



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PARA LA  
ENCAPSULACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PÉPTIDOS  
BIOACTIVOS DE LA SEMILLA DE YACA (*ARTOCARPUS  
HETEROPHYLLUS LAM*).**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
MARÍA ELENA CRUZ MAYA**

**TUTORA:  
DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: TECANTE CORONEL ALBERTO**

**VOCAL: FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA AMELIA MARÍA DE GUAI**

**SECRETARIO: ZAMBRANO ZARAGOZA MARÍA DE LA LUZ**

**1er. SUPLENTE: SÁNCHEZ CHINCHILLAS ARGELIA**

**2° SUPLENTE: DE ANDA AGUILAR LORENA**

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN Y TECNOLOGÍAS EMERGENTES DE ALIMENTOS L-16, DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA (UIM), FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN (FESC) CAMPO 4, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

---

**ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JOSÉ ELEAZAR AGUILAR TOALÁ**

---

**SUSTENTANTE: MARÍA ELENA CRUZ MAYA**

## EL PRESENTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR:

EL PROYECTO **PAPIIT IN 221823** “EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS (PÉPTIDOS Y POLIFENOLES) OBTENIDOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES” **DGAPA-UNAM**.

EL PROYECTO **IN222520** “MANUFACTURA, EVALUACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y USO DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS EN EL INCREMENTO DE VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS”.

EL PROGRAMA INTERNO DE CÁTEDRAS DE INVESTIGACIÓN. **CI2233** “EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y MANUFACTURA DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS NATURALES COMO COADYUVANTES EN EL PROCESO CON TECNOLOGÍAS EMERGENTES PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS”.

EL PROYECTO COMECYT **FICDTEM-2021-74** “EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS OBTENIDOS DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES.”

**MARÍA ELENA CRUZ MAYA**, AGRADECE EL APOYO POR LA BECA DE CONCLUSIÓN DE ESTUDIOS OTORGADA POR **DGAPA-UNAM** DENTRO DEL PROYECTO **IN222520** “MANUFACTURA, EVALUACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y USO DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS EN EL INCREMENTO DE VIDA ÚTIL DE ALIMENTOS”.

## **DEDICATORIA**

**DEDICO ESTA TESIS A MIS PADRES, MARCO ANTONIO Y MARÍA ELENA POR APOYARME Y GUIARME TODA MI VIDA, YA QUE GRACIAS A ELLOS LOGRÉ TERMINAR MI CARRERA.**

**A MI NOVIO, ÁNGEL YETLANEZI QUE SIEMPRE ME ALENTÓ CUANDO ME ATORABA EN MI TESIS. ESPERO PASAR MÁS AÑOS COMPITIENDO Y MOTIVÁNDONOS EN NUESTRA VIDA PROFESIONAL Y ACADÉMICA.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A MI TUTORA LA DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA POR SU APOYO Y GUÍA DURANTE MI SERVICIO SOCIAL, ESTANCIA ESTUDIANTIL Y DESARROLLO DE MI TESIS. GRACIAS POR INTRODUCIRME EN EL CAMPO DE LA NANOTECNOLOGÍA, YA QUE ME HA GUSTADO MUCHO Y QUIERO SEGUIR APRENDIENDO MÁS. ES UNA GRAN DRA. Y PERSONA QUE SIEMPRE ME HA INSPIRADO A SEGUIR EL CAMINO DE LA CIENCIA.**

**A LA MTRA. ARACELI, MTRO. SERGIO Y EL DR. ELEAZAR POR SU APOYO CUANDO TENÍA ALGUNA DUDA Y POR HACER MI ESTANCIA EN EL LAB-16 MÁS AMENA.**

**A LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR MI FORMACIÓN ACADÉMICA.**

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	4
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
3. HIPÓTESIS .....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 YACA ( <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam) .....	6
4.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA SEMILLA DE YACA.....	8
4.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LA SEMILLA DE YACA .....	10
4.4 MÉTODOS PARA OBTENER PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	11
4.4.1 Fermentación.....	12
4.4.2 Hidrólisis enzimática .....	13
4.4.3 Métodos físicos.....	14
4.5 NANOENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	18
4.6 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	21
4.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS.....	29
4.7.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad .....	30
4.7.2 Estabilidad de la nanodispersión de NLS .....	32
4.7.3 Potencial Z.....	33
4.7.4 Eficiencia de encapsulación .....	36
5. METODOLOGÍA .....	37
5.1 MATERIALES .....	37
5.2 DIAGRAMA DE FLUJO.....	39
5.2.1 Tratamiento de la muestra de semilla de yaca .....	40
5.2.2 Selección de las concentraciones de las enzimas Alcalase® y Flavourzyme® en función al grado de hidrólisis .....	40
5.2.3 Hidrólisis enzimática asistida con ultrasonido.....	45
5.2.4 Fraccionamiento de los péptidos bioactivos de acuerdo con la masa molecular: > 10 kD, < 10 kD, > 5 kD Y < 5 kD .....	47
5.2.5 Determinación de la actividad de captación de radicales DPPH· y contenido de proteína de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca.....	49

5.3	NANO-ENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA SEMILLA DE YACA EN NLS .....	52
5.3.1	Estandarización del método de doble emulsión para preparar NLS de péptidos bioactivos .....	52
5.3.2	Preparación de las NLS de péptidos bioactivos de la semilla de yaca .....	54
5.3.3	Caracterización de las NLS con péptidos bioactivos de la semilla de yaca	57
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	1
6.1	Estandarización de las condiciones de obtención de hidrolizados proteicos por el método enzimático con Alcalase <sup>®</sup> y Flavourzyme <sup>®</sup> .....	1
6.2	Selección del mejor tratamiento de ultrasonido con base a las velocidades de hidrólisis a Alcalase <sup>®</sup> y Flavourzyme <sup>®</sup> y el GH .....	6
6.3	Fraccionamiento de los péptidos bioactivos.....	17
6.4	Efecto del tratamiento de ultrasonido en la actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas .....	18
6.5	Efecto del tratamiento de ultrasonido en la concentración de proteína de las fracciones peptídicas .....	26
6.6	Selección de la formulación de NLS en base a la concentración de cera de abeja y manteca de cacao para estandarizar el método de doble emulsión .....	32
6.6.1	Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (IP).....	33
6.6.2	Eficiencia de encapsulación (EE) .....	36
6.7	Caracterización de las NLS con péptidos bioactivos de la semilla de yaca .....	37
6.7.1	Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad (IP).....	38
6.7.2	Potencial Z.....	41
6.7.3	Eficiencia de encapsulación (EE) y evaluación de la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca encapsulados en las NLS .....	41
6.7.4	Estabilidad de las NLS.....	43
7.	CONCLUSIONES .....	46
8.	REFERENCIAS .....	48

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de la yaca y sus partes.....	7
Cuadro 2 . Principales compuestos bioactivos en la semilla de yaca y sus funciones. ....	8
Cuadro 3. Péptidos bioactivos que se han identificado en la semilla de yaca.....	10
Cuadro 4. Características de las enzimas comerciales Alcalase®, Protamex® y Flavourzyme®.....	13
Cuadro 5. Métodos físicos para asistir a la hidrólisis enzimática.....	15
Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas y características de los lípidos empleados en nano encapsulación. ....	19
Cuadro 7. Péptidos bioactivos que se han encapsulado en las NLS. ....	21
Cuadro 8. Lípidos y bio-tensoactivos empleados en la formulación de NLS de péptidos bioactivos. ....	23
Cuadro 9. Modelos estructurales de las NLS de acuerdo con la incorporación de los péptidos bioactivos.....	25
Cuadro 10. Principales métodos empleados para preparar NLS de péptidos bioactivos .....	26
Cuadro 11. Técnicas de caracterización más empleadas para estudiar las propiedades de las NLS.....	30
Cuadro 12. Formulaciones para preparar NLS de colágeno hidrolizado.....	52
Cuadro 13. Formulación de NLS-péptidos de semilla de yaca.....	54
Cuadro 14. Grado de hidrólisis (%GH) de los diferentes tratamientos con las enzimas Alcalase y Flavourzyme. ....	2
Cuadro 15. Análisis de Varianza .....	2
Cuadro 16. Predicción de respuesta múltiple.....	4
Cuadro 17. GH (%) obtenidos en la validación de la optimización de respuesta GH (%) para tres diferentes hidrólisis. ....	4
Cuadro 18. Resultados de la prueba de Tukey. ....	5
Cuadro 19. Velocidades de hidrólisis y GH finales para el tratamiento 1 y 2 de ultrasonido, y el control. ....	14
Cuadro 20. GH (%) obtenidos en la validación del T2U.....	16
Cuadro 21. Resultados de la prueba de Tukey. ....	16
Cuadro 22. Eficiencias de filtración (%) de cada una de las fracciones peptídicas.....	17
Cuadro 23. Actividad de captación de radicales DPPH de cada una de las fracciones peptídicas.....	18
Cuadro 24. Prueba de Tukey para el T2U.....	22
Cuadro 25. Prueba de Tukey para el control.....	23
Cuadro 26. Concentración de proteína de cada una de las fracciones peptídicas.....	27
Cuadro 27. Prueba de Tukey para el T2U.....	30
Cuadro 28. Prueba de Tukey para el control.....	31
Cuadro 29. Resultados de la caracterización de las NLS-1, NLS-2 y NLS-3. ....	32
Cuadro 30. Caracterización de las NLS con y sin péptidos.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de la yaca. ....	6
Figura 2. Partes de la semilla de yaca. ....	7
Figura 3. Tipos de fermentación microbiana para producir péptidos bioactivos. ....	12
Figura 4. Cavitación ultrasónica. ....	17
Figura 5. Sistemas de nanoencapsulación lipídicos capaces de encapsular péptidos bioactivos. ....	20
Figura 6. Componentes de un equipo DLD. ....	31
Figura 7. Perfil DLD de NLS con cera de carnauba. ....	32
Figura 8. Funcionamiento de un difractor láser. ....	33
Figura 9. Perfil de retrodispersión. ....	33
Figura 10. Representación del potencial Z. ....	34
Figura 11. Funcionamiento de un sistema de DLE. ....	35
Figura 12. Diagrama de flujo. ....	39
Figura 13. Concentraciones de Alcalase® y Flavourzyme® empleadas en el diseño experimental. ....	41
Figura 14. Reacción de Lowry. ....	43
Figura 15. Curva patrón de albumina de suero bovino (ABS). ....	44
Figura 16. Unidades de filtración empleadas en el fraccionamiento de los péptidos bioactivos. ....	48
Figura 17. Reacción de DPPH. ....	50
Figura 18. Curva patrón de Trolox®. ....	51
Figura 19. Técnica de doble emulsión-ultrasonido para preparar NLS-péptidos de la semilla de yaca. ....	56
Figura 20. Diagrama de Pareto efecto Alcalase® y Flavourzyme®. ....	3
Figura 21. Gráfica de deseabilidad. ....	5
Figura 22. Gráfico de Tukey. ....	6
Figura 23. Cinética en relación con el GH para el T1U. ....	8
Figura 24. Cinética en relación con el GH para el T2U. ....	9
Figura 25. Cinética en relación con el GH para el control. ....	9
Figura 26. Cinética de Alcalase® para el T1U. ....	10
Figura 27. Cinética de Flavourzyme® para el T1U. ....	11
Figura 28. Cinética de Alcalase® para el T2U. ....	11
Figura 29. Cinética de Flavourzyme® para el T2U. ....	12
Figura 30. Cinética de Alcalase® para el control. ....	12
Figura 31. Cinética de Flavourzyme® para el control. ....	13
Figura 32. Gráfico de Tukey. ....	16
Figura 33. Eficiencias de filtración de las fracciones peptídicas. ....	18
Figura 34. Comparación de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U y el control en base a la actividad de captación de radicales DPPH. ....	19

Figura 35. Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U. ....	21
Figura 36. Actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones peptídicas del control. ....	22
Figura 37. Gráfica de Tukey. ....	23
Figura 38. Gráfica de Tukey. ....	24
Figura 39. Concentración de proteína de las fracciones peptídicas. ....	27
Figura 40. Concentración de proteína de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U. ....	29
Figura 41. Concentración de proteína de las fracciones peptídicas del control. ....	29
Figura 42. Gráfica de Tukey para el T2U. ....	30
Figura 43. Gráfica de Tukey para el control. ....	31
Figura 44 Perfil DLD de las NLS-1. ....	34
Figura 45. Perfil DLD de las NLS-2. ....	34
Figura 46. Perfil DLD de las NLS-3. ....	35
Figura 47. Perfil DLD de las NLS sin péptidos bioactivos ....	39
Figura 48. Perfil DLD de las NLS con péptidos bioactivos correspondientes a la fracción >5 kD. ....	39
Figura 49. Perfil DLD de las NLS con péptidos bioactivos correspondientes a la fracción <5 kD. ....	40
Figura 50. Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas > 5 kD y < 5kD encapsuladas y sin encapsular. ....	42
Figura 51. Perfil de retrodispersión de una nanodispersión de NLS con péptidos > 5kD. ....	44
Figura 52. Perfil de retrodispersión de una nanodispersión de NLS con péptidos < 5kD. ....	45

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Eficiencia de encapsulación . . . . .	36
Ecuación 2. Grado de hidrólisis. . . . .	44
Ecuación 3. Eficiencia de filtración. . . . .	48
Ecuación 4. Eficiencia de encapsulación . . . . .	53
Ecuación 5. Contenido de proteína no encapsulado ajustado. . . . .	54

## ABREVIATURAS

NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
ALN	Acarreadores Lipídicos Nanoestructurados
NE	Nanoemulsiones
EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
IP	Índice de Polidispersidad
TP	Tamaño de Partícula
DLD	Dispersión de Luz Láser
DL	Difracción Láser
PZ	Potencial Z
DEL	Dispersión de Luz Electroforética
EE	Eficiencia de Encapsulación
GH	Grado de Hidrólisis
EPA	Extracto Proteínico Acuoso
ASB	Albumina de Suero Bovino
IP	Intervalo de Predicción
T1U	Tratamiento 1 de Ultrasonido
T2U	Tratamiento 2 de Ultrasonido
VI	Velocidades Iniciales de Reacción
EF	Eficiencia de Filtración
DPPH·	2,2-Difenil-1-Picrilhidracilo
Trolox®	Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-Tetrametilcroman-2-Carboxílico
MC	Manteca de Cacao
CA	Cera de Abeja
F1	Formulación 1
F2	Formulación 2
F3	Formulación 3
NLS-1	Nanopartículas Lipídicas Sólidas elaboradas con la Formulación 1
NLS-2	Nanopartículas Lipídicas Sólidas elaboradas con la Formulación 2
NLS-3	Nanopartículas Lipídicas Sólidas elaboradas con la Formulación 3

## 1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue extraer y nano-encapsular péptidos bioactivos de la semilla de yaca en nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para su estabilización y funcionalización, con el fin de utilizarse como aditivos alimentarios y nutracéuticos.

En este estudio se determinó que la combinación de Alcalase<sup>®</sup> 8 % y Flavourzyme<sup>®</sup> 6 % tuvo el mejor grado de hidrólisis (GH) y que el mejor tratamiento de ultrasonido fue el tratamiento 2 de ultrasonido (T2U) ya que las  $V_i$  de Alcalase y Flavourzyme<sup>®</sup>, y el GH incrementaron más que las obtenidas por el T1U. También se encontró que el T2U incremento ( $P < 0.05$ ) la actividad de captación de radicales DPPH del EPA y de la fracción peptídica  $>5kD$ . La mayor actividad de captación de radicales DPPH fue para la fracción peptídica  $>5kD$  del T2U. Las concentraciones de proteína de las fracciones peptídicas del T2U fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en comparación con el control.

De acuerdo con las tres formulaciones de NLS de colágeno hidrolizado se seleccionó a la Formulación 3 (4.5 % MC y 0.5 % CA) como la mejor formulación para generar NLS de péptidos, debido a la mayor eficiencia de encapsulación ( $85.96 \pm 1.13$  %) de las NLS generadas. Se prepararon NLS de péptidos bioactivos  $> 5kD$  y  $< 5kD$  de la semilla de yaca obteniéndose TP de  $228.8 \pm 2.5$  nm y  $235.2 \pm 4.0$  nm, IP de  $0.336 \pm 0.055$  y  $0.412 \pm 0.094$ , EE de  $89.43 \pm 7.44\%$  y  $81.68 \pm 8.31\%$  y PZ  $-34.8 \pm 0.100$  mV y  $-36.68 \pm 8.31$  mV respectivamente. Debido a las EE altas es que se logró mantener y proteger la actividad antioxidante de los péptidos. Los perfiles de retrodispersión no mostraron fenómenos de desestabilización significativos. En conclusión, se obtuvieron NLS estables capaces de encapsular y proteger la actividad antioxidante de péptidos  $> 5kD$  y  $< 5kD$  de la semilla de yaca con TP, IP y EE aceptables.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Artocarpus heterophyllus Lam.*, conocida en México comúnmente como yaca, es un fruto que pertenece a la familia Moraceae originaria de la India que se cultiva en países con climas húmedos tropicales y subtropicales como Bangladesh, India, Filipinas, Tailandia, Brasil y México. La yaca es una fruta compuesta o múltiple que consiste en una porción comestible la cual incluye la pulpa y la semilla, y una porción no comestible que consta de la corteza y el raquis. En los bulbos se encuentra la pulpa amarilla que encierra a las semillas mientras que, la corteza externa de color verde a amarillo-marrón se compone de ápices de carpelo hexagonales y cónicos (Saxena et al., 2011). La yaca contiene entre 100 y 500 semillas las cuales representan del 18-25 % del peso total de la fruta. Las semillas son lisas, ovaladas, de color marrón claro, de 2 a 3 cm de longitud y de 1 a 1.5 de diámetro (Mahanta & Kalita, 2015).

