

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

ESCUELA DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, ALIMENTOS Y AMBIENTAL



Análisis de las propiedades tecnofuncionales y bioactivas de la harina de *Arsenura armida* y de sus extractos proteínicos

Tesis que, en cumplimiento parcial de los requisitos para obtener el grado de Doctora en Ciencia de Alimentos, es presentada por

M.C. Sheila Cortazar Moya

Asesor:

Dr. Jocksan Ismael Morales Camacho

Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla

Carta de Validación del Comité Tutorial



ACTA DE REVISIÓN Y AUTORIZACIÓN DE TESIS

ESCUELA DE INGENIERÍA
Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental
Doctorado en Ciencia de Alimentos

Nombre del estudiante: Sheila Cortazar Moya.

ID: 168733.

Nombre del director de tesis: Dr. Jocksan I. Morales Camacho.

Título de la tesis: Análisis de las propiedades tecnofuncionales y bioactivas de la harina de *Arsenura armida* y de sus extractos proteínicos.

Integrantes del Comité Doctoral	Firma
Dra. María Teresa Jiménez Munguía	
Dr. Aurelio López Malo Vigil	
Dr. Jocksan I. Morales Camacho	
Dra. Silvia Luna Suárez	
Dra. Emma Mani López	

Los integrantes del Comité Doctoral expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de Doctorado en Ciencia de Alimentos anteriormente descrita, por lo que estamos de acuerdo en que se proceda a generar la versión definitiva de la tesis y programar el examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.

Fecha y hora de examen: 13 de mayo del 2024 09:00 hrs.

Lugar: Puebla, Pue.

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por la oportunidad de alcanzar otro peldaño más en mi vida profesional con salud y rodeada de mi familia y amigos. A mis padres Norma y Arturo, por estar conmigo, por su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos en esta travesía que emprendí cinco años atrás. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades, gracias por darme alas fuertes y acompañarme en cada paso de mi vida. Los amo.

A mi hermanita Luz, gracias por siempre escucharme y tener una palabra de aliento para reconfortarme, gracias por recordarme cada vez que lo necesité, que soy más resiliente de lo que a veces creo. Te amo.

A Daniel, por estar conmigo y apoyarme incondicionalmente, por ser mi punto de apoyo cuando me faltaban las fuerzas.

A mi asesor el Dr. Jocksan, por depositar su confianza en mí para la elaboración de este proyecto, por su apoyo e inestimable ayuda y paciencia desde mis primeros pasos por el laboratorio. Muchas gracias.

Al Dr. Aurelio, gracias por adoptarme en su laboratorio, por dedicarme tiempo valioso a enseñarme que con paciencia y perseverancia todas las metas son alcanzables. Mil gracias.

A todos mis profesores, gracias a cada uno por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí.

Gracias a mis compañeros Chris, Rich y Vic, ustedes hicieron de esta travesía una experiencia divertida. Mucho éxito a cada uno de ustedes.

Finalmente, pero no menos importante mi agradecimiento a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) y al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme el apoyo financiero para mis estudios de Doctorado.

Índice

Carta de validación del Comité tutorial.....	2
Agradecimientos.....	3
Índice de tablas.....	8
Índice de figuras.....	10
Esquema de la tesis.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	16
1. Introducción	18
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. Artículos de investigación.....	20
3.1 Composición nutricional y propiedades tecnofuncionales de la harina desgrasada y no desgrasada del insecto comestible <i>Arsenura armida</i>	20
<i>Resumen</i>	20
3.1.1 Introducción.....	20
3.1.2 Materiales y Métodos.....	22
3.1.2.1 Procesamiento de la harina de <i>Arsenura armida</i>	22
3.1.2.2 Composición proximal.....	24
3.1.2.3 Perfil de proteínas (SDS-PAGE).....	25
3.1.2.4 Perfil mineral.....	25
3.1.2.5 Propiedades físicas.....	26
3.1.2.5.1 Determinación de color e índice de oscurecimiento.....	26
3.1.2.5.2 Tamaño de partícula, densidad compactada y aparente, índice de compresibilidad (IC), relación de Hausner (RH).....	26
3.1.2.6 Propiedades tecnofuncionales.....	28
3.1.2.6.1 Capacidad de retención de agua y aceite y calor específico.....	28
3.1.2.6.2 Viscosidad.....	28
3.1.2.6.3 Capacidad de formación de espuma y estabilidad de la espuma.....	29
3.1.2.6.4 Capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión.....	29

3.1.2.7	Análisis estadístico.....	30
3.1.3	Resultados y discusión.....	30
3.1.3.1	Composición proximal.....	30
3.1.3.2	Perfil de proteína (SDS-PAGE)	32
3.1.3.3	Propiedades físicas.....	32
3.1.3.4	Propiedades tecnofuncionales.....	34
3.1.3.4.1	Capacidad de retención de agua y aceite y calor específico.....	34
3.1.3.4.2	Viscosidad.....	34
3.1.3.4.3	Capacidad y estabilidad de la espuma y emulsión	34
3.1.4	Discusión.....	35
3.1.4.1	Composición proximal.....	35
3.1.4.2	Perfil de proteína (SDS-PAGE)	37
3.1.4.3	Propiedades físicas.....	38
3.1.4.4	Propiedades tecnofuncionales.....	38
3.1.4.4.1	Capacidad de retención de agua y aceite y calor específico.....	38
3.1.4.4.2	Viscosidad.....	41
3.1.4.4.3	Capacidad y estabilidad de la espuma y emulsión	41
3.1.5	Conclusión.....	42
3.1.6	Referencias.....	43
3.2	Aislamiento de mezclas de péptidos con potencial bioactivo a partir del hidrolizado de proteínas de las larvas de <i>Arsenura armida</i>	49
	<i>Resumen</i>	49
3.2.1	Introducción.....	50
3.2.2	Materiales y Métodos	52
3.2.2.1	Aislamiento de la proteína de la harina de <i>A. armida</i>	52
3.2.2.2	Digestión de la proteína.....	53
3.2.2.3	Actividad antioxidante.....	54
3.2.2.4.3.1	DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y determinación de IC ₅₀	54
3.2.2.4.3.2	ABTS (2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)).....	55
3.2.2.4.3.3	Ensayo <i>In vivo</i> con <i>Caenorhabditis elegans</i>	56

3.2.2.4 Ensayo antimicrobiano.....	58
3.2.2.4.1 Cepas bacterianas, medio de cultivo, condiciones de crecimiento, péptidos.....	58
3.2.2.4.2 Método por difusión en pocillo.....	58
3.2.2.4.3 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)	59
3.2.2.5 Identificación de péptidos.....	59
3.2.2.6 Análisis estadístico.....	60
3.2.3 Resultados y discusión.....	61
3.2.3.1 Digestión de la proteína.....	61
3.2.3.2 Actividad antioxidante	62
3.2.3.2.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), determinación de IC ₅₀ y ABTS (2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))	62
3.2.3.2.2 Ensayo <i>In vivo</i> con <i>Caenorhabditis elegans</i>	65
3.2.3.3 Ensayo antimicrobiano, concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)	67
3.2.3.4 Identificación de péptidos bioactivos.....	71
3.2.4 Conclusiones.....	74
3.2.5 Referencias.....	75
3.3 Explorando el potencial tecnofuncional de la harina de insectos en la formulación de pan de trigo: un estudio comparativo con harinas de <i>Arsenura armida</i> y <i>Acheta domesticus</i>	81
<i>Resumen</i>	81
3.3.1 Introducción.....	82
3.3.2 Materiales y métodos.....	83
3.3.2.1 Elaboración del pan.....	83
3.3.2.2 Determinación de las propiedades de calidad del pan.....	84
3.3.2.3 Evaluación sensorial de los panes.....	86
3.3.2.4 Análisis estadístico.....	87
3.3.3 Resultados y discusión.....	87
3.3.3.1 Propiedades de calidad del pan.....	87

3.3.3.2 Evaluación sensorial de los panes.....	96
3.3.4 Conclusiones.....	99
3.3.5 Referencias.....	100
4. Conclusiones y recomendaciones	104
5. Evidencias de productos.....	106
6. Anexos (materiales suplementarios)	115

Índice de tablas

Tabla 1. Composición proximal de la harina completa y desgrasada de <i>Arsenura armida</i> ..	31
Tabla 2. Contenido de minerales de la harina de <i>Arsenura armida</i>	31
Tabla 3. Características físicas y propiedades tecnofuncionales de la harina completa (HC) y harina desgrasada (HD) de <i>Arsenura armida</i>	33
Tabla 4. Viscosidad de las harinas de <i>A. armida</i> a tres velocidades diferentes y propiedades de formación de espuma y emulsión a diferentes concentraciones de harina.....	40
Tabla 5. Condiciones probadas y muestras obtenidas de la digestión con pepsina de proteínas extraídas de la harina de <i>A. armida</i>	53
Tabla 6. Efectos de los péptidos de <i>A. armida</i> en la esperanza de vida y porcentaje de sobrevivientes de <i>C. elegans</i> bajo estrés oxidativo inducido con 400 μ M de juglona.....	67
Tabla 7. Actividad antimicrobiana de los péptidos de la harina de <i>A. armida</i>	70
Tabla 8. Diámetro (mm) de las zonas de inhibición generadas por los péptidos obtenidos de la digestión de la harina de <i>A. armida</i> contra los microorganismos indicadores que mostraron sensibilidad en la prueba de screening.....	70
Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de la muestra A4.	71
Tabla 10. Formulaciones de pan probadas utilizando harina de <i>Acheta domesticus</i> y <i>Arsenura armida</i> de acuerdo al diseño factorial 2^3	84
Tabla 11. Propiedades de calidad de los panes con harina de <i>A. armida</i>	90
Tabla 12. Propiedades de calidad de los panes con harina de <i>A. domesticus</i>	91

Tabla 13. Puntajes promedio de la evaluación sensorial de las rebanadas de pan adicionadas con harina de <i>A. armida</i> (jueces no entrenados).	96
Tabla 14. Puntajes promedio de la evaluación sensorial de las rebanadas de pan adicionadas con harina de <i>A. domesticus</i> (jueces no entrenados).....	97
Tabla 15. Porcentaje de los ingredientes del pan de acuerdo a la optimización para maximizar sabor y aceptabilidad general.....	98
Tabla 16. Valores predichos y experimentales de las propiedades de calidad, sabor y aceptabilidad general del pan elaborado con la fórmula optimizada.....	98
Tabla S1. Secuencias de péptidos identificados en la muestra A2 por medio de LC-MS... ..	117
Tabla S2. Secuencias de péptidos identificados en la muestra A4 por medio de LC-MS... ..	119

Índice de figuras

Figura 1. Método tradicional para recolectar larvas de <i>A. armida</i>	23
Figura 2. Proteínas solubles de la harina de <i>Arsenura armida</i>	32
Figura 3. Diferencia de color entre las harinas de <i>Arsenura armida</i>	34
Figura 4. Actividad antioxidante de péptidos obtenidos del concentrado proteico de <i>A. armida</i>	63
Figura 5. Curvas de supervivencia representativas de Kaplan-Meier de <i>C. elegans</i>	66
Figura 6. Bioactividad de péptidos en las muestras A2 y A4 identificadas mediante LC-MS/MS y utilizando la base de datos BIOPEP.....	74
Figura 7. Rebanadas de panes con harina de <i>A. armida</i> (1Faa-8Faa) y <i>A. domesticus</i> (1Fad-8Fad).	93
Figura 8. Propiedades de color del pan con harina de insectos (<i>A. armida</i> y <i>A. domesticus</i>).	94
Figura 9. Propiedades de color de la miga del pan con harina de insectos (<i>A. armida</i> y <i>A. domesticus</i>).....	95
Figura S1. Emulsión de la harina completa de <i>A. Armida</i> a una concentración del 15%.....	115
Figura S2. Emulsión de la harina desgrasada de <i>A. armida</i> a una concentración del 10%.....	116

Figura S3. Zonas de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* de los péptidos de las muestras A4-A6 y del control (C) (proteína no digerida).....117

Esquema de la tesis

La presente tesis de investigación del área de Ciencia de Alimentos está compuesta de seis apartados que se explican a continuación. En el apartado 1 se describe la introducción general, la cual expone el problema principal a resolver, así como el marco general de la problemática y las investigaciones actuales relacionadas y publicadas en los últimos años. En el apartado 2 se describe el objetivo general y los objetivos específicos desglosados a partir de la problemática presentada, con el fin de encontrar una solución.

A continuación, en el apartado 3 se incluyen los artículos de investigación realizados a partir de los resultados obtenidos del trabajo experimental que se llevó a cabo durante el doctorado. Así, en este apartado se ha incluido el primer artículo (apartado 3.1) que tiene como título “Composición nutricional y propiedades tecnofuncionales de la harina desgrasada y no desgrasada del insecto comestible *Arsenura armida*”, el cual tuvo como objetivo establecer la composición aproximada, propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de las harinas obtenidas de *Arsenura armida* para contribuir a la búsqueda de fuentes alimentarias alternativas para el consumo humano. Después en el apartado 3.2 se encuentra el segundo artículo de investigación “Aislamiento de mezclas de péptidos con potencial bioactivo a partir del hidrolizado de proteínas de las larvas de *Arsenura armida*” en el cual se establecieron las condiciones para la obtención de péptidos bioactivos a partir de harina de *A. armida*, también se identificaron sus secuencias y evaluaron su potencial como agentes antioxidantes y antimicrobianos. Para finalizar este apartado se incluyó en la sección 3.3 el artículo “Explorando el potencial tecnofuncional de la harina de insectos en la formulación de pan de trigo: un estudio comparativo con harinas de *Arsenura armida* y *Acheta domesticus*” el cual tuvo como objetivo estudiar la incorporación de la harina de *A. armida* o *Acheta domesticus* al pan de trigo en diferentes proporciones y evaluar los cambios en calidad, características físicas y sensoriales.

En el apartado 4 se describen las conclusiones generales de la investigación, así como, algunas recomendaciones y perspectivas para trabajos a futuro sobre la misma línea de investigación de proteínas y péptidos bioactivos de fuentes alternativas como los insectos. En el apartado 5 se encuentran las evidencias de participación en eventos académicos y de

divulgación de los resultados obtenidos de la investigación doctoral, tales como constancias de participación en congresos, textos de divulgación científica, etc. Finalmente, en el apartado 6 (como anexos) se incluyó la información suplementaria que acompaña a los primeros artículos (3.1 y 3.2).

Resumen

Esta investigación se inició debido a la necesidad actual de encontrar nuevas fuentes alternativas de alimentos ricos en proteína eficientes y sostenibles; desde esta perspectiva los insectos son una opción ya que cumplen ambos criterios, pero se necesita mayor conocimiento acerca de sus características nutrimentales, tecnofuncionales, y bioactivas, comenzando con especies endémicas como lo es *Arsenura armida*. Por lo que esta investigación se centró en evaluar las propiedades de la harina obtenida a partir de la larva de *A. armida*, para poder utilizarla como ingrediente funcional en alimentos.

Se evaluó la composición proximal, propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de la harina desgrasada y no desgrasada obtenida de *A. armida*. Ambas harinas tuvieron una composición nutrimental adecuada para el consumo humano, además de poseer propiedades tecnofuncionales tales como buena retención de agua y aceite, formación de espuma y emulsiones que las convierten en una buena opción como sustitutos de las proteínas animales.

Posteriormente se establecieron las condiciones para la extracción de proteína de la harina completa, así como para la obtención de péptidos bioactivos, se logró identificar que los péptidos antioxidantes se pueden obtener por hidrólisis del aislado de proteína de *A. armida* con pepsina a partir de la relación enzima sustrato (E/S) 10:1 con un tiempo de digestión de 2 h y para los péptidos antimicrobianos una relación E/S de 1:1 con un tiempo de digestión de 1 h. Los péptidos antimicrobianos mostraron actividad contra bacterias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) con valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.11 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y concentración mínima bactericida (MBC) de 0.23 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El análisis de péptidos reveló que además de péptidos antioxidantes y antimicrobianos también hay péptidos con actividad antihipertensiva, anticancerígena, entre otros. Estableciendo el potencial de los péptidos de *A. armida* como componentes valiosos en alimentos funcionales con beneficios para la salud más allá de la nutrición básica.

Finalmente, en un estudio comparativo se utilizó la harina de *A. armida* y la harina *Acheta domesticus*, este último es uno de los insectos más estudiados en el mundo, se adicionaron en diferentes proporciones como ingredientes sustitutos para elaborar pan de

trigo . Los panes producidos se utilizaron para evaluar los cambios en parámetros de calidad, propiedades físicas y aspectos sensoriales. Los resultados de este estudio demostraron la posibilidad de utilizar harinas de insectos en productos horneados. La adición de cualquiera de las harinas afecta algunas cualidades y propiedades físicas del pan como el volumen, color, dureza, etc; sin embargo son una opción interesante en este tipo de productos.

Abstract

This research was started due to the current need to find new efficient and sustainable alternative sources of protein-rich foods; from this perspective, insects are an option since they meet both criteria, but more knowledge is needed about their nutritional, techno-functional, and bioactive characteristics, starting with endemic species such as *Arsenura armida*. Therefore, this research focused on assessing the properties of the flour obtained from the larva of *A. armida*, to be able to use it as a functional ingredient in foods.

The proximal composition, physicochemical, and techno-functional properties of the defatted and non-defatted flour obtained from *A. armida* were evaluated. Both flours had an optimal nutritional composition for human consumption, in addition to having techno-functional properties such as good water and oil retention, foam formation, and emulsions that make them a good option as substitutes for animal proteins.

Subsequently, selected conditions were evaluated for the extraction of protein from the whole flour, as well as for obtaining bioactive peptides. It was possible to identify that antioxidant peptides can be obtained by hydrolysis of the *A. armida* protein isolate with pepsin from the enzyme substrate ratio (E/S) 10:1 with a digestion time of 2 h and for antimicrobial peptides an E/S ratio of 1:1 with a digestion time of 1 h. The antimicrobial peptides showed activity against Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*), with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 0.11 µg/µL and minimum bactericidal concentration (MBC) of 0.23 µg/µL. The peptide analysis revealed that in addition to antioxidant and antimicrobial peptides, there are also peptides with antihypertensive and anticancer activity, among others. Establishing the potential of *A. armida* peptides as valuable components in functional foods with health benefits beyond basic nutrition.

Finally, in a comparative study, *A. armida* flour and *Acheta domesticus* flour (one of the most studied insects in the world), were added in different proportions as substitute ingredients to make wheat bread to later evaluate changes in quality parameters, physical properties, and sensory aspects. The results of this study demonstrated the possibility of using insect flour in baked products. The addition of either flour affects some qualities and physical

properties of the bread like volume, color, and hardness; however, they are an interesting option in this type of products.

1. Introducción

Para el año 2050 la FAO estima que la población mundial aumentará un 34%, lo cual traerá consigo una mayor demanda de alimentos, principalmente de aquellos con un elevado contenido de proteína de alto valor biológico debido a su importancia en el desarrollo adecuado físico y mental de las personas (Amarender et al., 2020; Huis, 2013). La mayor demanda hacia el sector ganadero y los cultivos agrícolas rebasará la producción, por lo que se necesita encontrar fuentes de proteína alternativa, eficiente y sostenible que pueda ser utilizada en la industria alimentaria (Govorushko, 2019; Gravel & Doyen, 2020).

Los insectos cumplen estos criterios y constituyen un recurso alimenticio natural para muchos grupos étnicos en Asia, África, y América del Sur, en donde la entomofagia puede ser sostenible y conlleva beneficios económicos, nutricionales y ecológicos principalmente para las comunidades rurales, pero el conocimiento acerca de las más de 2,000 especies aún es escaso (Batat & Peter, 2020; Van Huis, 2013). Además de la falta de información, otra barrera para el consumo de insectos como una fuente de alimento es la neofobia asociada principalmente a su aspecto y, para contrarrestar esta percepción negativa, se ha comenzado a utilizar a los insectos en formas en las que se puedan integrar a la alimentación de las personas sin que ellas puedan distinguirlos, algunas opciones viables son: harina pulverizada, proteína extraída en polvo, entre muchas otras. (Amarender et al., 2020).

Actualmente 3,071 grupos étnicos en 130 países consumen un total de 2,086 especies de insectos que han sido descritas hasta el momento (Teixeira et al., 2023). Los más consumidos son aquellos que tienen una gran disponibilidad y son consumidos en diferentes etapas de la vida como huevos, larvas, pupas y adultos (Bessa et al., 2020). Se tiene evidencia de que las especies del orden Orthoptera (saltamontes, grillos y langostas) y Lepidóptera (orugas) son ricas en proteína (hasta un 77% en base seca), la cual es una mejor fuente de este macronutriente en peso en comparación con la carne de res, cerdo, pollo y cordero (Melgar-Lalanne et al., 2019; Van Huis, 2013). En México Ramos-Elorduy *et al.* (1997) evaluaron la composición nutricional de 78 especies que representan siete órdenes y 23 familias de insectos comestibles, el contenido de proteínas de estas especies osciló entre el 15% y el 81% y su digestibilidad fue de 76% al 90%. Esto nos muestra que sí se puede

obtener proteína de insectos y que el estudio de especies endémicas para su utilización como ingrediente funcional en la industria alimentaria es posible y necesaria.

El género *Arsenura* pertenece a la familia Saturniidae dentro del orden Lepidoptera, *Arsenura armida* es de gran relevancia para muchos grupos étnicos en México debido a que las larvas comestibles son nutritivas, proporcionan grasas no saturadas y son una buena fuente de proteínas (Melo-Ruíz et al., 2016). Debido a que en efecto si pueden ser una fuente alternativa de proteínas, surge la necesidad de tener más información acerca de las propiedades físicas, tecnofuncionales y bioactivas de este insecto. Es por esto, que esta investigación propone analizar este insecto endémico, *Arsenura armida*, como una posible fuente de proteína de alto valor biológico y de compuestos bioactivos, para su futura utilización como ingrediente funcional en la industria alimentaria.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Analizar el potencial de las propiedades tecnofuncionales y los péptidos bioactivos presentes en la harina obtenida a partir de *A. armida* para su utilización como ingrediente funcional en la industria alimentaria.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas, bromatológicas y tecnofuncionales de la harina obtenida a partir de *Arsenura armida*.
2. Establecer las condiciones de extracción de las proteínas presentes en la harina de *Arsenura armida*, así como identificar y caracterizar las proteínas que están presentes en mayor proporción en la misma.
3. Establecer las condiciones de digestión de las proteínas de la harina de *Arsenura armida* para la obtención de péptidos con efecto antimicrobiano y antioxidante, así como identificar las secuencias de los péptidos bioactivos obtenidos.
4. Evaluar el efecto de la adición de harina de *Arsenura armida* en las propiedades tecnofuncionales de pan blanco y comparar sus efectos con los producidos en panes formulados con harina control.

3. Artículos de investigación

3.1 Composición nutrimental y tecnofuncionalidad de la harina completa y desgrasada del insecto comestible *Arsenura armida*

Resumen

Los insectos comestibles son alimentos tradicionales a nivel mundial, y en México, es una práctica prehispánica. Hoy en día, los insectos comestibles pueden ser una fuente de alimento para una población en aumento. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el perfil nutrimental, las características físicas y tecnofuncionales de la harina completa (HC) y desgrasada (HD) del insecto comestible *Arsenura armida* para utilizarla como ingrediente funcional. El contenido de lípidos en HC fue del 24.18%. Ambas harinas son ricas en proteínas, 20.36% en la HC y 46.89% en la HD; las proteínas solubles de *A. armida* se clasificaron según su peso molecular, que osciló entre 12 y 94 kDa. Las propiedades físicas sugieren que ambas harinas tienen buenas características de fluidez. En cuanto a las propiedades tecnofuncionales, la HD presentó los mayores valores de capacidad de retención de agua (275.6%) y aceite (121%). Los valores de viscosidad indican que en una concentración alta (20%), se comportan como un fluido adelgazante no newtoniano. Los valores de capacidad de formar emulsión oscilan entre 78.3 y 100% en ambas harinas, con estabilidad entre 92.4 y 100%. Estas harinas podrían ser una buena fuente de nutrientes y sus propiedades tecnofuncionales las convierten en una buena opción como sustituto de las proteínas animales.

3.1.1 Introducción

Según la FAO, para 2050 el mundo necesitará alimentar a 9 mil millones de personas, pero las condiciones reales no son suficientes (FAO, 2013). Al respecto, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura mencionó a los insectos como una opción de futuro para la seguridad alimentaria y nutricional por su contenido de macro y micronutrientes (Frigerio et al., 2020). Sin embargo, es importante saber que la neofobia sigue siendo un problema relacionado con el consumo de insectos comestibles.

En México se han reportado 348 especies de insectos comestibles (Rodríguez-Miranda et al., 2019). Los lepidópteros son uno de los órdenes de insectos más consumidos en México (Ramos-Elorduy et al., 2011). Entre la variedad de insectos locales (Puebla, México), se encuentra en estado larvario una mariposa conocida como Cuetlas (*Arsenura armida*), es uno de los más apreciados y consumidos y se puede encontrar en la temporada de verano. en el árbol de Jonote (*Heliocarpus appendiculatus*) (Melo-Ruíz et al., 2016).

Para aumentar la aceptación y el consumo, la harina de insectos comestibles se puede utilizar como una forma menos visible en productos comunes (Vanqa et al., 2022). Para utilizar estas harinas como ingrediente alimentario, primero se necesita información sobre las propiedades tecnofuncionales, el contenido nutricional y la optimización del procesamiento, como los pasos de extracción de lípidos y proteínas (Kim et al., 2022; Megido et al., 2016). En este sentido, en la literatura se describen varios métodos de extracción de lípidos con disolventes convencionales. Grava et al. (2021) informaron que para la proteína de la harina de *T. molitor* utilizaron n-hexano como disolvente desengrasante y que esto mejoraba sus propiedades funcionales. El hexano tuvo poco impacto en el perfil proteico en comparación con las harinas no desgrasadas, se redujo la solubilidad y se mejoraron las propiedades espumantes de las fracciones desgrasadas. Mishyna et al. (2019) informaron que la proteína extraída de insectos comestibles como *Schistocerca gregaria* y *Apis mellifera* usando n-hexano como solvente desengrasante mejoró sus propiedades funcionales. Y finalmente, Laroche et al. (2019) utilizaron la partición trifásica (TPP) y el CO₂ supercrítico (SC-CO₂) como métodos eficientes para la extracción de proteínas. Concluyeron que la metodología de desgrasado debería elegirse según la composición de grasa del insecto comestible utilizado. Esta investigación tuvo como objetivo establecer la composición proximal, propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales de la harina completa y desgrasada obtenida de *Arsenura armida* para contribuir a la búsqueda de fuentes alimentarias alternativas para el consumo humano.

3.1.2 Materiales y métodos

*3.1.2.1 Procesamiento de la harina de *Arsenura armida**

Se recolectaron larvas de *A. armida* de árboles de Jonote en Huaquechula, Puebla, México (18°45'16.6"N 98°34'16.4"W) a finales de agosto de 2020. Todos los insectos recolectados mostraron color marrón oscuro y espinas en su superficie lo que significa que están listos para el consumo (Melo-Ruíz et al., 2016). Después de la recolección, las larvas se procesaron según el método tradicional (Fig. 1), el cual incluye la eliminación del sistema digestivo de la larva, para después lavarlas y agregarles sal. Estas muestras se sellaron en bolsas de polietileno y se almacenaron en condiciones de oscuridad a -20 °C para su uso posterior.



Figura 1. Método tradicional para recolectar larvas de *A. armida*. **a-c**, ubicación e identificación de las larvas adultas en los árboles de Jonote deben ser de color marrón oscuro y tener espinas en su superficie; **d**, evisceración y limpieza manual de las larvas para eliminar los desechos del sistema digestivo; **e**, salado (20% NaCl) y secado, este se utiliza como método tradicional de conservación y luego se comercializa o almacena congelado; **f**, larvas secas, las larvas adultas suelen medir (10-12 cm).

Para obtener la harina, las larvas de *A. armida* recolectadas se lavaron cinco veces con agua destilada (1:5 p/v) para eliminar la sal y los contaminantes. Luego del lavado, se secaron en estufa (Felisa, México) durante 12 h a 55°C hasta peso constante. Finalmente se realizó el proceso de pulverización para obtener la harina utilizando un Nutribullet® a 10,000 rpm hasta una harina con apariencia homogénea (12 s).

El proceso de eliminación de grasa se realizó mediante el método de extracción con solvente semicontinuo Soxhlet (AOAC 960.39) en un aparato Soxhlet (E-500 Büchi, Flawil, Suiza). Se realizaron un total de 25 ciclos de reflujo utilizando hexano como solvente. La grasa extraída se almacenó en recipientes de color ámbar en condiciones de refrigeración hasta su posterior análisis. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico

3.1.2.2 Composición proximal

Para evaluar la composición proximal de la harina completa (HC) y desgrasada (HD) de *A. armida* se determinó el contenido de humedad, se cuantificó el contenido de proteína, el contenido de lípidos, cenizas y fibra cruda según los métodos de la A.O.A.C (AOAC, 2008); cada análisis se realizó por triplicado y los resultados de reportaron como la media \pm la desviación estándar. El contenido de carbohidratos se calculó restando la suma de todos los demás componentes determinados. El contenido de humedad se determinó mediante el método 950.46 (AOAC, 2008) secando la muestra en una estufa (Felisa, Modelo: FE-291AD, México). La proteína cruda se determinó mediante el método micro-Kjeldahl 945.01 (AOAC, 2008) con modificaciones menores, las muestras (0.1 g) se digirieron con 5 mL de H₂SO₄ concentrado y 0.5 g de mezcla del digestor (88.89% sulfato de potasio, 8.89% sulfato de cobre pentahidratado, 2.22% dióxido de selenio) a 120 °C durante 30 min, luego a 320 °C durante 70 min en una unidad digestora (Labconco, Modelo 23080, EE.UU.), la destilación se realizó en un destilador de nitrógeno/proteínas (Labconco, Modelo: Rapidstill II, EE.UU.) y el contenido de proteína cruda se calculó utilizando como factor 4.76 según Janssen et al. (2017) quienes estimaron un K_p específico de 4.76 para el contenido de proteína en larvas. El contenido de lípidos se determinó mediante el método 960.39 (AOAC, 2008) en un aparato Soxhlet (E-500 Büchi, Flawil, Suiza) con hexano como solvente. El contenido de cenizas y

fibra cruda se calculó siguiendo los métodos (AOAC, 2008) 920.153 y 920.153 respectivamente.

3.1.2.3 Perfil de proteínas (SDS-PAGE)

La técnica SDS-PAGE de la fracción proteica soluble de la harina de *A. armida* se realizó con el método reportado por Yi et al. (2013) con modificaciones menores. La harina de *A. armida* fue sometida a un tratamiento de extracción secuencial. Primero, se resuspendió la harina en una proporción de 1:10 (harina: tampón) utilizando un tampón salino (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 con NaCl 0.2 M), y la suspensión se mezcló en un mezclador de rodillos durante 24 h a 8 °C. Después, la suspensión se centrifugó a 7850 g a 4°C. El sobrenadante se mantuvo a -20 °C para ensayos adicionales, y los restos se resuspendieron en tampón desnaturizante (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 con NaCl 0.2 M más urea 2 M) y la suspensión se trató en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se aplicaron pasos similares aumentando la urea a 4 M y 6 M. Las fracciones de proteína soluble obtenidas se ajustaron a 12.5 mg/mL con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8, que contenía EDTA 2 mM. La fracción de proteína se mezcló con tampón de muestra (Tris-HCl 20 mM, pH 8, EDTA 2 mM, SDS al 5 % (p/v), 2-mercaptoetanol al 0.016 % (p/v) y azul de bromofenol al 0.02 %) en proporción 1:1. relación, luego se calentó a 100 ° C durante 5 minutos y se centrifugó a 13800 g antes de cargar el gel. Luego se sometieron a electroforesis 7.5 µL de cada muestra de proteína usando gel de flujo reducido (13%) y gel de apilamiento (6%). Se utilizó un marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder (catálogo no. 26616, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass., U.S.A.). El gel cargado se tiñó con azul de Coomassie R250 (Bio-Rad) y para desteñir se utilizó una solución de metanol (10%)-acético (7%) (Laemmli, 1970).

