Chatsuwan et al., 2018) y posteriormente fuesen hidrolizados por la acción de la enzima (reduciendo la actividad de inhibición), y al transcurrir 90 minutos de reacción se liberasen nuevamente péptidos con dicha actividad.

Mientras que la diferencia de las actividades en la inhibición del radical entre hidrolizados de otras fuentes proteicas o en el uso de enzimas, puede atribuirse a la composición de aminoácidos, la distribución molecular, sus estructuras y a la secuencia peptídica (Sarmadi & Ismail, 2010).



**Figura A3. Actividad de inhibición del radical DPPH. Los resultados representan los promedios del % de inhibición del radical (n=3)  $\pm$  la DE.**