La composición química de la semilla, la pulpa y la corteza de yaca es diferente. Goswami & Chacrabat (2015) reportaron que la semilla es rica en proteína (10.55-12.40 %) y almidón (49.18 %). Además, también se pueden encontrar minerales, vitaminas y algunos compuestos bioactivos con gran actividad funcional como flavonoides, polifenoles, fenil-propanoides, carotenoides y péptidos bioactivos (Galali et al., 2020). Estos compuestos se pueden emplear para desarrollar y producir alimentos funcionales que aportan un efecto benéfico en la salud de quien los consume (Smith & Charter, 2010). Se pueden aprovechar principalmente los péptidos bioactivos de la semilla de la yaca para desarrollar alimentos funcionales por dos razones: (1) la semilla es un subproducto que se genera durante el proceso de elaboración de algunos productos alimenticios de la yaca como, bebidas “*ready to drink*”, harinas para hornear y botanas (Mittal et al., 2016), y (2) el alto contenido de proteína de la semilla facilita la extracción, aislamiento e identificación de los péptidos bioactivos de la semilla (Chai et al., 2021). Los péptidos bioactivos, sin embargo, tienen el problema de ser susceptibles a la degradación por efecto de las interacciones con otros componentes y el medio ambiente, por lo que una manera de protegerlos y utilizarlos para desarrollar alimentos funcionales, o bien, como aditivos naturales en alimentos es nanoencapsulándolos, siendo una alternativa los nanoacarreadores lipídicos como las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Estas son

de tamaño nanométrico con base en lípidos que atrapan, protegen y liberan a los compuestos bioactivos con la finalidad de promover la biodisponibilidad y propiedades funcionales de los péptidos bioactivos (Pund *et al.*, 2021).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Extraer y fraccionar péptidos bioactivos de semilla de yaca funcionalizándolos en nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para protegerlos y estabilizarlos siendo así capaces de ser utilizados como aditivos alimentarios y nutracéuticos.

### **2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Favorecer la hidrólisis de las proteínas de la semilla de yaca al seleccionar la mejor combinación de concentraciones de enzima Alcalase® y Flavourzyme®.
- Promover la generación de péptidos de diferente masa molecular y la actividad antioxidante de éstos mediante la selección del mejor tratamiento de ultrasonido durante la hidrólisis enzimática secuencial en base a la velocidad inicial de reacción y el grado de hidrólisis.
- Obtener NLS funcionalizadas con péptidos de semilla de yaca con un tamaño de partícula < 500 nm, índice de polidispersidad < 0.4 y una eficiencia de encapsulación de (40-60) % en base a la selección de la mejor formulación de NLS.
- Proteger la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos al atraparlos eficientemente en NLS estables.

### 3. HIPÓTESIS

- La mejor combinación de concentración de la enzima Alcalase® y Flavourzyme®, y un tratamiento óptimo de ultrasonido, logrará una mayor hidrólisis de las proteínas de la semilla de yaca generando péptidos de diferente masa molecular y actividad antioxidante.
- La hidrólisis enzimática secuencial con Alcalase® y Flavourzyme® y el tratamiento de ultrasonido favorecerá la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de menor masa molecular.
- La mejor formulación de NLS de péptidos bioactivos generará tamaños de partícula < 500 nm, índices de polidispersidad < 0.4 y eficiencias de encapsulación entre 40-60 % con lo que se considerarían NLS aceptables y estables capaces de encapsular péptidos bioactivos de la semilla de yaca.
- Si se emplean NLS con una buena eficiencia de encapsulación entonces se logrará proteger y mantener su funcionalidad (actividad antioxidante).

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 YACA (*Artocarpus heterophyllus* Lam)

La yaca crece en árboles monoicos de 8 a 25 m de altura y diámetro de tronco de 30 a 80 cm. Como ya se mencionó anteriormente, consiste en una porción comestible la cual incluye la pulpa y semilla, y una porción no comestible que consta de la corteza y el eje o corazón de la yaca. En la Figura 1 se muestra la fruta completa, así como los bulbos que representan la fruta comestible de pulpa amarilla con sabor a plátano que encierran a las semillas lisas ovaladas de color marrón claro. En la Figura 2 se muestra que cada una de las semillas, de 2 a 3 cm de longitud y 1 a 1.5 de diámetro, está encerrada en un arilo blanco que rodea a la cubierta de la semilla de color marrón que, a su vez, recubre al endospermo carnoso de color blanco. Los bulbos están unidos mediante el eje o corazón del fruto que es rico en látex debido a la presencia de las células laticíferas. La parte exterior está compuesta por una corteza externa de color verde a amarillo-marrón que presenta ápices de carpelo hexagonales y cónicos. (Ajayi, 2011; Guiné & Florenca, 2019).

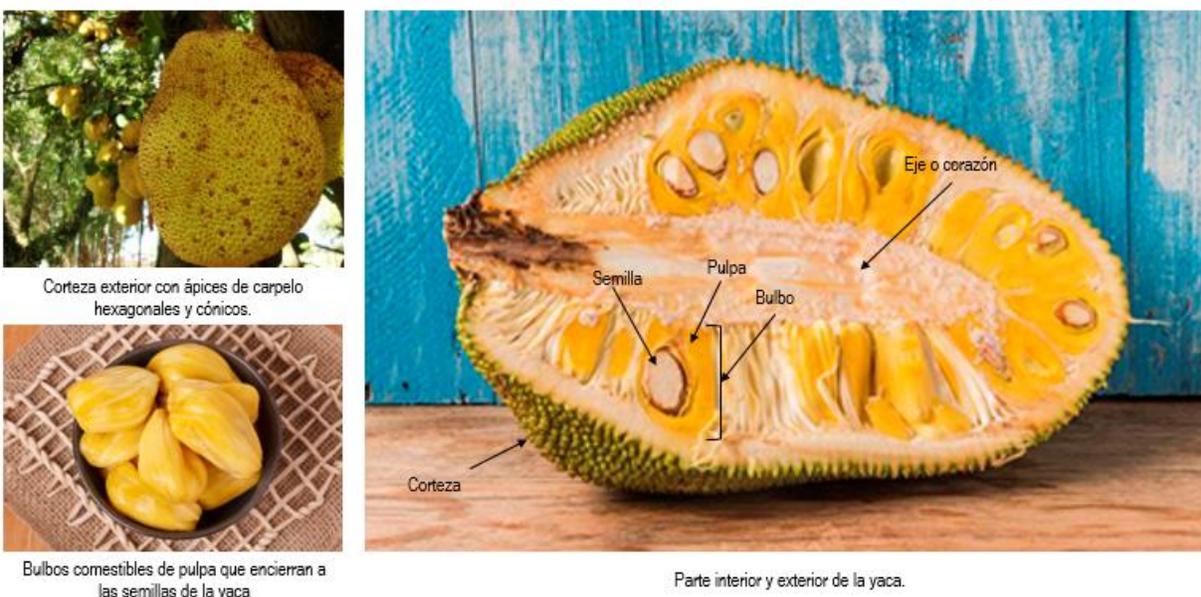


Figura 1. Partes de la yaca. Adaptado de (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2017)



Figura 2. Partes de la semilla de yaca.

En el Cuadro 1 se muestra la composición química de la semilla, pulpa y fruto maduro de la yaca. Goswami & Chacrabati, (2015) reportaron que la semilla de yaca es rica en proteína (10.55-12.40 %) y almidón (49.18 %).

Cuadro 1. Composición química de la yaca y sus partes.

Componente	Semilla	Pulpa	Fruta madura
Agua (%)	51-64.5	76.2-77	72-94
Proteína (%)	10-12	1.8-1.9	1.2-1.9
Grasas (%)	0.40-0.43	0.1-0.15	0.1-0.4
Carbohidratos (%)	25.8-38.4	18.9-19.8	16.0-25.4
Fibra (%)	1.0-1.5	1.0-1.1	1.0-1.5
<b>Minerales totales</b>	0.9-1.2	0.8-0.9	0.8-0.9
Calcio (mg/100g)	50	20.0	20-37
Fosforo (mg/100g)	38-97	41.0	38-41
Hierro (mg/100g)	1.5	0.5	0.5-1.1
Sodio (mg/100g)	63.2	--	2.0-41
Potasio (mg/100g)	246	--	191-407
Manganeso (mg/100g)	54	--	27
<b>Vitaminas</b>			
Vitamina A (UI)	170	540 (0.162 mg)	175-540
Tiamina (mg)	0.25	30	0.03-0.09
Riboflavina (mg)	0.11-0.3	--	0.05-0.4
Vitamina C (mg)	11	--	7.0-10.0

Adaptado de (Baliga et al., 2011; Saxena et al., 2011; Swami & Kalse, 2019)

## 4.2 COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LA SEMILLA DE YACA

Los compuestos bioactivos son componentes que se encuentran en pequeñas cantidades y se extraen de los alimentos o sus subproductos. Asimismo, tienen la capacidad de regular las actividades metabólicas de quien los consume brindando beneficios para su salud, más allá de un valor nutricional básico (Banwo et al., 2021; Pateiro et al., 2020). La semilla de la yaca contiene entre el 10-15 % de los compuestos bioactivos presentes en el total del fruto. Se ha mostrado que los compuestos bioactivos tienen propiedades funcionales y, además, aportan beneficios para la salud como, propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes. Los principales tipos de compuestos bioactivos presentes en la semilla de la yaca son carotenoides, esteroides, fitonutrientes como flavonas, lignina y saponinas, pernil flavonas, proteínas y péptidos bioactivos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. En el Cuadro 2 se resumen algunos de los componentes mencionados y su función (Srivastava & Singh, 2020; Waghmare et al., 2019).

*Cuadro 2 . Principales compuestos bioactivos en la semilla de yaca y sus funciones.*

Compuesto bioactivo	Ejemplo	Función	Referencia
<b>Carotenoides</b>	$\alpha$ -caroteno, luteína, $\beta$ -caroteno, licopeno, zeocaroteno, $\beta$ -caroteno-5,6-epóxido, neoxantina, neocromo, luteoxantina, anteraxantina, violoxantina, leteoxantina, I zexantina, zeinoxantina, criptoxantina	Antioxidante anticancerígeno Antiinflamatorio Prevenir enfermedades cardiovasculares	(Sreeja Devi et al., 2021)
<b>Esteroides</b>	Ácido betulínico, $\beta$ -sitoesterol, cicloartenol, ácido ursólico	Antioxidantes	(Baliga et al., 2011).
<b>Fitonutrientes</b>	Flavonas: ácido gálico, ácido fenólico, fenilpropanoides, isoflavonas riboflavonas, cicloartobiloxantona, flavonas trioxigenadas, heteroflavonas.	Antioxidantes Anticancerígenos Anhipertensivos Anti úlceras Anti envejecedores	(Guiné & de Guiné & Florença, 2019).

Saponinas y lignanos			
<b>Pernil flavonas</b>	Artocarpina, isoartocarpina, artocarpesina, noaratocarpina 6-prenillapigenina, albanina A, cudroflavona B, cudroflavona C, kuwanona C, brosinona I, artonina A, artonina B, cicloheterofilina, diacetato de cicloheterofilina, peracetato de cicloheterofilina, morina, dihidromorina, cinamocurina	Útiles en fiebre, furúnculos, heridas, enfermedades de la piel, convulsiones, diurético, estreñimiento, trastornos oftálmicos, mordedura de serpiente. Antiinflamatorio Anticancerígeno Actividad antineoplástica Inhibe la síntesis de melanina Antimicrobiano	(Ranasinghe et al., 2019).
<b>Proteínas y péptidos bioactivos</b>	Glutati6n, $\alpha$ -péptido de la jacalina, péptido JSF2 y leptina.	Antimicrobiano Antioxidantes	(Banerjee et al., 2017; Ngoc. Lien et al., 1993; Trapani et al., 2018)
<b>Fibra</b>	Fibra	Prevenir el estreñimiento y promueve los movimientos peristálticos.	(Ajayi, 2011)
<b>Ácidos grasos esenciales</b>	Ácido lipoico, ácido linoleico (omega 6) y ácido linolénico (omega 3)	Antioxidante	(Swami & Kalse, 2019)
<b>Vitaminas y minerales</b>	K, vitamina B6, vitamina C, Vitamina B3, vitamina B1, vitamina B2, Mg, Ca, Fe, Mn	Reducci6n de la presi6n arterial y enfermedades cardiacas. Promueven la firmeza de la piel. Antioxidante Funci6n del sistema nervioso. Prevenir enfermedades tiroideas.	(Swami et al., 2012)

Prevenir desordenes de los huesos y osteoporosis.

### 4.3 PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LA SEMILLA DE YACA

Los péptidos bioactivos son fragmentos específicos de proteínas de origen animal o vegetal con un promedio de 2-20 aminoácidos, que ejercen un beneficio a la salud de quien los consume. Las propiedades funcionales de los péptidos bioactivos dependen de la composición, conformación e hidrofobicidad de los aminoácidos de su cadena polipeptídica (Martinez-Villaluenga et al., 2017; Mora et al., 2018; Sharma et al., 2011). La semilla de yaca debido a su contenido de proteína (10.55 – 12.40 %) puede ser considerada una buena fuente de péptidos bioactivos.

Se han identificado cinco diferentes péptidos bioactivos extraídos de la semilla de yaca: péptido antioxidante JFS-2 (VGPWQK) (Valina, glicina, prolina, triptófano, glutamina, lisina), péptido antioxidante glutatión, péptido hormonal leptina y el péptido antiviral  $\alpha$  péptido de la jacalina. En el Cuadro 3 se encuentran las principales características de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca.

*Cuadro 3. Péptidos bioactivos que se han identificado en la semilla de yaca.*

Tipo de péptido bioactivo	Nombre del péptido bioactivo	Características	Referencias
<b>Antioxidante</b>	Péptido JFS-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Actividad antioxidante de EC<sub>50</sub> de 1,0 mg / mL.</li> <li>Su actividad antioxidante se puede deber a los aminoácidos prolina y valina.</li> <li>Su secuencia de aminoácidos es VGPWQK, tienen una masa molecular de 713.39 g/mol, un punto isoeléctrico de 10.10 y es un péptido hidrofóbico.</li> </ul>	(Chai et al., 2021).
	Glutatión	<ul style="list-style-type: none"> <li>Actividad antioxidante de EC<sub>50</sub> (concentración efectiva media) de 0,69 mg / ml.</li> <li>Protege a las células destruyendo el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el peróxido de hidrógeno</li> </ul>	(Basi & Turkoglu, 2019);

		<p>(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el radical hidroxilo (OH), el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito (ONOO-) y el radical peroxilo (ROO), que causan estrés oxidativo en la célula.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Papel crucial en la regulación de la presión arterial.</li> <li>• Es un tri-péptido con una secuencia de ECG y se considera un péptido hidrofílico.</li> </ul>	Fernandes et al., 2017).
<b>Hormonal</b>	Leptina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula el apetito, el metabolismo energético y la ingesta de glucosa en el sistema nervioso central (SNC) y es un agente terapéutico potencial para la obesidad.</li> <li>• Desempeñan funciones vitales en el desarrollo y la progresión del cáncer.</li> <li>• Péptido hidrofóbico con una masa molecular de 16 kD.</li> </ul>	(Banerjee et al., 2017; Ho et al., 2019; Khafagy et al., 2020)
<b>Antiviral</b>	α péptido de la jacalina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bloquea eficazmente la infectividad del VIH in vitro e in vivo sin afectar la función de los linfocitos T al inhibir la unión de gp120 al receptor CD4 de la célula huésped.</li> <li>• Es un péptido hidrofóbico homólogo al péptido VVIRSANFTDNAKT.</li> </ul>	(Diana et al., 2016; Lakshmi Tamma et al., 1996; Veljkovic et al., 2003).

La funcionalidad de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca hace posible el desarrollo de nuevos alimentos funcionales que aporten un beneficio a la salud de quien los consume (Caglar et al., 2017).