3.1.2.4 Perfil mineral

El análisis para la determinación de la concentración de minerales se realizó mediante espectroscopia de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) con el equipo Varian 710-ES, Agilent Technologies; Compatible con el estándar Cat # ICP-200.7-6^a. Todos los análisis se realizaron por triplicado y se expresaron como media ± desviación estándar.

3.1.2.5 Propiedades físicas

3.1.2.5.1 Determinación de color e índice de oscurecimiento

El color de la harina completa (HC) y la harina desgrasada (HD) se midió utilizando un colorímetro CR-410 (Konica Minolta Sensing Inc., Tokio, Japón). Las diferencias de color se registraron en la escala CIE L*a*b* en términos de luminosidad (L*) y color (a* – rojo, b* – amarillo). La medición del color se repitió tres veces para cada muestra. Además, la diferencia de color total (ΔE) se calculó según la ecuación 1:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Ec. (1)

donde ΔL , Δa , Δb son diferencias en los valores L^* , a^* , b^* entre la muestra de referencia y la muestra de prueba, respectivamente.

Índice de oscurecimiento (IO) ec. 2 y 3, fue calculado con los valores de L^* , a^* y b^* como se indica a continuación:

$$x = \left(\frac{(a^* + 1.75 L)}{(5.645L^* + a^* - 3.012b^*)} \right)$$

Ec. (2)

$$IO = \left(\frac{100(x - 0.31)}{0.17} \right)$$

Ec. (3)

3.1.2.5.2 Tamaño de partícula, densidad compactada y aparente, índice de compresibilidad (IC), y Relación de Hausner (RH)

La distribución del tamaño de las partículas de harina de HC y HD se determinó utilizando un analizador de partículas por difracción láser (Bluewave, Microtrac Inc., EE. UU.). Los datos del tamaño de partícula informados se dieron como el diámetro medio de partícula (D50). El análisis se realizó por triplicado.

La densidad aparente de las harinas de *A. armida* se obtuvo a partir del procedimiento descrito por Caparino et al. (2012) con algunas modificaciones. Primero, se vertieron libremente aproximadamente 2 g de cada harina en una probeta graduada de vidrio de 10 ml sin golpear, y esto se midió como densidad aparente. A continuación, las mismas muestras se golpearon manualmente repetidamente levantando y dejando caer (30 veces) el cilindro bajo su propio peso a una distancia vertical hasta que se observó una diferencia significativa en el volumen entre mediciones sucesivas; esto se midió como densidad compactada.

La densidad aparente y compactada se calcularon utilizando las siguientes expresiones (Ec. 4 y 5, respectivamente)

$$\text{Densidad aparente} = \left(\frac{\text{peso de la harina (g)}}{\text{Volúmen aparente de la harina (mL)}} \right)$$

Ec. (4)

$$\text{Densidad compactada} = \left(\frac{\text{peso de la harina (g)}}{\text{volúmen compactado de la harina (mL)}} \right)$$

Ec. (5)

IC and RH se calcularon a partir de los valores de densidad aparente y compactada utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{CI} = 100 \left(\frac{dT - dB}{dT} \right)$$

Ec. (6)

$$\text{RH} = \left(\frac{dT}{dB} \right)$$

Ec. (7)

Donde *dB* es la densidad aparente (g/mL), y *dT* es la densidad compactada (g/mL)

3.1.2.6 Propiedades tecnofuncionales

3.1.2.6.1 Capacidad de retención de agua y aceite y calor específico

Las capacidades de retención de agua y aceite de ambas harinas (HC y HD) se determinaron según el método de Beuchat (1977) con algunas modificaciones. Las pruebas se realizaron por triplicado; se pesaron 0.2 g de harina *A. armida* y se mezclaron con 1 ml de agua destilada o 1 ml de aceite de canola. La mezcla se mezcló durante 20 s usando un vórtex y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente se centrifugó a 13800 g durante 5 min a temperatura ambiente y se decantó y pesó el agua o aceite.

Las capacidades de retención de agua y aceite (CRA y CRO, respectivamente) se calcularon utilizando la ecuación. 8 y expresado como masa (g) de agua o aceite por unidad de masa (g) de harina.

$$\text{CRA or CRO (\%)} = \frac{W_o - W_s}{W_o} \times 100$$

Ec. (8)

donde W_o son los valores de masa de agua o aceite utilizados (g) y W_s es el agua recuperada en el sobrenadante o el aceite no absorbido (g), respectivamente.

3.1.2.6.2 Viscosidad

La viscosidad de la HC y HD se determinó según el método adaptado de Ramashia et al. (2018). Se prepararon cuatro suspensiones de harina diferentes con agua destilada al 5, 10, 15 y 20% (p/v). Una vez preparadas las suspensiones, se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente (25°C). Las mediciones se realizaron con un viscosímetro digital modelo DV3TLV (Brookfield Engineering Laboratories, MA, EE. UU.), utilizando un adaptador de muestra y el husillo SC4-31. Las mediciones se realizaron a velocidades de 150, 200 y 250 rpm durante 150 s. La viscosidad de las suspensiones se determinó en cinco puntos cada 30 s.

3.1.2.6.3 Capacidad de formación de espuma y estabilidad de la espuma

La capacidad espumante (CE) se determinó por triplicado. Se prepararon concentraciones de 5, 10, 15 y 20 % de harinas de *A. armida* (HC y HD) en agua destilada. Se realizó un control con caseína al 3%. Las mezclas se mezclaron durante 1.5 min usando un homogeneizador Omni-International (Modelo GLH-3005, EE. UU.) a 14,200 rpm, y el volumen de espuma (V₂) se registró inmediatamente a 0 y luego a 30 min. La capacidad de espuma (CE) se calculó usando la siguiente ecuación (Ec. 9). La estabilidad de la espuma (EE) se calculó utilizando la ecuación 10.

$$CE (\%) = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100$$

Ec. (9)

$$EE (\%) = \frac{V_{30}}{V_1} \times 100$$

Ec. (10)

Donde V₁ es el volumen inicial (mL) y V₂ es el volumen después de espumar (mL), V₃₀ es el volumen después de 30 min de reposo (mL).

3.1.2.6.4 Capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión

La capacidad emulsionante (CM) y la estabilidad de la emulsión (EM) se determinaron por triplicado. Se realizó un control de caseína al 3% (p/v). Se prepararon soluciones al 5, 10, 15 y 20% (p/v) con agua destilada y harina de *A. armida* (completa y desgrasada). Luego se agregaron 4 g de cada mezcla a 4 g de aceite de canola y se mezclaron usando un homogeneizador Omni-International (Modelo GLH-3005, EE. UU.) a 14,200 rpm durante 1.5 min. Se midieron la altura de la capa emulsionada y el contenido total del tubo después de 30 min. La capacidad emulsificante se calculó (Ec. 11) como:

$$CM(\%) = \frac{\text{Altura de la capa emulsificada en el tubo (mL)}}{\text{altura total del contenido de la mezlca en el tubo (mL)}} \times 100$$

Ec. (11)

La estabilidad de la emulsión fue calcula con la ec. 12:

$$EM (\%) = \frac{\text{Altura de la capa emulsionada en el tubo después de 30 min(mL)}}{\text{Altura de la capa emulsionada (mL)}} \times 100$$

Ec. (12)

3.1.2.7 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar y se analizaron utilizando ANOVA de una vía y pruebas de comparación de Tukey utilizando un nivel de confianza del 95%. Antes del análisis estadístico, se evaluó la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza. Además, el análisis de los resultados de la viscosidad se realizó mediante el procedimiento del modelo lineal general para identificar diferencias significativas ($p < 0.05$) utilizando Minitab 18® (Minitab Inc., EE. UU.).

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Composición proximal

La composición proximal de las muestras de HC y HD de *A. armida* se presenta en la Tabla 1. Todos los resultados son significativamente diferentes entre harinas ($p < 0.05$). El contenido de humedad fue bajo para ambas harinas (HC 2.32% y HD 4.12%). La proteína es el mayor porcentaje de los macronutrientes presentes en la HD (46.89%) mientras que en la HC fue del 20.36%. El contenido de lípidos en HC es significativamente diferente al de HD ($p < 0.05$); el total de lípidos se redujo de 24.18% a 0.50% mediante el proceso de desgrasado.

La fibra cruda es menor en HC (7.3%) que en HD (13.1%) y el contenido de cenizas en HC (4.7%) es significativamente diferente al de HD (6.7%) ($p < 0.05$). Los carbohidratos calculados fueron más abundantes en la HC 41.2%, mientras que en la HD fue 28.7%.

Tabla 1. Composición proximal de la harina completa y desgrasada de *Arsenura armida*.

Componentes	Contenido (g/100g BS)	
	HC	HD
Carbohidratos	41.19 ^a	28.69 ^b
Proteínas	20.36 ± 3 ^b	46.89 ± 3 ^a
Grasas	24.18 ± 2 ^a	0.50 ± 0.3 ^b
Fibra cruda	7.3 ± 0.5 ^b	13.07 ± 2 ^a
Ceniza	4.65 ± 0.3 ^b	6.73 ± 0.02 ^a
Humedad	2.32 ± 0.5 ^b	4.12 ± 0.09 ^a

HC, harina completa; HD, harina desgrasada; BS, base seca. Cada valor se presenta como la media ± DE (n=3). Los valores seguidos de una letra en superíndice diferente en cada fila difieren significativamente (p<0.05). Los carbohidratos se calcularon por diferencia.

El contenido de minerales en la HC se presenta en la Tabla 2.. Los principales macrominerales presentes fueron sodio, potasio, calcio y magnesio, mientras que los microminerales fueron hierro y zinc. No se detectó presencia de metales pesados, solo arsénico en concentración traza (2×10^{-5} mg/100 g).

Tabla 2. Contenido de minerales de la harina de *Arsenura armida*.

Mineral	mg/100 g peso seco
Na	1034.4 ± 1
K	561.0 ± 1
Ca	333.1 ± 6
Mg	132.3 ± 0.8
Zn	6.6 ± 0.1
Fe	5.9 ± 0.1
As	$2 \times 10^{-5} \pm 0.000004$
Cd	ND
Pb	ND

ND, no detectado. Cada valor es presentado como la media ± DE (n=3)

3.1.3.2 Perfil de proteínas (SDS-PAGE)

El tamaño de las proteínas se puede observar en la Fig. 2, donde las bandas se observan más claras e intensas con el último tratamiento con urea 6 M. Las proteínas solubles de *A. armida* se separaron mediante SDS-PAGE y se clasificaron en siete grupos según su peso molecular. Todas las fracciones mostraron bandas con pesos moleculares que oscilaron entre 10 y 100 kDa.

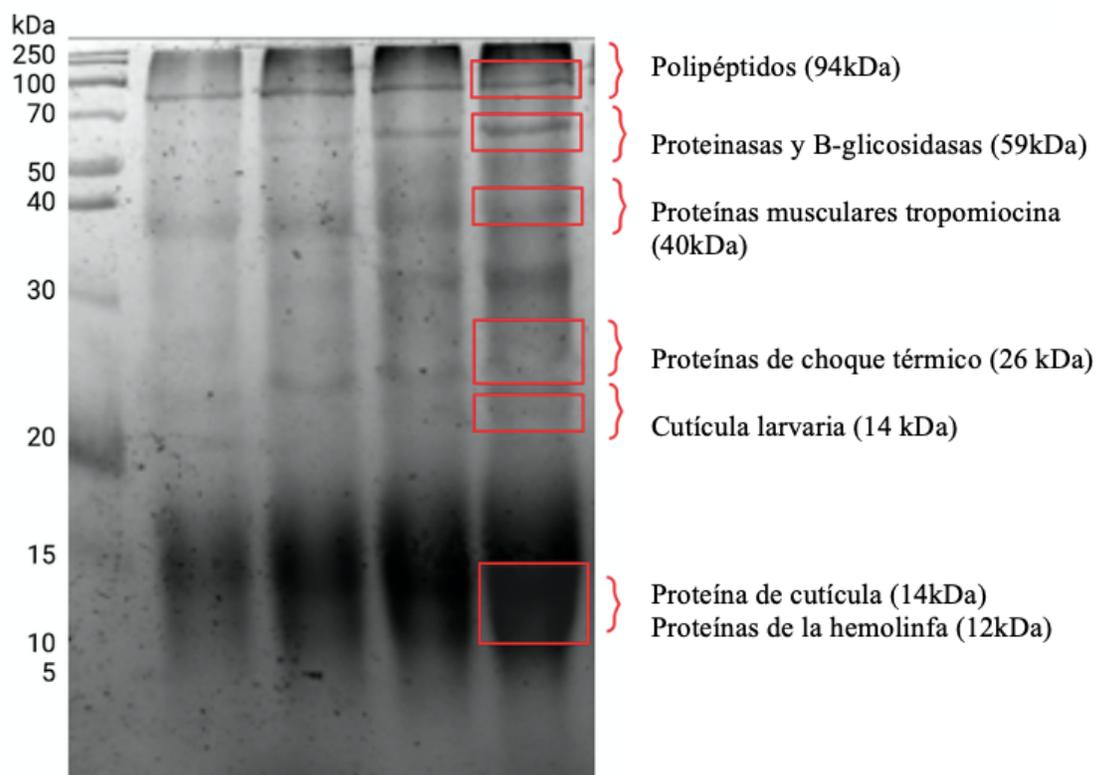


Figura 2. Proteínas solubles de la harina de *Arsenura armida*. **M**, marcador de peso molecular, extracción de proteína con diferentes soluciones 1 al 4. Líneas: 1, 20mM Tris HCl + 0.2 M NaCl; 2, 1+2M urea; 3, 1+ 4M urea; 4, 1+ 6M urea.

3.1.3.3 Propiedades físicas

Los atributos de color medidos en las harinas de *A. armida* (HC y HD) fueron luminosidad (L^*), contribución roja ($+a^*$) y amarilla ($+b^*$). La determinación del color de ambas harinas se muestra en la Tabla 3. Hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) en la luminosidad entre HC (17.08) y HD (20.41) siendo la HD de color más claro. También se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la contribución de los rojos y amarillos; ambos valores fueron

mayores en HC. El proceso de desgrasado produjo cambios de color, éste se expresa mediante el índice de oscurecimiento y la diferencia total de color (Tabla 3), el cambio de color es claramente notorio (Fig. 3), y la muestra con mayor índice de oscurecimiento fue la HC (46.09) (Mokrzycki y Tatol, 2011).

Tabla 3. Características físicas y propiedades tecnofuncionales de la harina completa (HC) y harina desgrasada (HD) de *Arsenura armida*.

	L*	a*	b*	ΔE	TP	DA	DC	IC	RH	IO	CRA (%)	CRO (%)	CE (kJ/g)
HC	17.08 $\pm 0.1^b$	0.68 \pm 0.08 ^a	6.1 \pm 0.06 ^a	-	316 ^a	0.38 $\pm 0.004^b$	0.49 $\pm 0.007^a$	22	1.2	46.09 $\pm 0.5^a$	222.51 $\pm 3^b$	118.7 $\pm 5^a$	21.21 $\pm 0.0^a$
HD	20.41 $\pm 0.2^a$	0.34 \pm 0.05 ^b	1.8 \pm 0.04 ^b	5.37	143 ^b	0.47 $\pm 0.006^a$	0.50 $\pm 0.007^a$	6	1.06	10.75 $\pm 0.1^b$	275.64 $\pm 5^a$	121 $\pm 5^a$	18.57 $\pm 0.08^b$

TP, tamaño de partícula(μm); DA, densidad aparente (g/mL); DC, densidad compactada (g/mL); IC, índice de compresibilidad; RH, Radio de Hausner; IO, Índice de oscurecimiento; CRA, capacidad de retención de agua; CRO, Capacidad de retención de aceite; CE, Calor específico. Cada valor es presentado como la media \pm DE (n=3). Valores seguidos de una superíndice diferente en cada columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Se detectó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el tamaño de partícula entre harinas, siendo la HC la de mayor tamaño (316 μm) (Tabla 3). La densidad aparente (DA) también se muestra en la Tabla 3 y hubo una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambas harinas. La HC presentó la menor DA de 0.38 g/mL mientras que la HD 0.47 g/mL, y la densidad compactada de las harinas no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$). Ambas harinas de *A. armida* pueden considerarse polvos de buena fluidez ya que sus valores de índice de compresibilidad (IC) las clasifican como aceptables (22) y excelentes (6) y el índice de Hausner (HR) las clasifican como buenas (1.2) y excelentes (1.06) para HC y HD, respectivamente (Tabla 3).

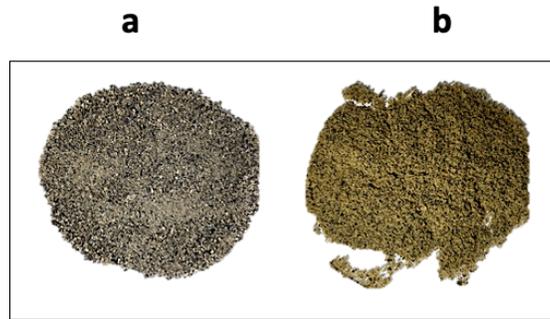


Figura 3. Diferencia de color entre las harinas de *Arsenura armida*. a, Harina desgrasada (HD); b, harina completa (HC).

3.1.3.4 Propiedades tecnofuncionales

3.1.3.4.1 Capacidad de retención de agua y aceite y calor específico

En la Tabla 3 se muestran los valores de CRA y CRO de ambas harinas. La menor CRA se observó en la HC 222.51%, mientras que con HD se obtuvo 275.64%. No hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los valores de CRO de la HC (118.7%) y la HD (121%). En cuanto a los valores de calor específico obtenidos para las harinas de *A. armida*, estos fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) 21.21 kJ/g para HC y 18.57 kJ/g para HD.

3.1.3.4.2 Viscosidad

Los resultados de viscosidad se muestran en la Tabla 4. El valor de viscosidad más alto se observó al 20% de concentración de HD a 150 rpm con una diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el resto de las concentraciones de harina (5, 10 o 15%). HC al 5-10% y HD al 5% mostraron una viscosidad mínima.

3.1.3.4.3 Capacidad y estabilidad de la espuma y emulsión

Los valores de la capacidad de formación de espuma (CE) y estabilidad de la espuma (ES) de las harinas de *A. armida* se muestran en la Tabla 4. La HC no mostró capacidad de espuma, mientras que la HD mostró capacidad de espuma a una concentración de 5-10% (p/v) que van del 24.60% al 36.67%; y la ES fue de 89.43 y 36.66%, respectivamente.

Los valores de la capacidad de formación de emulsión (CM) fueron mayores y significativamente diferentes ($p < 0.05$) del control, además el HD al 15 y 20% (p/v) mostró

diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$). Ambas harinas mostraron estabilidad de la emulsión (EM) de 92.43 a 100% y duraron aproximadamente 48 h mantenidas a temperatura ambiente (25 ° C) (Fig. S1, Fig. S2)

3.1.4 Discusión

3.1.4.1 Composición proximal

Los componentes principales de *A. armida* fueron proteínas, carbohidratos y lípidos (Tabla 1). El contenido de proteína encontrado en *A. armida* HC es menor que el de HD, probablemente relacionado con el proceso de extracción de lípidos (Laroche et al., 2019), además el valor de proteína en HD (46.89%) es similar a la proteína cruda reportada en *T. molitor* (44-68%), que es una larva popular con un potencial significativo para la producción a gran escala en los E.U.A., ahora utilizada para el consumo humano a nivel mundial y como alimento para mascotas, animales de zoológico, etc. (Hong et al., 2020). Por otro lado, el contenido de proteína HC (20.32%), es el porcentaje más bajo reportado para el orden Lepidoptera (Doberman, 2017); esta diferencia observada entre el contenido de proteínas en HC y HD también se reportaron en las harinas de *T. molitor* (desgrasadas 59.1 g/100 g y no desgrasadas 38.6 g/100 g) (Grove et al., 2021). Finalmente, al comparar las harinas de *A. armida* con fuentes de proteína vegetal como la soya seca (35.8%), o fuente animal como la carne se obtuvo un 23.2% para la carne de vacuno, un 24.8% para la ternera y un 21.5% para el cordero (Siulapwa et al., 2014) lo que hace evidente el potencial de este insecto como fuente alternativa de proteínas. Sin embargo, es necesario evaluar la calidad, digestibilidad y disponibilidad de los nutrientes de los alimentos.

El contenido lipídico de HC (24.18g/100g) está en el rango reportado por Doberman (2017) para el orden Lepidoptera, (8.81 a 56.65g/100g), este macronutriente es importante en los alimentos porque aumentan la palatabilidad, conservan sus sabores y ayudan a transportar vitaminas liposolubles esenciales (Omotoso, 2006). El hexano utilizado como solvente mostró un buen rendimiento de extracción en harina de *A. armida* al poder reducir el contenido de grasa a 0.50 g/100g, esto concuerda con Gravel et al. (2021) quienes informaron una extracción de aceite superior al 96% en *T. molitor*

Los alimentos ricos en fibra tienen un beneficio nutricional ya que ayuda a reducir el estreñimiento y es un conocido agente en el control de peso y reducción de grasa, en este sentido la harina de *A. armida* es una buena fuente de fibra para la nutrición humana ya que el contenido de fibra cruda que se encuentra es comparable a la fibra dietética de vegetales como el trigo, las lentejas, la remolacha y las almendras (entre 7.8 y 12.6 g/100 g) (Dhingra et al., 2012). Es posible que la quitina esté presente en la fibra de *A. armida*, porque se ha reportado que la quitina insoluble es la forma más común de fibra en los insectos (Kouřimská y Adámková, 2016). Asimismo, se ha reportado quitina en larvas de *T. molitor* con un contenido de 4.92% (Song et al., 2018).

Los carbohidratos determinados fueron más abundantes en HC que en HD, esto puede estar relacionado con la extracción de lípidos y la pérdida de carbohidratos solubles en solventes no polares como el hexano durante el proceso de desgrasado. El polisacárido que cumple estas características y está presente en mamíferos y no mamíferos como los insectos, es el glucógeno (Dilworth et al., 2017; Arrese y Soulages, 2010). Este insecto puede aportar hasta el 22% de la ingesta diaria total de carbohidratos recomendada para los humanos (130 a 210 g) (Schulz y Slavin, 2021).

Las diferencias en el valor energético entre harinas pueden deberse al mayor contenido de grasa en la HC que en la HD; ya que la grasa aporta más energía (más del doble) del aporte de los carbohidratos y las proteínas. Estos resultados son similares a los reportados para harinas de grillos comestibles que oscilan entre 20.33 y 21.92 kJ/g, lo que significa que estas harinas tienen un mayor aporte calórico (Montowska et al., 2019).

Los bajos valores de humedad en las harinas de *A. armida* representan una ventaja para la vida útil porque Fellers y Bean (1977) informaron que el contenido de humedad de la harina de trigo durante el almacenamiento debe ser del 10 al 12% para un almacenamiento seguro y a largo plazo. Hasta el momento no se ha especificado un rango de contenido de humedad como ideal para las harinas de insectos, pero diferentes estudios han reportado desde 1.5 hasta 27.7% de humedad en especies como *Orictes boas*, *Cirina forda*,

Gonimbrasia belina, *Oryctes rhinoceros* y *Gonimbrasia* (Nudaurelia) *alopia* (Anaduaka et al., 2021; Hlongwane et al., 2020; Vanqa et al., 2022).

Los insectos comestibles son reconocidos como una buena fuente de minerales de importancia nutricional como hierro, zinc, calcio, fósforo, potasio y otros (Kouřimská y Adámková, 2016). En este sentido, el consumo de harina de *A. armida* podría aportar entre 2 y 5 veces más hierro que la carne de res y el pollo, respectivamente. Además, el contenido de zinc que se encuentra en *A. armida* podría contribuir a la ingesta diaria recomendada que oscila entre 8 y 13 mg (Tao y Li., 2018). El calcio fue entre 3 a 8 veces mayor que lo reportado para *T. molitor* (larvas), *Grylloides sigillatus* y *Schistocerca gregaria* (adultos) (Zielińska et al., 2015) y puede contribuir con el 83% del requerimiento de este mineral para adultos (Beto, 2015). Finalmente, el contenido de potasio en la HC podría cubrir el 12% del requerimiento diario para el ser humano establecido en 4700 mg/d (Weaver, 2013). Los hallazgos en el contenido de minerales de este estudio son superiores a los reportados para el orden Lepidoptera por Siulapwa et al. (2014). En general, la adición de esta harina a los productos alimenticios procesados tiene el potencial de mejorar el contenido mineral de los alimentos y puede contribuir a mejorar las dietas de una población donde la fortificación de los alimentos es esencial.

3.1.4.2 Perfil de proteína (SDS-PAGE)

El tratamiento más efectivo para la extracción de proteínas fue utilizar la mayor concentración de urea (6 M) debido al efecto desnaturante de este compuesto. Los tres posibles mecanismos de acción de la urea son: interacciones directas de la urea con la proteína; efectos indirectos mediante la perturbación del entorno del disolvente para favorecer la solvatación de los residuos hidrofóbicos; y una combinación de efectos directos e indirectos (Bennion y Daggett, 2003). Los tamaños de las proteínas solubles de *A. armida* separadas por SDS-PAGE son similares a las proteínas encontradas en *Locusta migratoria* que oscilan entre 6 y 100 kDa, y a las proteínas de choque térmico (16, 26, 29, 70 y 82 kDa) en larvas de abeja (Brogan et al., 2021; Chacon-Almeida et al. 2000). Según la intensidad de los perfiles electroforéticos (Fig. 1), fueron abundantes las bandas ≤ 20 kDa. En particular, bandas que varían de 10 a 17 kDa son fuertemente visibles en *A. armida*, similares a las

reportadas por otros autores para larvas de *T. molitor*, que podrían corresponder a proteínas de hemolinfa a ~ 12 kDa (Yi et al., 2013). A continuación, se observaron bandas que van de 15 a 30 kDa, también reportadas por Yi et al. (2013), se planteó la hipótesis de que eran proteínas de la cutícula larvaria como proteínas similares a la quimotripsina (24 kDa). Otras bandas observadas alrededor de 60 kDa podrían pertenecer a β -glicosidasa (59 kDa), proteinasas similares a tripsina (59 kDa) y tipos de proteínas que participan en la melanización (65 kDa) (Yi et al., 2013). Bubler et al. (2016) y Brogan (2021) observaron hallazgos similares. . Otros tipos de proteínas que se pueden encontrar entre 40 a 100 kDa son la proteína muscular tropomiosina y altas cantidades de tubulina, que son responsables de la formación de los microtúbulos (Purschke et al., 2018). Finalmente, Annadurai et al. (1992) informaron que los polipéptidos dentro del rango de 14 a 94 kDa podrían ser para el cerebro, el cuerpo cardíaco, el ganglio subesofágico y la hemolinfa en especies como *S. gregaria*.

3.1.4.3 Propiedades físicas

El color es un factor crucial que influye en la aceptación de los insectos comestibles (Lucas-Gonzalez et al., 2019). Se han analizado la harina de algunos otros insectos, *G. belina*, *H. illucens* y *Macrotermes subhylanus*; estas especies han llamado la atención como fuentes alternativas de proteínas; de hecho, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) está considerando actualmente la mosca soldado-negra (*H. illucens*) como un ingrediente novedoso para su uso en alimentos (Vanqa et al., 2022). Estas harinas tuvieron valores más altos de luminosidad (57.95, 53.69, 43.52), contribución de rojo (3.92, 4.46, 5.72) y amarillo (20.02, 13.08, 12), respectivamente, que la harina de *A. armida*, esto puede estar relacionado con su diferente composición proximal.

3.1.4.4 Propiedades tecnofuncionales

3.1.4.4.1 Capacidad de retención de agua y aceite y calor específico

La capacidad de retención de agua (CRA) y la capacidad de retención de aceite (CRO) son propiedades tecnofuncionales importantes de ingredientes alimentarios como la harina, así como en el procesamiento y las aplicaciones en alimentos. Uno de los factores que afectan el

CRA y el CRO es el contenido de proteínas, ya que las proteínas tienen propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas para interactuar con el agua y el aceite de los alimentos. La cantidad de agua o aceite retenido afecta directamente la textura y sabor de los productos, especialmente en productos cárnicos y de panadería (Wang et al., 2021). Varios factores influyen en las propiedades de retención de agua de las harinas con alto contenido de proteínas, como la harina de *A. armida*, incluida la composición de aminoácidos, la conformación de las proteínas y la polaridad/hidrofobicidad de la superficie (Akpossan et al., 2014). Se observó un mayor CRA en HD, lo que puede estar relacionado con la mayor cantidad de proteínas y sus aminoácidos hidrófilos que pueden unirse a más moléculas de agua. En comparación, la harina de trigo tiene un CRA de 90.7%, la harina de avena 95.8% y la harina de soya 130% (Mesias y Morales, 2017). Por lo tanto, los CRO de ambas harinas de *A. armida* son más altos que las harinas de cereales comúnmente utilizadas y otras harinas de insectos comestibles como el saltamontes (*Zonoceros variegatus*) con 127%, por lo que pueden ser una opción para usar como ingrediente en productos de panadería o cárnicos (Aryee et al., 2018; Kim et al., 2017). El CRO es importante porque la grasa retiene el sabor y aumenta nuestra capacidad para saborear los alimentos (Vanqa et al., 2022). Los valores de CRO de HC y HD son menores en comparación con otras harinas de insectos, como *C. forda* (178.7%) y *T. molitor* (233%) (Omotoso, 2006). La capacidad de estas harinas para absorber y retener aceite puede mejorar la textura y la sensación en boca, potenciar el sabor y reducir la pérdida de grasa en productos alimenticios como carnes trituradas, análogos y masa horneada (Kisambra et al., 2015).

Tabla 4. Viscosidad de las harinas de *A. armida* a tres velocidades diferentes y propiedades de formación de espuma y emulsión a diferentes concentraciones de harina.