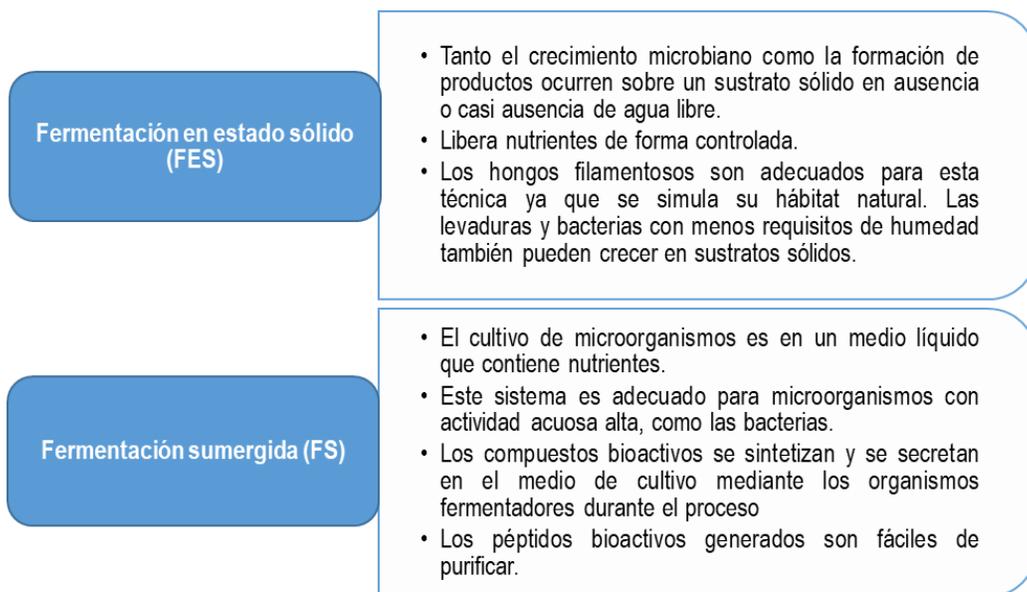
#### 4.4 MÉTODOS PARA OBTENER PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Los péptidos bioactivos se encuentran en la estructura primaria de las proteínas y están inactivos dentro de la proteína madre (proteína de origen de los péptidos bioactivos), es decir ahí, no funcionan como compuestos bioactivos. Para que los péptidos se activen y ejerzan sus propiedades funcionales es necesario fraccionar la proteína madre mediante proteólisis. Existen dos vías bioquímicas para liberar a los péptidos bioactivos de la proteína madre: (1) fermentación mediante microorganismos e (2) hidrólisis enzimática

basada en el tratamiento con una enzima proteolítica (Mahgoub et al., 2021). También, existen algunos métodos físicos que se emplean en conjunto con la hidrólisis enzimática para producir péptidos bioactivos con mejores resultados de rendimiento y bioactividades en menos tiempo y a menor costo.

#### 4.4.1 Fermentación

La fermentación microbiana es un proceso biotecnológico que implica el uso de microorganismos capaces de producir enzimas proteolíticas (proteasa) que hidrolicen a las proteínas y generen péptidos bioactivos. Los microorganismos utilizados son bacterias, hongos o levaduras, que pueden estar presentes en el sustrato de forma autóctona o añadirse como un cultivo iniciador. El proceso de fermentación microbiana se puede dividir en fermentación sumergida (FS) y fermentación en estado sólido (FES) los cuales, son los más empleados. La Figura 3 muestra los diferentes tipos de fermentación microbiana empleados en la producción de péptidos bioactivos.



*Figura 3. Tipos de fermentación microbiana para producir péptidos bioactivos.*

Varios factores, como las condiciones ambientales óptimas (temperatura, pH y humedad), sustratos y microorganismos utilizados, deben considerarse y controlarse durante la fermentación de los alimentos para producir péptidos bioactivos. Las

levaduras, los hongos y las bacterias ácido lácticas (BAL) son los cultivos iniciadores preferidos para la fermentación, ya que tienen una alta actividad de proteolítica y producen una gran variedad de proteasas (Chai et al., 2020; Cruz-Casas et al., 2021).

#### 4.4.2 Hidrólisis enzimática

En este método se emplean enzimas comerciales, proteasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos que unen a los aminoácidos de las proteínas liberando péptidos potencialmente bioactivos. Las proteasas que se emplean principalmente provienen de microorganismos ya que son más estables, rápidas de producir, y los microorganismos pueden ser manipulados genética y ambientalmente para generar las características deseadas, aumentar su actividad y rendimiento. Se utilizan una gran variedad de proteasas comerciales para producir péptidos bioactivos, sin embargo, entre las enzimas más populares comercialmente se encuentran Alcalase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup>. Es posible emplear diferentes combinaciones de estas enzimas para favorecer la hidrólisis de las proteínas y la bioactividad de los péptidos. En el Cuadro 4 se muestran las características más importantes de las enzimas Alcalase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> (Casas et al., 2021; Daliri et al., 2017; Novozymes, 2001, 2014, 2021).

*Cuadro 4. Características de las enzimas comerciales Alcalase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup>.*

	Alcalase <sup>®</sup>	Protamex <sup>®</sup>	Flavourzyme <sup>®</sup>
<b>Tipo de peptidasa</b>	Serin endo-peptidasas, subtilisina, metalo endo-proteasa extracelular, exo-peptidasa.	Serin endo-peptidasas, subtilisina y metalo endo-peptidasa	3 endo-peptidasas, 2 aminopeptidasas (exo-peptidasas), 2 di-peptidil peptidasas (exo-peptidasas) y 1 $\alpha$ -amilasa
<b>Microorganismo de origen</b>	<i>Bacillus lichiniformens</i>	<i>Bacillus lichiniformens</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<b>Actividad enzimática (U/g)</b>	2.5	1.5	500

<b>Intervalo de pH óptimo</b>	7-9	6-9	6-7
<b>Intervalo de temperatura óptima (°C)</b>	30-65	30-65	50-60
<b>Referencia</b>	(Castro et al., 2017; Novozymes, 2014)	(Novozymes, 2021)	(Merz et al., 2015; Novozymes, 2001)

Algunos parámetros, como el pH y la temperatura, deben medirse y controlarse durante la hidrólisis de las proteínas para lograr una hidrólisis óptima. Una hidrólisis eficiente de las proteínas sucede a la temperatura y pH óptimos de la(s) proteasa(s) seleccionada(s). Además, la duración de la hidrólisis es crucial ya que está directamente relacionada con el grado de hidrólisis, que influye en el tamaño y la composición de aminoácidos y, por lo tanto, las bioactividades de los péptidos generados. Varias condiciones, como la especificidad de la enzima, el tiempo de hidrólisis, la relación enzima/sustrato, así como la concentración proteica del sustrato, contribuyen al rendimiento, grado de hidrólisis, composición y actividad funcional de los péptidos bioactivos producidos (Yang et al., 2021).

#### **4.4.3 Métodos físicos**

Los métodos físicos se han empleado para asistir a la hidrólisis enzimática con el objetivo de reducir el tiempo de hidrólisis y los costos, y mejorar el rendimiento y las bioactividades de los péptidos. En el Cuadro 5 se muestran algunos métodos físicos que se han empleado para asistir a la hidrólisis enzimática.

*Cuadro 5. Métodos físicos para asistir a la hidrólisis enzimática.*

Método	Fundamento
<b>Homogenización a alta presión.</b>	Es un sistema discontinuo que utiliza presiones entre 100 y 1000 MPa, con o sin tratamiento térmico.  Las interacciones moleculares (fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrófobas) se ven afectadas por la presión, induciendo el despliegue de la estructura de la proteína y, exponiendo los sitios de corte para que las proteasas aceleren la hidrólisis de las proteínas.
<b>Extracción asistida por ultrasonido</b>	El ultrasonido genera fuerzas físicas, que incluyen cavitación, cizallamiento, ondas de choque y calor que afectan la estructura de las proteínas y aumentan la accesibilidad de las proteasas a los enlaces peptídicos.
<b>Extracción asistida por microondas</b>	Implica el uso de radiación electromagnética, en un rango de frecuencia de 300 MHz-300 GHz, para calentar las proteínas mediante la fricción intermolecular e intramolecular, exponiendo los sitios de corte para la hidrólisis enzimática.
<b>Extracción asistida por campos eléctricos pulsados</b>	Se generan pulsos eléctricos con una intensidad de campo eléctrico de 10 a 50 kV/cm en tiempos cortos (1 a 5 $\mu$ s) a frecuencias de 0,2 a 0,4 MHz que provocan el desdoblamiento y desnaturalización de las proteínas al romper enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas), liberar grupos sulfhidrilo y romper enlaces covalentes (enlaces di-sulfuro) exponiendo los sitios de corte para la hidrólisis enzimática.

Adaptado de (Das et al., 2021; Marciniak et al., 2018; Soquetta et al., 2018).

#### **4.4.3.1 Hidrólisis enzimática asistida con ultrasonido**

El ultrasonido es ampliamente usado en la hidrólisis enzimática debido a sus efectos físicos, mecánicos y cavitacionales que afectan positivamente la actividad enzimática de las proteasas, lo cual favorece la hidrólisis de las proteínas generando una gran variedad de péptidos bioactivos. Además, el ultrasonido también incrementa las propiedades funcionales y actividad antioxidante de los péptidos bioactivos (Wen et al., 2018). El ultrasonido de alta intensidad o potencia emplea bajas frecuencias (20-100 kHz) y potencias altas ( $>1 \text{ W/m}^2$ ), y es el tipo de ultrasonido que se emplea principalmente en conjunto con la hidrólisis enzimática de las proteínas. El principio básico del ultrasonido

se basa en la cavitación generada por ondas de presión que se propagan a través de un medio creando regiones de alta y baja presión. La magnitud de estas variaciones de presión, denominada amplitud de la onda de presión o presión acústica, es directamente proporcional a la cantidad de energía aplicada al sistema. A medida que esta onda atraviesa un medio, transmitirá esta energía en forma de un flujo viscoso. La energía que se transmite se puede percibir por medio de vibraciones (Tobergte & Curtis, 2013; Toma, 2017).

La transmisión de la energía ultrasónica induce una serie de ciclos de expansión o rarefacción y compresión en las moléculas del medio por el que pasa. Si estos cambios en la presión son lo suficientemente grandes, entonces se produce un desplazamiento molecular. Cuando la potencia acústica alcanza un determinado umbral, las presiones negativas que se producen durante el ciclo de rarefacción pueden superar las fuerzas de atracción de las moléculas en el líquido, especialmente la tensión superficial, formando así una burbuja de gas en el líquido. Una vez formada, la burbuja puede continuar creciendo mediante un mecanismo de difusión rectificado, que se caracteriza por un flujo neto de gas desde el líquido hasta la burbuja. En la Figura 4 se observa que, en el ciclo de presión negativa, el flujo de gas se produce desde el líquido hasta la burbuja, que se expande y aumenta de tamaño. Cuando la presión es positiva, el flujo es opuesto y la burbuja se vuelve más pequeña. La cantidad de vapor perdido siempre es menor que la cantidad de vapor ganado, por lo que el tamaño de la burbuja aumenta con cada ciclo. Este proceso de formación de las burbujas se llama cavitación (Islam et al., 2014; Ozuna et al., 2015; Torley & Bhandari, 2007).

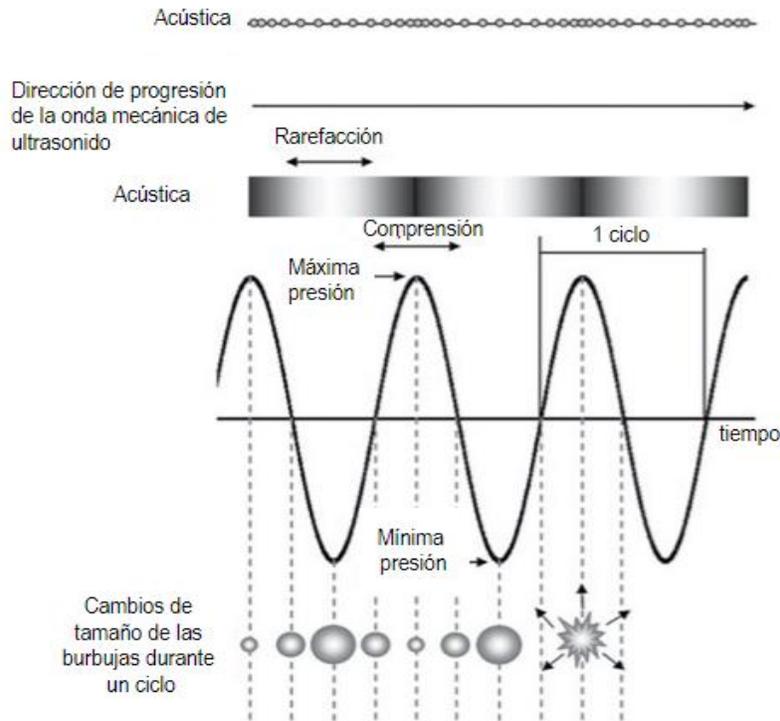


Figura 4. Cavitación ultrasónica. Adaptado de (Torley & Bhandari, 2007).

Durante la cavitación, la presión y la temperatura dentro de la burbuja pueden subir a 100 MPa y 5000 K, respectivamente. La cavitación acústica se puede clasificar en cavitación estable y transitoria en función de cómo las microburbujas se rompen. En la cavitación estable o repetitiva, las microburbujas se pueden expandir y comprimir durante varios ciclos hasta colapsar. El movimiento de las microburbujas estables conduce a micro flujos y microcorrientes a su alrededor. Por otro lado, si el ciclo de crecimiento de la burbuja es mayor que el ciclo de reducción, las burbujas crecen rápidamente y colapsan dentro de unos pocos ciclos acústicos. La burbuja colapsada luego se desintegra en burbujas más pequeñas que después colapsan rápidamente. Este tipo de cavitación se conoce como cavitación inestable o transitoria y generalmente se observa a bajas frecuencias (20–100 kHz). La liberación de energía durante el colapso de las burbujas produce ondas de choque que se propagan hacia el exterior lo que, provoca turbulencias y micro flujos (fluctuaciones de velocidad y presión en el fluido circundante) que se asocian con fuerzas de cizallamiento elevadas. Estos efectos mecánicos aceleran el contacto enzima - sustrato y mejoran la transferencia de calor y masa durante el

proceso (Huang et al., 2017; Wang et al., 2018). Las fuerzas de cizallamiento modifican la estructura de los sustratos proteicos abriendo sus grupos hidrofílicos, lo cual aumenta la solubilidad de la proteína y permite que la proteasa se una más fácilmente al sustrato. Estas fuerzas de cizallamiento también pueden provocar cambios en la estructura secundaria y terciaria de los sustratos proteicos y las enzimas promoviendo la proteólisis a través de una mayor exposición de los enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis y de los sitios activos de las enzimas, lo cual mejora la eficiencia de la hidrólisis enzimática de las proteínas para la síntesis de péptidos bioactivos (Christopher et al., 2021). Las altas temperaturas y los violentos cambios de presión que ocurren simultáneamente durante la cavitación transitoria y estable causan una serie de fenómenos químicos tanto en la fase de vapor dentro de la burbuja de cavitación como en el fluido inmediato que la rodea. El fenómeno químico más importante es la formación de radicales libres a partir de las moléculas de agua ( $H_2O \rightarrow H + \bullet OH$ ) que pueden reaccionar y, en consecuencia, modificar a las proteínas (Tobergte & Curtis, 2013).

#### **4.5 NANOENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

La incorporación de péptidos bioactivos en matrices alimentarias resulta complicada ya que estos tienen baja estabilidad química, baja permeabilidad a las membranas celulares, escasa solubilidad en agua, sabor amargo, alta reactividad y susceptibilidad a la digestión gastrointestinal que afecta su biodisponibilidad e impide su aplicación comercial en el desarrollo de alimentos funcionales. Debido a lo anterior, los sistemas de nanoencapsulación han emergido como una solución a estas limitaciones. De esta manera, es posible encapsular a los péptidos bioactivos de la semilla de yaca en un sistema de nanoencapsulación que los proteja y permita su incorporación en las matrices alimenticias de manera exitosa (Chin et al., 2016; Yadav et al., 2015).

La nanoencapsulación implica la incorporación o atrapamiento, absorción o dispersión de compuestos bioactivos, como los péptidos bioactivos, en una pared o núcleo que puede ser polimérico o lipídico; siendo así, un acarreador o cápsula de tamaño nanométrico ( $< 1 \mu m$ ), conocido como nanoacarreador o nanocápsula, que contiene

compuestos bioactivos. El proceso de nanoencapsulación tiene como objetivos: 1) proteger a los compuestos bioactivos contra la degradación; 2) proporcionar sabor y enmascarar sabores indeseables de los compuestos bioactivos, 3) mejorar su estabilidad; 4) mejorar la incorporación de los compuestos bioactivos en las matrices alimenticias, y 5) permitir que los compuestos bioactivos se liberen de una manera controlada en circunstancias específicas al actuar como sistemas inteligentes de entrega, lo cual conduce a una mayor biodisponibilidad y entrega a células y tejidos del cuerpo humano.

Se han utilizado diferentes tipos de biopolímeros de origen natural, incluidos polisacáridos, lípidos y proteínas para desarrollar una amplia gama de sistemas de nanoencapsulación. Sin embargo, los sistemas lipídicos son los más empleados para proteger a los compuestos bioactivos ya que se consideran excelentes sistemas de liberación capaces de encapsular compuestos bioactivos hidrofílicos o hidrofóbicos dependiendo de los tipos de lípidos empleados en su formulación y el método de preparación que se utiliza para su producción. Además, se prefieren a los lípidos para encapsular a los compuestos bioactivos e incorporarlos en una matriz alimentaria debido a sus propiedades fisicoquímicas, como son su capacidad de emulsificación, cristalización, polaridad, punto de fusión y composición química. En el Cuadro 6 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los lípidos y su relación con los sistemas de nano-encapsulación lipídicos.

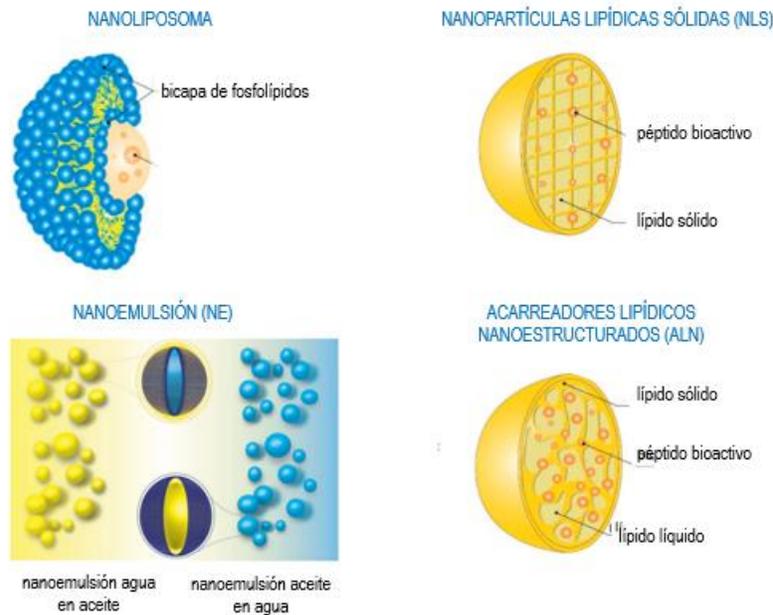
*Cuadro 6. Propiedades fisicoquímicas y características de los lípidos empleados en nano encapsulación.*

Propiedades fisicoquímicas y características de los lípidos	Relación con los sistemas de nano encapsulación lipídicos.
<b>Capacidad de formar emulsiones</b>	Nano emulsiones: aceite/agua, agua/aceite o emulsiones múltiples.
<b>Cristalización</b>	Transiciones polimórficas de los lípidos sólidos. Estabilidad de las NLS. Eficiencia de encapsulación.
<b>Punto de fusión</b>	Solubilización de los bioactivos y cristalización de los lípidos en las NLS.

<b>Composición química</b>	Grupo carboxilo (de los ácidos grasos) que les permite auto ensamblarse, formar interacciones iónicas con otros compuestos y ser solubles en sistemas acuosos.
<b>Polaridad</b>	Incorporación de péptidos bioactivos hidrofílicos y lipofílicos.
<b>Sistemas de protección</b>	Promueven la estabilización y biodisponibilidad de los péptidos bioactivos.
<b>GRAS</b>	Incorporación en matrices alimenticias de manera segura.

Adaptado de (Khorasani et al., 2021; Nobari Azar et al., 2020; Ponce & Marcovich, 2018).

Entre los sistemas de nanoencapsulación lipídica más comunes para atrapar péptidos bioactivos se encuentran los nanoliposomas, nanoemulsiones (NE), nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) y los acarreadores lipídicos nanoestructurados (ALN). En la Figura 5 se muestra una representación de los diferentes sistemas de nanoencapsulación lipídicos.



*Figura 5. Sistemas de nanoencapsulación lipídicos capaces de encapsular péptidos bioactivos. Adaptado de (Sun et al., 2014).*

Los nanoliposomas son nanovesículas formadas por moléculas lipídicas anfipáticas, generalmente por fosfolípidos. Presentan una nanoestructura de bicapa lipídica esférica con un núcleo acuoso (nanoliposoma unilaminar) o múltiples núcleos (nanoliposoma

multilaminar). Es común que tengan un tamaño de partícula de 1  $\mu\text{m}$  a 10 nm. Una nanoemulsión (NE) es un sistema coloidal disperso multifásico formado por gotitas a nanoescala con un tamaño de (10-100) nm. Las nanogotas dispersas de las NE consisten en una cubierta anfifílica que contiene al tensoactivo, el cual reduce la tensión interfacial entre las fases y ayuda a estabilizar la nanoemulsión. Existen dos tipos de nanoemulsiones: nanoemulsiones agua en aceite y nanoemulsiones aceite en agua. En la NE aceite en agua, la fase lipídica u oleosa está en forma de nanogotas dispersas en la fase acuosa y en la NE agua en aceite, la fase acuosa está en forma de nano gotas dispersas en la fase lipídica. Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) son nanopartículas compuestas por un núcleo lipídico sólido y un caparazón de tensoactivo que recubre al núcleo. Dependiendo de su estructura cristalina pueden encontrarse como esferas o plaquetas con un tamaño de partícula entre (50-500) nm. Los acarreadores lipídicos nanoestructurados (ALN) son nanopartículas compuestas por un núcleo lipídico que consta de una mezcla de lípidos sólidos y líquidos recubierto por el tensoactivo. Poseen un tamaño de partícula menor a 200 nm (Barroso et al., 2021; Fathi et al., 2017; Joshua Ashaolu, 2021; Katouzian et al., 2017; McClements & Öztürk, 2021; Zhu & Huang, 2019).

#### 4.6 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) son uno de los sistemas de nanoencapsulación más utilizados para péptidos bioactivos. En el Cuadro 7 se muestran algunos ejemplos de péptidos bioactivos que se han encapsulado en las NLS.

*Cuadro 7. Péptidos bioactivos que se han encapsulado en las NLS.*

Péptido bioactivo	Lípidos	Tensoactivos	Método de preparación	Referencia
<b>Péptidos de la avena</b>	Monoesterato de glicerilo (GMS)	Polaxamero 180®	Emulsificación por difusión de disolventes	(Su et al., 2020)
<b>Glutación</b>	Gelucire® 50/13	Tween 80®	Homogenización a alta presión en caliente	(Trapani et al., 2018)

<b>Ciclosporina</b>	Ácido esteárico y Epikuron 200 ®	Taurocolato de sodio	Microemulsión	(Ugazio et al., 2002)
<b>Péptido TAT</b>	Palmitato de cetilo	Tween 80 y Span 85	Homogenización a alta presión en caliente	(Rudolph et al., 2004)
<b>Insulina</b>	Ácido esteárico y ácido palmítico	Fosfatidilcolina de la soya y Polaxamero 188 ®	Doble emulsión	(Liu et al., 2008)
<b>Nisina</b>	Palmitato de cetilo, Softisan 378 ®, Softisan 154®, Imwitor 900® y Witepsol E85 ®	Deoxicolato de sodio y Polaxamero 188 ®	Homogenización a alta presión en caliente	(Prombutara et al., 2012)

Las NLS se prefieren para encapsular péptidos bioactivos sobre otros sistemas lipídicos ya que presentan ciertas ventajas:

1. Mayor estabilidad coloidal y química.
2. Mayor eficiencia de encapsulación.
3. Mayor protección del bioactivo en contra de la degradación química-oxidativa.
4. Portadores nano seguros (GRAS)
5. La mayoría de los métodos de preparación no emplean disolventes orgánicos potencialmente tóxicos, que también pueden tener un efecto perjudicial sobre los péptidos bioactivos.
6. Protegen contra la degradación física o química a los péptidos bioactivos.
7. Promueven la biodisponibilidad de los péptidos bioactivos.
8. Ofrecen un mejor perfil de liberación controlada.
9. Encapsulan péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos.
10. Se pueden emplear bio-tensoactivos y lípidos de origen natural como ceras o mantecas para su preparación.
11. Posible escalamiento a nivel industrial (Sun et al., 2021).

Las NLS se formulan empleando lípidos sólidos, bio-tensoactivos o tensoactivos sintéticos y los péptidos bioactivos que encapsulan. En el Cuadro 8 se muestran algunos ejemplos de lípidos y bio-tensoactivos que se pueden emplear para preparar NLS capaces de encapsular péptidos bioactivos.

*Cuadro 8. Lípidos y bio-tensoactivos empleados en la formulación de NLS de péptidos bioactivos.*

Lípidos	Bio-tensoactivos
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácidos grasos: ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico</li> <li>Triglicéridos (TGs): tripalmitina y trioleína como TGs de cadena larga y TGs del ácido caprílico y cáprico como TGs de cadena media</li> <li>Mono- y di- glicéridos: monoesterato de glicerol, monooleato de glicerol, palmitoesterato de glicerilo y mono / diglicéridos de ácido caprílico</li> <li>Fosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, dipalmitoil-glicero-hospocolina, dimiristoil-fosfatidilcolina y diestearoilfosfatidiletanolamina-PEG</li> <li>Grasas sólidas: manteca de cacao</li> <li>Ceras: cera de carnauba, candelilla, candeuba (candelilla y carnauba) y de abeja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Saponinas</li> <li>Goma arábiga</li> <li>Proteínas del suero de la leche</li> <li>Lecitina de soya</li> <li>Ramnlípidos</li> </ul>

Adaptado de (McClements & Gumus, 2016; Sivakamasundari et al., 2021; Soleimani et al., 2020)

La función principal de los lípidos en las NLS es formar el núcleo lipídico de la nanopartícula en donde se incorporará, en la mayoría del caso, los péptidos bioactivos. Los lípidos, durante la preparación de las NLS, cristalizan o solidifican después de fundirse a una temperatura aproximada de 10°C arriba de su punto de fusión en la preparación de las nanopartículas para formar estructuras cristalinas esféricas o en

forma de plaqueta. En la preparación de las NLS se emplean tensoactivos como agentes estabilizadores que recubren el núcleo lipídico. Los tensoactivos son moléculas anfifílicas, que tienen un resto hidrofílico y lipofílico. Los tensoactivos en las NLS se emplean con los objetivos de: a) reducir la tensión interfacial y el tamaño de partícula; b) evitar mecanismos de desestabilización como la coalescencia, cremación, separación gravitacional, agregación y la maduración de Ostwald; c) controlar la cristalización lipídica; d) evitar la lipo-oxidación y e) promover la absorción de los péptidos bioactivos en el tracto gastrointestinal (TGI). Los bio-tensoactivos se han empleado actualmente en la formulación de las NLS como una alternativa para reemplazar a los tensoactivos sintéticos debido a que son biodegradables, GRAS y cumplen las mismas funciones que los tensoactivos sintéticos. Los bio-tensoactivos se consideran como cualquier producto de un sistema biológico, que exhibe las propiedades tensoactivas comúnmente asociadas con los tensoactivos químicos (Carabin et al., 2014; Gutnick, 2017; Doktorovova et al., 2017; Karthik et al., 2017; Lee et al., 2013; Ravera et al., 2021).

Dependiendo la naturaleza hidrofílica o lipofílica de los péptidos bioactivos es como se incorporan en las NLS. lo cual resulta en tres tipos de modelos estructurales diferentes para las NLS: modelo de núcleo enriquecido, modelo de cáscara enriquecida y el modelo de solución sólida. En el Cuadro 9 se muestra una breve descripción y representación gráfica de cada uno de los modelos estructurales.

*Cuadro 9. Modelos estructurales de las NLS de acuerdo con la incorporación de los péptidos bioactivos.*

	Modelo de núcleo enriquecido	Modelo de caparazón o cáscara enriquecida	Modelo de solución sólida
<b>Incorporación del péptido bioactivo</b>	Concentrado en el núcleo lipídico	Concentrado en el caparazón exterior	Distribución homogénea en el núcleo
<b>Mecanismo</b>	Cristalización del péptido bioactivo saturado en el lípido.	Cristalización rápida del núcleo expulsando al péptido bioactivo hacia el caparazón donde cristaliza. Mayor solubilidad del péptido bioactivo en el tensoactivo y cristalización.	Dispersión del péptido bioactivo en el núcleo donde permanece durante el enfriamiento.
<b>Factores que favorecen al modelo</b>	Péptido bioactivo lipofílico.	Lípidos con temperaturas de cristalización altas, altas concentraciones de tensoactivo, enfriamiento rápido, baja concentración de bioactivo, péptido bioactivo hidrofílico y técnicas de homogenización en caliente.	Sin emplear tensoactivos, péptidos bioactivos lipofílicos o hidrofílicos.
<b>Representación</b>	<p> <span style="color: cyan;">  </span> tensoactivo  <span style="color: yellow;">●</span> lípido sólido  <span style="color: red;">●</span> péptido bioactivo         </p>		

Adaptado de (Greiner et al., 2018).

## MÉTODOS DE PREPARACIÓN

Los métodos que se han empleado en la elaboración de NLS capaces de encapsular péptidos bioactivos son: homogenización a alta presión (HAP), emulsificación-difusión de disolventes (DED), emulsificación-evaporación de disolventes, ultrasonido, doble emulsión y contactor de membrana. En el Cuadro 10 se muestra el fundamento y metodología de cada uno de los métodos que se emplean para preparar NLS de péptidos bioactivos (Matougui et al., 2016).

*Cuadro 10. Principales métodos empleados para preparar NLS de péptidos bioactivos*

Método de preparación	Fundamento	Metodología	Referencias
<b>Homogenización a alta presión en caliente (HAPC)</b>	La homogenización a alta presión es una técnica de preparación de NLS que emplea presiones altas (100 a 200 bar) que empujan a la nanoemulsión precursora a través de un espacio estrecho de unos pocos micrómetros para producir gotas lipídicas de tamaño nanométrico. La aplicación de un esfuerzo cortante, fuerzas de cavitación y turbulencia ocasionan la descomposición de las gotas lipídicas en nanogotas, lo que resulta en una reducción del tamaño de las gotas. La HAPC se basa principalmente en la creación de una pre-emulsión en caliente que posteriormente se enfría para obtener las NLS.	La fase lipídica se funde a una temperatura de 10°C arriba del punto de fusión de los lípidos. Esta solución se agrega a la fase acuosa, que contiene al tensoactivo, pre-calentada a la misma temperatura que la fase lipídica. Después, esta dispersión se homogeniza a altas presiones (500-1500 bar) en caliente empleando de 3 a 5 ciclos para generar la pre-emulsión que posteriormente se enfría a temperatura ambiente. Durante el enfriamiento se adicionan los péptidos bioactivos para obtener las NLS.	(Duan et al., 2020; Sivakamasundari et al., 2021).
<b>Homogenización a alta presión en frío (HAPF)</b>	La HAPF se basa principalmente en la creación de	La fase lipídica se funde a una temperatura de 10°C arriba del punto de fusión de	(Naseri et al., 2017).

	<p>una pre-emulsión en frío para obtener las NLS.</p>	<p>los lípidos y rápidamente se enfría usando hielo seco o nitrógeno líquido para poder pulverizarla y obtener un polvo con partículas de 50 a 100 <math>\mu\text{m}</math>. Este polvo se dispersa en la fase acuosa con el tensoactivo y los péptidos. Después, esta dispersión se homogeniza a alta presión (500-1500 bar) empleando de 3 a 5 ciclos para generar las NLS.</p>	
<p><b>Emulsificación-difusión de disolventes</b></p>	<p>Este método implica el uso de disolventes orgánicos para obtener las NLS a partir de su precipitación durante la difusión de los disolventes.</p>	<p>La solución lipídica se disuelve en una solución saturada de disolvente orgánico no polar y agua. En esta solución se agregan los péptidos bioactivos hasta que se disuelvan. Esta fase orgánica se emulsifica con la fase acuosa, que es una solución saturada de agua con el tensoactivo, empleando ultrasonido u homogenización a alta presión. Después, se agrega un agua a la nano emulsión, lo cual, permite la difusión del solvente en la fase acuosa ocasionando que la solubilidad de los lípidos disminuya hasta que precipiten en NLS. Finalmente, el solvente que se difunde se elimina por</p>	

		destilación o liofilización (Battaglia et al., 2007)	
<b>Emulsificación- evaporación de disolventes</b>	Este método implica el uso de disolventes orgánicos para obtener las NLS a partir de su precipitación durante la evaporación de los disolventes.	La solución lipídica se disuelve en una solución saturada de disolvente orgánico no polar y agua. En esta solución se agregan los péptidos bioactivos hasta que se disuelvan. Esta fase orgánica se emulsifica con la fase acuosa, que es una solución saturada de agua con el tensoactivo, empleando ultrasonido u homogenización a alta presión. Finalmente, se evapora el disolvente orgánico de la pre-emulsión para generar la precipitación de las NLS en la fase acuosa.	(Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2021; Parhi & Suresh, 2016).
<b>Ultrasonido</b>	Esta técnica se basa en el principio de reducción del tamaño de las partículas mediante la aplicación de ondas sonoras. Las ondas sonoras de alta frecuencia que se propagan en medios líquidos producen burbujas de cavitación. Las condiciones extremas que se producen cuando las burbujas colapsan generan altas fuerzas de cizallamiento y micro chorros que conducen a la reducción de tamaño de las nanogotas.	Sigue la misma metodología que la homogenización a alta presión en caliente o el método de doble emulsión y solo, que en vez de emplear un homogeneizador a alta presión para generar la nanoemulsión se emplea un baño de ultrasonido o una sonda ultrasónica.	(Sarangi & Padhi, 2016).