Tipo de harina	Concentración % (p/v)	Viscosidad			Formación de espuma y emulsión			
		η (cP)			Porcentaje (%)			
		150 rpm	200 rpm	250 rpm	CE	ES	CM	EM
HC	5	<0.01 ^e	<0.01 ^d	<0.01 ^d	NS	NS	94.44 ±0 ^a	92.43 ±0.6 ^c
	10	<0.01 ^e	<0.01 ^d	<0.01 ^d	NS	NS	93.75 ±6 ^a	100 ±0 ^a
	15	1.70±0.9 ^d	0.96±0.9 ^d	1.53±0.6 ^c	NS	NS	100 ±0 ^a	100 ±0 ^a
	20	4.27±0 ^c	3.20±0 ^c	2.30±0.6 ^c	NS	NS	100 ±0 ^a	100 ±0 ^a
HD	5	<0.01 ^e	<0.01 ^d	<0.01 ^d	24.60 ±0.7 ^c	89.43 ±2 ^a	83.33 ±0 ^b	100 ±0 ^a
	10	4.27±0 ^c	2.24±0.9 ^c	1.53±0.6 ^c	36.67 ±3 ^b	36.66 ±3 ^b	78.33 ±3 ^b	100 ±0 ^a
	15	17.07±0 ^b	11.20 ±0 ^b	7.68±0 ^b	NS	NS	100 ±0 ^a	100 ±0 ^a
	20	55.04±2 ^a	39.68±0.71 ^a	29.69±2 ^a	NS	NS	98.27 ±0.8 ^a	98.27 ±0.8 ^b
Control Caseína	3	-	-	-	68.75 ±6 ^a	90.06 ±6 ^a	83.33 ±0 ^b	100 ±0 ^a

Cada valor de viscosidad se presenta como la media ± DE (n=5). Los valores seguidos de una letra en superíndice diferente en cada columna son significativamente diferentes (p <0.05). CE, Capacidad de formación de espuma; ES, estabilidad de la espuma; CM, capacidad de emulsión; EM, estabilidad de la emulsión. NS, no mostró valores. Cada valor de capacidad de espuma y emulsión se presenta como la media ± DE (n=3). Los valores seguidos de una letra en superíndice diferente en cada columna son significativamente diferentes (p<0.05).

3.1.4.4.2 Viscosidad

La viscosidad es una propiedad importante que limita la concentración máxima en procesos como la evaporación y la ultrafiltración, e influye en la atomización de los productos antes del secado en algunos ingredientes alimentarios como harinas y productos lácteos (Morison et al., 2013).

Los resultados obtenidos mostraron que las harinas de *A. armida* se comportan como fluidos no newtonianos a medida que aumenta la concentración (15-20% para HC y 10-20% para HD) (Tabla 4). Este comportamiento no newtoniano es similar al observado en concentrados proteicos, concentrado de leche desnatada, leche condensada, nata y otros productos (da Silva y da Costa, 2017).

3.1.4.4.3 Capacidad y estabilidad de la espuma y emulsión

Las espumas son sistemas coloidales de dos fases que son una propiedad tecnofuncional crítica porque son importantes para la aceptación de muchos productos alimenticios por parte del consumidor. Para exhibir buenas propiedades espumantes, una proteína debe ser capaz de migrar rápidamente a la interfaz aire-agua, desplegarse y reorganizarse en la interfaz (Vanqa et al., 2022). La concentración y la presencia de grasa en la harina influyeron en ambas propiedades. La HC no mostró capacidad de formación de espuma; esto puede estar relacionado con su contenido de grasa debido a que se ha reportado que algunos aceites naturales y sus componentes como ácidos grasos son agentes antiespumantes (Kougias et al., 2013). Mientras tanto, la HD mostró capacidad de espuma a una concentración de 5-10% (p/v) con valores superiores a los reportados para insectos comestibles populares como el grillo africano (*Gryllidae sp.*) (6% CE y 3.05% ES) y *C. forda* (7.10% CE y 3% ES) (Hall et al., 2017; Omotoso, 2006). Comparando los resultados con la CE y ES de la caseína utilizada como control (68.75%), este estudio sugiere que *A. armida* HD (5-10%) podría ser deseable como agente espumante.

Una emulsión se compone de dos líquidos inmiscibles, uno disperso como gotas en el otro líquido que funciona como fase continua (Hu et al., 2017). Las diferencias

significativas de los valores de CM de la HC y HD respecto al control pueden deberse a la capacidad de los lípidos y proteínas presentes en la harina de *A. armida* para adsorberse en la interfaz, ya sea en forma individual o agregada, y por lo tanto son capaces de cumplir con los requisitos para funcionar como agente emulsionante (Lazzaro et al., 2017). La harina de *A. armida* es una opción interesante para usar como emulsionante debido a que hoy en día la industria alimentaria está buscando una alternativa sin huevo para usar en productos como mayonesa, aderezos para ensaladas, panadería, etc. (He et al., 2019). Estas harinas tuvieron mayor CM en comparación con algunos insectos comestibles estudiados en los últimos años como *G. belina*, *M. subhyllanus*, *H. illucens*, *S. gregaria* y *A. mellifera*, que reportaron valores de CM más bajos (20.8 a 67.33%) (Hall et al., 2017; Vanqa et al., 2022). La estabilidad de la emulsión de ambas harinas es mayor en comparación con la EM que muestran las harinas de arroz (37.31%), trigo (38.38%) y papa (41.92%), esto es importante cuando se utiliza como ingrediente en alimentos como productos cárnicos triturados, ensaladas, aderezos, postres helados y mayonesa (Chandra y Samsher, 2013).

La buena capacidad de emulsión y la estabilidad de la harina de *A. armida* resaltan el potencial para utilizarla de manera efectiva en emulsiones alimentarias.

3.1.5 Conclusión

Los resultados del presente estudio establecieron el potencial de las harinas comestibles del insecto *A. armida* como fuente de nutrientes, así como sus propiedades tecnofuncionales. Las harinas HC y HD son ricas en proteínas, un nutriente esencial necesario para la dieta humana. Los resultados obtenidos para las propiedades físicas y tecnofuncionales las clasifican con buenas características de fluidez, lo que hace que estas harinas sean valiosas para la industria alimentaria como un potencial fortificante. HD exhibió buena capacidad de retención de agua, propiedades de espuma y emulsión; estos valores son superiores a los de HC, esto la hace útil en la producción de alimentos como salchichas, sustitutos de la carne y productos de panadería. Antes de incorporarlas en formulaciones de productos alimenticios, son esenciales estudios futuros sobre la vida útil y las propiedades reológicas y estructurales de estas harinas. Estas harinas pueden recomendarse para el consumo general como alimento nutricional.

3.1.6 Referencias

- Amon Akpoussan, R., Dogoré Digbeu, Y., Djary Koffi, M., & N'Guessan Kouadio, P.E., Ahipo Dué, E., Lucien Kouamé, P. (2014). Protein fractions and functional properties of dried *Imbrasia oyemensis* larvae full-fat and defatted flours. *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 5(2), 116–126. <https://doi.org/10.9734/IJBCRR/2015/12178>
- Anaduaka, E. G., Uchendu, N. O., Osuji, D. O., Ene, L. N., & Amoke, O. P. (2021). Nutritional compositions of two edible insects: *Oryctes rhinoceros* larva and *Zonocerus variegatus*. *Heliyon*, 7(3), e06531.
- Annadurai, R. S., Oberthür, W., & Remboldm, H. (1992). High resolution two-dimensional mapping of tissue-specific polypeptides in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Electrophoresis*, 13(1), 456–458. <https://doi.org/10.1002/elps.1150130195>
- AOAC. (2008). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Aryee, A. N. A., Agyei, D., & Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. *Proteins in Food Processing*, 27–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00003-6>
- Bennion, B. J., & Daggett, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5142–5147. <https://doi.org/10.1073/pnas.0930122100>
- Beto, J. A. (2015). The role of calcium in human aging. *Clinical nutrition research*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.7762/cnr.2015.4.1.1>
- Beuchat, L. R. (1977). Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(2), 258–261. <https://doi.org/10.1021/jf60210a044>
- Brogan, E., Park, Y. L., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2021). Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silkworm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. *LWT- Food Science and Technology*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112314>
- Bubler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M., & Schluter, O. K. (2016). Recovery and techno functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*, 2(12), e00218.
- Caparino, O. A., Tang, J., Nindo, C. I., Sablani, S. S., Powers, J. R., & Fellman, J. K. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine “Carabao” var.) powder. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.010>

- Carr, R. L. (1965). Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*, 72(3), 163–168.
- Chacon-Almeida, V. M. L., Paulino-Simoes, Z. L., & Gentile-Bitondi, M. M. (2000). Induction of heat shock proteins in the larval fat body of *Apis mellifera* L. bees. *Apidologie*, 31, 487–501. <https://doi.org/10.1051/apido:2000141>
- Chandra, S., & Samsheer. (2013). Assessment of functional properties of different flours. *African Journal of Agricultural Research*, 8(38), 4849–4852. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.6905>
- Da Silva, V. B., & da Costa, M. P. (2017). Rheology Applied to Dairy Products. *Rheology: Open Access*, 1(2), e104.
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fiber in foods: A review. *Journal of Food Science Technology*, 49(3), 255–266. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0365-5>
- Dilworth, L. L., Riley, C. K., & Stennett, D. K. (2017). Plant constituents. *Pharmacognosy*, 61–80. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802104-0.00005-6>
- Doberman, D., Swift, J. A., & Fiel, L. M. (2017). Opportunities and hurdles of edible insects for food and feed. *Nutrition Bulletin*, 42, 293–308. <https://doi.org/10.1111/nbu.12291>
- Domian, E., & Cenkier, J. (2013). Flowability and homogeneity of food powders with plated oil ingredient. *Journal of Food Process Engineering*, 36, 626–633. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12026>
- Fellers, D. A., & Bean, M. M. (1977). Storage stability of wheat-based foods: A review. *Journal of Food Science*, 42(5), 1143–1147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb14446.x>
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2013). *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. Rome (pp. 1–29).
- Frigerio, J., Agostinetto, G., Galimberti, A., De Mattia, F., Labra, M., & Bruno, A. (2020). Tasting the differences: Microbiota analysis of different insect-based novel food. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109426>
- Gravel, A., Marciniak, A., Couture, M., & Doyen, A. (2021). Effects of hexane on protein profile, solubility and foaming properties of defatted proteins extracted from *Tenebrio molitor* Larvae. *Molecules*, 26(2), 351. <https://doi.org/10.3390/molecules26020351>
- Gupta, A., Sharama, S., Singh, B. (2018). Influence of Germination conditions on the Techno-functional Properties of Amaranth flour. In *Proceedings of the 2018 International Conference on Food Properties, Sharjah, United Arab Emirates*.
- Hall, F. G., Jones, O. G., & Ó Haire, M.E., Liceaga, A.M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Grylodes sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.138>
- He, Y., Shim, Y. Y., Mustafa, R., Meda, V., & Reaney, M. J. T. (2019). Chickpea cultivar selection to produce aquafaba with superior emulsion properties. *Foods*, 8(12), 685. <https://doi.org/10.3390/foods8120685>. MDPI AG.

- Hlongwane, Z. T., Slotow, R., & Munyai, T. C. (2020). Nutritional composition of edible insects consumed in Africa: A systematic review. *Nutrients*, *12*(9), 2786. <https://doi.org/10.3390/nu12092786>
- Hong, J., Han, T., & Kim, Y. Y. (2020). Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: A review. *Animals*, *10*(11), 2068. <https://doi.org/10.3390/ani10112068>
- Houmy, N., Melhaoui, R., Kodad, S., Zantar, S., & Elamrani, A. (2021). *Valorisation of cold-pressed almond oil's cake as raw material for the preparation of naturally gluten-free flour for specific food applications* (Vol. 240, p. 03004)..
- Hu, Y. T., Ting, Y., Hu, J., & Y., Hsieh, S.C. (2017). Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.021>
- Janssen, R. H., Vincken, J. P., van den Broek, L. A. M., & Foglinao, V. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 2275–2278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471>
- Kim, H. W., Setyabrata, D., Lee, Y., Jones, O. G., & Brad Kim, Y. H. (2017). Effect of house Cricket (*Acheta domesticus*) flour addition on physicochemical and textural properties of meat emulsion under various formulations. *Journal of Food of Science*, *82*(12), 2787–2793. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13960>
- Kim, T. K., Lee, J. H., Yong, H. I., Kang, M. C., Cha, J. Y., Chun, J. Y., & Choi, Y. S. (2022). Effects of defatting methods on the physicochemical properties of proteins extracted from *Hermetia illucens* larvae. *Foods*, *11*, 1400. <https://doi.org/10.3390/foods11101400>
- Kisambra, A., Muyonga, J. H., Byaruhanga, Y. B., Tukamuhabwa, P., Tumwegamire, S., & Gruneberg, W. J. (2015). Composition and functional properties of yam bean (*Pachyrhizus* spp.) seed flour. *Food and Nutrition Sciences*, *6*(8), 736–746. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.68076>
- Kougias, P. G., Tsapekos, P., Boe, K., & Angelidaki, I. (2013). Antifoaming effect of chemical compounds in manure biogas reactors. *Water Research*, *47*(16), 6280–6288. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.045>
- 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>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laroche, M., Perreault, V., Marciniak, A., Gravel, A., Chamberland, J., & Doyen, A. (2019). Comparison of conventional and sustainable lipid extraction methods for the production of oil and protein isolate from edible insect meal. *Foods*, *8*(11), 572. <https://doi.org/10.3390/foods8110572>
- Laurent, S., Jury, V., De Lamballerie, M., & Fayolle, F. (2022). Effect of two defatting processes on the physicochemical and flow properties of *Hermetia illucens* and

- Tenebrio molitor* larvae powders. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16853>
- Lazzaro, F., Saint-Jalmes, A., Violleau, F., Lopez, C., Gaucher-Delmas, M., Madec, M.-N., ... Gaucheron, F. (2017). Gradual disaggregation of the casein micelle improves its emulsifying capacity and decreases the stability of dairy emulsions. *Food Hydrocolloids*, 63, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.037>
- Lucas-González, R., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2019). Effect of drying processes in the chemical, physico-chemical, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from house cricket (*Acheta domestica*). *European Food Research and Technology*, 245, 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03301-4>
- Manikantan, M. R., Kingsly Ambrose, R. P., & Alavi, S. (2015). Flow-specific physical properties of coconut flours. *International agrophysics*, 29, 1–7. <https://doi.org/10.1515/intag-2015-000>
- Megido, R. C., Gierts, C., Blecker, C., Brostaux, Y., Haubruge, E., Alabi, T., & Francis, F. (2016). Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food Quality and Preference*, 52, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.05.004>
- Melo-Ruiz, V., Quirino-Barreda, T., Macín-Cabrera, S., Sánchez-Herrera, K., Díaz-García, R., & Gazga-Urioste, C. (2016). Nutraceutical effect of cuetlas (*Arsenura armida*, C.) edible insects as local food at Ixcaquixtla, Mexico. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 16, 423–428. <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2016.06.008>
- Mesias, M., & Morales, F. (2017). Effect of different flours on the formulation of hydroxymethylfurfural, furfural, and dicarbonyl compounds in heated glucose/flour systems. *Foods*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.3390/foods6020014>
- Mishyna, M., Martinez, 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>
- Mokrzycki, W. S., & Tatol, M. (2011). Colour difference ΔE -A survey. *Machine Graphics and Vision International Journal*, 20(4), 383–411. <https://doi.org/10.5555/3166160.3166161>
- Montowska, M., Kowalczewski, P.Ł., Rybicka, I., & Fornal, E. (2019). Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chemistry*, 289, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.062>
- Morison, K. R., Phelan, J. P., & Bloore, C. G. (2013). Viscosity and non-newtonian behaviour of concentrated milk and cream. *International Journal of Food Properties*, 16(4), 882–894. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.573113>
- Omotoso, O. T. (2006). Nutritional quality, functional properties, and anti-nutrient compositions of the larva of *Cirina forda* (Westwood) (Lepidoptera: Saturniidae).

- Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(1), 51–55. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.b0051>
- Purschke, B., Tanzmeister, H., Meinschmidt, P., Baumgartner, S., Lauter, K., & Jäger, H. (2018). Recovery of soluble proteins from migratory locust (*Locusta migratoria*) and characterization of their compositional and techno-functional properties. *Food Research International*, 106, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.067>
- Ramashia, S. E., Gwata, E. T., Meddows-Taylor, S., Anyasi, T. A., & Jideani, A. I. O. (2018). Some physical and functional properties of finger millet (*Eleusine coracana*) obtained in sub-Saharan Africa. *Food Research International*, 104, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.065>
- Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M., Vázquez, A. I., Landero, I., Oliva-Rivera, H., & Camacho, V. H. M. (2011). Edible Lepidoptera in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-7-2>
- Raza, N., Arshad, M. U., Anjum, F. M., Saeed, F., Maan, A. A., Bader, A., & H. b. (2019). Impact of drying methods on composition and functional properties of date powder procured from different cultivars. *Food Science and Nutrition*, 7(7), 2345–2352. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1081>
- Rodríguez-Miranda, J., Alcánta-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>
- Schulz, R., & Slavin, J. (2021). Perspective: Defining carbohydrate quality for human health and environmental sustainability. *Advances in Nutrition*, 12(4), 1108–1121. <https://doi.org/10.1093/advances/nmab050>
- Siulapwa, N., Mwambungu, A., Lungu, E., & Sichilima, W. (2014). Nutritional value of four common edible insects in Zambia. *International Journal of Science and Research*, 3(6), 876–884.
- Song, Y. S., Kim, M. W., Moon, C., Seo, D. J., Han, Y. S., Jo, Y. H., ... Jung, W. J. (2018). Extraction of chitin and chitosan from larval exuvium and whole body of edible mealworm, *Tenebrio molitor*. *Entomological research*, 48, 227–233. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12304>
- Tao, J., & Li, Y. O. (2018). Edible insects as a means to address global malnutrition and food insecurity issues. *Food Quality and Safety*, 2, 17–26. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy001>
- US National Toxicology Program. (2021). *Report on Carcinogens, Fifteenth Edition: Arsenic and Inorganic Arsenic Compounds*. Research Triangle Park, NC: US Department of Health and Human Services, Public Health Service. <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/arsenic.pdf>

- Vanqa, N., Mshayisa, V. V., & Basitere, M. (2022). Proximate, physicochemical, techno-functional, and antioxidant properties of three edible insect (*Gonimbrasia belina*, *Hermetia illucens* and *Macrotermes subhylanus*) flours. *Foods*, *11*(7), 976. <https://doi.org/10.3390/foods11070976>
- Wang, J., Jousse, M., Jayakumar, J., Fernández-Arteaga, A., de Lamo-Castellví, S., Ferrando, M., & Güell, C. (2021). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein concentrates as a sustainable source to stabilize o/w emulsions produced by a low-energy high-throughput emulsification technology. *Foods*, *10*, 1048. <https://doi.org/10.3390/foods10051048>
- Weaver, C. M. (2013). Potassium and health. *Advances in Nutrition*, *4*(3), 368S–377S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003533>
- Yi, L., Lakemond, C. M. M., Sagis, L. M. C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., & van Boekel, M. A. J. S. (2013). Extraction and characterization of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*, *141*(4), 3341–3348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.115>
- Zielinska, E., Baraniak, B., Karas, M., Rybczynska, K., & Jakubczyk, A. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*, *77*, 460–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.008>

3.2 Aislamiento de mezclas de péptidos con potencial bioactivo a partir del hidrolizado de proteínas de las larvas de *Arsenura armida*

Resumen

Este estudio explora el uso de insectos como fuente de proteínas de alta calidad rica en péptidos bioactivos para la nutrición humana. Los objetivos incluyen establecer condiciones óptimas para la extracción de péptidos, identificar sus secuencias y evaluar su potencial como antioxidantes y agentes antimicrobianos en la harina de *Arsenura armida*. El contenido de proteína en el extracto de harina de *A. armida* fue del 54%. Para obtener péptidos como potenciales agentes antioxidantes y antimicrobianos, se empleó una relación enzima (pepsina)/sustrato de 10:1 y 1:1, con tiempos de digestión de 2 h (A2) y 1 h (A4), respectivamente. El valor de CI_{50} para el ensayo antioxidante DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) fue de 22.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para A2. En el ensayo antioxidante in vivo con *Caenorhabditis elegans*, los péptidos A2 en concentraciones de 0.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ exhibieron un porcentaje de supervivencia que oscilaba entre 32.6% y 35.3%. La muestra A4 demostró la mayor actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*) con valores de MIC (concentración mínima inhibidora) de 0.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y MBC (concentración mínima bactericida) de 0.23 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ambos. El análisis de péptidos reveló que A2 contenía péptidos con actividades antihipertensivas (37%) y antioxidantes (58%) identificadas, mientras que A4 comprendía péptidos con propiedades antihipertensivas (62%), antioxidantes (31%) y antimicrobianas (2%). Los péptidos antimicrobianos identificados a través de la base de datos BIOPEP fueron LFGF y FLLF. Esta investigación subraya el potencial de los péptidos de *A. armida* como componentes valiosos en alimentos funcionales o nutracéuticos, ofreciendo beneficios para la salud más allá de la nutrición básica.

3.2.1. Introducción

Según las Naciones Unidas, se espera que la población mundial crezca hasta casi 9.700 millones de personas en 2050, un hecho que exigirá un aumento en la producción de alimentos y piensos (Quah et al., 2023). Derivado de esto se necesita una solución sostenible, como es el caso de la entomofagia, que ha ido ganando relevancia en los últimos años (Teixeira et al., 2023). En este sentido, la Organización para la Agricultura y la Alimentación promueve los insectos comestibles como fuente de alimento, y se han informado que se reconocen más de 2000 especies de insectos comestibles (Quah et al., 2023).

Aunque la composición nutricional de los insectos varía considerablemente según la especie, la etapa de desarrollo, las condiciones ambientales y la alimentación, generalmente se les considera una fuente importante de proteínas de alta calidad con un contenido equilibrado de aminoácidos (Kouřimská y Adámková, 2016). Prueba de ello es el gran número de publicaciones de los últimos años (Amarender et al., 2020; Brogan et al., 2021; Eleftherianos et al., 2021; Zielińska et al., 2021). Sin embargo, investigaciones recientes contribuyen a los beneficios para la salud del consumo de insectos al resaltar no solo su valor nutricional sino también su bioactividad peptídica. Esto se atribuye a su alto contenido de proteínas, que oscila entre el 7 y el 91 %, lo que los convierte en una valiosa fuente de péptidos biológicamente activos. Se ha demostrado que estos péptidos ofrecen diversos efectos beneficiosos para la salud humana, incluidas propiedades antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, antidiabéticas, antiobesidad y antiinflamatorias, entre otras (Teixeira et al., 2023; Zielińska et al., 2020). El creciente interés por los péptidos bioactivos derivados de insectos que han sido denominados “nuevo alimento” por la Comisión Europea según el Reglamento (UE) 2015/2883 y esto ha llevado a la comunidad científica a explorar sus aplicaciones en la salud humana tal como el impacto positivo en las funciones corporales (Iriti y Vitalini, 2022; Van Huis, 2016).

Los péptidos bioactivos con beneficios para la salud humana suelen oscilar entre dos y veinte residuos de aminoácidos, y la secuencia y composición determinan su actividad. La hidrólisis de proteínas es un proceso crucial para extraer péptidos biológicamente activos de las proteínas de los insectos. Estudios recientes se han centrado en identificar la forma más

eficaz de purificar péptidos bioactivos para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica (Bhandari et al., 2020; Ferrazzano et al., 2023). Los péptidos bioactivos pueden desempeñar funciones importantes en diferentes sistemas fisiológicos. En el sistema cardiovascular pueden actuar como agentes antihipertensivos al inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Sánchez & Vázquez, 2017). En el sistema inmunológico, exhiben propiedades anticancerígenas al suprimir la proliferación del ciclo celular e inducir la apoptosis en células cancerosas (Bhandari et al., 2020). Además, diferentes péptidos bioactivos procedentes de insectos han demostrado efectos antidiabéticos al inhibir enzimas como la α -amilasa, la α -glucosidasa y la dipeptidil peptidasa IV (DDP-IV), suprimiendo los picos de glucosa posprandial contrarrestando la hiperglucemia. Estos ejemplos representan una nueva generación de reguladores bioactivos (Apostolopoulos et al., 2021; Ferrazzano et al., 2023). Sin embargo, a pesar de esta nueva información, se ha estudiado un número limitado de insectos comestibles en busca de propiedades bioactivas (Teixeira et al., 2023).

En todo el mundo, el gusano de seda (*Bombyx mori*) de la familia Lepidoptera es la especie más estudiada entre varios insectos comestibles (Nongonierma y FitzGerald, 2017). Se ha demostrado que sus péptidos exhiben efectos antihipertensivos, antioxidantes, antidiabéticos e inmunomoduladores. En este sentido, los antioxidantes juegan un papel esencial en la prevención de procesos degenerativos porque varios estudios han demostrado que los péptidos antioxidantes tienen efectos protectores contra las especies reactivas de oxígeno y pueden contribuir a una reducción significativa del nivel de estrés oxidativo (Zielińska et al., 2018).

Los AMP o péptidos antimicrobianos (AMP) son un grupo variado de moléculas. Son componentes indispensables de la inmunidad innata de los insectos y son una especie de péptidos de secuencia corta (menos de 50 residuos de aminoácidos), que tienen un amplio espectro de actividad contra virus, bacterias, hongos y parásitos (Sánchez & Vázquez, 2017; Stączek et otros, 2023). Por lo tanto, los AMP de insectos se consideran una fuente importante de agentes antimicrobianos potenciales en aplicaciones alimentarias, tienen efectos positivos sobre la inmunidad congénita de las células huésped y están involucrados

en los sistemas de defensa inmune de los humanos. También desempeñan funciones importantes en la defensa inmune innata, la inducción de quimiocinas, la quimiotaxis y la inflamación (Liu et al., 2019).

A pesar de la temprana aceptación de la entomofagia en México, no existen suficientes estudios que identifiquen péptidos bioactivos en insectos comestibles consumidos tradicionalmente en algunas regiones. *Arsenura armida* es una mariposa consumida en su estado larvario en Huaquechula, Puebla, comúnmente conocida como Cuetlas, es uno de los insectos más apreciados y consumidos en esta región, y se puede encontrar en temporada de verano en el árbol de Jonote (*Heliocarpus appendiculatus*) (Cortazar-Moya et al., 2023; Melo-Ruíz et al., 2016). Esta investigación tuvo como objetivo establecer las condiciones para la obtención de péptidos bioactivos a partir de harina de *A. armida*, identificar su secuencia y evaluar su potencial como agente antioxidante y antimicrobiano.

3.2.2 Materiales y métodos

3.2.2.1 Aislamiento de la proteína de la harina de A. armida

Se recolectaron larvas de *A. armida* de árboles de Jonote en Huaquechula, Puebla, México (18°45'16.6"N 98°34'16.4"W) en agosto de 2020. Las larvas de *A. armida* recolectadas se lavaron cinco veces con agua destilada (1 :5 p/v) para obtener harina de larvas. Luego del lavado, se secaron en estufa (Felisa, México) durante 12 h a 55°C hasta peso constante, y luego se pulverizaron durante 12 s a 10,000 rpm utilizando un Nutribullet® hasta homogeneizar la textura (para obtener 100 g de harina, se necesitan aproximadamente 105 larvas secas). El proceso de eliminación de grasa se realizó mediante el método de extracción por solvente semicontinuo Soxhlet (AOAC 960.39), utilizando hexano como solvente.

Luego, la harina desgrasada se suspendió en un tampón pH 7.5 (NaCl 0.2 M, Tris-HCl 20 mM y urea 6 M; harina/tampón, 1:10, p/v) y se dejó en un mezclador de rodillos de tubo a 4 °C durante 24 h, después la suspensión se centrifugó a 7,850 g durante 15 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se realizó un segundo ciclo de extracción utilizando el pellet. Ambos sobrenadantes se combinaron y se dializaron utilizando una membrana de celulosa de 43 mm en 500 ml de una solución con urea 3 M, NaCl 0.2 M, tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, durante 1 h a 22 °C. Este proceso se repitió para disminuir la concentración de urea

a 1 M, 0.25 M y 0 M, hasta que se eliminó la urea presente. Finalmente, se aplicaron dos ciclos de diálisis con 500 ml de tampón NaCl 0.2 M y Tri-HCl 20 mM, pH 7.5. Luego, la solución se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior. La proteína total se determinó mediante el método micro-Kjeldahl 945.01 (AOAC, 2008) con modificaciones menores como se describe en trabajos anteriores (Cortazar-Moya et al., 2023)

3.2.2.2 Digestión de la proteína

La digestión de la proteína de *A. armida* se realizó con pepsina porcina (≥ 400 unidades/mg de proteína) (Sigma-Aldrich) en tampón citrato fosfato (Na_2CO_3 0.5 M, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.09 M) pH 2.4 a 0.75 mg/mL de proteína. Se probaron tres relaciones diferentes enzima/sustrato (10:1, 1:1, 1:10 p/p) (Tabla 5). La mezcla se dejó en un agitador de rodillos (Cole-Parmer SRT6D, Fisher Scientific, UK) a 30 rpm, 37 °C durante 3 h, cada hora se tomaron alícuotas de todas las proporciones y luego se filtró usando filtros Amicon® Ultra de 15 mL, con membranas de corte de peso molecular (PM) de 10 kDa (EMD Millipore; Billerica, MA, EE. UU.), se centrifugaron a 7,850 g durante 40 min. Finalmente, los filtrados resultantes se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Tabla 5. Condiciones probadas y muestras obtenidas de la digestión con pepsina de proteínas extraídas de la harina de *A. armida*.

ID muestra	Relación enzima: sustrato	Tiempo de Digestión (h)
A1	1:10	1
A2	1:10	2
A3	1:10	3
A4	1:1	1
A5	1:1	2
A6	1:1	3
A7	10:1	1
A8	10:1	2
A9	10:1	3

3.2.2.3 Actividad antioxidante

3.2.2.4.3.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) y determinación de IC₅₀

La actividad antioxidante se determinó mediante dos métodos, ensayos de radicales DPPH⁺ y ABTS⁺. El método DPPH se realizó según el procedimiento reportado por Jiménez-González et al. (2023) y se realizó a todas las muestras (A1-A9). Brevemente, se mezclaron 20 µl de cada muestra (1 µg/µl) con 200 µl de solución etanólica de DPPH (0.1 mM) en una microplaca. Las mezclas se homogeneizaron utilizando la función de agitación de un espectrofotómetro UV-Vis Multiskan Sky Microplate (Thermo Scientific, Singapur). Después de la incubación en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 517 nm. Se incluyó un control negativo con proteína no digerida. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La capacidad antioxidante se reportó como mg de equivalente de Trolox (TE)/100 mg de muestra, ya que Trolox es una sustancia química estándar para comparar la actividad antirradical. Para este propósito, i) se estimó el % de inhibición de los péptidos utilizando la ecuación (1) donde Abs_{DPPH} es la absorbancia del DPPH reactivo sin la muestra, Abs_s es la absorbancia de cada muestra con DPPH después de 30 min, y DF es el factor de dilución.

$$Inhibición \% = \frac{Abs_{DPPH} - Abs_s}{Abs_{DPPH}} \times 100$$

Ec. (1)

ii) Se construyó una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de Trolox (0 – 200 ppm) (Ec. 2). iii) El % de inhibición para cada concentración de Trolox se representó en función de su concentración (x).

$$Inhibición \% = 0.4739x - 1.2876$$

Ec. (2)

iv) La ecuación de regresión lineal de la curva de calibración (Ec. 2) se utilizó para calcular la capacidad de actividad antioxidante reemplazando el % de inhibición de cada muestra (péptido y control negativo) (Ec. 3).

$$\text{Actividad antioxidante} \left(\frac{\text{mg TE}}{\text{g}} \right) = \left(\frac{\text{Inhibición \%} - 1.2876}{0.4739} \right) \times DF \quad \text{Ec. (3)}$$

Para obtener el valor IC₅₀, definido como la concentración necesaria para disminuir la actividad oxidante al 50%, se emplearon diferentes concentraciones de péptidos. Los cambios en el % de inhibición (ecuación 2) se representaron frente a las concentraciones de péptidos. El valor de IC₅₀ se calculó sólo en la muestra con mayor actividad antioxidante.