<b>Doble emulsión</b>	Este método se basa en formación de una doble emulsión agua/aceite/agua para obtener las NLS.	Una solución acuosa de péptidos bioactivos se dispersa en una solución de lípidos para formar una emulsión agua en aceite que a continuación se dispersa en una solución acuosa del tensoactivo para formar la doble emulsión agua/aceite/agua. Finalmente, las NLS se obtiene diluyendo esta doble emulsión en agua.	(Wong et al., 2021).
<b>Contactador de membrana</b>	En esta técnica la solución de lípidos pasa través de los poros de la membrana sobre la fase acuosa en movimiento para permitir la formación de pequeñas gotas.	La solución lipídica se calienta a una temperatura de 10°C arriba del punto de fusión de los lípidos y se hace pasar por el contactador de membrana. La solución acuosa con el tensoactivo y los péptidos bioactivos en el contactador de membrana circula continuamente para generar nano gotas. Que después se enfrían a temperatura ambiente para obtener las NLS.	(Ramteke et al., 2016).

#### 4.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

La adecuada caracterización de las NLS es importante para controlar su calidad y preparar NLS estables capaces de encapsular a los péptidos bioactivos e idóneas para incorporarlas en los alimentos para así, desarrollar alimentos funcionales. La caracterización de las NLS incluye la determinación del tamaño de partícula, morfología, potencial Z y eficiencia de encapsulación. El estudio de las propiedades de las NLS

permite seleccionar las técnicas idóneas para estudiarlas y caracterizarlas. En el Cuadro 11 se muestran las técnicas de caracterización que se emplean para estudiar las propiedades de las NLS.

*Cuadro 11. Técnicas de caracterización más empleadas para estudiar las propiedades de las NLS.*

Propiedades de las NLS	Técnicas de caracterización de las NLS
Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad	Difracción de luz dinámica (DLD).
Estabilidad de la nanodispersión de NLS	Difracción laser (DL)
Potencial Z	Dispersión de luz electroforética (DLE)
Eficiencia de encapsulación	Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Elaboración propia.

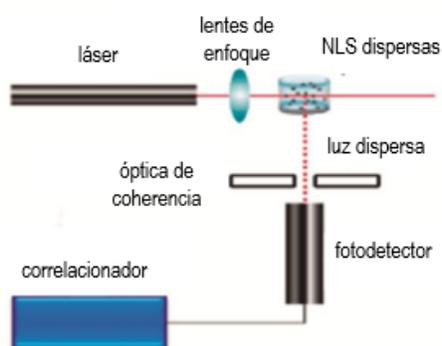
#### **4.7.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad**

El control del tamaño de partícula (TP) es una propiedad fundamental debido a que influye en las características fisicoquímicas y estabilidad de las NLS, eficiencia de encapsulación y biodisponibilidad de los péptidos bioactivos. Una formulación de NLS aceptable debe de producir nanopartículas con un TP menor a 500 nm y un IP aproximadamente de 0.4. Un TP menor incrementa la claridad de la solución coloidal de las NLS y genera NLS más estables ante fenómenos de desestabilización como la cremación y la agregación de las nanopartículas. Un TP aceptable favorece el transporte por el tracto gastro intestinal, adsorción, captación celular en el intestino delgado, y distribución de las nanopartículas a través del sistema linfático para que lleguen al sitio específico de liberación de los péptidos bioactivos (Campos et al., 2020; Danaei et al., 2018; Santos, Valeria, Ribeiro & Santana, 2019)

El índice de polidispersidad (IP) es una medida de la heterogeneidad de una muestra de nanopartículas en función a su tamaño de partícula. Los valores de polidispersidad varían de 0-1 en donde, un valor de 0 representa una muestra uniforme o mono dispersa y un valor de 1 representa una muestra no uniforme o poli dispersa. Un  $IP < 0.4$  se considera aceptable e indica que se trata de una muestra mono dispersa de NLS con una

distribución de tamaño estrecha mientras que, un  $IP > 0.5$  se considera inaceptable e indica que se trata de una muestra polidispersa de NLS con una distribución de tamaño amplia (Mudalige et al., 2018).

La dispersión de luz dinámica (DLD) es una técnica que determina el tamaño de las NLS en un rango de (3-3000) nm. Esta técnica reporta diámetros hidrodinámicos ya que analizan muestras de NLS en solución y asumen que las NLS son esféricas independiente de su morfología real (Sastri et al., 2020). Un equipo de DLD está compuesto por las partes que se muestran en la Figura 6.



*Figura 6. Componentes de un equipo DLD. Adaptado de (Giudice, 2017).*

En la DLD una muestra de NLS en solución se expone a una luz láser. La luz láser incide en las NLS que presentan movimiento Browniano produciéndose un desplazamiento Doppler el cual ocasiona que la luz se disperse en un ángulo diferente al incidente y cambie su longitud de onda. Un detector, ubicado a  $90^\circ$  o  $173^\circ$  del rayo láser, registra las fluctuaciones de luz dispersa, que se generan por las colisiones de las NLS originadas durante el movimiento Browniano, en función del tiempo. Posteriormente una computadora calcula el coeficiente de difusión y después, el diámetro hidrodinámico. A partir de los datos obtenidos se obtiene un perfil DLD que nos proporcionan información sobre la distribución del tamaño de partícula (Mudalige et al., 2018). En la Figura 7 se muestra un ejemplo de un perfil DLD obtenido de una muestra de NLS de cera de carnauba (Espinosa de los Monteros Vega, 2016)

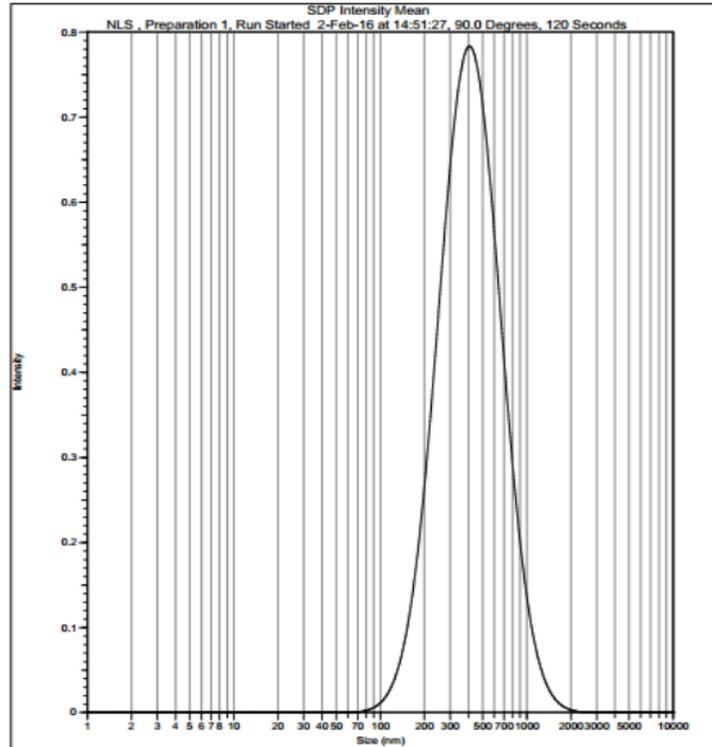


Figura 7. Perfil DLD de NLS con cera de carnauba. Adaptado de (Espinosa de los Monteros Vega, 2016).

#### 4.7.2 Estabilidad de la nanodispersión de NLS

Durante el proceso de preparación de las NLS se genera una nanodispersión. La nanodispersión generada se puede romper con el tiempo debido a mecanismos desestabilizadores como la cremación, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald, fusión y gelificación por lo cual es importante determina la estabilidad de la nano dispersión (Aswathanarayan & Vittal, 2019).

La difracción láser (DL) es una técnica de dispersión de luz que se emplea para estudiar la estabilidad de la nanodispersión de NLS. La funcionalidad de un equipo DL se muestra en la Figura 8. En esta técnica, una muestra de NLS en una celda de medición se coloca en la cámara de medición en donde la luz que proviene de un rayo láser incide en las NLS y posteriormente, la intensidad de luz transmitida y retrodispersada en toda la altura de la celda es detectada. Estas intensidades permiten monitorear directamente las heterogeneidades físicas locales con una resolución vertical de hasta 20  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, los fenómenos de desestabilización pueden detectarse y monitorearse a lo largo del

tiempo en diferentes intervalos. En la Figura 9 se observa un perfil de retrodispersión que nos proporciona información sobre la estabilidad de las NLS.

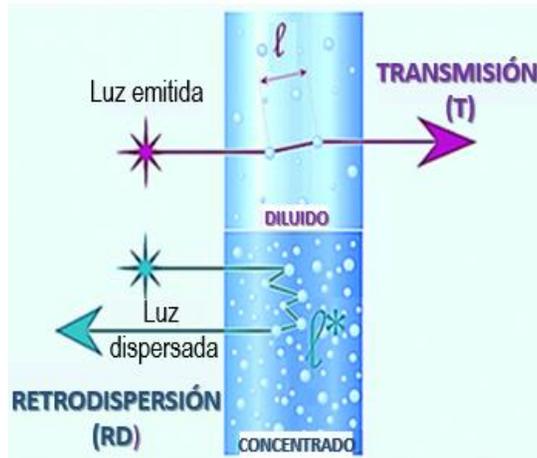


Figura 8. Funcionamiento de un difractómetro láser. Adaptado de (Sivakamasundari et al., 2021).

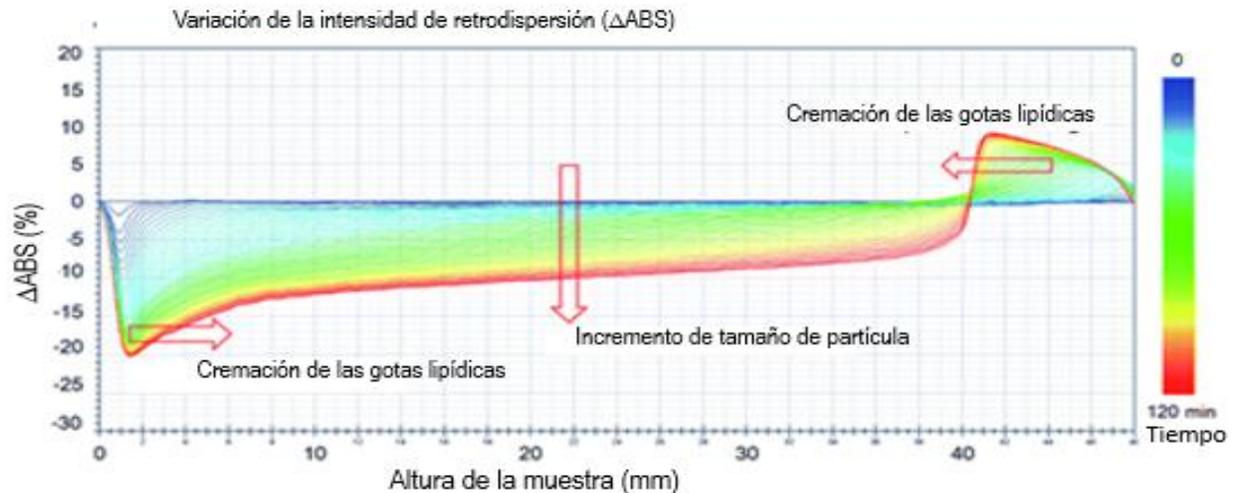


Figura 9. Perfil de retrodispersión. Adaptado de (Sivakamasundari et al., 2021).

### 4.7.3 Potencial Z

El potencial Z (PZ) de las NLS se determina por la carga de su superficie, influye en la interacción de las NLS con el medio, y se emplea para predecir la estabilidad de las NLS a largo plazo durante su almacenamiento y estudiar las propiedades de superficie y captación celular de las NLS. El PZ se refiere al potencial del plano de deslizamiento o

plano de corte de una nanopartícula que se mueve en un campo eléctrico y refleja la diferencia de potencial entre la doble capa eléctrica y la capa dispersa alrededor de las NLS en el plano de deslizamiento (Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2018; Selvamani, 2018). En la Figura 10 se representa al PZ.

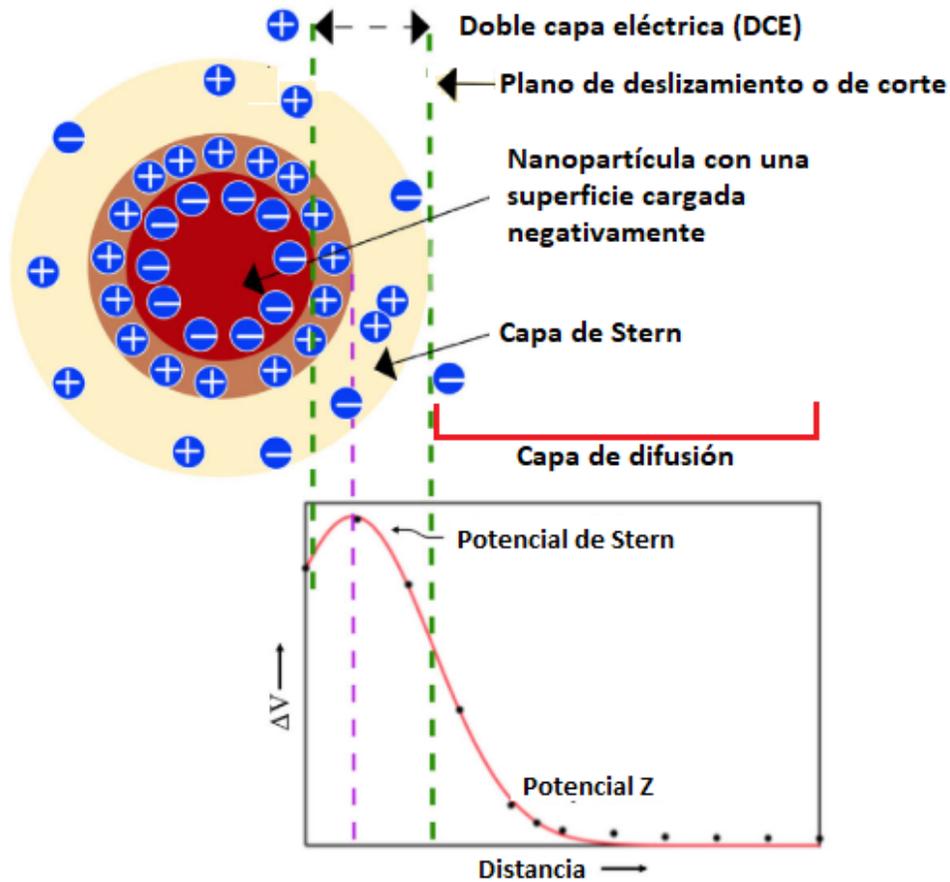


Figura 10. Representación del potencial Z. Adaptada de (Selvamani, 2018).

La técnica más utilizada para determinar el PZ es la dispersión de luz electroforética (DLE). El fundamento de esta técnica se basa en el desplazamiento Doppler: la frecuencia del haz de luz disperso está en función de la velocidad de las nanopartículas. Es una técnica que se basa en la medición del movimiento de las nanopartículas cargadas cuando se aplica un campo eléctrico. En la Figura 11 se muestra el funcionamiento del dispositivo de DLE.

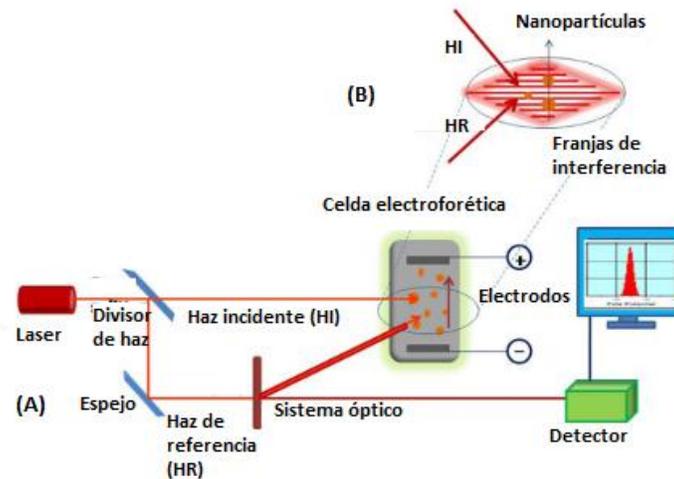


Figura 11. Funcionamiento de un sistema de DLE. Adaptada (Dukhin & Xu, 2020).

En esta técnica, la dilución de nanopartículas que tiene una carga superficial específica se coloca en una celda electroforética que tiene un par de electrodos colocados a cierta distancia. Se aplica un potencial entre los electrodos que ocasiona la migración de las nanopartículas cargadas hacia el electrodo de carga opuesta. La movilidad electroforética de las nanopartículas se mide empleando un láser Doppler. El haz de luz del láser se divide en dos haces, el haz de referencia (HR) y el haz incidente (HI) que se enfocan en la celda electroforética con las nanopartículas. El HI interactúa con las nanopartículas en movimiento generando un haz de dispersión (HD). El HR se cruza, en la celda electroforética, con el HD y sus frecuencias se combinan generando ondas de interferencia. La velocidad de las nanopartículas se mide por el cambio de frecuencia de las ondas de interferencia cuando las nanopartículas cruzan las franjas de interferencia. La computadora calcula la movilidad electroforética que se obtiene a partir de la velocidad de las nanopartículas y la amplitud del campo eléctrico para finalmente, obtener el PZ (Dima et al., 2020; Dukhin & Xu, 2020).

#### 4.7.4 Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE), expresada en porcentaje, es la proporción de compuesto bioactivo encapsulado en las NLS en relación con la cantidad de compuesto bioactivo total agregado en la fase lipídica o acuosa. La Ecuación 1 que se muestra a continuación corresponde al cálculo de la EE.

*Ecuación 1.* Eficiencia de encapsulación (Galindo, 2019).

$$EE(\%) = \frac{[\text{bioactivo añadido} - \text{bioactivo no encapsulado}]}{[\text{bioactivo añadido}]} (100\%)$$

La EE se puede medir después de la preparación y separación de las NLS de la fase continua. Algunas técnicas típicas de separación incluyen la centrifugación o ultrafiltración para después cuantificarlos (Alanchari et al., 2021; Daneshmand et al., 2018; Hajj Ali et al., 2016).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 MATERIALES

Los reactivos, materiales y equipos que se emplearon se muestran en el Cuadro 11.

*Cuadro 1. Reactivos, equipos y materiales empleados durante el desarrollo experimental.*

Reactivos
Metabisulfito de sodio 0.05% m/v
Proteasas Alcalase® ( $\geq 2.4$ U/g, Proteinase from <i>Bacillus licheniformis</i> , Subtilisin A de Sigma Aldrich, Merck) y Flavourzyme® ( $\geq 500$ U/g de Sigma Aldrich, Merck)
Albúmina de suero bovino
Tartrato de sodio dihidratado ( $C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$ )
Sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$ )
Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ )
Hidróxido de sodio NaOH
Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®)
Manteca de Cacao
Cera de Abeja
Tween 80®
Lecitina de soya
Equipos
Procesador de alimentos NutriBullet®
Deshidratador de alimentos Sunix
Molino para café KRUPS
Centrifuga Frontier™ 5707
Termómetro digital Checktemp® 1
Espectrofotómetro UV Vis GENESYS™ 10S
Balanza analítica Santorius
Balanza digital Scout-Pro
Procesador ultrasónico UP200Ht Hielscher
Parrillas de calentamiento Thermo Scientific
Parrilla de agitación magnética Cymarec 2 Thermoline
Limpiador Ultrasónico SB 120 DTN Hinotek
Materiales

Tina de plástico

Tubos para centrifuga de 50 mL

Vasos de precipitado de 100 mL

Vasos de precipitado de 50 mL

Matraz volumétrico de 10 mL

Pipeta graduada de 5 mL

Probeta graduada de 10 mL

Probeta graduada de 2000 mL

Vaso de precipitados de 2000 mL

Vaso de precipitados de 5 mL

Vaso de precipitados de 10 mL

Agitadores magnéticos

Espátula de acero inoxidable de dos puntas

Matraz aforado de 25 mL

Micropipeta (10-100)  $\mu$ L Nichiryo Nichipet EX Plus II

Micropipeta (100-1000)  $\mu$ L Nichiryo Nichipet EX Plus II

Unidades de filtración para centrifugado (Amicon <sup>®</sup> Ultra-4; Merck Millipore) con membrana de celulosa regenerada (Ultracel <sup>®</sup>) con tamaño de poro de 10 kD para muestras de 4 mL.

Unidades de filtración para centrifugado (Spin- X <sup>®</sup> UF Concentrator; Sigma Aldrich) con membrana de polietersulfona con tamaño de poro de 5 MWCO (5 kD) para muestras de más de 6 mL.

## 5.2 DIAGRAMA DE FLUJO

En la Figura 12 se muestra el diagrama de flujo con las etapas principales que se siguieron para obtener nanopartículas lipídicas sólidas capaces de encapsular péptidos bioactivos de la semilla de yaca.

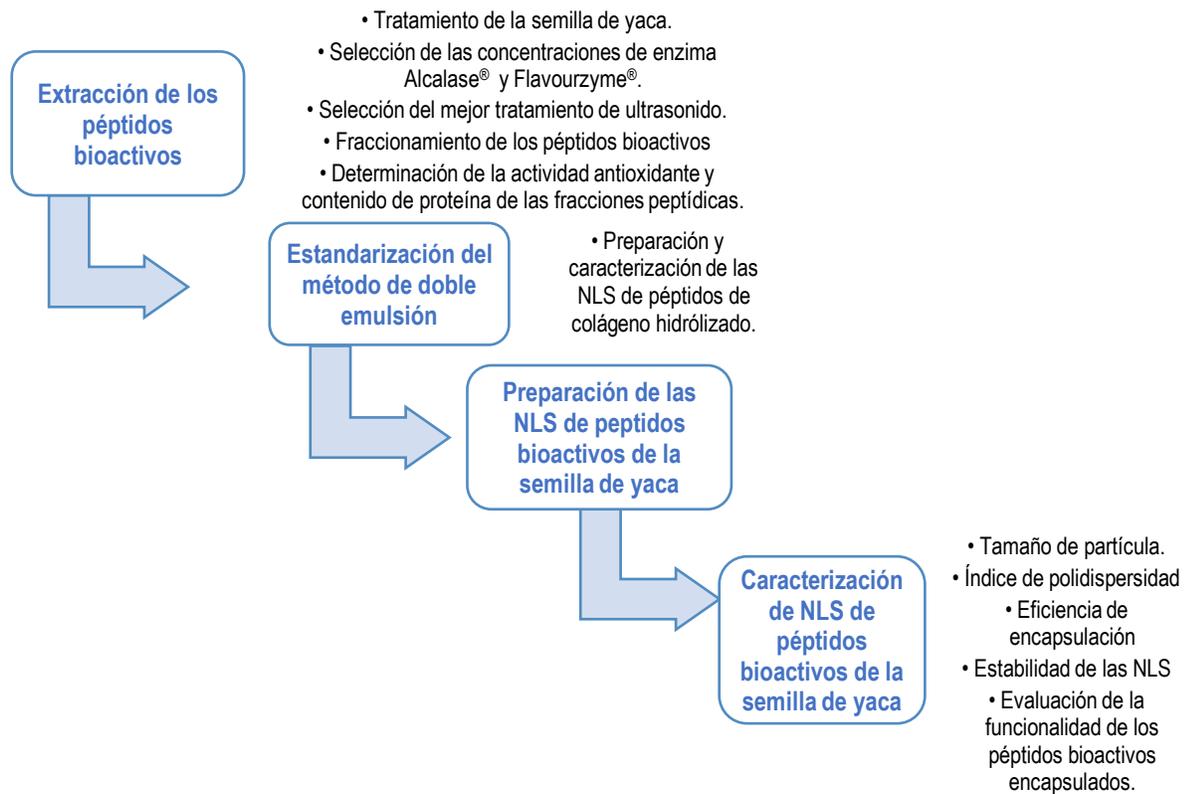


Figura 12. Diagrama de flujo. Elaboración propia.

## **EXTRACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA SEMILLA DE YACA.**

### **5.2.1 Tratamiento de la muestra de semilla de yaca**

Las yacas fueron recolectadas en el poblado del Llano, Municipio de San Blas, Nayarit; en estado de madurez comercial. Estas fueron lavadas, desinfectadas y, una vez abiertas se obtuvieron las semillas de la parte central de los bulbos. Las semillas se lavaron y se retiró el arilo y la cubierta de la semilla para obtener el endospermo, que se sumergió en una solución de metabisulfito de sodio al 0.05% por 24 h con el objetivo de preservar la harina de la semilla de yaca, ya que evita el pardeamiento enzimático de la harina al inhibir a la enzima polifenoloxidasas. Posteriormente, las semillas de la yaca se molieron empleando un procesador de alimentos (NutriBullet®) hasta que se obtuvo una pasta que se secó empleado un deshidratador de alimentos (Sunix®) a una temperatura de 50-60°C. Finalmente, la pasta seca se pulverizó con un molino (KRUPS®) para obtener la harina de la semilla de la yaca.

### **5.2.2 Selección de las concentraciones de las enzimas Alcalase® y Flavourzyme® en función al grado de hidrólisis**

Para el diseño experimental, se empleó una hidrólisis enzimática secuencial Alcalase® - Flavourzyme®, ya que se obtiene una hidrólisis más extensa de la proteína y un grado de hidrólisis mayor en comparación con la hidrólisis enzimática con un solo tipo de enzima (Pascacio et al., 2020). Para llevar a cabo la hidrólisis se preparó una solución de harina de semilla de yaca al 5 % m / v. El tiempo de hidrólisis total fue de 180 min, el tiempo de hidrólisis para Alcalase® y Flavourzyme® fue de 90 min debido a que después de este tiempo se ha reportado que el grado de hidrólisis no aumenta significativamente (Ozón et al., 2022). Una vez que transcurrieron los 180 min de hidrólisis, las enzimas se inactivaron a 80-85 °C por 10 min. El pH y la temperatura de hidrólisis fueron de 7 y 55-60 °C respectivamente de acuerdo con las condiciones óptimas reportadas por el fabricante Novozymes para las enzimas Alcalase® y Flavourzyme®. Las concentraciones de enzima que se eligieron fueron 4,6 y 8 % relación enzima/proteína. En la Figura 13 se esquematizan las diferentes concentraciones de enzima y las combinaciones con Alcalase® y Flavourzyme® para el diseño experimental

(Novozymes, 2001, 2014). Después de llevada a cabo la hidrólisis, se recuperó el extracto acuoso de cada tratamiento para determinar el contenido de proteína y grado de hidrólisis (GH).

**Posibles combinaciones con Alcalase® y Flavourzyme®**

T1: A 4% - F 4%

T2: A 4% - F 6%

T3: A 4% - F 8%



T4: A 6% - F 4%

T5: A 6% - F 6%

T6: A 6% - F 8%



T7: A 8% - F 4%

T8: A 8% - F 6%

T9: A 8% - F 8%



A: Alcalase®

F: Flavourzyme®

T: tratamiento, concentración en % enzima / proteína



Hidrólisis enzimática

*Figura 13. Concentraciones de Alcalase® y Flavourzyme® empleadas en el diseño experimental. Elaboración propia.*

### **5.2.2.1 Determinación del contenido de proteína del extracto proteínico acuoso mediante el método de Lowry**

El hidrolizado obtenido al final de cada tratamiento enzimático secuencial fue centrifugado a 2408 RCF por 10 min en una centrifuga (Frontier™ 5707). El sobrenadante obtenido fue considerado el extracto proteínico acuoso (EPA). El contenido de proteína del EPA se determinó por el método de Lowry de acuerdo con la metodología propuesta por Ebru (2020). La concentración de proteína en el EPA se estimó al leer la absorbancia ( $\lambda = 750$  nm) del producto final de la reacción de Lowry frente a una curva patrón de una solución de albumina de suero bovino (ASB). La solución de Lowry se preparó mezclando las soluciones A, B y C en una proporción v/v de 100:1:1. Para preparar la solución A se pesaron 2.8598 g de NaOH y 14.3084 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  que se disolvieron en 500 mL de agua destilada; para la solución B, 1.4232 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$  en 100 mL de agua destilada, y para la solución C, 2.85299 g de  $\text{Na}_2$ Tartrato. $2(\text{H}_2\text{O})$  en 100 mL de agua destilada. La solución de Folin se preparó mezclando 1.25 mL del Reactivo de Folin-Ciocalteu con 1.5 mL de agua destilada. Se elaboró una curva patrón de ASB a partir de una solución madre de 100 mg/L, con la cual se prepararon 6 diluciones diferentes a un volumen final de 5 mL con diferentes concentraciones: (0, 20, 40, 60, 80 y 100) mg/L. En microtubos de centrifuga de 2 mL se hicieron reaccionar 0.5 mL de cada dilución de la solución madre con 0.7 mL de la solución de Lowry por 20 min en la oscuridad. Los microtubos con la reacción se agitaron en un mezclador vortex (Turbo Mixer, UNICO). Transcurridos los 20 min, se adicionó 0.1 mL de la solución de Folin, se agitaron los tubos con ayuda de un mezclador vortex y se incubaron por 30 min en la oscuridad. Para determinar el contenido de proteína del EPA, se realizó una dilución 1:10 de este extracto. Después, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para llevar a cabo la reacción de Lowry, solo que, en vez de adicionar 0.5 mL de dilución de solución madre se adicionaron 0.5 mL del EPA diluido. Se midió la absorbancia a  $\lambda = 750$  nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis (GENESYS™ 10S, Thermo Scientific), el contenido de proteína se expresó en mg proteína/L. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la Figura 14 se muestra la reacción de Lowry. Los enlaces peptídicos reaccionan con

el  $\text{CuSO}_4$ , formando el complejo tetradentado de  $\text{Cu}^+$  (en condiciones alcalinas) que transfiere electrones y reduce al ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico. Los aminoácidos aromáticos también pueden reducir al ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico. Como producto final de la reacción de reducción se genera un complejo colorido (azul). La concentración de proteína se puede estimar al leer la absorbancia del producto final a 750 nm frente a una curva patrón de una solución de proteína estándar (Lucarini & Kilikian, 1999; Pavel et al., 2013).

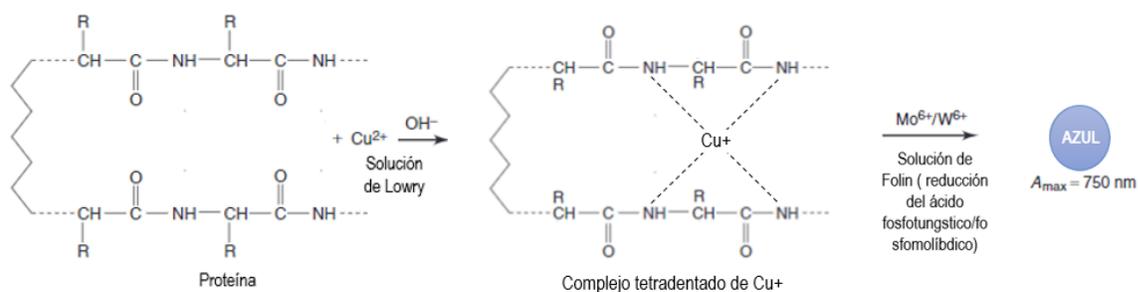


Figura 14. Reacción de Lowry. Adaptada de (Pavel et al., 2013).

La ecuación de la recta de la curva patrón de ASB que determinó el espectrofotómetro fue  $y=3.506286 \times 10^{-3}x + 0.1990171$  con un índice de correlación de 0.99608. La curva patrón de ASB que se empleó para determinar el contenido de proteína de los extractos proteínicos acuosos por medio del método de Lowry se muestra en la Figura 15.

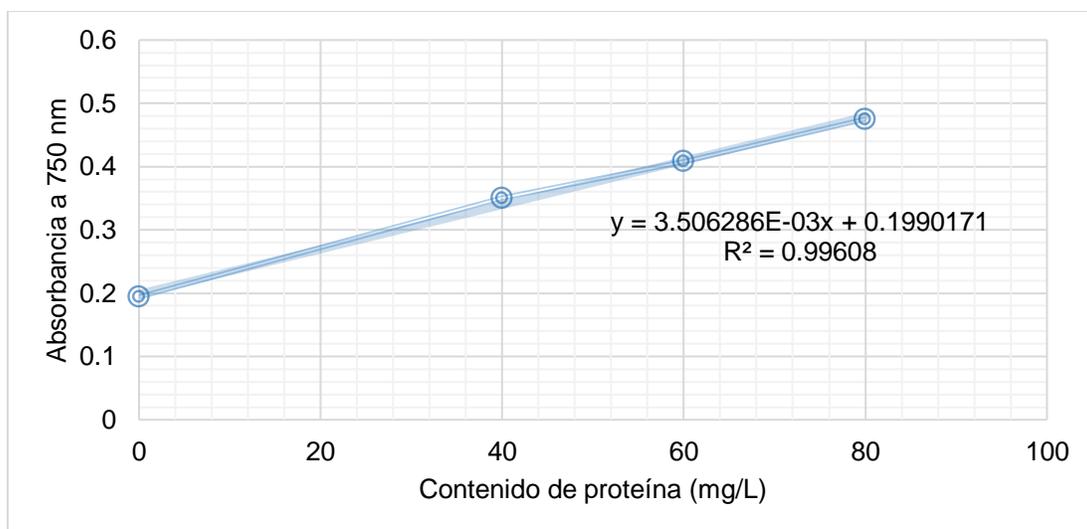


Figura 15. Curva patrón de albumina de suero bovino (ABS).

### 5.2.2.2 Cálculo del grado de hidrólisis (GH)

El GH se determinó de acuerdo con la Ecuación 2 (Tkaczewska et al., 2020). Considerándose que la muestra de harina de semilla de yaca contiene 20 % de proteína de acuerdo con lo reportado por Ajayi (2008).

*Ecuación 2. Grado de hidrólisis.*

$$GH = \frac{\text{proteína en el EPA [mg]}}{\text{proteína en la muestra de harina de semilla de yaca antes de la hidrólisis [mg]}} (100\%)$$

Donde la proteína en el EPA representa la concentración de péptidos hidrolizados.