3.2.2.4.3.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico))

El segundo método utilizado para determinar la actividad antioxidante en todas las muestras (A1-A9) ocupa el radical ABTS⁺, siguiendo la metodología propuesta por Gómez-García et al. (2022) con algunas modificaciones. Primero, se preparó el radical ABTS⁺ (ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2.45 mM, en proporción 1:1) y se dejó incubar durante un mínimo de 16 h en la oscuridad a temperatura ambiente (22 °C). Luego, se mezclaron 15 µL de cada muestra (1 µg/µL) con 200 µL de solución ABTS y se mantuvieron durante 6 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 750 nm con un lector de microplacas (Multiskan Sky, Thermo Scientific, Singapur). Se incluyó un control negativo con proteína no digerida. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los resultados se expresaron como mg TE/100 mg de muestra. i) Los valores de absorbancia de la muestra y la solución ABTS se usaron para calcular el porcentaje de inhibición (Ec. 4), donde Abs_{ABTS} es la absorbancia del ABTS reactivo sin la muestra, Abs_{SS} es la absorbancia de cada muestra y mezcla de ABTS después de 6 minutos, y DF es el factor de dilución.

$$\text{Inhibición \%} = \frac{Abs_{ABTS} - Abs_{SS}}{Abs_{ABTS}} \times 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

ii) Se construyó una curva estándar con Trolox a diferentes concentraciones (Ec. 5). Se calculó y representó el porcentaje de inhibición de la absorbancia en función de la

concentración de antioxidantes (Trolox para el estándar). iii) Se obtuvo la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración para utilizarla en cálculos posteriores.

$$\text{Inhibición \%} = 0.1035x - 2.52 \quad \text{Ec. (5)}$$

iv) La ecuación 5 se utilizó para obtener actividad antioxidante (Ecuación 6). El % de inhibición de cada muestra se usó para reemplazarlo en la ecuación.

$$\text{Actividad antioxidante} \left(\frac{\text{mg TE}}{\text{g}} \right) = \left(\frac{\text{Inhibición \%} - 2.52}{0.1035} \right) \times DF \quad \text{Ec. (6)}$$

3.2.2.4.3.3 Ensayo *in vivo* con *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un organismo que suele vivir en el suelo y se alimenta de bacterias y otros microorganismos. Debido a su pequeño tamaño, anatomía simple, corta vida útil, estructura única, fácil reproducción y genoma completamente secuenciado, se utiliza como modelo biológico en la investigación científica. Este organismo sirve como un modelo importante para investigar una variedad de procesos diferentes, como la capacidad antioxidante, la toxicidad de los alimentos, los compuestos bioactivos y más (Lozada-Ramírez et al., 2023). En este ensayo se utilizó como modelo biológico el nematodo *C. elegans* (cepa N2, tipo salvaje Bristol), alimentado con la bacteria uracilo auxotrófica *Escherichia coli* OP50 de crecimiento en caldo Luria Bertani (LB); ambos organismos fueron obtenidos a través del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de las Américas Puebla. Siguiendo el método reportado por González-Peña et al. (2021), los nematodos se mantuvieron a 22 ± 2 °C en placas de medio de crecimiento de nematodos (NGM) (60 x 15 mm) (12 mL) inoculadas previamente con 200 µL de *E. coli* OP50 (10^8 UFC/mL) como fuente de alimento. Luego, cada 5 a 7 días, las placas se lavaron con 2 ml de tampón M9 (Na₂HPO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 85 mM, MgSO₄ · 7H₂O 0,8 mM), luego se centrifugaron a 6,000 g a 4 °C durante 1 min (centrífuga Sorvall ST 8R, Thermo Fisher Scientific, Alemania) y transferidos a placas frescas con NGM.

La sincronización de nematodos es esencial para realizar observaciones comparables en ensayos *in vivo*. Para lograr la sincronización se utiliza una solución alcalina de

hipoclorito. Esta solución aprovecha la vulnerabilidad de los adultos maduros al hipoclorito, lo que provoca su disolución, mientras que los embriones quedan protegidos por la cáscara del huevo y permanecen ilesos (Lozada-Ramírez et al., 2023). Para la obtención de los huevos del nematodo, los gusanos se tomaron en estado adulto (72 h), se lavaron con tampón M9 para eliminar las bacterias y se centrifugaron a 6,000 g y 4 °C durante 1 min (centrífuga Sorvall ST 8R, ThermoFisher Scientific, Alemania). Después de retirar el sobrenadante, se añadió 1 ml de solución M9 y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante una vez más y se añadió 1 ml de NaOH 1 M. Luego, la mezcla se agitó con un vórtex (Vortex-Genie 2 G560, Scientific Industries, EE. UU.) durante 30 segundos y luego se centrifugó en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de NaOH 1 M y 500 µL de NaOH 1 M: NaClO al 5% (60:40 v/v); Luego se agitó en vórtice durante 60 segundos y se centrifugó en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante, se lavó dos veces con 1 ml de solución M9 y se centrifugó entre cada lavado, aumentando la velocidad de centrifugación a 7,400 g. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y el residuo con los huevos de los nematodos se colocó en nuevas placas NGM con *E. coli* OP50 fresca. Las placas se incubaron a 22 ± 0.2 °C (González-Peña et al., 2021).

Los nematodos sincronizados se utilizaron para el ensayo antioxidante *in vivo*. Para ello, se planificó la suplementación alimenticia de *C. elegans* utilizando los péptidos. El ensayo biológico consistió en el crecimiento de huevos de *C. elegans* en los siguientes grupos: (a) grupo control, NGM con *E. coli*; (b) NGM con *E. coli* suplementada con 0.75 µg/µL y 1.5 µg/µL de péptidos de harina de *A. armida* de la muestra A2; (c) NGM con *E. coli* suplementada con 225 µg/mL de Trolox como antioxidante (control positivo). Los nematodos *C. elegans* se cultivaron en esas condiciones durante 48 h, luego se transfirieron a placas nuevas con 400 µM de juglona (5 hidroxí-1,4-naftoquinona; Sigma-Aldrich, México) como agente oxidante. Para este ensayo, se utilizaron 22 ± 3 nematodos por placa y el ensayo se realizó por duplicado. Se contaron los nematodos que sobrevivieron en todos los grupos analizados cada hora hasta un total de siete horas. Los nematodos se consideraban muertos cuando no se observaba respuesta a un estímulo provocado por un asa de platino.

3.2.2.4 Ensayo antimicrobiano

3.2.2.4.1 Cepas bacterianas, medio de cultivo, condiciones de crecimiento y péptidos

Las cepas modelo utilizadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), *Listeria monocytogenes* (Scott A) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), todas las cepas se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de las Américas Puebla (Puebla, México). Las cepas modelo se reactivaron en caldo de soya tripticaseína (TSB, Bioxon BD, México) y se incubaron a 37 ± 1.0 °C durante 24 h (Arrijoja-Bretón et al., 2020). Los péptidos analizados corresponden a las muestras A1-A9.

3.2.2.4.2 Método por difusión en pocillo

Las muestras A1-A9 fueron evaluadas para medir su potencial actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en pozos de agar reportado por Arrijoja-Bretón et al. (2020) con modificaciones menores. Las cepas modelo se cultivaron en 10 ml de Caldo Soya tripticaseína (TSB, Bioxon BD, México) y se incubaron a 37 ± 1.0 °C durante 24 h hasta una concentración inicial de 10^8 UFC/mL, luego se realizaron una serie de diluciones hasta una concentración final de 10^4 UFC/mL, excepto *S. aureus* (ATCC 25923) 10^3 UFC/mL, luego se utilizó 0.1 mL de cada cultivo de las bacterias modelo y se extendió en placas de Agar (TSA). Se perforaron cuatro pocillos (de 9 mm de diámetro) en cada placa y se llenaron con 200 μ l (0.75 μ g/ μ l de proteína) de cada muestra (A1-A9). Como controles se utilizaron 200 μ L de proteína no digerida (0.75 μ g/ μ L) y la solución tampón. Las muestras de péptidos y la proteína no digerida se resuspendieron en agua Milli-Q. Las placas se incubaron a 37 °C \pm 1.0 °C durante 24 h. Cada experimento se realizó por duplicado. Se observó el crecimiento bacteriano y se midió el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento alrededor de los pocillos (mm) (incluido el pocillo) con un calibrador vernier digital (Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japón).

3.2.2.4.3 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se definió como la concentración mínima de péptidos a la que no se observó crecimiento microbiano (no se observó turbidez en el pozo). El ensayo se realizó con la muestra con mayor sensibilidad de la prueba de detección de la Tabla 7 (A4) que tenía 16.04 ± 0.23 mm de inhibición contra *S. aureus* y 14.38 ± 1.07 mm contra *L. monocytogenes*. El método se realizó según Arrijoja-Bretón et al. (2020) con modificaciones menores. Para el ensayo se utilizó un volumen de 25, 50 y 75 μL con una concentración de 0.11, 0.23 y 0.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de péptidos respectivamente. Las cepas bacterianas (*L. monocytogenes* y *S. aureus*) se cultivaron a 37 ± 1 °C durante 18 h, desde una concentración inicial de aproximadamente 10^8 UFC/mL, después se realizaron diluciones seriadas hasta una concentración final de 10^4 UFC/mL, luego 50 μL de las suspensiones bacterianas se agregaron a cada pocillo para lograr una concentración final de $\approx 1 \times 10^3$ UFC/mL, se usó caldo de soya tripticaseína y agua estéril para alcanzar un volumen final de 200 μL por pocillo. Se utilizó un control positivo con nisina (2.5 $\text{mg}/\mu\text{L}$) y un control negativo (sin agente inhibidor) con las cepas bacterianas (Shin et al., 2016). Las microplacas se incubaron a 37 ± 1 °C durante 24 h y la absorbancia se midió a 630 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El MBC de los péptidos se obtuvo añadiendo 50 μL de soluciones de los pocillos donde no se observó crecimiento en placas de agar soya tripticaseína. El valor de MBC correspondió a la concentración más baja de péptidos con subcultivos negativos después de la incubación a 37 ± 1 °C durante 48 h. Estas determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

3.2.2.5 Identificación de péptidos

Las muestras A2 y A4, que exhibieron las mayores actividades antioxidantes y antimicrobianas, respectivamente, se sometieron a análisis con espectrómetro de masas (LC-MS/MS) para la identificación de péptidos. Para esto, ambas muestras de hidrolizado de pepsina se fraccionaron utilizando un sistema RSLC UltiMate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA) y se interconectaron con un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo-Fisher Scientific, San José, CA) equipado con un sistema “EASY Spray” Fuente de

nanoiones” (Thermo-Fisher Scientific, San José, CA). El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización positiva con el voltaje de nanopulverización establecido en 3,5 kV y una temperatura de fuente de 280 °C. Para la identificación de péptidos y el análisis estadístico, los datos sin procesar se analizaron utilizando el software PEAKS Studio 11 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canadá) con la base de datos de secuencias de la superfamilia Bombycoidea (164,697 descargadas el 6 de junio de 2023) de la base de datos de proteínas NCBI. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: digestión proteolítica con pepsina a pH 2, oxidación de metionina y desamidación de asparagina/glutamina como modificaciones dinámicas, masa precursora de 20 ppm y ion fragmento de 0.5 Da como tolerancias. Todos los péptidos con puntuación ALC > 90 % se consideraron secuenciados correctamente y, utilizando este criterio, se buscó manualmente cada péptido en la base de datos BIOPEP-UWM (Minkiewicz et al., 2019) para determinar si poseían o no alguna de las bioactividades como se analizó anteriormente (antioxidante o antimicrobiana).

3.2.2.6 *Análisis estadístico*

Antes de realizar el análisis estadístico, era importante evaluar la normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza para garantizar que se cumplieran los supuestos subyacentes a las pruebas estadísticas elegidas. Para verificar la normalidad de la distribución se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se reportaron las medias y las desviaciones estándar (DE) de todas las determinaciones realizadas por duplicado y triplicado. Los datos se analizaron mediante la prueba ANOVA y rutinas de comparación de medias (Tukey, $p < 0.05$). Los ensayos de supervivencia de *C. elegans* se analizaron utilizando la metodología de Kaplan-Meier y la prueba de rangos logarítmicos para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico Minitab (versión 18, Minitab Inc., EE. UU.).

3.2.3 Resultados y discusión

3.2.3.1 Digestión de la proteína

Los aminoácidos que componen los péptidos bioactivos suelen ser inertes en su proteína original (Najafian y Babji, 2014). Para tener efectos funcionales, deben liberarse de la secuencia de proteínas mediante hidrólisis enzimática, fermentación microbiana (acción proteolítica de los microorganismos) o mediante hidrólisis química ácida y alcalina (extracción con solventes) (Lemes et al., 2016). La bioactividad de los hidrolizados de proteínas está influenciada por diferentes factores, incluidas las condiciones de hidrólisis, el tipo de enzima utilizada, la configuración y secuencia de los péptidos y la composición de aminoácidos. Estos factores están estrechamente relacionados con la actividad de los hidrolizados, como son sus capacidades antimicrobianas y antioxidantes, que juegan un papel importante en su bioactividad (Borrajo et al., 2019).

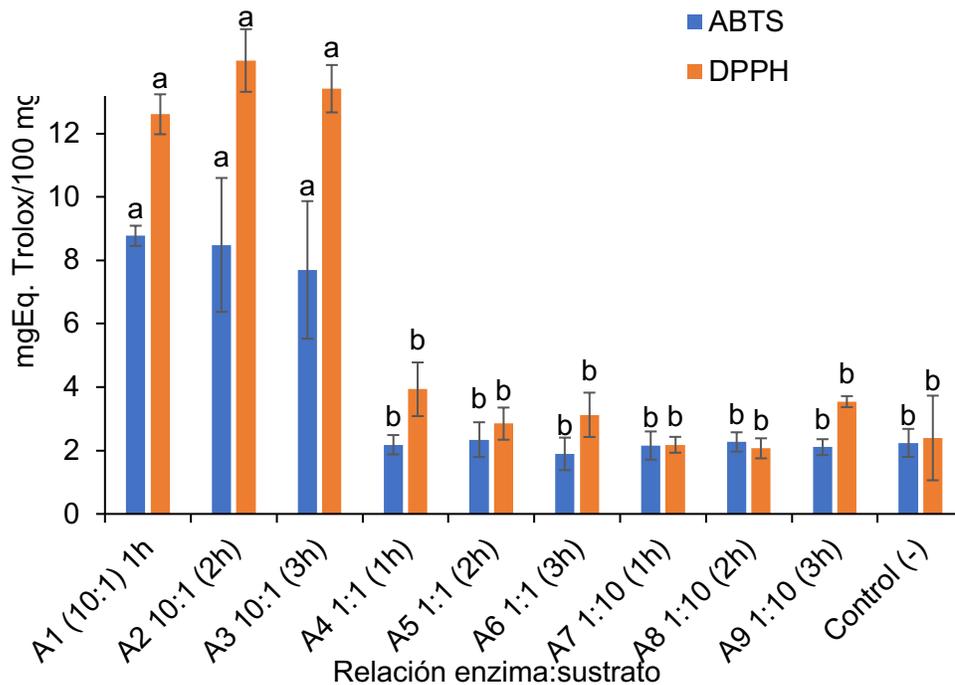
El contenido de proteína total cuantificado en el extracto de harina de *A. armida* fue del 54%, lo que lo clasificó como un concentrado de proteína según el informe de Zhong y Jin (2008), donde los concentrados de proteína de suero son productos comerciales con un contenido de proteína del 25% al 80%, y los aislados de proteínas suelen tener más del 90% de proteína. En este trabajo se realizó la hidrólisis enzimática del concentrado proteico de *A. armida* utilizando tres diferentes relaciones enzima/sustrato (E/S) y diferentes tiempos para evaluar las diferencias que ocurren en este amplio rango de hidrólisis y bioactividades, para encontrar la muestra con la mayor bioactividad antioxidante y antimicrobiana. Otros estudios han reportado el uso de un rango de relación estrecho que puede limitar las observaciones de los efectos de esta variable en la obtención de péptidos con bioactividad (Hall et al., 2018; Sousa et al., 2020).

3.2.3.2 Actividad antioxidante

3.2.3.2.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) y determinación de IC_{50}

Los radicales $DPPH^+$ y $ABTS^+$ tienen una absorbancia característica a 515 y 734 nm, respectivamente, esta absorbancia cambia después de su reducción por un compuesto antirradical (AH). La reducción de $DPPH^+$ y $ABTS^+$ se puede controlar midiendo la disminución de la absorbancia durante la reacción. Los métodos son simples, precisos y económicos, lo cual es importante en una investigación de detección (Shalaby y Shanab, 2013).

a)



b)

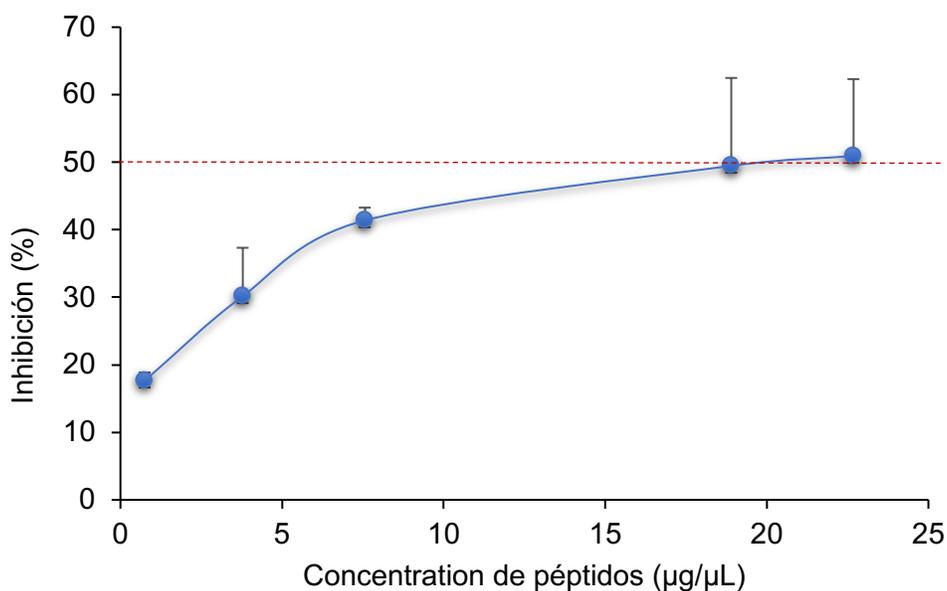


Figura 4. Actividad antioxidante de péptidos obtenidos del concentrado proteico de *A. armida*. a) Actividad antioxidante de los péptidos A1-A9 de *A. armida* frente a los radicales DPPH⁺ y ABTS⁺. Cada valor se presenta como la media ± DE (n=3). Los valores seguidos de una letra diferente en cada barra del mismo color son significativamente diferentes (p<0.05). b) Porcentaje de inhibición de la muestra A2 frente a DPPH⁺ y el valor de IC₅₀.

La actividad antioxidante de todas las muestras obtenidas (A1-A9) y el control negativo con proteína no digerida se probaron *in vitro* utilizando los métodos ABTS⁺ y DPPH⁺; los resultados se muestran en la Figura 4a. Como se puede observar, todas las muestras tuvieron un efecto antioxidante con ambos radicales DPPH⁺ y ABTS⁺. La relación enzima/sustrato tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la actividad antioxidante de los péptidos de *A. armida*. Las muestras A1-A3 tuvieron la mayor actividad antioxidante contra DPPH⁺ y ABTS⁺ con un valor máximo de 14.30 mg Eq. Trolox/100 mg (muestra A2) y 8.77 mg Eq. Trolox/100 mg (muestra A1), respectivamente. El tiempo de digestión no tuvo efecto significativo ($p > 0.05$) entre las muestras. La diferencia en los patrones de captación de ABTS⁺ y DPPH⁺ podría deberse a la afinidad de ABTS⁺ por péptidos hidrofílicos, mientras que los péptidos hidrofóbicos pueden interactuar fácilmente con radicales peroxilo, como DPPH⁺, lo que nos puede llevar a suponer que las muestras analizadas tienen más péptidos hidrofóbicos (Jiang et al., 2018; Vanqa et al., 2022). Respecto a las muestras A4-A9, la menor capacidad antioxidante puede estar relacionada con el grado de hidrólisis y el tipo de grupo de aminoácidos liberados con esas condiciones, estudios previos han reportado que la actividad bioactiva depende del número de enlaces peptídicos hidrolizados, concentración del sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación, demostrando así que las condiciones de digestión de las muestras A4-A9 no son las adecuadas para la obtención de péptidos antioxidantes (López-García et al., 2022; Zhao & Liu, 2023).

La muestra A2 presentó la mayor capacidad inhibidora contra el radical DPPH⁺, y esta misma muestra se utilizó para determinar la IC₅₀, cabe señalar que la muestra A2 contiene una mezcla de péptidos no purificados, y los péptidos que se mencionan a continuación como referencia son péptidos purificados. Los resultados mostraron un valor de IC₅₀ de 22.5 µg/µL (Fig. 4b), que se acerca al valor informado por Quah et al. (2023), quienes observaron un valor de IC₅₀ de 8.73 µg/µL para un péptido (KVEGDLK) aislado de *Grylloides sigillatus*. Estos resultados son inferiores a los reportados para el péptido FDPFPK, que es uno de los péptidos antioxidantes más potentes que se encuentran en los insectos. Este péptido se aisló de langostas (*Schistocerca gregaria*) y mostró una fuerte capacidad de eliminación de ABTS⁺ y DPPH⁺ con valores de IC₅₀ de 0.08 y 0.35 µg/µL, respectivamente

(Zielińska et al., 2018; 2020). La diferencia entre los valores puede estar relacionada con el método de hidrólisis y la pureza de los péptidos porque se ha reportado que los métodos de extracción de péptidos a partir de las proteínas han demostrado tener un gran impacto en la estabilidad, biodisponibilidad y funcionalidad de los péptidos. La mayoría de los péptidos funcionales están presentes en matrices complejas que contienen una gran cantidad de fracciones de proteínas hidrolizadas y se requiere su separación y purificación para mejorar su actividad (Jiang et al., 2020; Okoye et al., 2022). El valor de la investigación de péptidos antioxidantes radica en las posibles aplicaciones de dichos péptidos como aditivos alimentarios, suplementos que promuevan la salud y agentes terapéuticos (Zielińska et al., 2018). La mayoría de los péptidos funcionales están presentes en matrices complejas que contienen una gran cantidad de fracciones de proteínas hidrolizadas y se requiere su separación y purificación para mejorar su actividad (Jiang et al., 2020; Okoye et al., 2022).

3.2.3.2.2 Ensayo *In vivo* con *Caenorhabditis elegans*

C. elegans es susceptible al estrés oxidativo experimental cuando se expone a ciertos compuestos prooxidantes, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroperóxido de terbutílico (tBuOOH), paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio), o juglona (5-hidroxi-1,4-naftalendiona). Esta exposición conduce a un aumento de los niveles de O_2 y ROS, lo que acorta la vida y la supervivencia de los nematodos (González-Peña et al., 2021; Zhong y Jin, 2008). Debido a su idoneidad como organismo modelo, *C. elegans* se ha utilizado ampliamente para estudiar los efectos de varios compuestos sintéticos y naturales sobre el envejecimiento, la esperanza de vida y la regulación genética. Con base en esta característica, los péptidos obtenidos de la muestra A2 de proteína digerida de *A. armida* se utilizaron para evaluar la capacidad antioxidante en *C. elegans*. Esta muestra fue seleccionada debido a los resultados que se muestran en la Fig. 1a. donde se puede observar que la muestra A2 tiene el mayor efecto antioxidante.

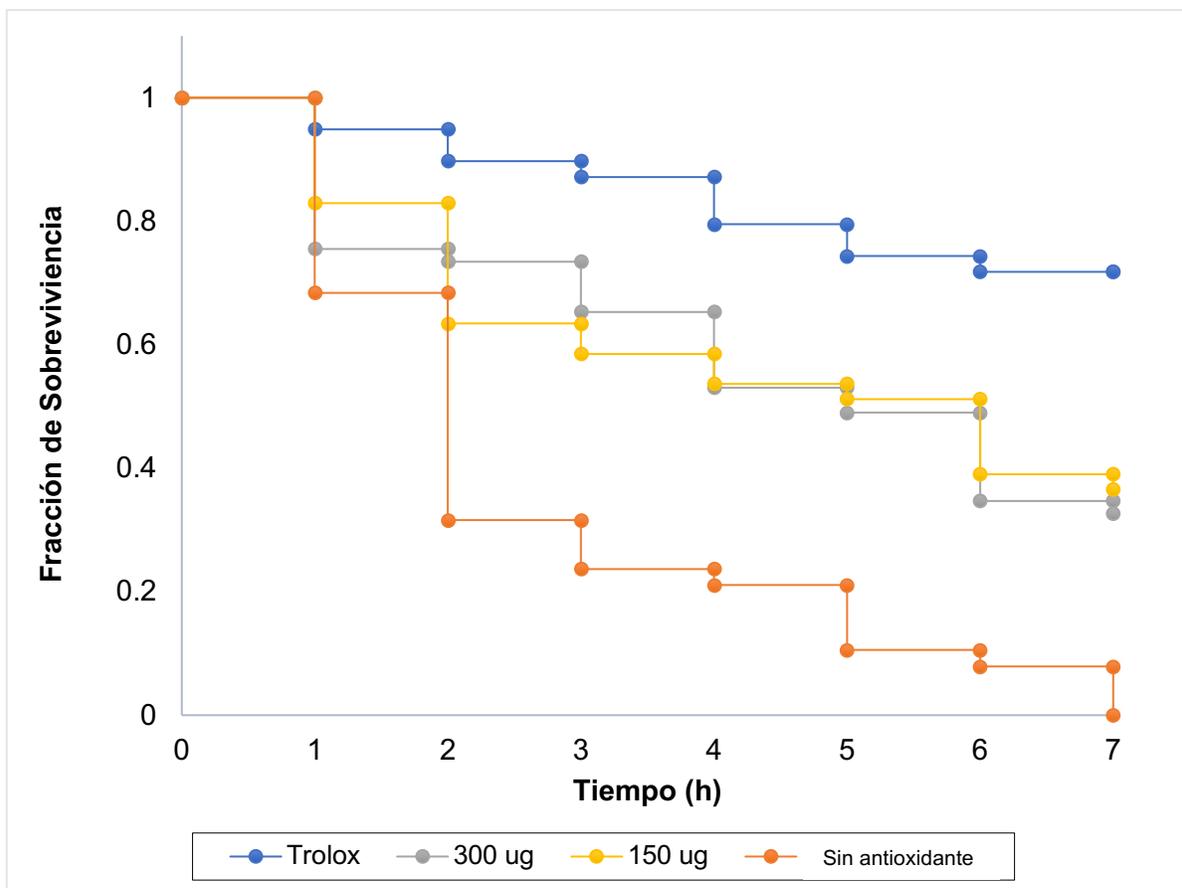


Figura 5. Curvas de supervivencia representativas de Kaplan-Meier de *C. elegans*. Comparación de la tasa de supervivencia de *C. elegans* tratados con péptidos de *A. armida* 150 μg ($0.75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 300 μg ($1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) bajo estrés oxidativo con 400 μM de juglona durante siete horas. Se compararon todos los tratamientos con el control negativo (naranja), que no recibió ningún tratamiento. Se utilizó como control positivo un grupo con Trolox como antioxidante estándar (azul).

En este experimento se utilizó juglona para inducir estrés oxidativo agudo en *C. elegans* en la etapa L4, los cuales habían sido expuesto previamente a péptidos de *A. armida*. El grupo de péptidos ($0.75 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) tuvo un porcentaje de supervivencia del 35.5%, el grupo de péptidos ($1.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) del 32.7% y el más bajo fue el grupo sin antioxidantes con 0% de sobrevivientes al final del ensayo (Fig. 5), en ambos tratamientos con péptidos no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$). El mayor porcentaje de supervivencia se observó en el grupo Trolox (71.8%). Trolox, un análogo soluble en agua de la vitamina E, es un antioxidante bien conocido que se ha utilizado anteriormente para proteger contra el daño oxidativo en los nematodos. En este sentido, Zhang et al. (2018) demostraron que tanto Trolox como la vitamina E podrían revertir el daño oxidativo en *C. elegans*, prolongando así su esperanza de vida. Estos resultados son consistentes con los resultados de este estudio,

respaldando el valor de *C. elegans* como modelo biológico para evaluar la actividad antioxidante de muchas sustancias y la capacidad de Trolox para reducir el daño del estrés oxidativo.

La esperanza de vida se extendió >7 h en el grupo Trolox, y los nematodos expuestos a 0.75 µg/µL y 1.5 µg/µL de péptidos tuvieron una esperanza de vida de 4.91 h y 4.71 h, respectivamente (Tabla 6). Un estudio realizado con 1 µg/µL de péptidos de grillo (*Gryllodes sigillatus*) tuvo un efecto antioxidante en *C. elegans*, extendiendo su porcentaje de supervivencia dos veces en comparación con el efecto de 0.75 µg/µL de péptidos de *A. armida* utilizados en este estudio (Mudd et al., 2022). Por otro lado, las especies vegetales son las especies más reportadas que tienen un gran potencial antioxidante. En este sentido, se informaron resultados similares para extractos de Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), donde los nematodos expuestos al extracto vivieron significativamente más que el control bajo estrés oxidativo (Bonomo et al., 2014), y un estudio similar mostró que los péptidos de *Angelica sinensis* pudieron aumentar la esperanza de vida de *C. elegans* expuesta al estrés oxidativo (Krishnaiah et al., 2011; Wang et al., 2016).

Tabla 6. Efectos de los péptidos de *A. armida* en la esperanza de vida y porcentaje de sobrevivientes de *C. elegans* bajo estrés oxidativo inducido con 400 µM de juglona.

Grupo	Esperanza de vida (h)	Sobrevivientes (%)
Trolox	>7	71.8
Péptidos (0.75 µg/µL)	4.91±0.23 ^a	35.3
Péptidos (1.5 µg/µL)	4.71±1.02 ^a	32.7
Sin antioxidantes	1.47±0.24 ^b	0

Cada valor se presenta como la media ± DE (n=2). Los valores seguidos de una letra en superíndice diferente en cada columna son significativamente diferentes (p<0.05).

3.2.3.3 Ensayo antimicrobiano, concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son péptidos compuestos de 12 a 50 residuos de aminoácidos. Hasta ahora se han descubierto más de 3,100 AMP de diversas fuentes naturales como bacterias, plantas, insectos, peces, aves y otros animales. Aunque no tienen una secuencia definida e identificada, la mayoría de los AMP son hidrófobos y tienen carga

positiva. En el caso de los AMP de insectos, se ha reportado que contienen múltiples residuos de arginina (R) y/o lisina (K) que confieren una carga positiva neta que tiene afinidad de unión a los fosfolípidos aniónicos en las membranas celulares bacterianas. Este hecho está relacionado con los mecanismos de acción reportados que consisten en alteración de la membrana, alteración de la pared celular e interacción con otros sitios de acción internos. Algunos péptidos antimicrobianos (AMP) pueden penetrar la membrana celular y dirigirse a componentes intracelulares que interrumpen o inhiben procesos metabólicos vitales, incluida la replicación, transcripción, biosíntesis de proteínas, plegamiento y síntesis de componentes de la pared celular (Eleftherianos et al., 2021; Liu et al., 2019; Savini et al., 2020; Sączek et al., 2023).