### 5.2.2.3 Modelo estadístico empleado en el diseño experimental

Para establecer las concentraciones óptimas de las enzimas Alcalase® y Flavourzyme®, se realizó un diseño factorial  $2^2$  con 3 puntos centrales y 3 réplicas por experimento. El factor 1 fue la enzima Alcalase®, y el factor 2, la enzima Flavourzyme®, la concentración mínima fue de 4 % y la máxima de 8 % en relación enzima/ proteína, considerándose como variable de respuesta el GH (Montgomery, 2004). Los resultados fueron analizados utilizando el software estadístico Minitab® 19. El análisis de varianza se realizó con  $\alpha = 0.05$ , y para la obtención de las mejores condiciones se realizó un análisis de deseabilidad considerando maximizar el grado de hidrólisis. Obtenida la combinación de

las mejores concentraciones de enzima, se llevó a cabo la validación para confirmar la reproducibilidad del método. En la validación se consideró un intervalo de predicción ( $I_P$ ) de 95 % con respecto al resultado de las mejores condiciones. Este  $I_P$  se definió como un rango, el cual, fue probable que contuviera un valor de GH futuro para la combinación de las mejores concentraciones de enzima Alcalase® y Flavourzyme®. Es decir, si se determinaba otro valor de GH proveniente de una hidrólisis enzimática que empleaba la combinación de las mejores concentraciones de enzima, era probable que el nuevo valor se encontrara dentro de este  $I_P$  (Minitab 19, 2020, 2022).

La significancia de las variables independientes (concentración de enzima Alcalase® y Flavourzyme®) y sus interacciones sobre la variable de respuesta (GH) se determinaron por medio del análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, así la influencia de las variables y su nivel de significancia en el proceso de hidrólisis están dadas por el valor-P, cuando este es  $P < 0.05$  entonces la variable tendrá una influencia significativa.

### **5.2.3 Hidrólisis enzimática asistida con ultrasonido**

Para determinar el mejor tratamiento de ultrasonido se realizaron tres hidrólisis enzimáticas: dos hidrólisis enzimáticas asistidas con diferentes tratamientos de ultrasonido y una hidrólisis control sin tratamiento de ultrasonido. Las tres hidrólisis enzimáticas emplearon las concentraciones de enzima Alcalase® y Flavourzyme® que resultaron de la optimización de respuesta y la validación del método. Las condiciones de la hidrólisis fueron: tiempo de hidrólisis total de 120 min, es decir, 60 min de hidrólisis para Alcalase® y 60 min de hidrólisis para Flavourzyme®; pH 7 y temperatura de 55-60 °C. Al final de la hidrólisis, las enzimas se inactivaron a 80-85 °C por 10 min. En el caso de las hidrólisis asistidas con ultrasonido, se utilizó un homogeneizador ultrasónico (UP200HT; Helshier; Alemania) con un “sonotrodo” de 14 mm de diámetro a una potencia de homogeneización de 50 W y 50 kHz de frecuencia y se les aplicaron 4 periodos de ultrasonido, cada uno con una duración de 5 min. El primer periodo de ultrasonido se aplicó después de adicionar la enzima Alcalase® a la solución de harina de semilla de yaca, el segundo periodo después de que transcurrieron 30 min de hidrólisis con Alcalase®®, el tercer periodo después de adicionar la enzima Flavourzyme® y, por último, un cuarto

periodo de ultrasonido después de que transcurrieron 30 min de hidrólisis con Flavourzyme®. El tratamiento 1 de ultrasonido (T1U) consistió en periodos de 3 pulsos de 60 s on/60 s off y el tratamiento 2 de ultrasonido (T2U) en periodos de 5 pulsos de 40 s on/20 s off y. El tiempo “on” se definió como el tiempo en el cual el homogeneizador ultrasónico se prendió y el tiempo “off” como el tiempo en el cual el homogeneizador ultrasónico se apagó.

Se monitoreó el GH con respecto al tiempo de hidrólisis y la cinética de las tres hidrólisis enzimáticas con la finalidad de comparar las velocidades iniciales de reacción ( $V_i$ ) de Alcalase® y Flavourzyme® del T1U, T2U y el control. Para las hidrólisis del T1U, T2U y control se tomaron muestras de 3 mL de la solución hidrolítica cada 5 min hasta el final de la hidrólisis (120 min). Se determinó el contenido de proteína de cada una de las muestras por triplicado por el método de Lowry y posteriormente, con estos datos, se calculó el GH con la Ecuación 4. Se construyeron las gráficas de cinética enzimática en relación con el GH para las enzimas Alcalase® y Flavourzyme® para cada una de las hidrólisis en las cuales, se graficó el GH (%) vs. tiempo de hidrólisis (min), y las gráficas de cinética enzimática en relación con el contenido de proteína para las enzimas Alcalase® y Flavourzyme®, en las cuales se graficó el contenido de proteína (mg/L) vs. tiempo de hidrólisis (min). A partir de las gráficas de contenido de proteína vs. tiempo de hidrólisis, se obtuvieron las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® al realizar una regresión lineal que nos proporcionó la ecuación de la recta y su pendiente, que fue igual a la  $V_i$ , con unidades de mg/L · min. El contenido de proteína por el método de Lowry y el GH final se determinó por triplicado a los EPAs obtenidos de la centrifugación de los hidrolizados de los dos tratamientos de ultrasonido y el control. Posteriormente, se seleccionó el mejor tratamiento de ultrasonido el cual debía de presentar el mayor incremento en las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® y el mayor GH final en comparación con el GH final del control. Finalmente, con el objetivo de validar la repetibilidad del tratamiento de ultrasonido, se prepararon tres hidrolizados con las mismas condiciones del tratamiento de ultrasonido seleccionado. Se recuperaron los EPAs de los tres hidrolizados y se determinó el contenido de proteína por Lowry y GH por triplicado de cada uno de ellos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza

del 95 % y una prueba de Tukey para comparar las medias de los GH de las tres hidrólisis empleando el software estadístico Minitab® 19.

#### **5.2.4 Fraccionamiento de los péptidos bioactivos de acuerdo con la masa molecular: > 10 kD, < 10 kD, > 5 kD Y < 5 kD**

Se prepararon 300 mL de una solución de harina de semilla de yaca a 5 % m/v y se llevó a cabo la hidrólisis enzimática secuencial Alcalase® - Flavourzyme® empleando la mejor combinación de concentraciones de enzima que se determinó en la sección 6.3.2 y el mejor tratamiento de ultrasonido seleccionado previamente. Las condiciones de hidrólisis fueron: pH 7, temperatura entre 55-60 °C y tiempo total de hidrólisis de 120 min con 60 min de hidrólisis para cada enzima. Una vez transcurridos los 120 min de hidrólisis enzimática, las enzimas se inactivaron entre 80-85 °C por 10 min. Al final de la hidrólisis se recuperó el EPA obtenido por el tratamiento de ultrasonido y posteriormente, se empleó en el fraccionamiento de los péptidos bioactivos. También, se fraccionaron los péptidos bioactivos del EPA del control (hidrólisis sin ultrasonido). Para fraccionar los péptidos bioactivos del EPA, se empleó la técnica de ultrafiltración de membrana, en la cual se separan los péptidos bioactivos de acuerdo con sus pesos moleculares (Sosalagere et al., 2022). Se usaron unidades de filtración para centrifugado (Amicon® Ultra-4; Merck Millipore) con membrana de celulosa regenerada (Ultracel®) con tamaño de poro de 10 kD para muestras de 4 mL y unidades de filtración para centrifugado (Spin-X® UF Concentrator; Sigma Aldrich) con membrana de polietersulfona con tamaño de poro de 5 MWCO (5 kD) para muestras de más de 6 mL como las que se muestran en la Figura 16 (Merck, 2022a, 2022b).



*Figura 16. Unidades de filtración empleadas en el fraccionamiento de los péptidos bioactivos.*

Se agregaron 3 mL del EPA con una micropipeta (Nichipet EX Plus II;) de (100-1000)  $\mu$ L en la parte superior de las unidades de filtración para centrifugado de 10 kD. Se centrifugó el EPA a 2408 RCF por 15 min en una centrífuga (Frontier <sup>TM</sup> 5707) para separar los péptidos bioactivos en dos fracciones: primera fracción superior con péptidos bioactivos > 10 kD y segunda fracción inferior con péptidos bioactivos < 10 kD. Ambas fracciones se recuperaron por separado en frascos de vidrio y almacenaron en refrigeración a 4°C. De la fracción de péptidos bioactivos < 5 kD se tomaron 3 mL con la micropipeta de 100-1000  $\mu$ L y se agregaron en la parte superior de las unidades de filtración para centrifugado de 5 kD. Se centrifugó la fracción <5 kD a 2408 RCF por 15 min en una centrífuga (Frontier <sup>TM</sup> 5707) para separar los péptidos bioactivos en dos fracciones: primera fracción superior con péptidos bioactivos > 5 kD y segunda fracción inferior con péptidos bioactivos < 5 kD. Se midió el volumen recuperado de las fracciones superiores e inferiores, para después calcular la eficiencia de filtración de cada una de las fracciones recuperadas de acuerdo con la Ecuación 3:

*Ecuación 3. Eficiencia de filtración.*

$$EF (\%) = \frac{\text{Volumen de la fracción superior o inferior (mL)}}{\text{Volumen total (mL)}} (100\%)$$

### **5.2.5 Determinación de la actividad de captación de radicales DPPH· y contenido de proteína de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca**

La evaluación de la actividad antioxidante para cada fracción de péptidos bioactivos se realizó mediante el ensayo de DPPH según Boligon, (2014) con algunas modificaciones. Para ello, se preparó una disolución del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·) 0.1 mM pesando 0.3943 mg y disolviendo en alcohol etílico hasta un volumen final de 25 mL. Se construyó una curva patrón de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), preparada a partir de una solución madre de 0.5 mM, con la que se prepararon diluciones a un volumen final de 1.5 mL con las siguientes concentraciones: (0, 100, 200, 300, 400 y 500)  $\mu$ M. Se hicieron reaccionar en microtubos de centrifuga de 2 mL, 125  $\mu$ L de cada dilución de Trolox correspondiente a la curva patrón con 375  $\mu$ L de alcohol etílico y 1 mL de DPPH 0.1 mM por 30 min en la oscuridad hasta medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV Vis (GENESYS™ 10S, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 515 nm, empleando como blanco alcohol etílico. La curva patrón de Trolox® se empleó para determinar la actividad antioxidante, por triplicado, de las fracciones de péptidos bioactivos > 10 kD, < 10 kD, > 5kD y < 5 kD recuperadas del tratamiento con ultrasonido y del control. Para las fracciones anteriores, a excepción de la fracción < 5 kD recuperada del control, se siguió el mismo procedimiento, que se empleó en la curva patrón, para llevar a cabo la reacción de DPPH·. Para la reacción de DPPH· de la fracción < 5 kD del control, se hicieron reaccionar 65  $\mu$ L del sobrenadante con 435  $\mu$ L de alcohol etílico al 96 % y 1 mL de DPPH· 0.1 mM. De acuerdo con lo anterior, el factor de dilución que se empleó fue de 1.92 en base a la curva patrón de Trolox®. La capacidad antioxidante se expresó en  $\mu$ M Trolox/L.

La reacción de DPPH·, que se lleva a cabo en cada microtubo, con la dilución de Trolox® o la muestra se muestra en la Figura 17. En el método de DPPH·, el radical cromógeno púrpura 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) se reduce mediante compuestos antioxidantes/reductores a la correspondiente hidracina de color amarillo pálido. La actividad de captación de radicales DPPH· se puede estimar al leer la absorbancia del producto final a 515 nm frente a una curva patrón de Trolox® (Boligon, 2014).

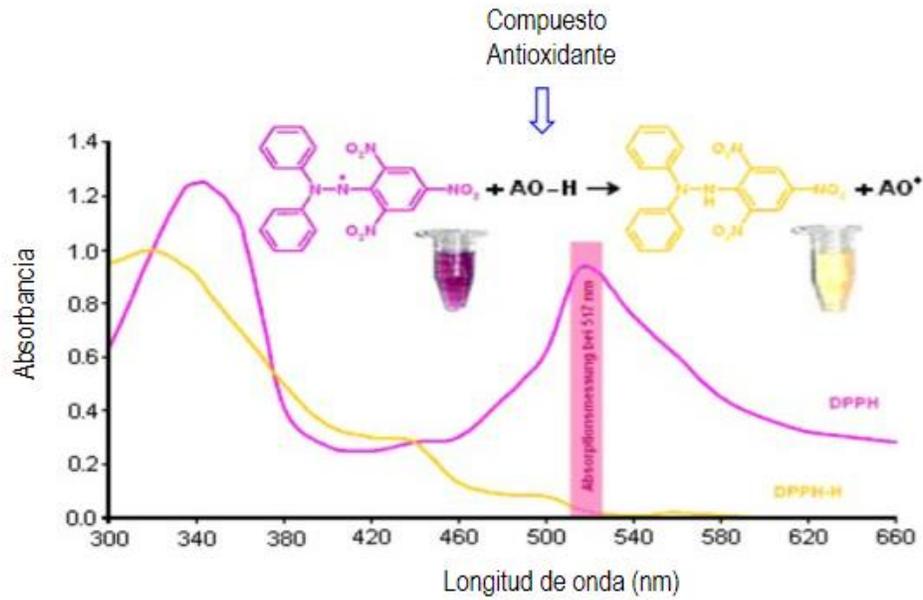
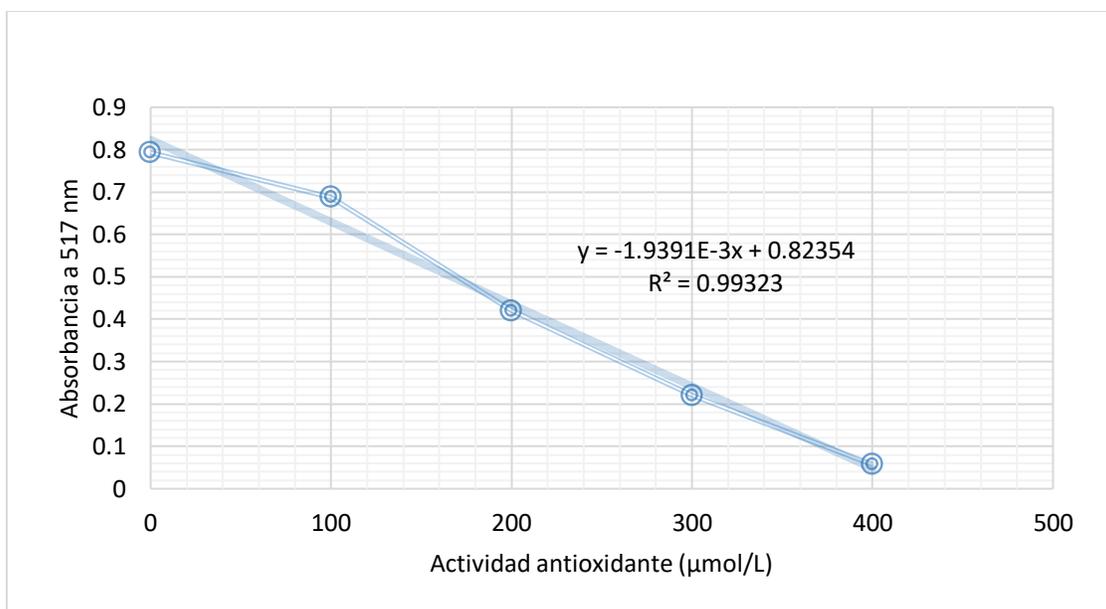


Figura 17. Reacción de DPPH. Adaptada de (Zheng et al., 2015)

La ecuación de la recta de la curva patrón de Trolox®, que determinó el espectrofotómetro, fue  $y = -1.9391 \times 10^{-3}x + 0.82354$  con un índice de correlación de 0.99323. La curva patrón de Trolox® que se empleó para determinar la actividad antioxidante de las fracciones de péptidos bioactivos recuperadas del tratamiento con ultrasonido y del control por medio del método de DPPH· se muestra en la Figura 18.



*Figura 18. Curva patrón de Trolox ®.*

Se determinó el contenido de proteína a cada una de las fracciones peptídicas obtenidas por el tratamiento de ultrasonido y el control según la sección 6.3.2.1.

Se realizaron 5 pruebas T para comparar las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas obtenidas con diferentes tratamientos (ultrasonido y el control) correspondientes a la misma fracción. También, se realizaron dos pruebas de Tukey, una para comparar las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas obtenidas por el tratamiento de ultrasonido y otra para comparar las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas del control. Para comparar las medias del contenido de proteína de las fracciones peptídicas obtenidas con diferentes tratamientos (ultrasonido y el control) pero una misma masa molecular, se realizaron cinco pruebas T. Se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias de las concentraciones de proteína de las fracciones peptídicas obtenidas por el tratamiento de ultrasonido y otra para comparar las medias de las concentraciones de proteína de las fracciones peptídicas del control. El análisis estadístico se realizó empleando el software estadístico Minitab ® 19.