Estos péptidos exhiben una potente actividad antimicrobiana contra una variedad de bacterias, hongos y virus. Los AMP tienen numerosas ventajas, como una fuerte bioactividad, baja toxicidad para las células eucariotas, una fuerte estabilidad térmica, alta solubilidad, bajo peso molecular y falta de resistencia (Luo & Song, 2021; Miyoshi et al., 2016). Por lo tanto, tienen un enorme potencial para aplicaciones en diversos campos (Jia et al., 2018). El efecto de los péptidos de la harina de *A. armida* (muestras A1-A9) contra las bacterias modelo analizadas se muestra en la Tabla 7. Todas las muestras analizadas mostraron una inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. aureus*, que son Gram-positivas.

El efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram-positivas ha sido reportado en defensinas de insectos, incluidas algunas bacterias patógenas humanas como *S. aureus* (Brady et al., 2019). Las gloverinas presentes exclusivamente en insectos lepidópteros muestran un amplio espectro de actividad antimicrobiana, siendo algunos miembros de esta familia solo activos contra bacterias Gram-positivas y otros solo contra bacterias Gram-negativas (Buonocore et al., 2021). Se ha observado que AMP incluso de insectos de la misma familia, los efectos sobre las bacterias pueden variar. Por ejemplo, la defensina de ostras tiene una acción limitada sobre las bacterias Gram-negativas debido a las interacciones electrostáticas entre la defensina y las membranas bacterianas cargadas negativamente. Algunos componentes, como el lípido II, están protegidos por la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, lo que impide que la defensina de ostras acceder al espacio

periplásmico. Para volverse accesible en las bacterias Gram-negativas, es necesario dañar la membrana externa. Por el contrario, las defensinas de los mamíferos tienen el mismo lípido II objetivo y son activas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, probablemente debido a su actividad disruptiva de la membrana. Esto les permite acceder al lípido II en bacterias Gram-negativas (Schmitt et al., 2010).

Se encontró que la muestra A4 tenía las mayores zonas de inhibición contra ambas bacterias, 16.04 mm para *S. aureus* y 14.38 mm para *L. monocytogenes* (Fig. S3 y Tabla 8). También se observó que no existe efecto significativo de los factores (relación enzima:sustrato o tiempo de digestión) en el diámetro de la inhibición en el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero en la inhibición de *S. aureus*, ambos factores y su interacción tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$).

El efecto antimicrobiano observado de los péptidos de *A. armida* puede deberse a la capacidad de ciertos AMP para atacar las membranas bacterianas; por ejemplo, las atacinas y las gloverinas de AMP ricas en glicina pueden inhibir la síntesis de varias proteínas de la membrana externa y otros AMP alteran los mecanismos intracelulares, por ejemplo, la pirrocorisina AMP rica en prolina, aislada de *Pyrrhocoris apterus* (Eleftherianos et al., 2021). Diversas defensinas han sido identificadas en distintos ordenes de insectos, como Hemiptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera y Lepidoptera. Las defensinas de insectos tienen entre 36 y 46 aminoácidos de longitud, son catiónicas, contienen residuos de cisteína y pueden formar puentes disulfuro. Son particularmente activos contra bacterias Gram-positivas como *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus megaterium* (Bulet et al., 1999; Duwadi et al., 2018).

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de los péptidos de la harina de *Arsenura armida*.

Muestra	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A 1 x 10 ⁴ CFU/mL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25931 1 x 10 ³ CFU/mL	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931 1 x 10 ⁴ CFU/mL	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028 1 x 10 ⁴ CFU/mL	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 1 x 10 ⁴ CFU/mL
	A1	+	+	-	-
A2	+	+	-	-	-
A3	+	+	-	-	-
A4	+	+	-	-	-
A5	+	+	-	-	-
A6	+	+	-	-	-
A7	+	+	-	-	-
A8	+	+	-	-	-
A9	+	+	-	-	-

Los experimentos se realizaron por duplicado (n = 4, 2 experimentos independientes con 2 repeticiones cada uno). (+) No se observó crecimiento microbiano; (-) Crecimiento microbiano observado.

Tabla 8. Diámetro (mm) de las zonas de inhibición generadas por los péptidos obtenidos de la digestión de la harina de *A. armida* contra los microorganismos indicadores que mostraron sensibilidad en la prueba de screening.

Muestra	Diámetro de inhibición (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25931 1 x 10 ³ CFU/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A 1 x 10 ⁴ CFU/mL
A1	12.19 ± 0.99 ^{cd}	14.88 ± 2.05 ^a
A2	11.12 ± 0.38 ^d	13.11 ± 0.46 ^a
A3	11.72 ± 0.19 ^d	14.88 ± 2.11 ^a
A4	16.04 ± 0.23 ^a	14.38 ± 1.07 ^a
A5	15.61 ± 0.31 ^a	15.15 ± 0.04 ^a
A6	13.02 ± 0.51 ^{bcd}	15.57 ± 0.17 ^a
A7	14.70 ± 1.09 ^{ab}	13.19 ± 0.59 ^a
A8	13.90 ± 0.23 ^{abc}	15.90 ± 0.36 ^a
A9	13.24 ± 0.29 ^{bcd}	15.93 ± 1.52 ^a

Cada valor se presenta como la media ± DE (n = 4, 2 experimentos independientes con 2 repeticiones cada uno). Los valores seguidos de una letra en superíndice diferente en cada columna son significativamente diferentes (p < 0.05).

La actividad antimicrobiana de los péptidos de la muestra A4 extraída de *A. armida* se probó frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus* en términos de MIC y MBC. Los resultados mostraron que la MIC es de 0.11 µg/mL para *L. monocytogenes* y de 0.23 µg/mL para *S. aureus* (Tabla 9). Los péptidos tuvieron un efecto bactericida en contra de ambas bacterias a una concentración de 0.23 µg/mL. Los valores de MIC reportados en esta investigación son inferiores a los reportados para los péptidos antimicrobianos de *Tribolium castaneum* (HOLO1) (13.2 µg/mL) y *Pediculus humanus humanus* (LOUDEF1) (35 µg/mL) contra *S. aureus*. Las defensinas de insectos reportadas en la literatura tienen una MIC en un rango de 1.3 a 39 µg/ml, estas defensinas han sido utilizadas para inhibir el crecimiento de diferentes cepas de bacterias Gram-positivas (Duwadi et al., 2018). En el caso de MBC, se reportó que un péptido (Thanatin) de *Podisus maculiventris* tiene un efecto inhibitor en *Enterococcus faecalis* a 55.87 µg/mL (Rouhani, 2021).

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de la muestra A4.

Cepas bacterianas	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
<i>Listeria monocytogenes</i> (Scott A) 1 x 10 ³ CFU/mL	0.11	0.23
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 2593) 1 x 10 ³ CFU/mL	0.23	0.23

3.2.3.4 Identificación de péptidos bioactivos

Los péptidos son moléculas compuestas por una cadena de aminoácidos. Son estructuralmente similares a las proteínas, pero más cortas y se sabe que tienen un papel clave en muchos procesos fisiológicos. Se ha demostrado que los péptidos bioactivos derivados de alimentos muestran una amplia gama de funciones fisiológicas, incluidos efectos antioxidantes, antihipertensivos, antimicrobianos y antiproliferativos (Zhang et al., 2013).

La búsqueda en la base de datos BIOPEP reveló que en la muestra A2 el 37% de los péptidos identificados están asociados a un efecto antihipertensivo, el 58% están asociados a un efecto antioxidante y con un porcentaje menor se identificaron otros efectos bioactivos (Fig. 6, Tabla S1). Para obtener péptidos con propiedades funcionales, como actividad antioxidante, la

hidrólisis enzimática es el método más eficaz y confiable en comparación con la extracción con solventes o la fermentación microbiana (Najafian y Babji, 2014). Los péptidos antioxidantes suelen contener de 2 a 20 unidades de aminoácidos y su potencial se atribuye a su composición de aminoácidos. Con frecuencia, los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, como la leucina (L), la isoleucina (I) y la prolina (P) (Jiang et al., 2018), así como los residuos de aminoácidos aromáticos, como la tirosina (Y), se encuentran dentro de los péptidos antioxidantes (Sun et al., 2019). Además, se ha informado que la mayoría de los péptidos con actividad antioxidante extraídos de fuentes alimentarias muestran pesos moleculares que oscilan entre 500 y 1800 Da, y los residuos de aminoácidos hidrofóbicos se encuentran en el extremo N de los péptidos y tienen tirosina (Y), lisina (K), histidina (H), prolina (P) o metionina (M) en su secuencia (Najafian y Babji, 2014). En este sentido, los péptidos encontrados en la muestra A2 tienen más del 90% de esta longitud, y el 100% de los péptidos tienen alguno de los aminoácidos mencionados anteriormente (Tabla S1). En la lista de péptidos identificados en la muestra A2 (Tabla S1), el 40% tenía L o V en el extremo N, y el 83% tenía Y, K, H, P o M en su secuencia.

Los péptidos bioactivos pueden enriquecer a los alimentos nutracéuticos y funcionales al mejorar las defensas biológicas contra el estrés oxidativo y las enfermedades inflamatorias (Lorenzo et al., 2018). Además otra opción es adicionar las fracciones de péptidos antioxidantes como ingredientes funcionales en los sistemas alimentarios para reducir los cambios oxidativos durante el almacenamiento. Varios estudios informaron que la actividad antioxidante de los hidrolizados de proteínas y péptidos aislados preparados a partir de fuentes como yema de huevo, gelatina de piel de hoki, mejillón azul marino, entre muchas otras, es superior a la del α -tocoferol y, en algunos casos, tiene una actividad similar o superior al de los antioxidantes sintéticos comúnmente utilizados como el BHA (hidroxianisol butilado) y el BTH (hidroxitolueno butilado) (Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

Por otro lado, el análisis de los péptidos identificados en la muestra A4 reveló péptidos con actividad antihipertensiva (62%), actividad antioxidante (31%) y actividad antimicrobiana (2%). En esta muestra, se encontraron secuencias que coinciden

completamente con los péptidos antimicrobianos LFGF y FLLF reportados en la base de datos BIOPEP-UWM (Minkiewicz et al., 2019). En los insectos, los AMP reportados se aíslan comúnmente de larvas (24%) como *A. armida*, seguido del veneno (22%), adultos (19%), péptidos sintetizados (18%), pupas (11%), estudios genéticos (4%) y por último el medio de cultivo (2%) (Azmiara et al., 2022). Las defensinas son un tipo de péptidos antimicrobianos (AMP) que se encuentran en varios órdenes de insectos como hemípteros, coleópteros, dípteros, himenópteros y lepidópteros. Se han identificado como particularmente activos contra bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Bacillus megaterium* y *Micrococcus luteus*. No obstante, algunos de ellos también han mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas como *E. coli* (Manniello et al., 2021). Otro grupo importante son las Gloverinas (péptidos ricos en glicina); algunos de los péptidos con esta característica se encontraron en la muestra A4: YGYQGLGHGLGHGLGLGY, FGLGGGLGGSGGLGGHNY, HAGVGLGLLGGGAGGGL, GFGGGDGGGFGF (Tabla S2). Los péptidos gloverinas exhiben actividad principalmente en bacterias Gram-negativas, especialmente contra *E. coli*, pero algunos también tienen propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas, hongos y virus (Eleftherianos et al., 2021).

Las familias de AMP mencionadas anteriormente están relacionadas con la información disponible en las referencias y las características observadas en las secuencias de péptidos obtenidas por LC-MS. El hecho de que algunas otras familias estén excluidas no implica que no estén presentes en la muestra A4 de *A. armida*. Es posible que las condiciones de digestión probadas no liberaran otro tipo de péptidos. Por ejemplo, las cecropinas son un AMP ampliamente reportado en insectos, pero es posible que no hayan sido liberadas durante la digestión. (Brady et al., 2019).

Finalmente, como se puede observar en ambas muestras (A2 y A4), se identificaron péptidos con efectos antihipertensivos; la capacidad antihipertensiva es la propiedad bioactiva más estudiada en los péptidos derivados de alimentos. Hasta el momento, dos especies de insectos con potentes péptidos antihipertensivos (*H. illucens* y *P. adspersa*) han sido identificadas. Desde esta perspectiva, la identificación de péptidos con efectos antihipertensivos en la harina de *A. armida* puede ser lo siguiente a realizar.

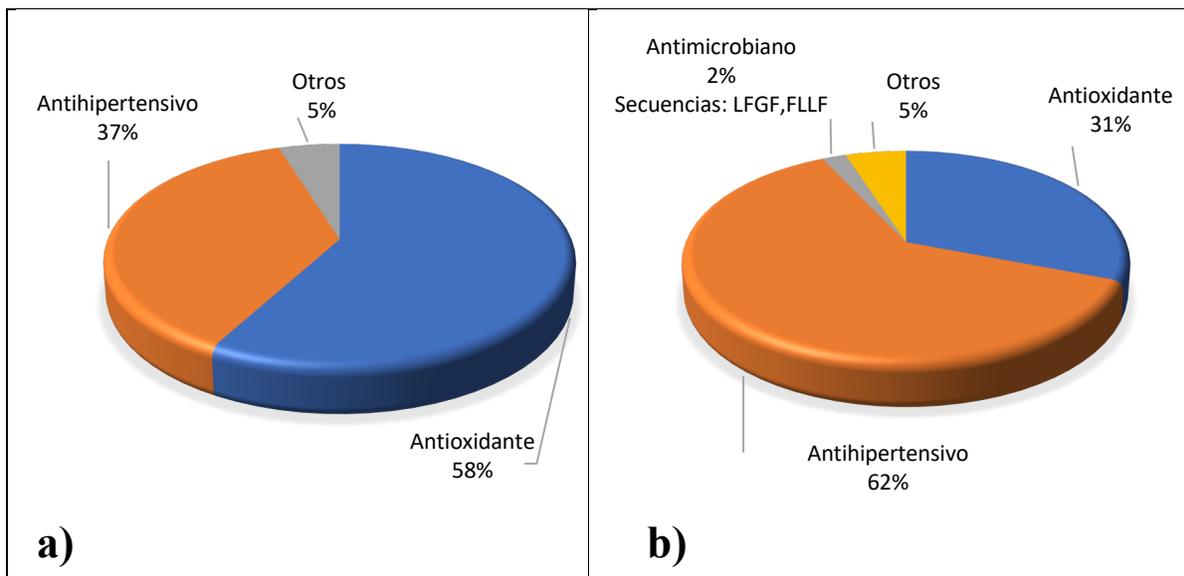


Figura 6. Bioactividad de péptidos en las muestras A2 y A4 identificadas mediante LC-MS/MS y utilizando la base de datos BIOPEP. a) La muestra A2 mostró la presencia de péptidos con efecto antioxidante (58%), efecto antihipertensivo (37%) y otras bioactividades en un porcentaje menor (5%) b) La muestra A4 mostró péptidos con efecto antihipertensivo (62%), antioxidante (31%) y antimicrobiano (2%) con dos secuencias con coincidencia exacta: LFGF y FLLF.

Algunos estudios han informado que se pueden incorporar AMP o péptidos antioxidantes al material de empaque para extender la vida útil de tres maneras: incorporando péptidos directamente al material de empaque, recubrimiento e inmovilización de péptidos en la superficie del polímero usando métodos físicos o químicos (Sultana et al. al., 2021). La proteína de *A. armida* podrían servir como fuente de nuevos péptidos antioxidantes y antimicrobianos naturales que se podrían utilizar en productos alimenticios. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones para explicar la relación estructura-función de los péptidos antioxidantes y antimicrobianos (Najafian y Babji, 2014).

3.2.4 Conclusiones

Los resultados del presente estudio establecieron el potencial de las harinas comestibles del insecto *A. armida* como fuente de péptidos con fuerte actividad antioxidante y antimicrobiana, así como las condiciones para extraer estos péptidos. La muestra A2 fue la que tuvo mayor actividad antioxidante y la muestra A4 la que tuvo mayor actividad antimicrobiana. Se cree que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en las

secuencias peptídicas contribuye a la alta actividad antioxidante en la muestra A2 de harina de *A. armida*. Los péptidos ricos en glicina de A4 pueden contribuir al efecto antimicrobiano. La harina de *A. armida* puede servir como fuente de nuevos péptidos antioxidantes y antimicrobianos naturales que se podrían utilizar en productos alimenticios.

3.2.5 Referencias

- Amarender, R. V., Bhargava, K., Dossey, A. T., & Gamagedara, S. (2020). Lipid and protein extraction from edible insects – Crickets (Gryllidae). *LWT*, *125*, 109222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109222>
- Apostolopoulos, V., Bojarska, J., Chai, T.-T., Elnagdy, S., Kaczmarek, K., Matsoukas, J., New, R., Parang, K., Lopez, O. P., Parhiz, H., Perera, C. O., Pickholz, M., Remko, M., Saviano, M., Skwarczynski, M., Tang, Y., Wolf, W. M., Yoshiya, T., Zabrocki, J., ... Toth, I. (2021). A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*, *26*(2), 430. <https://doi.org/10.3390/molecules26020430>
- Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Bach, H., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity of protein-containing fractions isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*(3), 1289–1296. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>
- Azmiera, N., Krasilnikova, A., Sahudin, S., Al-Talib, H., & Heo, C. C. (2022). Antimicrobial peptides isolated from insects and their potential applications. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, *25*(2), 101892. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101892>
- 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>
- Bonomo, L. D. F., Silva, D. N., Boasquivis, P. F., Paiva, F. A., Guerra, J. F. D. C., Martins, T. A. F., De Jesus Torres, Á. G., De Paula, I. T. B. R., Caneschi, W. L., Jacolot, P., Grossin, N., Tessier, F. J., Boulanger, E., Silva, M. E., Pedrosa, M. L., & De Paula Oliveira, R. (2014). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Modulates Oxidative Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans* by Direct and Indirect Mechanisms. *PLoS ONE*, *9*(3), e89933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089933>
- Borrajo, P., Pateiro, M., Barba, F. J., Mora, L., Franco, D., Toldrá, F., & Lorenzo, J. M. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Peptides Extracted from Meat By-products: A Review. *Food Analytical Methods*, *12*(11), 2401–2415. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01595-4>
- Brady, D., Grapputo, A., Romoli, O., & Sandrelli, F. (2019). Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23), 5862. <https://doi.org/10.3390/ijms20235862>

- Brogan, E. N., Park, Y.-L., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2021). Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silk worm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. *LWT*, *152*, 112314. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112314>
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, *23*(4–5), 329–344. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00015-4)
- Buonocore, F., Fausto, A. M., Della Pelle, G., Roncevic, T., Gerdol, M., & Picchiatti, S. (2021). Attacins: A Promising Class of Insect Antimicrobial Peptides. *Antibiotics*, *10*(2), 212. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020212>
- Cortazar-Moya, S., Mejía-Garibay, B., López-Malo, A., & Morales-Camacho, J. I. (2023). Nutritional composition and techno-functionality of non-defatted and defatted flour of edible insect *Arsenura armida*. *Food Research International*, *173*, 113445. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113445>
- Duwadi, D., Shrestha, A., Yilma, B., Kozlovski, I., Sa-eed, M., Dahal, N., & Jukosky, J. (2018). Identification and screening of potent antimicrobial peptides in arthropod genomes. *Peptides*, *103*, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.01.017>
- Eleftherianos, I., Zhang, W., Heryanto, C., Mohamed, A., Contreras, G., Tettamanti, G., Wink, M., & Bassal, T. (2021). Diversity of insect antimicrobial peptides and proteins - A functional perspective: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *191*, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.082>
- Ferrazzano, G. F., D'Ambrosio, F., Caruso, S., Gatto, R., & Caruso, S. (2023). Bioactive Peptides Derived from Edible Insects: Effects on Human Health and Possible Applications in Dentistry. *Nutrients*, *15*(21), 4611. <https://doi.org/10.3390/nu15214611>
- Gómez-García, R., Vilas-Boas, A. A., Machado, M., Campos, D. A., Aguilar, C. N., Madureira, A. R., & Pintado, M. (2022). Impact of simulated in vitro gastrointestinal digestion on bioactive compounds, bioactivity and cytotoxicity of melon (*Cucumis melo* L. *inodorus*) peel juice powder. *Food Bioscience*, *47*, 101726. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101726>
- González-Peña, M. A., Lozada-Ramírez, J. D., & Ortega-Regules, A. E. (2021). Carotenoids from mamey (*Pouteria sapota*) and carrot (*Daucus carota*) increase the oxidative stress resistance of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *26*, 100989. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100989>
- Hall, F., Johnson, P. E., & Liceaga, A. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein. *Food Chemistry*, *262*, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.058>
- Iriti, M., & Vitalini, S. (2022). Edible insects – a new trend in Functional Food Science. *Functional Food Science*, *2*(7), 157. <https://doi.org/10.31989/ffs.v2i7.939>
- Jia, F., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Kong, Z., Wang, K., Yan, W., & Wang, R. (2018). The in vitro, in vivo antifungal activity and the action mode of Jelleine-I against *Candida* species. *Amino Acids*, *50*(2), 229–239. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2507-1>
- Jiang, X., Cui, Z., Wang, L., Xu, H., & Zhang, Y. (2020). Production of bioactive peptides from corn gluten meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* MTCC5480 and

- evaluation of its antioxidant capacity in vivo. *LWT*, *131*, 109767. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109767>
- Jiang, Y., Zhang, M., Lin, S., & Cheng, S. (2018). Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins. *Food Research International*, *105*, 836–844. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.022>
- 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>
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, *89*(3), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H., & He, Q. (n.d.). The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Antimicrobial Peptides*.
- Lemes, A., Sala, L., Ores, J., Braga, A., Egea, M., & Fernandes, K. (2016). A Review of the Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein-Rich Waste. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 950. <https://doi.org/10.3390/ijms17060950>
- Liu, S., Wang, W., Deng, L., Ming, J., Yao, S., & Zeng, K. (2019). Control of sour rot in citrus fruit by three insect antimicrobial peptides. *Postharvest Biology and Technology*, *149*, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.025>
- López-García, G., Dublan-García, O., Arizmendi-Cotero, D., & Gómez Oliván, L. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. *Molecules*, *27*(4), 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules27041343>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science & Technology*, *79*, 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Lozada-Ramírez, J. D., Guerrero-Moras, M. C., González-Peña, M. A., Silva-Pereira, T. S., Anaya De Parrodi, C., & Ortega-Regules, A. E. (2023). Stabilization of Anthocyanins from Coffee (*Coffea arabica* L.) Husks and In Vivo Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Molecules*, *28*(3), 1353. <https://doi.org/10.3390/molecules28031353>
- Luo, Y., & Song, Y. (2021). Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 11401. <https://doi.org/10.3390/ijms222111401>
- Manniello, M. D., Moretta, A., Salvia, R., Scieuzo, C., Lucchetti, D., Vogel, H., Sgambato, A., & Falabella, P. (2021). Insect antimicrobial peptides: Potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *78*(9), 4259–4282. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03784-z>
- Miyoshi, N., Saito, T., Ohmura, T., Kuroda, K., Suita, K., Ihara, K., & Isogai, E. (2016). Functional structure and antimicrobial activity of persulcatusin, an antimicrobial peptide from the hard tick *Ixodes persulcatus*. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1360-5>
- Mudd, N., Martin-Gonzalez, F. S., Ferruzzi, M., & Liceaga, A. M. (2022). In vivo antioxidant effect

- of edible cricket (*Gryllobates sigillatus*) peptides using a *Caenorhabditis elegans* model. *Food Hydrocolloids for Health*, 2, 100083. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100083>
- Najafian, L., & Babji, A. S. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 9, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.003>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.014>
- Okoye, C. O., Ezeorba, T. P. C., Okeke, E. S., & Okagu, I. U. (2022). Recent Findings on the Isolation, Identification and Quantification of Bioactive Peptides. *Applied Food Research*, 2(1), 100065. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100065>
- Oscar, J.-G., Julio, G.-P., Beatriz, M.-G., Aurelio, L.-M., & José Ángel, G.-B. (2023). Caramel colour pigments from black sapote (*Diospyros digyna*): Obtention and food application. *Sustainable Food Technology*, 1(4), 555–566. <https://doi.org/10.1039/D2FB00037G>
- Quah, Y., Tong, S.-R., Bojarska, J., Giller, K., Tan, S.-A., Ziora, Z. M., Esatbeyoglu, T., & Chai, T.-T. (2023). Bioactive Peptide Discovery from Edible Insects for Potential Applications in Human Health and Agriculture. *Molecules*, 28(3), 1233. <https://doi.org/10.3390/molecules28031233>
- Rouhani, A. (2021). A Comparison of Antibacterial Properties of Tachyplesin, Thanatin, and Enterocin P on *Enterococcus faecalis*. *European Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.14744/ej.2021.04696>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Savini, F., Loffredo, M. R., Troiano, C., Bobone, S., Malanovic, N., Eichmann, T. O., Caprio, L., Canale, V. C., Park, Y., Mangoni, M. L., & Stella, L. (2020). Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(8), 183291. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183291>
- Schmitt, P., Gueguen, Y., Desmarais, E., Bachère, E., & De Lorgeril, J. (2010). Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-23>
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *INDIAN J. MAR. SCI.*, 42(5).
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449–1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>

- Sousa, P., Borges, S., & Pintado, M. (2020). Enzymatic hydrolysis of insect *Alphitobius diaperinus* towards the development of bioactive peptide hydrolysates. *Food & Function*, *11*(4), 3539–3548. <https://doi.org/10.1039/D0FO00188K>
- Stączek, S., Cytryńska, M., & Zdybicka-Barabas, A. (2023). Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5753. <https://doi.org/10.3390/ijms24065753>
- Sultana, A., Luo, H., & Ramakrishna, S. (2021). Harvesting of Antimicrobial Peptides from Insect (*Hermetia illucens*) and Its Applications in the Food Packaging. *Applied Sciences*, *11*(15), 6991. <https://doi.org/10.3390/app11156991>
- Sun, C., Tang, X., Ren, Y., Wang, E., Shi, L., Wu, X., & Wu, H. (2019). Novel Antioxidant Peptides Purified from Mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) Leaf Protein Hydrolysates with Hemolysis Inhibition Ability and Cellular Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(27), 7650–7659. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01115>
- Teixeira, C. S. S., Villa, C., Costa, J., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Mafra, I. (2023). Edible Insects as a Novel Source of Bioactive Peptides: A Systematic Review. *Foods*, *12*(10), 2026. <https://doi.org/10.3390/foods12102026>
- Van Huis, A. (2016). Edible insects are the future? *Proceedings of the Nutrition Society*, *75*(3), 294–305. <https://doi.org/10.1017/S0029665116000069>
- Vanqa, N., Mshayisa, V. V., & Basitere, M. (2022). Proximate, Physicochemical, Techno-Functional and Antioxidant Properties of Three Edible Insect (*Gonimbrasia belina*, *Hermetia illucens* and *Macrotermes subhylanus*) Flours. *Foods*, *11*(7), 976. <https://doi.org/10.3390/foods11070976>
- Virginia Melo-Ruíz, Tomas Quirino-Barreda, Susana Macín-Cabrera, Karina Sánchez-Herrera, Rafael Díaz-García, & Cesar Gazga-Urioste. (2016). Nutraceutical Effect of Cuetlas (*Arsenura armida* C.) Edible Insects as Local Food at Ixcaquixtla, Mexico. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, *6*(6). <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2016.06.008>
- Wang, Q., Huang, Y., Qin, C., Liang, M., Mao, X., Li, S., Zou, Y., Jia, W., Li, H., Ma, C. W., & Huang, Z. (2016). Bioactive Peptides from *Angelica sinensis* Protein Hydrolyzate Delay Senescence in *Caenorhabditis elegans* through Antioxidant Activities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/8956981>
- Zhang, J., Xue, X., Yang, Y., Ma, W., Han, Y., & Qin, X. (2018). Multiple biological defects caused by calycosin-7-*O*- β -D-glucoside in the nematode *CAENORHABDITIS ELEGANS* are associated with the activation of oxidative damage. *Journal of Applied Toxicology*, *38*(6), 801–809. <https://doi.org/10.1002/jat.3588>
- Zhang, Q.-X., Wu, H., Ling, Y.-F., & Lu, R.-R. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*, *80*(3), 367–373. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000320>
- Zhao, D., & Liu, X. (2023). Purification, Identification and Evaluation of Antioxidant Peptides from Pea Protein Hydrolysates. *Molecules*, *28*(7), 2952.

<https://doi.org/10.3390/molecules28072952>

- 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>
- Zielińska, E., Baraniak, B., & Karaś, M. (2018). Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Grylloides sigillatus* , *Tenebrio molitor* , *Schistocerca gregaria*). *International Journal of Food Science & Technology*, 53(11), 2542–2551. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13848>
- Zielińska, E., Karaś, M., Baraniak, B., & Jakubczyk, A. (2020). Evaluation of ACE, α -glucosidase, and lipase inhibitory activities of peptides obtained by in vitro digestion of selected species of edible insects. *European Food Research and Technology*, 246(7), 1361–1369. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03495-y>
- Zielińska, E., Pankiewicz, U., & Sujka, M. (2021). Nutritional, Physicochemical, and Biological Value of Muffins Enriched with Edible Insects Flour. *Antioxidants*, 10(7), 1122. <https://doi.org/10.3390/antiox10071122>

3.3 Explorando el potencial tecnofuncional de la harina de insectos en la formulación de pan de trigo: un estudio comparativo con harinas de *Arsenura armida* y *Acheta domesticus*

Resumen

La fortificación y el enriquecimiento de los alimentos son tendencias populares en la producción de alimentos. Implican añadir nutrientes esenciales a los alimentos para mejorar su valor nutricional, potenciar sus propiedades funcionales y mejorar las propiedades tecnofuncionales del producto. El enriquecimiento de los alimentos sólo puede tener éxito si los alimentos enriquecidos se consumen ampliamente y en cantidades suficientes. Por lo tanto, los productos de panadería como el pan o la pasta a menudo se seleccionan como matriz alimenticia. Teniendo en cuenta lo anterior, se evaluó la influencia de la adición de harina de insectos sobre la calidad de pan de trigo, sus propiedades físicas y características sensoriales. Esta investigación tuvo como objetivo sustituir parcialmente en el pan la harina de trigo (5, 10 %) con harinas de *Arsenura armida* o *Acheta domesticus*. Se empleó un diseño factorial (2^3) para evaluar los efectos de las proporciones seleccionadas de la harina de insectos, harina de trigo y porcentaje de agua sobre las características del pan. Los panes de las diferentes formulaciones que contenían *A. armida* mostraron un contenido de humedad, a_w y relación alto/ancho (A/a) similares en comparación con el pan de trigo control. De la misma manera, el pan con *A. domesticus* solo mostró similitudes en el contenido de humedad y dureza con el control. La adición de *A. armida* cambió el volumen específico, el pH y la dureza de los panes; mientras tanto, la adición de *A. domesticus* afectó el contenido de humedad, a_w , relación A/a y volumen específico. Para el color del pan, no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) en el ΔE de la miga de todas las formulaciones probadas, ni para *A. armida* ni para *A. domesticus*. Las variables evaluadas no afectaron esta característica. Se observaron valores de índice de oscurecimiento (IO) más altos en las cortezas de los panes que en la miga. Los resultados de la evaluación sensorial revelaron que la modificación de la formulación no afectó los atributos evaluados; los puntajes de la escala hedónica fueron “ligeramente parecidos”, sin diferencia significativa con el control ($p>0.05$). La optimización del diseño factorial mostró que la formulación con mejor aceptabilidad general fue 5% harina de insectos-60% agua-90% harina de trigo para *A. armida* y 5% harina de insectos-50% agua-95% harina de trigo para *A. domesticus*.

3.3.1 Introducción

El sector alimentario se maneja actualmente entre la sostenibilidad, la seguridad alimentaria y la innovación, como una visión que apunta a prácticas de consumo consciente y cuidado del medio ambiente. La fortificación y el enriquecimiento de los alimentos son tendencias populares en la producción de alimentos. Implican agregar nutrientes esenciales a los alimentos para mejorar su valor nutricional, potenciar las propiedades protectoras de la salud y mejorar las propiedades tecnofuncionales del producto (Zielińska et al., 2021). Esto puede atribuirse a una mayor conciencia entre los consumidores sobre la importancia de una dieta bien equilibrada y el papel que desempeñan estos nutrientes en el mantenimiento de una buena salud. Como resultado, los productos con altas cantidades de proteínas, vitaminas, aminoácidos y minerales están ganando popularidad (Agrahar-Murugkar, 2020).

El enriquecimiento de los alimentos sólo puede tener éxito si los alimentos enriquecidos se consumen ampliamente y en cantidades suficientes. Por lo tanto, los productos de panadería como el pan o la pasta a menudo se seleccionan como matriz alimenticia, ya que pueden enriquecerse agregando ciertos ingredientes directamente durante el procesamiento. Este tipo de fortificación no sólo potencia el valor nutricional del producto, sino que también influye en sus características tecnofuncionales y sensoriales. La calidad nutricional de determinados tipos de pan suele mejorar incorporando legumbres, semillas oleaginosas o hierbas (Agrahar-Murugkar, 2020). Sin embargo, la tendencia en la fortificación de alimentos está cambiando hacia el uso de fuentes no convencionales de nutrientes e ingredientes bioactivos. Esto se debe, por ejemplo, a la necesidad de transformar la industria alimentaria, conduciendo a una gestión racional de los alimentos, el uso de nuevas tecnologías, materias primas alternativas y la gestión de residuos, con un impacto negativo menor al medio ambiente. En este contexto, utilizar insectos comestibles como ingredientes alimentarios puede ser una buena alternativa para fortificar o enriquecer alimentos convencionales (González et al., 2019).

Los insectos son una fuente importante de proteínas, así como de micronutrientes y compuestos bioactivos. El contenido de macronutrientes de los insectos puede oscilar entre

el 35% y el 61% de proteínas, entre el 15% y el 40% de grasas y entre el 3% y el 10% de minerales (Rumpold y Schlüter, 2013). En todo el mundo los insectos más consumidos pertenecen a las familias de Coleoptera Coleóptera (escarabajos), Lepidoptera (orugas de mariposas y polillas), Hymenoptera (abejas, avispas, hormigas), Orthoptera Ortóptera (saltamontes, langostas, grillos, termitas), Hemiptera (cigarras, saltamontes y saltamontes, chinches verdaderas, cochinillas), Odonata (libélulas) y Diptera (moscas) (Sogari, 2015). Los grillos son una fuente popular de alimento debido a su alta eficiencia de conversión de alimentos y su capacidad para alimentarse de subproductos y granos de cereales (González et al., 2019).

Muchos investigadores han concluido que los consumidores estarían dispuestos a consumir insectos en una forma menos visible, como por ejemplo en polvos o harinas. En países como Australia y Polonia, sus pobladores indicaron que sí consumirían una galleta o pan enriquecido con harina de insectos comestibles (Guiné, 2022; Herbert y Beacom, 2021; Orkusz et al., 2020). Este hallazgo resalta que las personas están dispuestas a consumir insectos comestibles siempre y cuando se incorporen a productos de panadería con los que estén familiarizados (González et al., 2019; Wilkinson et al., 2018). Esta investigación tuvo como objetivo estudiar la incorporación de la harina de dos insectos diferentes (*Arsenura armida* y *Acheta domesticus*) al pan de trigo en diferentes proporciones y evaluar los cambios en calidad, características físicas y sensoriales.

3.3.2. Materiales y métodos

3.3.2.1 Elaboración del pan

Una formulación estándar de pan con harina de trigo (HH), según lo reportado por Hernández-Figueroa et al. (2023), se utilizó como control (C), incluyendo harina de trigo (62%), sal (1%), levadura (1%) y agua (37%). Según un diseño factorial de dos niveles con tres factores (harina de insecto, agua y harina de trigo), se formularon un total de ocho combinaciones (Tabla 10). La harina de insectos utilizada fue de *Arsenura armida* (Faa) o *Acheta domesticus* (Fad).

Tabla 10. Formulaciones de pan probadas utilizando harina de *Acheta domesticus* y *Arsenura armida* de acuerdo al diseño factorial 2³.

ID Harina: <i>A. armida</i>	ID Harina: <i>A. domesticus</i>	Harina de insecto (%)	Agua (%)	Harina de trigo (%)
	Control	0	62	100
1 Faa	1 Fad	10	60	90
2 Faa	2 Fad	10	50	90
3 Faa	3 Fad	5	60	90
4 Faa	4 Fad	5	50	90
5 Faa	5 Fad	5	60	95
6 Faa	6 Fad	10	50	95
7 Faa	7 Fad	10	60	95
8 Faa	8 Fad	5	50	95

La harina Fad fue comprada en un supermercado de la ciudad de Puebla, la etiqueta reporta una composición de 70% de proteína, 17% de lípidos, 5% de minerales, 2% de humedad y 6% de carbohidratos. La Faa se obtuvo en la Universidad de las Américas Puebla a partir de larvas recolectadas en agosto de 2020. Las larvas de *A. armida* recolectadas se lavaron cinco veces con agua destilada (1:5 p/v). Luego del lavado, se secaron en estufa (Felisa, México) durante 12 h a 55°C hasta peso constante, y luego se pulverizaron a 10,000 rpm utilizando un Nutribullet® hasta homogeneizar la textura (12 s), la composición de la harina de *A. armida* fue 20.4% de proteínas, 24% de lípidos, 2.3% de contenido de humedad y 41.2% de carbohidratos (Cortazar-Moya et al., 2023). Se usó una mezcladora/amasadora Legacy HL200 (Hobart, Troy, OH, EE. UU.) para mezclar y amasar los ingredientes. Todas las piezas de pan se fermentaron durante 30 min a 40°C utilizando un horno Mini combo (Zucchelli Alpha, Trevenzuolo, Verona, Italia); luego, la masa se dividió y formó en piezas (60 g) y se horneó a 200 °C durante 18 min en un horno eléctrico Mini combo (Zucchelli Alpha, Trevenzuolo, Verona, Italia). Luego, el pan se enfrió a temperatura ambiente durante 60 minutos y se almacenó en bolsas de polietileno selladas para su uso posterior.

3.3.2.2 Determinación de las propiedades de calidad del pan.

A los panes se le evaluaron las propiedades de calidad: pH, contenido de humedad, actividad del agua (a_w), volumen específico, relación peso/alto, color y dureza. El pH del pan se midió con un medidor de pH modelo HI2210 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) según el método 02–52 de la AACCI (American Association of Cereal Chemists., 2000). Para la

determinación del contenido de humedad se utilizó el método AOAC 930.15 (AOAC, 2019). La a_w se midió de una muestra mixta de miga y corteza en un equipo AquaLab Serie 4TEV (Meter Food, Pullman, WA, EE. UU.). La determinación del volumen se midió mediante el la técnica de desplazamiento de semillas de acuerdo al método AACC 10-05 (American Association of Cereal Chemists., 2000), y el volumen específico del pan se expresó como el volumen entre el peso del pan (cm^3/g). Para medir la relación ancho/alto se utilizó un vernier electrónico en las rebanadas centrales con un espesor de 2.5 cm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las mediciones se realizaron al día siguiente del horneado de los panes.

El color de la miga y de la corteza se midió utilizando un colorímetro CR-410 (Konica Minolta Sensing Inc., Tokio, Japón). Las diferencias de color se registraron en la escala CIE $L^*a^*b^*$ con respecto a la luminosidad (L^*) y el color (a^* – contribución roja, b^* – contribución amarilla). Los valores numéricos de a^* y b^* se utilizaron para calcular el ángulo de tono (h°) y croma (C^*) que representan el tono y el índice de saturación (E_{c1} , E_{c2}). Se realizaron dos mediciones en diferentes puntos de cada miga y corteza. Además, la diferencia de color total (ΔE) se calculó según la ecuación 3:

$$h^\circ = \left(\frac{\tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)}{(2\pi)} \right) 360$$

Ec. (1)

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Ec. (2)

Los resultados se expresaron como ángulo hue (h°) y Croma (C^*).

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Ec. (3)

donde ΔL , Δa , y Δb son las diferencias de los valores de L^* , a^* , b^* con la muestra control, respectivamente.

El índice de oscurecimiento (IO) ec. 4 y 5, fue calculado usando los valores L^* , a^* , y b^* como se indica a continuación.

$$x = \left(\frac{(a^* + 1.75 L)}{(5.645L^* + a^* - 3.012b^*)} \right) \quad \text{Ec. (4)}$$

$$IO = \left(\frac{100 (x - 0.31)}{0.17} \right) \quad \text{Ec. (5)}$$

La dureza del pan se midió un día después de hornearlo. Se llevó a cabo un análisis del perfil de textura (TPA) utilizando el medidor de textura EZ Test EZ-LX (Shimadzu, Kyoto, Japón) controlado por el software Trapezium X Texture Pl. Una muestra de rebanada (incluida la miga) de la parte central del pan se comprimió dos veces con un espacio de 10 s entre cada compresión a lo largo de su eje con un disco de acero inoxidable de 50 mm de diámetro a una velocidad de $1.7 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ hasta un 25% de deformación, de acuerdo al método reportado por Hernández-Figueroa et al. (2023). Las medidas se tomaron por duplicado. La dureza se registró a partir de la medición de TPA.

3.3.2.3 Evaluación sensorial de los panes

Los panes fueron evaluados por 20 jueces no entrenados. Se probaron las ocho formulaciones (Tabla 10) con *A. armida* o *A. domesticus*. Se analizaron cinco atributos del pan (aroma, color, apariencia de la miga, apariencia de la corteza, sabor y aceptabilidad general) utilizando una escala hedónica de 9 puntos, donde 9 representa “me gusta mucho” y 1 representa “Me disgusta mucho”. Se consideraron aceptables puntuaciones medias de ~ 6.0 .

3.3.2.4 Análisis estadístico

Los resultados del diseño experimental se expresaron como valores promedios y desviación estándar. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Análisis de Varianza (ANOVA). Las comparaciones de pares para los valores medios se realizaron con la prueba de Tukey $p < 0.05$, utilizando el software Minitab 18® (Minitab Inc., EE. UU.). Antes del análisis estadístico, se evaluó la normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas.

Se utilizó Minitab 18® (Minitab Inc., EE. UU.) para el análisis mediante un diseño factorial de dos niveles para identificar variables experimentales e interacciones que influyen significativamente en las características del pan. Se utilizó un diseño factorial 2^3 para investigar los efectos de tres variables independientes, el porcentaje de harina de insectos, el porcentaje de harina de trigo y el porcentaje de agua, sobre las propiedades físicas, de calidad y sensoriales del pan. Además, los datos experimentales se analizaron para ajustarlos a la ecuación del modelo de regresión (ecuación 1):

Modelo de regresión $Y =$

$$\beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_4 \cdot x_1 \cdot x_2 + \beta_5 \cdot x_1 \cdot x_3 + \beta_6 \cdot x_2 \cdot x_3 + \beta_7 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$$

donde, x_1 representa el factor harina de insectos (*A. armida* o *A. domesticus*), x_2 representa el porcentaje de agua, x_3 representa la harina de trigo y β_i son los coeficientes de los efectos principales y sus interacciones.

3.3.2 Resultados y discusión

3.3.3.1 Propiedades de calidad del pan

Se utilizó un diseño factorial de dos niveles como método de análisis para determinar cuáles de las variables afecta la calidad, propiedades texturales y sensoriales del pan adicionado con harina de *A. armida* y *A. domesticus*. El diseño comprende 8 formulaciones (Tabla 10).

Las propiedades de calidad del pan con harina de *A. armida* se presentan en la Tabla 11, los valores de contenido de humedad, actividad de agua y relación ancho/alto (A/a) no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) entre las ocho formulaciones y el control. El contenido de humedad de los panes con harina de *A. armida* varió entre 32.3 a 37.7% (bh), que es el

rango reportado para el pan de trigo (33 a 42%) (Bárcenas & Rosell, 2005; Park et al., 2006; Vartolomei & Turtoi, 2021), en cuanto a la actividad del agua los valores de las ocho formulaciones no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) del control. El gluten, así como los gránulos de almidón, son los principales factores que influyen en la retención de humedad en el pan, en el caso de la harina de *A. armida* se reportó que tiene buenas propiedades de retención de agua del 222.5 %, este hecho puede contribuir a la retención de humedad observada en las muestras Faa1 a Faa8 (Cortazar-Moya et al., 2023; Hernández-Figueroa et al., 2023). En este sentido, la adición de harina de *A. armida* no influyó negativamente en la retención de agua en el pan. Finalmente, la relación A/a no fue afectada por la adición de la harina de *A. armida*, lo que puede estar relacionado a la interacción de las proteínas presentes en esta harina y el gluten presente en la harina de trigo logrando la estabilidad adecuada de la matriz del pan, lo que evita que la relación A/a se vea alterada (Bárcenas & Rosell, 2005; Bojňanská et al., 2021).

El volumen específico es un buen indicador de la calidad del pan y está relacionado con la cantidad de agua y gas retenidos en la matriz del pan. Diferentes formulaciones y métodos para preparar el pan pueden provocar una variación de su volumen final. En este sentido, el volumen específico del pan comercial de trigo se ha reportado en un rango entre 3.5 y 5.5 cm³/g. Los panes que contenían harina de *A. armida* tuvieron un volumen específico significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con el pan de trigo control, con excepción del pan elaborado con la mezcla 4Faa (5-50-90) que fue significativamente similar al control ($p < 0.05$) con un volumen específico de 3.67 cm³/g, este valor se encuentra en el rango reportado para un pan de buena calidad. El menor volumen específico y, por tanto, de menor calidad fue el pan elaborado con la mezcla 6Faa (10-50-95). El volumen final del pan depende de la expansión de la masa durante la fermentación y horneado, y de la capacidad de la matriz para estabilizar y retener el CO₂, esta capacidad está relacionada con la cantidad de gluten y la interacción del gluten con otros componentes como las proteínas, en este caso las proteínas de la harina de *A. armida* (Kowalski et al., 2022). En otro estudio en el que se añadió harina de leguminosas al pan también se encontró que reducían el volumen del pan cuando la sustitución de harina era de entre 10 y 12% (Bojňanská et al., 2021). González et al., (2019) reportaron tres harinas de insectos que afectan el volumen específico de las formulaciones de

pan. En este estudio, los panes que contenían harinas de insectos tuvieron un volumen específico significativamente menor en comparación con el control de trigo (tabla 2). En todas las formulaciones probadas con adiciones de harina de *A. armida* excepto 6Faa, el volumen del pan fue significativamente menor en comparación con el control ($p < 0.05$), esta disminución en el volumen específico observada puede deberse a la interrupción de la formación del gluten, resultando en la disminución de la capacidad de retención de gas durante la fermentación y el horneado. Se ha reportado que la elaboración de pan es sensible a la adición de ingredientes sin gluten a la harina de trigo, en relación con la alteración del desarrollo del gluten y la reducción de la producción de gas (Haber et al., 2019).

En cuanto al pH, Zhao et al. (2020) y Hernández-Figueroa et al. (2022) reportan valores de pH en pan blanco entre 5.9 y 6.1, lo que lo hace ligeramente ácido. Se sabe que el pH de la masa del pan puede afectar la textura y sabor del pan; un pH bajo (más ácido) puede hacer que la masa se vuelva pegajosa y difícil de trabajar, dando lugar a un pan denso y pesado (Hernández-Figueroa et al., 2023). El pan control tuvo un pH de 5.9, el cual es significativamente diferente al resto de las formulaciones ($p < 0.05$). La adición de la harina de *A. armida* disminuyó el pH del pan; la muestra 1Faa (10-60-90) tuvo el valor más bajo, 5.3. En este sentido Osimani et al. (2018) también reportaron una disminución en los valores de pH del pan al agregar 10% de harina de grillo (5.71). Esta reducción del pH también podría afectar algunas características físicas como la relación A/a y el volumen específico del pan (Hernández-Figueroa et al., 2023) como se puede observar en la Tabla 11. Este proceso puede estar asociado con la activación de proteasas del gluten a pH más bajo, que afectan la red del gluten disminuyendo la retención de vapor de agua durante el horneado (Hernández-Figueroa et al., 2023).

La textura del pan depende de sus propiedades mecánicas, las cuales contribuyen significativamente a su vida útil y aceptación por parte del consumidor (Balestra et al., 2011). La dureza es uno de los parámetros más frecuentemente utilizados para evaluar la textura del pan, la cual se ve afectada por diversos factores como el tipo de aditivos, el manejo de la masa y el peso específico de la miga de pan, entre otros. El análisis estadístico mostró que el control no fue significativamente diferente del resto de las muestras ($p < 0.05$) excepto la

muestra 6Faa (10-50-95) que fue la más dura (91.2 N) y 1Faa (que fue la más suave (35.3N) (Tabla 11).

Tabla 11. Propiedades de calidad de los panes con harina de *A. armida*

Muestras	Humedad (%)	Actividad de agua (a_w)	Relación A/a	Volumen específico (cm^3/g)	pH	Dureza (N)
Control	31.9 ± 0.1 ^a	0.95 ± 0.01 ^a	2.05 ± 0.01 ^a	3.84 ± 0.17 ^a	5.9 ± 0.02 ^a	60.1 ± 5.1 ^{b,c}
1Faa	32.6 ± 3.0 ^a	0.95 ± 0.01 ^a	2.08 ± 0.01 ^a	3.19 ± 0.01 ^{b,c}	5.3 ± 0.02 ^e	35.3 ± 3.1 ^d
2Faa	32.3 ± 3.1 ^a	0.93 ± 0.01 ^a	2.33 ± 0.05 ^a	3.28 ± 0.03 ^b	5.4 ± 0.02 ^d	51.6 ± 4.5 ^{b,c,d}
3Faa	35.3 ± 2.1 ^a	0.94 ± 0.01 ^a	2.14 ± 0.11 ^a	3.13 ± 0.04 ^{b,c,d}	5.5 ± 0.02 ^c	64.7 ± 2.6 ^b
4Faa	33.4 ± 2.8 ^a	0.93 ± 0.01 ^a	2.40 ± 0.2 ^a	3.67 ± 0.04 ^a	5.5 ± 0.02 ^{c,d}	48.5 ± 5.2 ^{b,c,d}
5Faa	37.7 ± 2.1 ^a	0.95 ± 0.1 ^a	2.44 ± 0.19 ^a	3.16 ± 0.03 ^{b,c}	5.5 ± 0.03 ^{c,d}	50.4 ± 0.6 ^{b,c,d}
6Faa	32.3 ± 3.1 ^a	0.94 ± 0.01 ^a	3.06 ± 0.9 ^a	2.45 ± 0.1 ^e	5.5 ± 0.02 ^{c,d}	91.2 ± 5.5 ^a
7Faa	34.5 ± 2.6 ^a	0.93 ± 0.01 ^a	2.50 ± 0.06 ^a	2.90 ± 0.02 ^{c,d}	5.7 ± 0.02 ^{c,d}	38.5 ± 3.1 ^{c,d}
8Faa	35.2 ± 1.3 ^a	0.93 ± 0.01 ^a	2.62 ± 0.09 ^a	2.83 ± 0.07 ^d	5.7 ± 0.02 ^b	61.2 ± 4.7 ^{b,c}

Cada valor se presenta como la media ± DE (n=2). En cada columna, los superíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Las propiedades de calidad del pan con harina de *A. domesticus* se presentan en la Tabla 12. Los valores del contenido de humedad y dureza no mostraron diferencia significativa entre las formulaciones ($p > 0.05$). Los valores de a_w variaron de 0.90 a 0.95, la muestra de control tuvo la a_w más alta y 6Fad (10-50-95) la más baja. Los valores altos de a_w pueden promover el crecimiento de moho en la superficie del pan, y una forma común de reducir el crecimiento de moho es controlar y reducir estos valores de a_w (De Luca et al., 2021). La a_w crítica para el crecimiento de moho depende de la especie/sustrato de moho y de la temperatura. En comparación con las muestras con harina de *A. armida* (Tabla 11), la harina de *A. domesticus* (Tabla 12) reduce la actividad del agua del pan a 0.90, lo que puede ser beneficioso para prevenir el crecimiento de moho.

Los resultados de la relación A/a mostraron que las muestras 5Fad (5-60-95) y 6Fad (10-50-95) tuvieron la relación más alta (3.69 y 5.43, respectivamente) y fueron significativamente diferentes del resto de las muestras, las rebanadas de estos panes eran más anchas y menos altas que el resto (Fig. 7). La muestra con menor volumen específico fue 6Fad (10-50-95), y era significativamente diferente de la muestra control ($p < 0.05$); esto es similar a lo que se observó en 6Faa (50-10-95). En el caso del pH, todas las formulaciones adicionadas con *A. domesticus* fueron significativamente diferentes y menores al control

($p < 0.05$), el mismo efecto se observó en las muestras con harina de *A. armida* (Tabla 11), ambas harinas de insectos pueden reducir el pH, lo que puede resultar útil si se utiliza como factor para prolongar la vida útil del pan.

Tabla 12. Propiedades de calidad de los panes con harina de *A. domesticus*.

Muestras	Humedad (%)	Actividad de agua (a_w)	Relación A/a	Volumen específico (cm^3/g)	pH	Dureza (N)
Control	31.9 \pm 0.1 ^a	0.95 \pm 0.01 ^a	2.05 \pm 0.01 ^e	3.84 \pm 0.2 ^a	5.9 \pm 0.02 ^a	60.1 \pm 5.1 ^a
1Fad	32.3 \pm 0.4 ^a	0.93 \pm 0.01 ^{a,b}	2.28 \pm 0.01 ^{d,e}	3.51 \pm 0.1 ^{a,b}	5.8 \pm 0.02 ^b	32.2 \pm 8.9 ^a
2Fad	30.8 \pm 1.6 ^a	0.92 \pm 0.01 ^{b,c,d}	2.51 \pm 0.02 ^{c,d,e}	2.94 \pm 0.2 ^{a,b,c}	5.8 \pm 0.02 ^{b,c}	29.5 \pm 7.7 ^a
3Fad	32.3 \pm 1.7 ^a	0.92 \pm 0.01 ^{b,c,d}	2.70 \pm 0.2 ^{c,d}	3.17 \pm 0.04 ^{a,b}	5.7 \pm 0.01 ^{b,c,d}	36.1 \pm 2.2 ^a
4Fad	31.2 \pm 0.5 ^a	0.93 \pm 0.01 ^{b,c}	2.80 \pm 0.06 ^c	2.72 \pm 0.3 ^{b,c}	5.6 \pm 0.02 ^e	38.1 \pm 5.1 ^a
5Fad	30.7 \pm 1.3 ^a	0.92 \pm 0.1 ^{b,c,d}	3.69 \pm 0.01 ^b	2.05 \pm 0.2 ^{c,d}	5.7 \pm 0.04 ^{d,e}	36.8 \pm 4.4 ^a
6Fad	24.5 \pm 0.3 ^b	0.90 \pm 0.01 ^d	5.43 \pm 0.3 ^a	1.32 \pm 0.1 ^d	5.7 \pm 0.02 ^{b,c,d,e}	49.8 \pm 8.9 ^a
7Fad	28.4 \pm 1.7 ^{a,b}	0.91 \pm 0.01 ^{c,d}	2.23 \pm 0.07 ^{d,e}	3.34 \pm 0.1 ^{a,b}	5.7 \pm 0.02 ^{c,d,e}	41.9 \pm 8.5 ^a
8Fad	30.6 \pm 2.1 ^a	0.92 \pm 0.01 ^{b,c,d}	2.64 \pm 0.03 ^{c,d}	2.85 \pm 0.5 ^{b,c}	5.8 \pm 0.01 ^{b,c}	47.8 \pm 2.3 ^a

Cada valor se presenta como la media \pm DE (n=2). En cada columna, los superíndices con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

El color del pan es uno de los indicadores más importantes de calidad. El color deseado de la corteza del pan debe ser dorado y blanco cremoso para el color de la miga. El dorado de la masa durante el horneado es causado por reacciones químicas como la pirólisis, la caramelización y la reacción de Maillard, o una combinación de estas reacciones en función de las diferentes formulaciones. El color es un aspecto crucial de los productos de panadería; además del volumen y la textura, influye en la elección y aceptación del consumidor. La forma más sencilla de evaluarlo es mediante la diferencia de color total (ΔE) y el índice de oscurecimiento (IO) (Fig. 8 a y b, Fig. 9 a y b) (Kowalski et al., 2022).

En el caso de la corteza de las piezas de pan, la más oscura fue la del pan elaborado con la fórmula 8Faa (5-50-95) para *A. armida* y las formulaciones 6Fad (10-50-95) y 7Fad (10-60-95) para *A. domesticus* (Fig. 8a). Este cambio en el color de la corteza respecto al control puede estar relacionado con el proceso de caramelización durante el horneado y la reacción de Maillard entre grupos amino (aminoácidos y proteínas) y compuestos carbonílicos (azúcares reductores) (Pauter et al., 2018). La relación observada entre el oscurecimiento de la corteza del pan y la sustitución de la harina de trigo por harina de insectos puede estar relacionada, con el color más oscuro de la harina de insectos, en

comparación con la harina de trigo, y por otro lado, puede estar relacionada con el contenido de proteínas de estas materias primas (Kowalski et al., 2022). Se observaron valores de índice de oscurecimiento (IO) más altos para las cortezas de pan en comparación con las migas del pan.

En cuanto a los valores de diferencia de color total entre el control y la corteza de las piezas de pan elaboradas con la harina de *A. armida* no hubo diferencia significativa entre sí ($p>0.05$), mientras que la harina de *A. domesticus* produjo mayor diferencia de color en la muestra 3Fad (5-60-90), 6Fad (10-50-95) y 7Fad (10-60-95) (Fig. 8b); y la más baja fue de las formulaciones 1Fad (10-60-90), 5Fad (5-60-95) y 8Fad (5-50-95) sin diferencia significativa entre ellas ($p>0.05$). En general, los panes con un 5-10 % de harina de insectos mostraron un valor de IO y ΔE significativamente mayor y perceptible para el ojo humano (Mokrzycki, & Tatol, 2011).

En la Figura 9a se presentan los resultados del índice de oscurecimiento de la miga del pan con la harina de *A. armida*. La adición de harina de *A. armida* al pan da como resultado un índice de oscurecimiento más alto en las formulaciones 5Faa (5-60-95), 7Faa (10-60-95) y 8Faa (5-50-95). El menor IO se observó en la miga del pan de las formulaciones 1Faa (10-60-90), 2Faa (10-50-90), 3Faa (5-60-90), 4Faa (5-50-90) y 6Faa (10-50-95) sin diferencias significativas entre ellos. No hubo diferencia significativa en el ΔE de la miga de todas las formulaciones de mezcla, ni para *A. armida* ni para *A. domesticus*. Las variables evaluadas no afectaron esta característica.

Kowalski et al. (2022) también reportaron un IO mayor en la corteza que en la miga de los panes adicionados con harina de *Alphitobius diaperinus*, *A. domesticus* y *Tenebrio molitor* con un valor promedio de 90.45, mientras que el IO de la corteza del pan con *A. armida* tenía 55.74 y la corteza del pan con *A. domesticus* 69.99. Respecto al ΔE Haber et al., (2019) describieron resultados similares en pan adicionado con 10% de *Schistocerca gregaria* (22.1), con relación a los observados en la miga de los panes con *A. armida* y *A. domesticus* 21.95 y 15.95 respectivamente.



Figura 7. Rebanadas de panes con harina de *A. armida* (1Faa-8Faa) y *A. domesticus* (1Fad-8Fad).

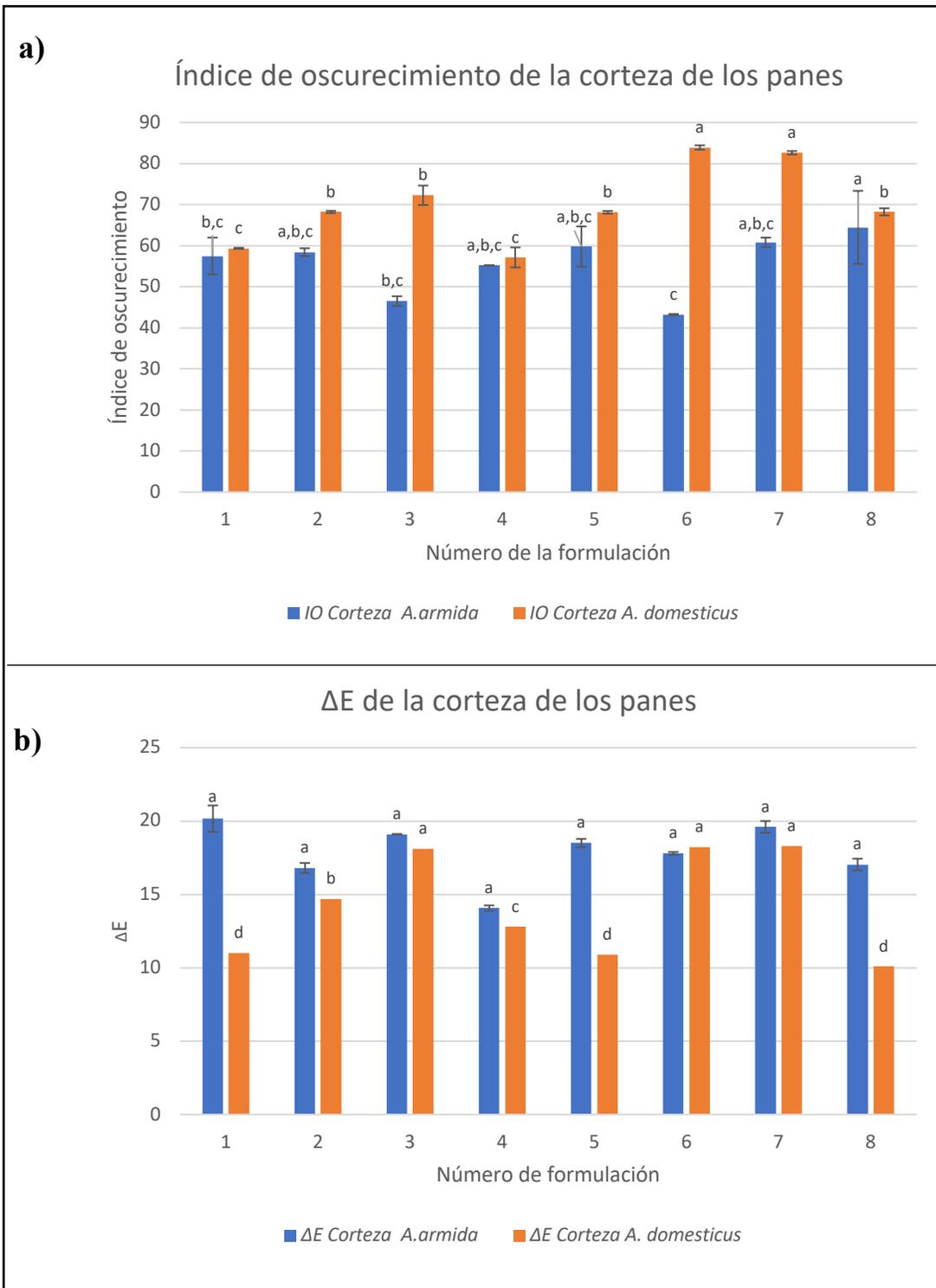


Figura 8. Propiedades de color de la corteza del pan con harina de insectos (*A. armida* y *A. domesticus*). a) Índice de oscurecimiento de la corteza del pan con muestras de *A. armida* y *A. domesticus* del 1 al 8. b) Diferencia de color (ΔE) de la corteza de las muestras de pan 1-8 adicionadas con harina de *A. armida* y *A. domesticus*. Cada valor se presenta como la media \pm DE (n=2). Los valores seguidos de una letra diferente en cada barra del mismo color son significativamente diferentes ($p < 0.05$). 1 (10-60-90), 2 (10-50-90), 3 (5-60-90), 4 (5-50-95), 6 (10-50-95), 7 (10-60 -95), 8 (5,50-95).

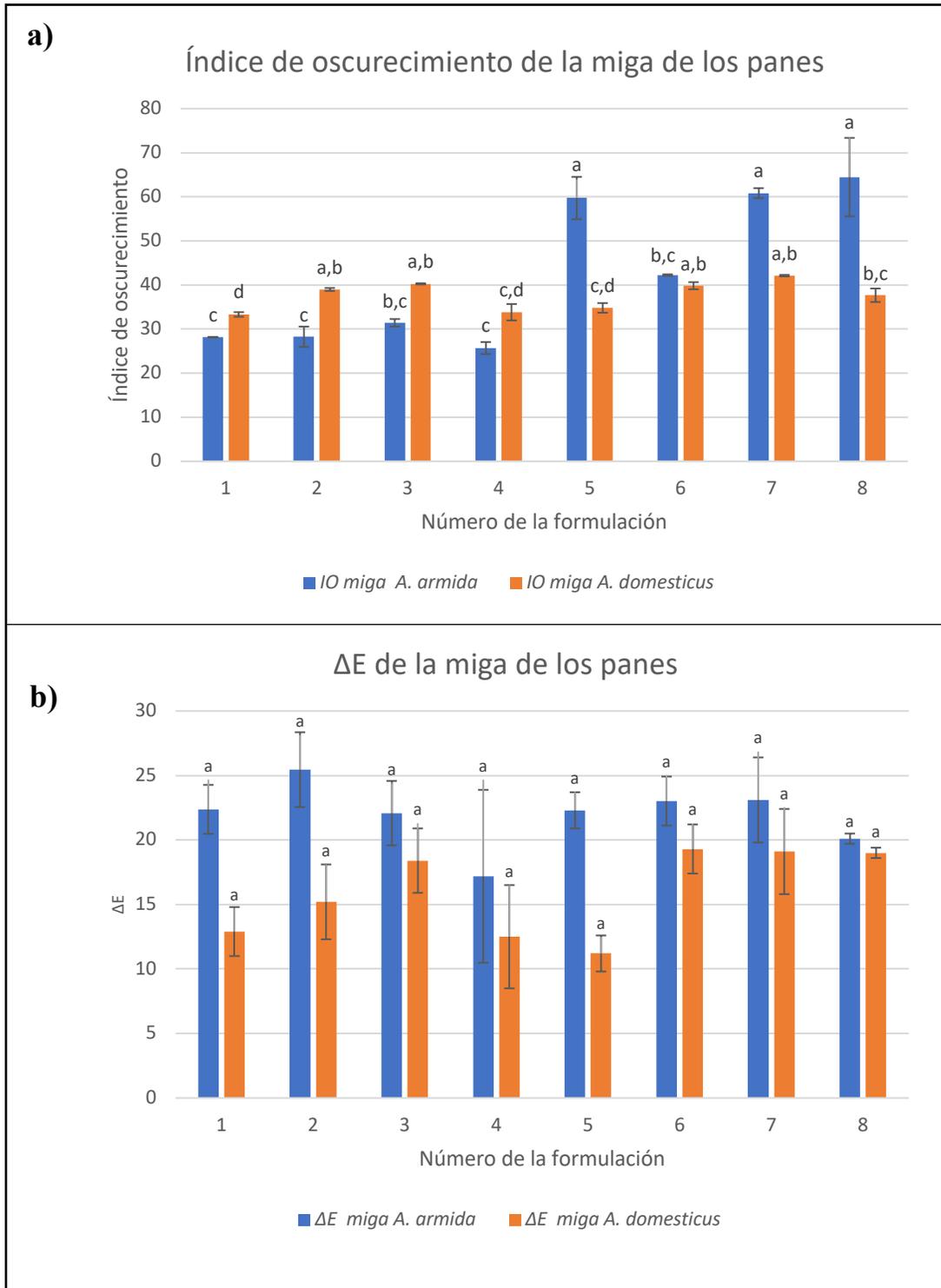


Figura 9. Propiedades de color de la miga del pan con harina de insectos (*A. armida* y *A. domesticus*). a) Índice de oscurecimiento de la corteza del pan con muestras de *A. armida* y *A. domesticus* del 1 al 8. b) Diferencia de color (ΔE) de la corteza de las muestras de pan 1-8 adicionadas con harina de *A. armida* y *A. domesticus*. Cada valor se presenta como la media \pm DE (n=2). Los valores seguidos de una letra diferente en cada barra del mismo color son significativamente diferentes ($p < 0.05$). 1 (10-60-90), 2 (10-50-90), 3 (5-60-90), 4 (5-50-95), 6 (10-50-95), 7 (10-60-95), 8 (5,50-95)

3.3.3.2 Evaluación sensorial de los panes

Los resultados del análisis sensorial realizado para las muestras 1Faa a 8Faa se muestran en la Tabla 13. Para el atributo de aroma 8Faa tuvo la puntuación más alta (≈ 6.95), que de acuerdo a la escala hedónica corresponde a "me gusta ligeramente", la muestra 1Faa tuvo la puntuación más baja en este atributo; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los resultados de las muestras y el control ($p > 0.05$).

Respecto al color también la muestra 8Faa tuvo el mejor puntaje (≈ 6.7), aunque tampoco se observó una diferencia significativa entre las muestras ($p > 0.05$). La puntuación más alta para la apariencia de la corteza y la miga fue 6.9 y 6.8 para 7Faa (10-60-95) y 2Faa (10-50-90), respectivamente. Finalmente, la aceptabilidad general y el sabor del pan elaborado con la formulación 7Faa (10-60-95) tuvo las puntuaciones más altas de 6.9 y 6.6, respectivamente.

Tabla 13. Calificaciones promedio de la evaluación sensorial de las rebanadas de pan adicionadas con harina de *A. armida* (jueces no entrenados).

Atributo	Muestras								
	1Faa	2 Faa	3 Faa	4 Faa	5 Faa	6 Faa	7 Faa	8 Faa	Control
Aroma	6.1 \pm 2.4 ^a	6.4 \pm 2.4 ^a	6.4 \pm 1.8 ^a	6.8 \pm 1.7 ^a	6.8 \pm 1.9 ^a	6.3 \pm 1.6 ^a	6.6 \pm 1.9 ^a	6.9 \pm 2.1 ^a	6.2 \pm 2.1 ^a
Color	6.0 \pm 1.9 ^a	6.4 \pm 1.9 ^a	6.6 \pm 1.7 ^a	6.1 \pm 1.9 ^a	6.7 \pm 1.8 ^a	5.7 \pm 1.9 ^a	6.5 \pm 1.7 ^a	6.7 \pm 2.3 ^a	6.1 \pm 2.1 ^a
Apariencia de la corteza	6.4 \pm 1.9 ^a	6.5 \pm 2.1 ^a	6.5 \pm 1.9 ^a	6.8 \pm 2.1 ^a	6.5 \pm 2.1 ^a	6.3 \pm 1.9 ^a	6.9 \pm 2.1 ^a	6.8 \pm 2.1 ^a	6.2 \pm 2.1 ^a
Apariencia de la miga	6.5 \pm 1.7 ^a	6.8 \pm 2.1 ^a	6.5 \pm 1.7 ^a	6.6 \pm 1.8 ^a	6.5 \pm 1.7 ^a	6 \pm 1.8 ^a	6.6 \pm 1.6 ^a	6.2 \pm 2.1 ^a	6.3 \pm 1.9 ^a
Sabor	5.5 \pm 2.4 ^a	5.9 \pm 1.8 ^a	6.3 \pm 2.1 ^a	6.3 \pm 1.7 ^a	6.5 \pm 2.1 ^a	5.6 \pm 1.8 ^a	6.6 \pm 1.9 ^a	6.3 \pm 2.4 ^a	6.1 \pm 2.1 ^a
Aceptabilidad general	6.2 \pm 2.1 ^a	6.4 \pm 1.7 ^a	6.6 \pm 1.6 ^a	6.7 \pm 1.5 ^a	6.8 \pm 1.9 ^a	6.1 \pm 1.8 ^a	6.9 \pm 1.8 ^a	6.7 \pm 2.2 ^a	6.2 \pm 2.1 ^a

Para cada atributo, diferentes letras en superíndice indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Control: pan elaborado con la formulación básica.

Los resultados de la evaluación sensorial de los panes adicionados con harina de *A. domesticus* se presentan en la Tabla 14. El atributo aroma tuvo puntajes entre 5.8 y 6.5, el más alto fue para el pan de la formulación 5-60-90 (3Fad) pero no hubo diferencia significativa con el resto de las muestras, incluido el control ($p > 0.05$).

Las puntuaciones del resto de los atributos (color, apariencia de corteza y miga, sabor y aceptabilidad general) tuvieron calificaciones entre 5.5 y 6.5, lo que se clasifica como “ligeramente parecido”, según la escala hedónica. Las muestras 1Fad a 8Fad no tuvieron diferencia significativa con el control. Los jueces no informaron diferencias sensoriales entre las rebanadas de pan con harina de insecto (*A. domesticus*) y el control con harina de trigo.

Como se puede observar en las tablas 13 y 14, los panes con *A. armida* tuvieron puntajes más altos en aceptabilidad general en comparación con las calificaciones de los panes adicionados con *A. domesticus*. Por lo tanto, se puede inferir que el consumidor prefiere el pan adicionado con *A. armida*.

Tabla 14. Calificaciones promedio de la evaluación sensorial de las rebanadas de pan adicionadas con harina de *A. domesticus* (jueces no entrenados).

Atributo	Muestras								
	1Fad	2 Fad	3 Fad	4 Fad	5 Fad	6 Fad	7 Fad	8 Fad	Control
Aroma	6.1 ±2.3 ^a	6.1 ±2.2 ^a	6.5 ±2.1 ^a	6.1 ±2.1 ^a	6.3 ±1.9 ^a	5.4 ±2.1 ^a	5.8 ±2.3 ^a	6.2 ±1.9 ^a	6.2 ±2.1 ^a
Color	5.9 ±2.5 ^a	6.1 ±2.3 ^a	6.1 ±2.1 ^a	6 ±2.1 ^a	6.2 ±1.9 ^a	5.5 1.9 ^a	5.8 ±2.3 ^a	6.5 ±2.1 ^a	6.1 ±2.1 ^a
Apariencia de la corteza	6.1 ±2.2 ^a	6.2 ±2.4 ^a	6.1 ±2.1 ^a	6.1 ±2.1 ^a	6.3 ±2.2 ^a	5.6 ±2.2 ^a	6.2 ±2.3 ^a	6.1 ±2.1 ^a	6.2 ±2.1 ^a
Apariencia de la miga	6.1 ±2.3 ^a	6 ±2.4 ^a	6 ±1.8 ^a	5.5 ±2.1 ^a	6.1 ±2.1 ^a	5.6 ±2.2 ^a	5.6 ±2.4 ^a	5.9 ±2.6 ^a	6.3 ±1.9 ^a
Sabor	6.2 ±2.1 ^a	5.9 ±2.3 ^a	5.6 ±2.5 ^a	5.5 ±2.2 ^a	6 ±2.1 ^a	5.5 ±2.5 ^a	5.5 ±2.5 ^a	6.1 ±2.3 ^a	6.1 ±2.1 ^a
Aceptabilidad general	6.2 ±2.1 ^a	6 ±2.2 ^a	5.7 ±2.2 ^a	5.8 ±2.2 ^a	6.2 ±2.1 ^a	5.6 ±2.3 ^a	5.7 ±2.4 ^a	6.3 ±2.5 ^a	6.2 ±2.1 ^a

Para cada atributo, diferentes letras en superíndice indican una diferencia significativa ($p < 0.05$). Control: pan elaborado con la formulación básica.

A partir de los coeficientes obtenidos de los modelos polinomiales se realizó la optimización para obtener las proporciones de los ingredientes que nos permitieran maximizar el sabor y la aceptabilidad general de las piezas de pan (Tablas 13 y 14). Los resultados de la optimización se muestran en la Tabla 15. Los resultados optimizados coinciden con las proporciones de ingredientes de la formulación 5Faa para la harina de *A. armida* y la formulación 8Fad para la harina de *A. domesticus* probados en este estudio.

Tabla 15. Porcentaje de los ingredientes del pan de acuerdo a la optimización para maximizar sabor y aceptabilidad general.

	Harina de insecto (%)	Agua (%)	Harina de trigo (%)
<i>Arsenura armida</i>	5	60	95
<i>Acheta domesticus</i>	5	50	95

La Tabla 16 muestra los valores predichos y experimentales de los panes correspondientes a las fórmulas optimizadas. Khuenpet et al. (2020) probaron un pan adicionado con diferentes porcentajes de polvo de *Tenebrio molitor*; encontraron que una adición del 5% modificó el volumen específico de 4.13 cm³/g (control) a 3.38 cm³/g, en el caso del pan con *A. armida* en este estudio se obtuvo un menor volumen específico de 3.16 cm³/g y 2.85 cm³/g con la harina de *A. domesticus*, este último valor es cercano al reportado por Bartkiene et al. (2022) para pan con 5% de *A. domesticus* (2.52 cm³/g). En el estudio de Khuenpet et al. (2020), reportaron que a medida que aumenta el porcentaje de harina de insectos, el volumen específico del pan disminuyó, el pan con 10% tuvo un volumen específico de 2.40 cm³/g y con 15% 2.03 cm³/g. La disminución en el volumen específico del pan puede deberse a la interrupción de la formación de la red del gluten, lo que resulta en una reducción de la capacidad del pan para retener gas durante la fermentación y el horneado. Cuando se añaden ingredientes sin gluten a la harina de trigo, se puede alterar el desarrollo del gluten y reducir la producción de gases, lo que puede afectar negativamente el proceso de elaboración de pan (González et al., 2019a).

Tabla 16. Valores predichos y experimentales de las propiedades de calidad, sabor y aceptabilidad general del pan elaborado con la fórmula optimizada.

	<i>A. Armida</i>		<i>A. domesticus</i>	
	Predicho	Experimental	Predicho	Experimental
Dureza (N)	49.3	50.4	47.8	47.9
Relación A/a	2.3	2.4	3.2	2.6
Volumen específico (cm ³ /g)	3.1	3.2	2.5	2.9
Humedad (%)	37.8	37.7	30.2	30.6
a _w	0.94	0.95	0.92	0.92
pH	5.57	5.53	5.8	5.8
Sabor	6.6	6.5	6.1	6.1
Aceptabilidad general	6.8	6.8	6.3	6.3

Los valores predichos y experimentales de los panes se presentan en la Tabla 16. El error promedio entre los valores predichos y los valores experimentales fue del 1.9% para el pan con *A. armida* y del 4.2% para el pan con *A. domesticus*. La actividad del agua para los valores experimentales fue de 0.95 para el pan con *A. armida* y 0.92 para *A. domesticus*, Gantner et al., (2022), reportaron 0.96-0.97 para pan adicionado con *T. molitor* (5-15%). El pan, con buena aceptabilidad y sabor, tiene un contenido de humedad de 30.6% con harina de *A. domesticus* y 37.7% con harina de *A. armida*, los valores predichos se aproximan a los experimentales. Sin embargo, las diferencias entre las muestras con una u otra harina pueden estar relacionadas con la capacidad de retención de agua reportados para la harina de *A. armida* en investigaciones anteriores (Cortazar-Moya et al., 2023) esta mayor retención de agua puede estar relacionada con el mayor contenido de humedad final de estos panes.

El pH reportado en masa adicionada con 5% de harina de grillo fue de 5.32, con 10% de harina de 4.93 y de 5.32 con 15% de harina de *A. domesticus* (Bartkiene et al., 2022), estos valores resultan menores comparados con el valor experimental obtenido en este estudio (5.78). El pan con *A. armida* tuvo un pH menor que el que presentó con harina de *A. domesticus*. Los valores experimentales y predichos de dureza fueron superiores a los reportados por otros autores para pan adicionado con harinas de insectos (Bartkiene et al., 2022; Gantner et al., 2022; González et al., 2019a).

3.4 Conclusión

Los resultados de este estudio demostraron la posibilidad de utilizar harinas de insectos en productos horneados. La adición de cualquiera de las harinas puede cambiar algunas características de calidad y propiedades físicas del pan; una de las propiedades más importantes por su impacto en la aceptabilidad del producto es el color; la adición de harina de insectos produce una apariencia más oscura y un mayor cambio de color total. Aunque la percepción sensorial no fue afectada respecto al control con harina de trigo. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para investigar los efectos de agregar insectos comestibles a otras matrices alimentarias y aumentar la aceptación y conciencia de los consumidores.

3.5 Referencias

- Agrahar-Murugkar, D. (2020). Food to food fortification of breads and biscuits with herbs, spices, millets and oilseeds on bio-accessibility of calcium, iron and zinc and impact of proteins, fat and phenolics. *LWT*, *130*, 109703. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109703>
- American Association of Cereal Chemists. (2000). *Approved methods of the American association of cereal chemists (10th ed)*. AACC.
- Balestra, F., Cocci, E., Pinnavaia, G., & Romani, S. (2011). Evaluation of antioxidant, rheological and sensorial properties of wheat flour dough and bread containing ginger powder. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(3), 700–705. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.017>
- Bárcenas, M. E., & Rosell, C. M. (2005). Effect of HPMC addition on the microstructure, quality and aging of wheat bread. *Food Hydrocolloids*, *19*(6), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.01.005>
- Bartkiene, E., Starkute, V., Katuskevicius, K., Laukyte, N., Fomkinas, M., Vysniauskas, E., Kasciukaityte, P., Radvilavicius, E., Rokaite, S., Medonas, D., Valantinaviciute, E., Mockus, E., & Zokaityte, E. (2022). The contribution of edible cricket flour to quality parameters and sensory characteristics of wheat bread. *Food Science & Nutrition*, *10*(12), 4319–4330. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3024>
- Bojňanská, T., Musilová, J., & Vollmannová, A. (2021). Effects of Adding Legume Flours on the Rheological and Breadmaking Properties of Dough. *Foods*, *10*(5), 1087. <https://doi.org/10.3390/foods10051087>
- Cortazar-Moya, S., Mejía-Garibay, B., López-Malo, A., & Morales-Camacho, J. I. (2023a). Nutritional composition and techno-functionality of non-defatted and defatted flour of edible insect *Arsenura armida*. *Food Research International*, *173*, 113445. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113445>
- Cortazar-Moya, S., Mejía-Garibay, B., López-Malo, A., & Morales-Camacho, J. I. (2023b). Nutritional composition and techno-functionality of non-defatted and defatted flour of edible insect *Arsenura armida*. *Food Research International*, *173*, 113445. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113445>
- De Luca, L., Aiello, A., Pizzolongo, F., Blaiotta, G., Aponte, M., & Romano, R. (2021).

- Volatile Organic Compounds in Breads Prepared with Different Sourdoughs. *Applied Sciences*, 11(3), 1330. <https://doi.org/10.3390/app11031330>
- Gantner, M., Król, K., Piotrowska, A., Sionek, B., Sadowska, A., Kulik, K., & Wiącek, M. (2022). Adding Mealworm (*Tenebrio molitor* L.) Powder to Wheat Bread: Effects on Physicochemical, Sensory and Microbiological Qualities of the End-Product. *Molecules*, 27(19), 6155. <https://doi.org/10.3390/molecules27196155>
- González, C. M., Garzón, R., & Rosell, C. M. (2019a). Insects as ingredients for bakery goods. A comparison study of *H. illucens*, *A. domestica* and *T. molitor* flours. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.021>
- González, C. M., Garzón, R., & Rosell, C. M. (2019b). Insects as ingredients for bakery goods. A comparison study of *H. illucens*, *A. domestica* and *T. molitor* flours. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 51, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.021>
- Guiné, R. P. F. (2022). Textural Properties of Bakery Products: A Review of Instrumental and Sensory Evaluation Studies. *Applied Sciences*, 12(17), 8628. <https://doi.org/10.3390/app12178628>
- Haber, M., Mishyna, M., Martinez, J. J. I., & Benjamin, O. (2019). The influence of grasshopper (*Schistocerca gregaria*) powder enrichment on bread nutritional and sensorial properties. *LWT*, 115, 108395. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108395>
- Herbert, M., & Beacom, E. (2021). Exploring Consumer Acceptance of Insect-based Snack Products in Ireland. *Journal of Food Products Marketing*, 27(6), 267–290. <https://doi.org/10.1080/10454446.2021.1994080>
- Hernández-Figueroa, R. H., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2022). Antifungal Capacity of Poolish-Type Sourdough Supplemented with *Lactiplantibacillus plantarum* and Its Aqueous Extracts In Vitro and Bread. *Antibiotics*, 11(12), 1813. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121813>
- Hernández-Figueroa, R. H., Mani-López, E., & López-Malo, A. (2023). Antifungal activity of wheat-flour sourdough (Type II) from two different *Lactobacillus* in vitro and bread. *Applied Food Research*, 3(2), 100319. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100319>

- Institute of Food Technology of Plant Origin, Poznań University of Life Sciences, Poland, Pauter, P., Róžańska, M., Wiza, P., Dworzak, S., Grobelna, N., Sarbak, P., & Kowalczewski, P. Ł. (2018). Effects of the replacement of wheat flour with cricket powder on the characteristics of muffins. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 17(3), 227–233. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.0570>
- Kowalski, S., Mikulec, A., Mickowska, B., Skotnicka, M., & Mazurek, A. (2022). Wheat bread supplementation with various edible insect flours. Influence of chemical composition on nutritional and technological aspects. *LWT*, 159, 113220. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113220>
- Orkusz, A., Wolańska, W., Harasym, J., Piwowar, A., & Kapelko, M. (2020). Consumers' Attitudes Facing Entomophagy: Polish Case Perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2427. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072427>
- Osimani, A., Milanović, V., Cardinali, F., Roncolini, A., Garofalo, C., Clementi, F., Pasquini, M., Mozzon, M., Foligni, R., Raffaelli, N., Zamporlini, F., & Aquilanti, L. (2018). Bread enriched with cricket powder (*Acheta domesticus*): A technological, microbiological and nutritional evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.007>
- Park, Y.-H., Jung, L.-H., & Jeon, E.-R. (2006). Quality Characteristics of Bread Using Sour Dough. *Preventive Nutrition and Food Science*, 11(4), 323–327. <https://doi.org/10.3746/jfn.2006.11.4.323>
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.005>
- Sogari, G. (n.d.). *Entomophagy and Italian consumers: An exploratory analysis*.
- Vartolomei, N., & Turtoi, M. (2021). The Influence of the Addition of Rosehip Powder to Wheat Flour on the Dough Farinographic Properties and Bread Physico-Chemical Characteristics. *Applied Sciences*, 11(24), 12035. <https://doi.org/10.3390/app112412035>
- Wilkinson, K., Muhlhäuser, B., Motley, C., Crump, A., Bray, H., & Ankeny, R. (2018). Australian Consumers' Awareness and Acceptance of Insects as Food. *Insects*, 9(2),

44. <https://doi.org/10.3390/insects9020044>

Zhao, Y., Zhang, J., Wei, Y., Ai, L., Ying, D., & Xiao, X. (2020). Improvement of Bread Quality by Adding Wheat Germ Fermented with *Lactobacillus plantarum* dy-1. *Journal of Food Quality*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/9348951>

Zielińska, E., Pankiewicz, U., & Sujka, M. (2021). Nutritional, Physiochemical, and Biological Value of Muffins Enriched with Edible Insects Flour. *Antioxidants*, 10(7), 1122. <https://doi.org/10.3390/antiox10071122>

4. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados del presente estudio dejan ver el potencial que tiene la harina comestible del insecto *A. armida* como fuente de nutrientes y, por sus propiedades tecnofuncionales, como un posible ingrediente o aditivo alimentario para la formulación de alimentos. Las harinas (tanto la completa como la desgrasada) son ricas en proteínas. Sus propiedades físicas y tecnofuncionales las clasificaron con buenas características de fluidez. La harina desgrasada exhibió buena capacidad de retención de agua, propiedades de espuma y emulsión con valores superiores a los observados en la harina completa. Ambas harinas podrían ser una opción de ingrediente en alimentos para la formulación de embutidos o productos de panadería.

Las harinas de *A. armida* también son una fuente de péptidos con actividad antioxidante y antimicrobiana. Para la obtención de los péptidos antioxidantes las condiciones de digestión con pepsina se establecieron como se indica a continuación: proporción enzima/sustrato 10:1 y 2 h de digestión; para la obtención de péptidos antimicrobianos, la proporción enzima/sustrato 1:1 y una hora de digestión. La presencia de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en las secuencias peptídicas puede contribuir a la alta actividad antioxidante, mientras que los péptidos ricos en glicina pueden estar contribuyendo al efecto antimicrobiano observado.

Finalmente, la adición de la harina de *A. armida* a pan de trigo produjo algunos cambios en las propiedades físicas y de calidad del pan, como en el volumen específico, pH y dureza. El color también es una propiedad que se vio modificada por la adición de la harina de *A. armida*, se observó un mayor oscurecimiento en la corteza y la miga comparado con los panes control de trigo. A pesar de los cambios físicos, la percepción sensorial no se vio afectada respecto a los panes control con harina de trigo. La adición de harina de *A. domesticus*, uno de los insectos más estudiados y utilizado actualmente en la industria alimentaria produjo más cambios físicos en el pan de trigo comparado con los producidos por la adición de la harina de *A. armida*.

Derivado de la información obtenida de esta investigación se recomienda realizar estudios sobre la vida útil, las propiedades reológicas y estructurales de estas harinas, con el objetivo de poder continuar con el proceso de investigación de las opciones de productos en los cuales se podrían añadir como ingrediente tecnofuncional. En este sentido también se recomienda continuar con la investigación de los otros efectos bioactivos observados en los péptidos que se identificaron en la harina de *A. armida*, como el efecto antihipertensivo y antidiabético. Lo anterior podrá contribuir a ampliar la información de este insecto comestible y de cómo poder agregarlo a otras matrices alimentarias y aumentar la aceptación del mismo y con ello contribuir a la formulación de nuevos productos alimenticios.

5. Evidencias de productos

5.1 Artículos de investigación y divulgación

Cortazar-Moya, S., Mejía-Garibay, B., López-Malo, A., Morales-Camacho, J.I. (2023). Nutritional composition and techno-functionality of non-defatted and defatted flour of edible insect *Arsenura armida*. *Food Research International*, 113445.

Food Research International 173 (2023) 113445

Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Nutritional composition and techno-functionality of non-defatted and defatted flour of edible insect *Arsenura armida*

Sheila Cortazar-Moya, Beatriz Mejía-Garibay, Aurelio López-Malo, Jocksan Ismael Morales-Camacho

Department of Chemical, Food and Environment Engineering, Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula, Puebla 72810, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Insect flour
Insect protein
Total fat
Nutrition
Entomology

ABSTRACT

Edible insects are traditional foods worldwide, and in Mexico, is a prehispanic practice. Nowadays, edible insects can be a food source for the increasing population. This research aimed to evaluate the nutritional profile, physical and techno-functional characteristics of non-defatted (NDF) and defatted (DF) flour of the edible insect *Arsenura armida* to use as a functional ingredient. The lipid content in NDF was 24.18%. Both flours are high in protein, 20.36% in NDF and 46.89% in DF; their soluble proteins from *A. armida* were classified according to their molecular weight, which ranged from 12 to 94 kDa. The physical properties suggest that both flours have good flow characteristics. Regarding techno-functional properties, DF had the highest water (275.6%) and oil (121%) holding capacity values. The viscosity values indicate that they behave as a non-Newtonian shear-thinning fluid at a high concentration (20%). Emulsion capacity values range between 78.3 and 100% in both flours, with stability between 92.4 and 100%. These flours could be a good source of nutrients, and their techno-functional properties make them a good option for animal protein substitutes.

1. Introduction

According to the FAO, by 2050, the world will need to feed 9 billion people, but the actual conditions are not enough (FAO, 2013). In this regard, the Food and Agriculture Organization of the United Nations mentioned insects as a future option for food and nutrition security due to their content of macro and micronutrients (Frigerio et al., 2020). Nevertheless, it is important to know that neophobia is still an issue related to the consumption of edible insects.

In Mexico, 348 species of edible insects have been reported (Rodríguez-Miranda et al., 2019). Lepidoptera is one of the richest insect orders eaten in Mexico (Ramos-Elorduy et al., 2011). Among the variety of local insects (Puebla, Mexico), it is found as the larvae stage of a butterfly known as Cuetlas (*Arsenura armida*), it is one of the most appreciated and consumed and can be found in the summer season on the Jonote tree (*Heliconia appendiculata*) (Melo-Ruiz et al., 2016).

To increase acceptance and consumption, the flour of edible insects can be used as a less visible form in common products (Vanqa et al., 2022). In order to use these flours, as a food ingredient, first, information about techno-functional properties, nutritional content, and the

optimization of the processing, as the lipid and protein extraction step (Kim et al., 2022; Megido et al., 2016) is needed. In this regard, several lipid extraction methods with conventional solvents are described in the literature. Gravel et al. (2021) reported that the protein from *T. molitor* meal used n-hexane as the defatting solvent improved their functional properties. Hexane had little impact on protein profile compared to non-defatted meals, solubility was reduced, and foaming properties were improved for defatted fractions. Mishyna et al. (2019) reported that the protein extracted from edible insects such as *Schistocerca gregaria* and *Apis mellifera* using n-hexane as the defatting solvent improved their functional properties. And finally, Laroche et al. (2019) used three-phase partitioning (TPP) and supercritical CO₂ (SC-CO₂) as efficient methods for protein extraction. They concluded that the defatting methodology should be chosen according to the fat composition of the edible insect used. This research aimed to establish the proximate composition, physicochemical, and techno-functional properties of the defatted and non-defatted flour obtained from *Arsenura armida* to contribute to finding alternative food sources for human consumption.

* Corresponding author at: Department of Chemical, Food and Environmental Engineering, Universidad de las Américas Puebla, Ex Hacienda Sta. Catalina Mártir S/N. San Andrés Cholula, Puebla CP 72810, Mexico.
E-mail address: jocksan.morales@uap.mx (J.I. Morales-Camacho).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113445>

Received 16 November 2022; Received in revised form 1 September 2023; Accepted 9 September 2023
Available online 11 September 2023

0963-9969/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Isolation of peptide mixtures with potential biological activities from the protein hydrolysate of *Arsenura armida* larval meal

Cortazar-Moya, S.; Jiménez-González, O.; Bojórquez-Velázquez, E.; Ruiz-May, E.; López-Malo, A.; Morales-Camacho, J.I. (2024). Isolation of peptide mixtures with potential biological activities from the protein hydrolysate of *Arsenura armida* larval meal. *Journal of Insects as Food and Feed*. <https://doi.org/10.1163/23524588-00001115>.



JOURNAL OF INSECTS AS FOOD AND FEED (2024) DOI:10.1163/23524588-00001115



RESEARCH ARTICLE

Isolation of peptide mixtures with potential biological activities from the protein hydrolysate of *Arsenura armida* larval meal

S. Cortazar-Moya¹ , O. Jiménez-González¹ , E. Bojórquez-Velázquez² , E. Ruiz-May² ,
A. López-Malo¹  and J.I. Morales-Camacho^{1*} 

¹Department of Chemical, Food and Environmental Engineering, Universidad de las Américas Puebla, San Andrés Cholula, Puebla 72810, México; ²Red de Estudios Moleculares Avanzados, Clúster Científico y Tecnológico BioMimic*, Instituto de Ecología A.C. (INECOL), Carretera Antigua a Coatepec No. 351, Xalapa, Veracruz, México; *jocksan.morales@udlap.mx

Received 4 January 2024 | Accepted 13 May 2024 | Published online 31 May 2024

Exploring the Techno-Functional Potential of Insect Powder Flour in Wheat Bread Formulation: A Comparative Study with *Arsenura armida* and *Acheta domesticus* flours

S. Cortazar-Moya, R. H. Hernández-Figueroa, V. E. Vera-Santander, A. López-Malo, J.I. Morales-Camacho

Revista: Journal of Insects as Food and Feed

Status: Enviado

Artículo de divulgación

Cortazar-Moya, S., López-Malo, A., Morales-Camacho, J.I. (2023). Los insectos como fuente de alimento para el futuro. Contexto UDLAP. Disponible en:

<https://contexto.udlap.mx/los-insectos-como-fuente-de-alimento-para-el-futuro/>



30 **Los insectos como fuente de alimento para el futuro**

May Ciencia y salud, Destacada Contexto, entomofagia, futuro, insectos, nutrición, proteína, UDLAP

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO/ONU) informó que para el año 2050 la población mundial aumentará a más de 9.1 billones de personas (FAO, 2013), lo cual implicará una mayor demanda de alimentos convirtiendo a la seguridad alimentaria en un gran desafío. En este sentido, los alimentos ricos en proteínas de alto valor biológico son una prioridad debido a su importancia para el óptimo desarrollo de las personas. Actualmente, los insectos

5.2 Participaciones en congresos

Latin food 2022. Nutrition profile, physical and techno-functional properties of *Arsenura armida* flour. Presentación oral.



Nutrition profile, physical and techno-functional properties of *Arsenura armida* flour

Cortazar-Moya, S.^{1*}, Morales-Camacho, J.I.¹

¹ DIQAA, Universidad de las Américas Puebla, Sta. Catarina Mártir, San Andrés Cholula, Puebla 72810, México.

*Presenting author: sheila.cortazarma@udlap.mx

Abstract

Edible insects are considered traditional foods in over 100 countries, and in Mexico, is a prehispanic practice [1]. Besides this traditional aspect, edible insects are gaining interest as alternative food sources for the increasing world population [2]. The purpose of this research was to evaluate the nutritional profile, physical and techno-functional characteristics of edible insect flour *Arsenura armida* to use as functional ingredient in the food industry. Results showed that this flour contains 26.62% protein, 24.18% lipids, 4.65% ash (macrominerals and microminerals), 7.3% fiber, 2.32% moisture and 28.98% total carbohydrates with a heat gross of 5.79 kcal/g. The oil is composed of 84.62% saturated fatty acids, 8.77% monounsaturated fatty acids and 6.61% polyunsaturated fatty acids. The particle size was 143 μm , the bulk density 0.38 g/ml and tapped density 0.49 g/ml with a compressibility index (CI) of 22 and a Hausner ratio of 1.2, which suggest this flour can have good flow characteristics. Regarding to functional properties, it had specific water and oil holding capacity of 222.51% and 118.7%, respectively. The viscosity values point that it behaves as a Newtonian fluid at a minimum concentration (5%), but as a non-Newtonian shear thinning fluid at high concentration (20%). No foam capacity was exhibited (5-20% flour) but had a 100% emulsion capacity and emulsion stability (15 and 20% flour). This flour could be a good source of nutrients to use as an ingredient for human food due to its protein content is like animal sources as beef (24.8%), and mineral profile can cover from 12 up to 70% of daily requirements [3-7]. Besides its functional properties make it a good option to use in some products as a substitute of animal protein due to insects shows great potential for food and feed as an environmentally friendly choice in future food systems [8].

Keywords: Edible insects, Nutrition, Protein, Fatty acids.

[1] Rodriguez-Miranda *et al.*, 2019. European Food Research & Technology, 245, 2613-2620. [2] Baiano, 2020. Trends in Food Science & Technology, 100, 35-50. [3] Siulapwa *et al.*, 2014. International Journal of Science and Research, 3, 876-884. [4] FAO, 2013. Food and Agricultural Organization/The International Network of Food Data Systems (INFOOD). [5] Weaver, 2013. Advances in nutrition, 4, 368S-377S. [6] Beto, 2015. Clinical nutrition research, 4, 1-8. [7] FAO/WHO. 2002. [8] Akhtar *et al.*, 2018. Proteins in food processing, 263-288.

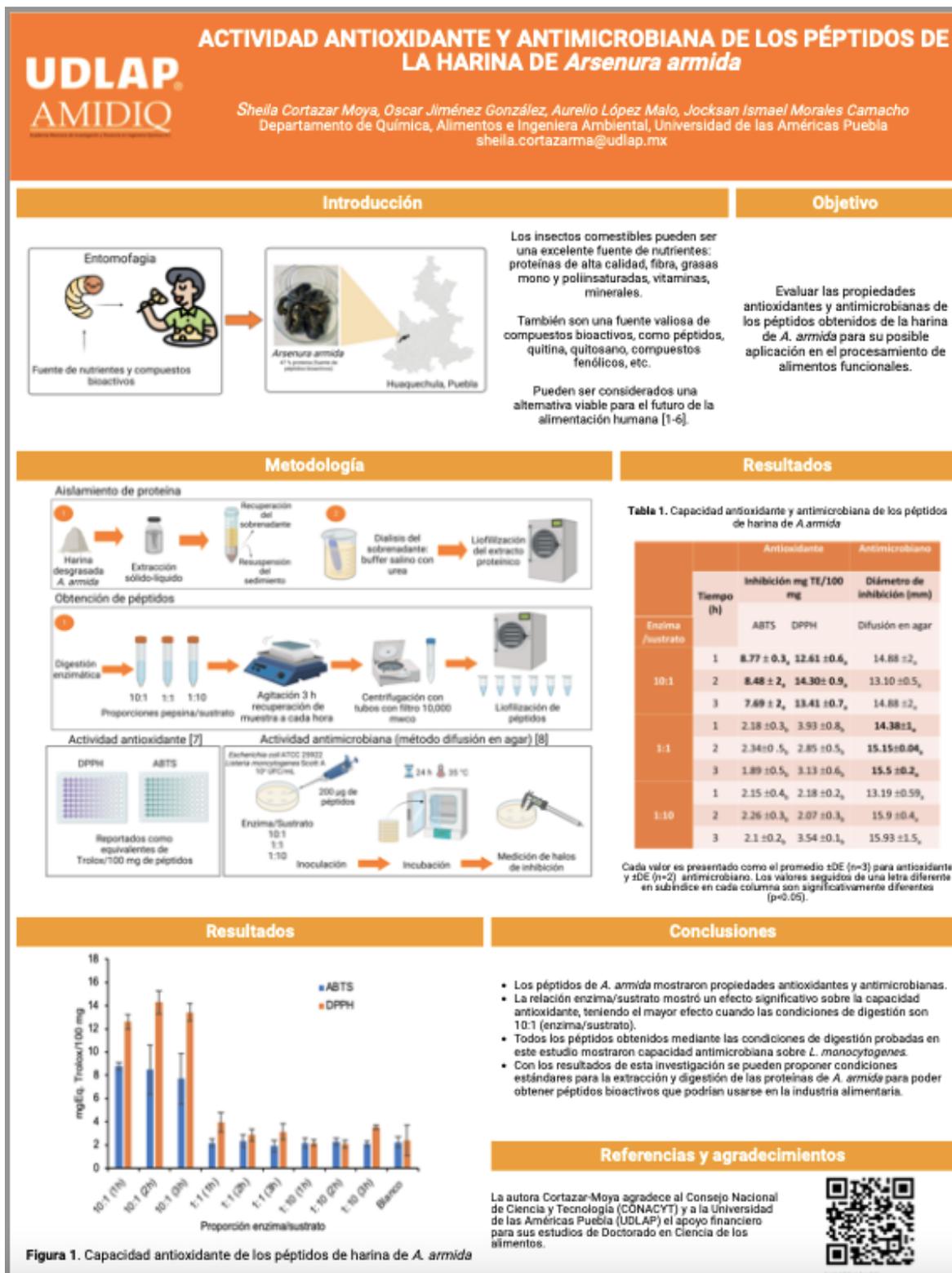
10th Food Science, Biotechnology & Safety Congress
Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos A.C.
MEXICAN ASSOCIATION OF FOOD SCIENCE

PUEBLA
MÉXICO | 16-18 NOVIEMBRE 2022

Constancia de participación



AMIDIQ 2023. Actividad antioxidante y antimicrobiana de los péptidos de la harina de *Arsenura armida*. Presentación de cartel.



Constancia de participación

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Sheila Cortazar Moya, Oscar Jiménez González, Jocksan Ismael Morales Camacho.

Por la presentación del trabajo:

Actividad antioxidante y antimicrobiana de los péptidos de la harina de Arsenura Armida

En el área de BIOTECNOLOGÍA en modalidad CARTEL
ID: 440

XLIV
ENCUENTRO NACIONAL DE LA
AMIDIQ
Investigación e industria: inclusión, retos y oportunidades para la Ingeniería Química en México

UDLAP.

Dr. Aarón Romo Hernández
Presidente del Comité Organizador

Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz
Presidente Nacional de la AMIDIQ

Dr. Tomás Xiverot García
Presidente del Comité Técnico

Huatulco, Oaxaca, México 30 de mayo al 2 de junio de 2023

Congreso Euroamericano de procesos y productos alimentarios 2023. Actividad antioxidante de los péptidos de la harina de *Arsenura armida* y la identificación de sus péptidos bioactivos. Presentación de cartel.



Constancia de participación

#acciónreamigos

Código de autenticidad 18667459.89247323.724861.8.8667459892473237248618 <https://www.event3.com.br/documentos>

**II CONGRESO EUROAMERICANO
DE PROCESOS E PRODUTOS ALIMENTICIOS**

05 A 07 DE DEZEMBRO DE 2023

**“VALORIZACIÓN DE PRODUCTOS LOCALES: CIMIENTO DE
SOSTENIBILIDAD Y CIRCULARIDAD”**

Certificamos que el trabajo en formato resumen titulado **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PÉPTIDOS DE LA HARINA DE Arsenura armida Y LA IDENTIFICACIÓN DE SUS PÉPTIDOS BIOACTIVOS**, de autoría de **Sheila Cortazar Moya, Oscar Jiménez-González, Aurelio López Malo e JOCKSAN ISMAEL MORALES CAMACHO**, fue aprobado y presentado en formato e-poster en el II Congreso Euroamericano de Procesos y Productos Alimentarios.

Online, 08 de diciembre de 2023.


Profa. Dra. Poliana Mendes de Souza
Organización central del II CEAPA

Organizadores:



6. Anexos (Material suplementario)

6.1 Composición nutricional y tecnofuncionalidad de la harina completa y desgrasada del insecto comestible *Arsenura armida*

Figura S1. Emulsión de la harina completa de *A. Armida* a una concentración del 15%. **a**, emulsión 0 h; **b**, emulsión 48 h después.

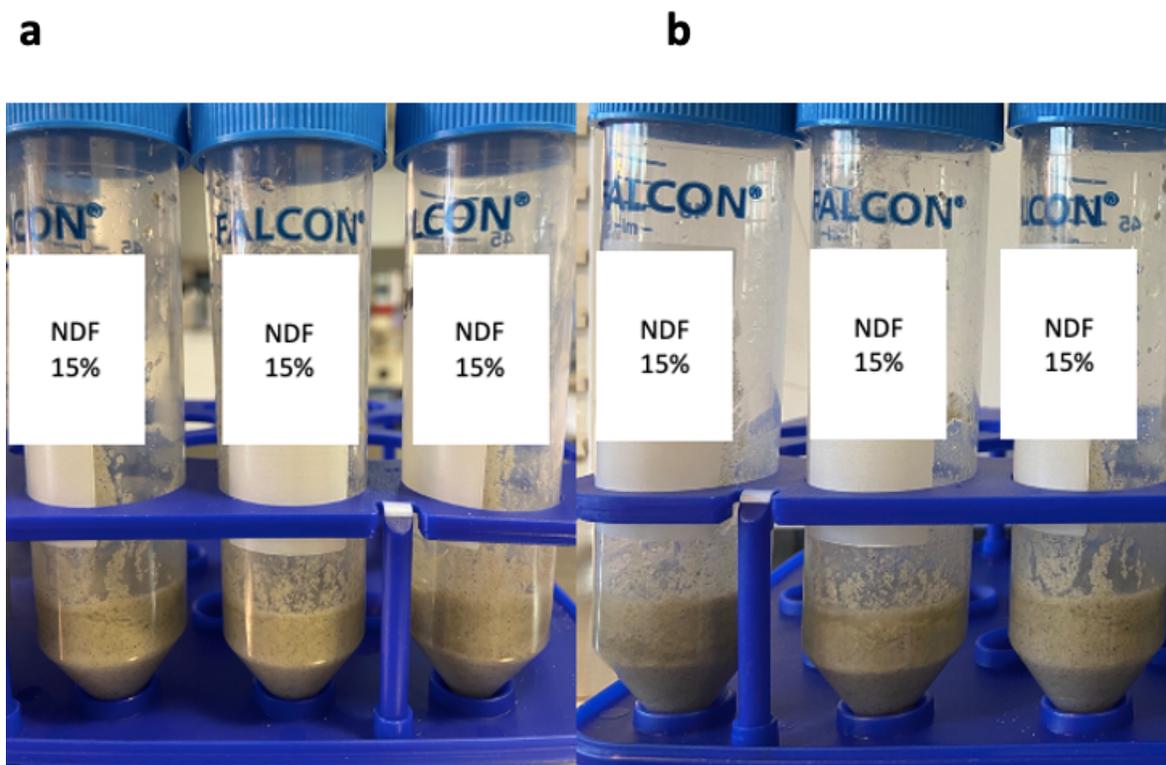
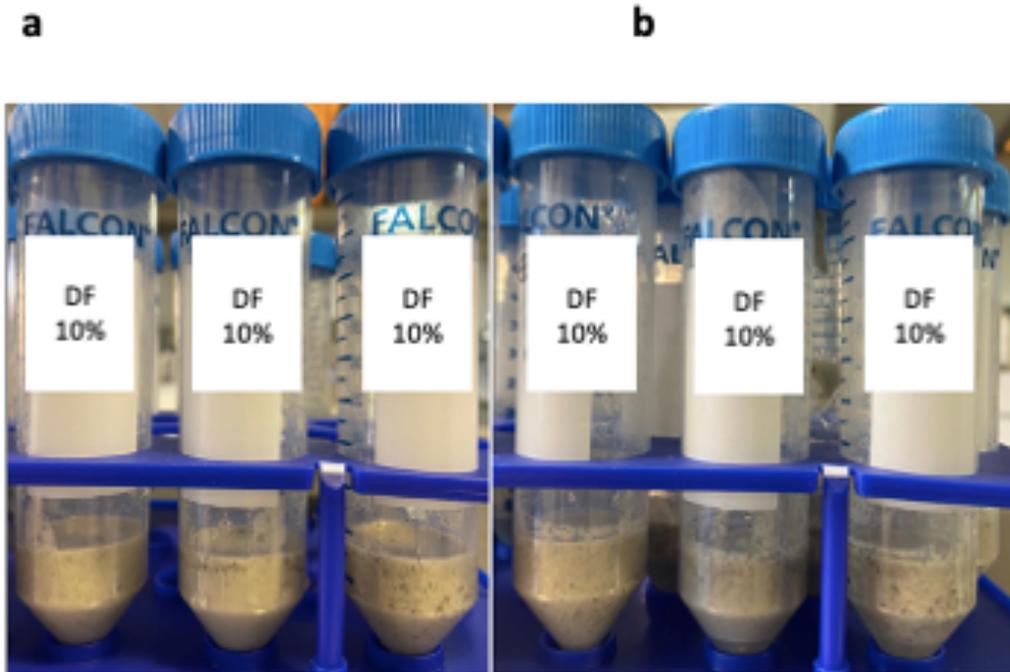


Figura S2. Emulsión de la harina desgrasada de *A. armida* a una concentración del 10%. **a**, emulsión 0 h; **b**, emulsión 48 h después.



6.2 Optimización de la formulación de pan de trigo adicionada con harina de insectos (*Arsenura armida* y *Acheta domesticus*)

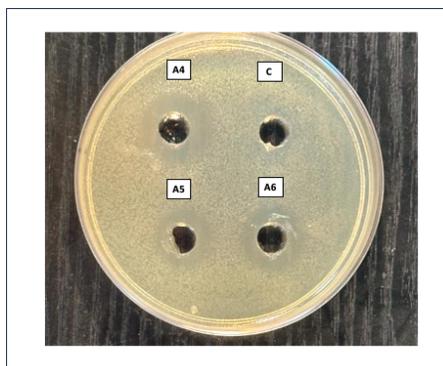


Figura S3. Zonas de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* de los péptidos de las muestras A4-A6 y del control (C) (proteína no digerida).

Tabla S1. Secuencias de péptidos identificados en la muestra A2 por medio de LC-MS.

Muestra A2		
Secuencias completas	Péptidos bioactivos	Efecto
FLLGF	LGF	antioxidante
LYYAPFDGLL	YYA	antioxidante
	LYY	antioxidante
LYVPLTF	LY	antioxidante
PPWML	PW	antioxidante
LTAPLGRVPLW	LW	antioxidante
	PEL	antioxidante
NGYQPQGSHLPVGPVPEL	GPP	antioxidante
	GSH	antioxidante
PVGPVPLHA	LHA	antioxidante
FTKYVPWGF	VPW	antioxidante
	PWG	antioxidante
VADEDGYQPQGSHLPVGPVPEL	PEL	antioxidante
LGDYGLNF	YGLN	antioxidante
DGYQPQGSHLPVGPVPEL	GSH	antioxidante
FLLGF	LGF	antioxidante
FSPFGF	FGF	antioxidante
YYAPFDGLL	YYA	antioxidante
YKLPDAF	ADF	antioxidante
YLYAPFN(+0.98)GLGL	YLY	antioxidante
LPWLQRPLL	PWL	antioxidante
PLVEGPE	GPE	antioxidante

LYYAPFDGLL	YYA	antioxidante
	LYY	antioxidante
PVGPVPLHA	LHA	antioxidante
FTKYVPWGF	VPW	antioxidante
	PWG	antioxidante
LGDYGLNF	YGLN	antioxidante
YYAPFDGLL	YYA	antioxidante
YKLPDAF	ADF	antioxidante
YLYAPFN(+0.98)GLGL	YLY	antioxidante
VPPGVPLHA	LHA	antioxidante
LPWLQRPLL	PWL	antioxidante
YSTSPEGLPLVL	LPL	antioxidante
YLLML	YLL	antioxidante
LGDEPLECCALHTEY	LHT	antioxidante
YKFPLPDL	PLP	antihipertensivo
VLLPVPAF	LLP	antihipertensivo
CPVSLLYPLPVA	LPVA	antihipertensivo
LLVL	LVL	antihipertensivo
FLLF	LLF	antihipertensivo
LPFVF	LPF	antihipertensivo
VVVVF	VVF	antihipertensivo
HPPEPLKLL	LKL	antihipertensivo
YGLLTHA	YGL	antihipertensivo
LLNVVF	VVF	antihipertensivo
LSTYGTGSMTGLLGDY	GTG	antihipertensivo
VPPGVPLHA	VPP	antihipertensivo
ALYPSLSASGATFAF	LYP	antihipertensivo
QLYPSLSASQTPVF	LYP	antihipertensivo
YSTSPEGLPLVL	LVL	antihipertensivo
	GLP	antihipertensivo
PSLSASGATAFFL	FFL	antihipertensivo
LPFVLNRMLY	LPF	antihipertensivo
FVVLF	VVL	antihipertensivo
PLVEGPE	LVE	antihipertensivo
PVVVPPFL	VVPP	antihipertensivo
	VVVPPF	antihipertensivo
APPELPKLLF	LLF	antihipertensivo
MTLVGLW	VGL	antidiabético
VVVVF	VVV	anticancerígeno
YYAPFDGLL	DGLL	antimicrobiano

Tabla S2. Secuencias de péptidos identificados en la muestra A4 por medio de LC-MS.

Muestra A4		
Secuencia completa	Péptidos bioactivos	Efecto
LLYTGGF	LLY	antioxidante
VKLPFL	VKL	antioxidante
FLPLYF	LPL	antioxidante
FPLLR	LLR	antioxidante
PLYSTGVHGLPSSF	GLP	antioxidante
	YGY	antioxidante
YGYQGLGHGLGHGLGLGY	LGY	antioxidante
PALAAAGPAVAHGLAGPGF	GPA	antioxidante
YEFPHTVL	PHT	antioxidante
WEQPWL	PWL	antioxidante
PLLDPLGPKSLKGLE	PLG	antioxidante
DLKPTNEKLPTYTGGF	LKP	antioxidante
LVLGF	LGF	antioxidante
	LVL	antihipertensivo
VKVAPDFVF	VKV	antioxidante
	VAP	antihipertensivo
VVLWL	VVL	antioxidante
YYKLLGL	YYK	antioxidante
FKLGSAGPEVF	GPE	antioxidante
	AGP	antihipertensivo
LSLVGPHGLL	PHG	antioxidante
	VGP	antihipertensivo
FGLGGGLGSGGLGGHNY	GSGGL	antioxidante
YGYQGLGHGLGHGLGL	YGY	antioxidante
	GHG	antihipertensivo
LFGF	FGF	antioxidante
PEPLKLLRSDF	LLR	antioxidante
LYDDPLAF	LAF	antioxidante
DVKPLNEKLPTYGTL	VKP	antioxidante
	LDY	antioxidante
AFLPLDY	LPL	antioxidante
	LDY	antihipertensivo
	AFL	antihipertensivo
LPWNL	PWN	antioxidante
	PEL	antioxidante
NGYQPQGSHPVGPVPEL	GPP	antioxidante
	GSH	antioxidante
	GAH	antioxidante
NSVYGG AHLPLL	LPL	antioxidante
	YGG	antihipertensivo

FLPLYAQ	LPL	antioxidante
PLYTGGFGPPGLLKYY	KYY	antioxidante
FYKLFNPEL	GPP	antioxidante
VVYSPEL	PEL	antioxidante
VSLSANGLFPHGNY	PEL	antioxidante
FLLGPDSPLHVTE	PHG	antioxidante
LYYAPFDGLL	LHV	antioxidante
EFLPEEPAKDEL	YYA	antioxidante
VYYPFKSSTKDLTPFEA	LYY	antioxidante
SFSPLGFL	FLPE	antioxidante
LKGQLPLVDL	VYY	antioxidante
LAYPSLSASQTFAF	LGF	antioxidante
NGYQPQGSHPVGPVPEL	LPL	antioxidante
VYLGQF	AYPS	antioxidante
GFGGGDGGGFGF	GPP	antioxidante
LFKLGSAGPEVF	GSH	antioxidante
NRNNPYDPFGF	YLG	antioxidante
ALAAPWLTTPYA	FGF	antioxidante
HVVLANPDPFF	GPE	antioxidante
YLPTNFGGPPGLLKYY	FGF	antioxidante
ETEDGLTGQAVGQVKVF	PWL	antioxidante
ELDLGTFYDPDYNL	LAN	antioxidante
PALAAGPAVAHGLAGPGF	KYY	antioxidante
QHLGLATPYGYGLHGLGA	GPP	antioxidante
YKLPDWF	VKV	antioxidante
LDKLTTF	YNL	antioxidante
VVLKDLF	GPA	antioxidante
PLYSTGVHGLPSSF	LAA	antihipertensivo
FVVPAPYEVY	AGP	antihipertensivo
FLVF	YGY	antioxidante
VVFSF	LHG	antioxidante
FPYKLVPSY	YGL	antihipertensivo
DVSHLVGTGEQNAKLL	KLP	antihipertensivo
FAPLLKL	LTF	antihipertensivo
	VVL	antihipertensivo
	GLP	antihipertensivo
	PAP	antihipertensivo
	LVF	antihipertensivo
	VVF	antihipertensivo
	PYK	antihipertensivo
	PSY	antihipertensivo
	GTG	antihipertensivo
	FAP	antihipertensivo

DGFQPSGN	FQP	antihipertensivo
LSLNHLTF	LTF	antihipertensivo
WTAPDGQVLR	TAP	antihipertensivo
ALSLSPLEPKPEKF	LSP	antihipertensivo
PLLDPLGPKSLKGLE	LGP	antihipertensivo
ELSPFLRSPTF	PLG	antihipertensivo
MLSPAPLF	LSP	antihipertensivo
VVLWL	LSPA	antihipertensivo
YKLLFL	LSP	antihipertensivo
LLVL	VVL	antihipertensivo
WFGTSGVNKYGTGF	LLF	antihipertensivo
VLLPNKLGDLQA	LVL	antihipertensivo
EYTG DGLSAGADGVVAKF	GTG	antihipertensivo
YFKLFNPLEKQ	NKL	antihipertensivo
LVHLYHEGEQFPYKL	LLP	antihipertensivo
LPPWPF	DGL	antihipertensivo
FLEPEKLPPLF	LEK	antihipertensivo
FLLPDMKL	PYK	antihipertensivo
PEPLKLLRSDF	LPP	antihipertensivo
FLLF	KLP	antihipertensivo
DSDVYPDQFRF	PPL	antihipertensivo
DVKPLNEKLPTYGTL	LPP	antihipertensivo
EYTG DGLSAGADGVVAKF	LLP	antihipertensivo
YAGLPDLTGALAL	LKL	antihipertensivo
EYTG DGLSAGADGVVKANF	LLF	antihipertensivo
KLLLPSF	VYP	antihipertensivo
DDYVPLL	VKP	antihipertensivo
LELPYKEENF	KLP	antihipertensivo
LLFF	DGL	antihipertensivo
FLFGKTSF	GLP	antihipertensivo
PSLSKPTGDVKPFDQKLPSY	DGL	antihipertensivo
EYTG NGLSAGWGVVKAF	LLP	antihipertensivo
PEPFPVHF	YVP	antihipertensivo
VLLPLL	PYK	antihipertensivo
PDLVL	LLF	antihipertensivo
FVVF	FGK	antihipertensivo
WKLLPL	PSY	antihipertensivo
	YTGN	antihipertensivo
	PFP	antihipertensivo
	LLP	antihipertensivo
	LVL	antihipertensivo
	VVF	antihipertensivo
	LPL	antihipertensivo

DGFQPSGDHLVPGPSAL	LLP	antihipertensivo
RLAPLVPA	FQP	antihipertensivo
DVSHLVGTGEGADAKLLSQEL	VGP	antihipertensivo
VVTQSLTQSHMWWHAAVPVAHAPVAY	LAP	antihipertensivo
LSTKLPL	GTG	antihipertensivo
VLLLPNKLGDLQAL	AVP	antihipertensivo
LPAALPF	VAY	antihipertensivo
LRDLPYVGL	KLP	antihipertensivo
LLFPL	LPL	antihipertensivo
AAPLAAPFAASL	LLP	antihipertensivo
VLDDKPLGYPFDRPSL	NKL	antihipertensivo
PVAPVVKPFLGAPVQPVAKA	LPF	antihipertensivo
LAPVVYPGF	DLP	antihipertensivo
FDPLPQY	LLF	antihipertensivo
ALSPAPFAPLVRPVA	ASL	antihipertensivo
CHMGKRGGLGQNRSLQGTGQRNQGLGQSVSNAF	LAA	antihipertensivo
FETENGLTGQAVGKVN	AAP	antihipertensivo
VLLLPNKLGDLQA	PLG	antihipertensivo
HPPEPLKLL	LGY	antihipertensivo
LYPLKF	VAP	antihipertensivo
LTGPQLVHKQFNSPLGL	VKP	antihipertensivo
YETGDGLSAEDRVKAFDSEY	VYP	antihipertensivo
LVVSYALPAA	LAP	antihipertensivo
KLPDLTAGPSL	YPG	antihipertensivo
FLLNPTL	PLP	antihipertensivo
QYAPDGKVLMTA	FAP	antihipertensivo
	VRP	antihipertensivo
	LVR	antihipertensivo
	LSP	antihipertensivo
	GTG	antihipertensivo
	GKV	antihipertensivo
	NKL	antihipertensivo
	LKL	antihipertensivo
	LYP	antihipertensivo
	PLG	antihipertensivo
	TGP	antihipertensivo
	LTGP	antihipertensivo
	DGL	antihipertensivo
	ALP	antihipertensivo
	AGP	antihipertensivo
	KLP	antihipertensivo
	LNP	antihipertensivo
	GKV	antihipertensivo

LSPAPFAPLVRVPA	FAP	antihipertensivo
	LVR	antihipertensivo
	LSPA	antihipertensivo
	PAP	antihipertensivo
LQAPVAAAPVAAAPVF	VAA	antihipertensivo
	AAP	antihipertensivo
LGYKQAVPVPGMVDNF	GYK	antihipertensivo
	LGY	antihipertensivo
LVGLPEGPYAF	GLP	antihipertensivo
CPVSVFAAALPVA	ALP	antihipertensivo
LPTLEGKLQPL	LQP	antihipertensivo
VGVPVPAPFPVAVPKVPVA	VPK	antihipertensivo
	PFV	antihipertensivo
	AAP	antihipertensivo
ALAAPWLTPYA	LAA	antihipertensivo
HAGVGLGGLLGGGAGGGL	VGL	antidiabético
MRLPLF	LPL	antidiabético
WRLLSF	WRL	antidiabético
FLLF	LLF	antimicrobiano
LGGWNF	LGGW	antiinflamatorio
	GGW	antiinflamatorio
LSLGVPL	VPL	antiamnésico
PTFKLPANPKSLL	ANP	antiinflamatorio
LPVWVL	VWV	anticancerígeno
LRLDGFL	GFL	inmunomodulador
VVVSLL	VVV	anticancerígeno
YEFHTVL	TVL	antimicrobiano
LFGF	LFGF	antimicrobiano
FLLF	FLLF	antimicrobiano