## 5.3 NANO-ENCAPSULACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS DE LA SEMILLA DE YACA EN NLS

### 5.3.1 Estandarización del método de doble emulsión para preparar NLS de péptidos bioactivos

Para determinar en qué proporción se debería de adicionar la manteca de cacao (MC) y la cera de abeja (CA) a la formulación de las NLS, se realizaron pruebas de nano encapsulación empleando péptidos de colágeno hidrolizado BODYBALANCE® (Entera Parallel México S.A. de C.V.). El colágeno hidrolizado es un grupo de péptidos de bajo masa molecular (3 - 6 kD) que se obtienen vía enzimática al hidrolizar materia animal de origen porcino o bovino (López et al., 2019). Se propusieron tres formulaciones diferentes, que se muestran en el Cuadro 12, en las cuales variaba la proporción de MC y CA.

Cuadro 12. Formulaciones para preparar NLS de colágeno hidrolizado.

Ingrediente	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Manteca de cacao	5%	4.75%	4.5%
Cera de abeja	0%	0.25%	0.5%
Lecitina de soya	0.35%	0.35%	0.35%
Tween 80®	1.5%	1.5%	1.5%
Colágeno hidrolizado	0.1%	0.1%	0.1%
Agua destilada	93%	93%	93%

Para preparar NLS de colágeno hidrolizado, se empleó la técnica de doble emulsión asistida con ultrasonido según (Becker Peres et al., 2016) con algunas modificaciones. La CA y MC, en un vaso de precipitados de 10 mL, se fundieron a una temperatura 5 °C por encima de su punto de fusión y se mezclaron con la lecitina de soya. Esta fase lipídica, se mantuvo en calentamiento a la misma temperatura de fusión durante 30 min con la finalidad de eliminar la memoria térmica de la MC y CA. Al mismo tiempo, en un vaso de precipitados de 5 mL, la fracción >5 kD de péptidos bioactivos en solución acuosa se calentó hasta alcanzar una temperatura de 65-70 °C. La solución acuosa de péptidos bioactivos precalentada se dispersó en la fase lipídica fundida bajo

homogenización por ultrasonido, usando un homogeneizador ultrasónico (UP200HT; Helshier; Alemania) con un “sonotrodo” de 7 mm de diámetro, para formar una nano emulsión agua en aceite. Se emplearon dos ciclos de ultrasonido de 2 min on / 2 min off a una potencia de 100 W para generar la ruptura de las gotas de la emulsión por cavitación acústica y la posterior formación de la nano emulsión agua en aceite. Después, la nanoemulsión agua/aceite se dispersó en una solución acuosa de Tween 80®, precalentada a  $\cong 65^{\circ}\text{C}$ , se homogenizó empleando un homogeneizador ultrasónico (UP200HT; Helshier; Alemania) con un “sonotrodo” de 14 mm de diámetro para formar la doble nanoemulsión agua/aceite/agua. Para obtener las NLS, esta doble nanoemulsión se enfrió gradualmente en un baño de agua fría, bajo agitación magnética, hasta alcanzar la temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ).

Finalmente, se caracterizaron las NLS de colágeno hidrolizado que se prepararon de acuerdo con las tres formulaciones: tamaño de partícula, índice de polidispersidad y eficiencia de encapsulación.

### **5.3.1.1 Caracterización de las NLS de colágeno hidrolizado**

#### **5.3.1.1.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad**

El tamaño de partícula de las NLS se determinó mediante la técnica de dispersión de luz láser utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano® ZS90 (Malvern Instruments Ltd, RU) con un ángulo de detección a  $90^{\circ}$  y una longitud de onda de 633 nm. Se realizó una dilución de NLS 1: 20, es decir, 1 mL de la solución de NLS se diluyó en 19 mL de agua destilada. La muestra de NLS diluida se colocó en una celda de plástico para ser medida a temperatura ambiente. Las mediciones fueron realizadas por triplicado.

#### **5.3.1.1.2 Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de encapsulación se calculó empleando la Ecuación 4.

*Ecuación 4. Eficiencia de encapsulación*

$$E = \frac{[\text{contenido de proteína añadido} - \text{CPNEA}]}{[\text{contenido de proteína del colágeno hidrolizado añadido}]} (100\%)$$

El contenido de proteína no encapsulado ajustado (CPNEA) se calcula con la Ecuación 5.

*Ecuación 5. Contenido de proteína no encapsulado ajustado.*

$$CPNEA = \text{contenido de proteína en el sobrenadante de las NLS de colágeno hidrolizado} \\ - \text{contenido de proteína en el sobrenadante de las NLS control}$$

Las NLS control se consideraron a las NLS preparadas sin colágeno hidrolizado. Para cuantificar el contenido de proteína en el sobrenadante, se centrifugaron en tubos de microcentrífuga de 2 mL, 2 mL de la solución coloidal de NLS a 16278 RCF por 60 min y después, con una pipeta de transferencia se recuperó el sobrenadante en otro tubo de microcentrífuga. El contenido de proteína del sobrenadante recuperado se determinó por triplicado por medio del método de Lowry según la sección 6.3.2.1.

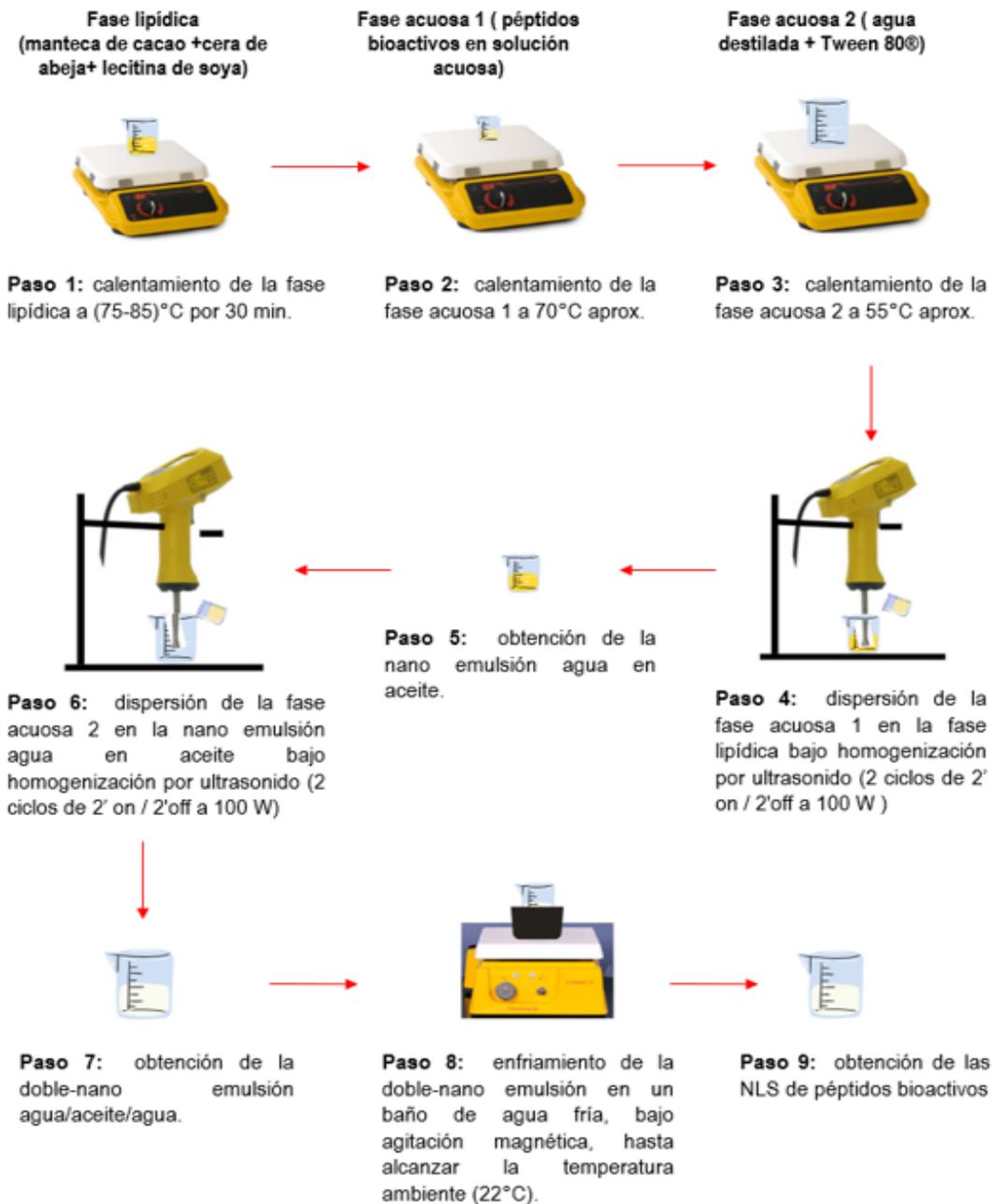
### 5.3.2 Preparación de las NLS de péptidos bioactivos de la semilla de yaca

Las mejores condiciones de preparación de NLS con colágeno hidrolizado fueron utilizados para preparar las NLS con los péptidos bioactivos de semilla de yaca, considerando la mayor eficiencia de encapsulación (40 - 60%), tamaño de partícula  $\leq$  500 nm e índice de polidispersidad  $<$  0.4. En el Cuadro 13 se muestran las condiciones de preparación empleadas.

*Cuadro 13. Formulación de NLS-péptidos de semilla de yaca.*

Ingrediente	Concentración (%)	Para preparar 50 mL de una solución de NLS.
<b>Manteca de cacao</b>	4.5	2.25 g
<b>Cera de abeja</b>	0.5	0.25 g
<b>Lecitina de soya</b>	0.35	0.175 g
<b>Tween 80 ®</b>	1.5	0.75 g
<b>Solución acuosa de péptidos bioactivos &gt; 5kD de la semilla de yaca</b>	0.1	0.5 mL
<b>Agua destilada</b>	93	93 mL

La técnica de doble emulsión asistida por ultrasonido también se empleó para preparar NLS de péptidos bioactivos, al igual que para NLS de colágeno hidrolizado. En la Figura 20 se ilustran los pasos que se siguieron para preparar NLS de péptidos bioactivos de la semilla de yaca. También se prepararon NLS sin péptidos bioactivos siguiendo el mismo método de preparación que las NLS de péptidos bioactivos de la semilla de yaca y la Formulación 3.



*Figura 19. Técnica de doble emulsión-ultrasonido para preparar NLS-péptidos de la semilla de yaca. Elaboración propia.*

### **5.3.3 Caracterización de las NLS con péptidos bioactivos de la semilla de yaca**

#### **5.3.3.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad**

El tamaño de partícula e índice de polidispersidad se determinaron con la misma metodología que para las NLS de colágeno hidrolizado según la sección 6.4.1.1.1. Se empleó un equipo Zeta-sizer ZS90 para medir la muestra diluida 1:20 de NLS en la celda de plástico. Las mediciones fueron realizadas por triplicado para las NLS con péptidos bioactivos de la semilla de yaca y NLS sin péptidos bioactivos de la semilla de yaca. Se realizó una prueba de Tukey con el software Minitab ® para comparar el tamaño de partícula e IP de las NLS con y sin péptidos.

#### **5.3.3.2 Potencial Z**

El PZ de las NLS se determinó mediante electroforesis de partícula empleando el equipo Zeta-sizer Nano ZS90. Para realizar las mediciones se usó una dilución 1:20 de las NLS. Las mediciones fueron realizadas por triplicado. Las mediciones fueron realizadas por triplicado para las NLS con péptidos bioactivos de la semilla de yaca y NLS sin péptidos bioactivos de la semilla de yaca. Se realizó una prueba de Tukey con el software Minitab ® para comparar el PZ de las NLS con y sin péptidos bioactivos de la semilla de yaca.

#### **5.3.3.3 Eficiencia de encapsulación**

La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó empleando las ecuaciones 6 y 7. Al igual que para las NLS de colágeno hidrolizado, según la sección 6.4.1.1.2, se recuperó el sobrenadante después de centrifugar la solución de NLS y se le determinó el contenido de proteína por triplicado por medio del método de Lowry según la sección 6.3.2.1.

#### **5.3.3.4 Determinación de la estabilidad de las NLS**

La estabilidad física de las NLS de péptidos bioactivos de la semilla de yaca fue analizada usando un equipo "Turbiscan Classic". Se diluyó la solución de NLS en una proporción 1:100, es decir, 1 mL de solución de NLS en 99 mL de agua destilada. Después, 5 mL de la dilución de NLS se colocó en una celda cilíndrica de vidrio. La longitud de detección fue de 55 nm, adquiriéndose las mediciones de transmisión y retrodispersión. Las mediciones se realizaron durante 48 h, que corresponden a 2 días.

#### **5.3.3.5 Evaluación de la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca encapsulados en las NLS**

Al sobrenadante recuperado, se le determinó su actividad antioxidante mediante el método de DPPH·. Se empleó la curva patrón de Trolox® construida en la sección 6.3.5. En la reacción de DPPH· se hicieron reaccionar 65 µL del sobrenadante con 435 µL de alcohol etílico al 96 % y 1 mL de DPPH· 0.1 mM. De acuerdo con lo anterior, el factor de dilución que se empleó fue de 1.92 en base a la curva patrón de Trolox®.

Se realizó una prueba T de dos muestras con el software Minitab® para comparar las actividades de captación de radicales DPPH· de los péptidos > 5 kD y < 5kD en las NLS y las fracciones peptídicas > 5 kD y < 5kD (controles).

## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 6.1 Estandarización de las condiciones de obtención de hidrolizados proteicos por el método enzimático con Alcalase<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup>

Se empleó una hidrólisis enzimática secuencial con Alcalase<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> en lugar de emplear una hidrólisis con una sola enzima, ya sea Alcalase<sup>®</sup> o Flavourzyme<sup>®</sup>, porque la combinación de proteasas con diferentes especificidades y mecanismos de acción promueven las actividades funcionales y biológicas de los hidrolizados proteicos, resultando en péptidos bioactivos de diferente tamaño y composición de aminoácidos (Castro & Sato, 2015). Alcalase<sup>®</sup> es una mezcla de endopeptidasas (serin endopeptidasas, 1 subtilisina y 1 metalo endo-proteasa extracelular) que hidrolizan los enlaces peptídicos de las regiones internas de las cadenas polipeptídicas, liberando péptidos de bajo masa molecular mientras que, Flavourzyme<sup>®</sup> es una mezcla de 8 enzimas diferentes (3 endo-peptidasas, 2 aminopeptidasas, 2 di-peptidil peptidasas y 1  $\alpha$ -amilasa), de las cuales 4 son exopeptidasas que hidrolizan la región N-terminal de la cadena polipeptídica liberando di-peptidos de alto masa molecular (Merz et al., 2015). En combinación, las dos enzimas aumentan el GH, lo cual puede atribuirse a la hidrólisis inicial por Alcalase<sup>®</sup> que pre-digiere la proteína y aumenta el número de regiones disponibles N-terminales facilitando de esta manera la hidrólisis de los péptidos por Flavourzyme<sup>®</sup> y la generación de péptidos de bajo masa molecular (Rezvankhah et al., 2021). En general, la hidrólisis con una sola enzima no es tan efectiva para producir una extensa hidrólisis como lo es la hidrólisis enzimática secuencial con diferentes proteasas (Ambigaipalan et al., 2015). Xu et al., (2020) demostraron que la hidrólisis secuencial del aislado de proteína de garbanzo con Alcalase<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> incrementó 50 % el GH en comparación con la hidrólisis con Alcalase<sup>®</sup>.

Determinar las mejores concentraciones de Alcalase<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> considerando el GH fue fundamental para desarrollar una hidrólisis enzimática óptima. En el Cuadro 14, se muestran los resultados obtenidos del diseño experimental, observándose que el mayor GH se obtuvo al emplear una concentración de Alcalase<sup>®</sup> al 8 % enzima/proteína en combinación con Flavourzyme<sup>®</sup> al 6 % enzima/proteína. Por otro lado, el menor GH se obtuvo a una concentración de Alcalase<sup>®</sup> al 4% enzima/proteína y Flavourzyme<sup>®</sup> al 4

% enzima/proteína. Esto se atribuye a que al disminuir la concentración de enzima, hay menos moléculas de enzima disponibles para hidrolizar los enlaces peptídicos, lo que resulta en un menor GH (Pereira et al., 2019).

*Cuadro 14. Grado de hidrólisis (% GH) de los diferentes tratamientos con las enzimas Alcalase y Flavourzyme.*

Alcalase	Flavourzyme	
Concentración de enzima (% enzima/ proteína)		GH (%) n = 3
4	4	27.45 ± 2.21**
	6	29.46 ± 0.68
	8	30.48 ± 0.85
6	4	30.48 ± 0.35
	6	31.21 ± 1.47
	8	30.37 ± 1.13
8	4	29.04 ± 0.52
	6	32.34 ± 1.73*
	8	28.92 ± 1.63

\*mayor GH obtenido; \*\*menor GH obtenido

En el Cuadro 15 se muestran los resultados del análisis de varianza, observándose que la variable de mayor influencia fue la concentración de Flavourzyme® (P < 0.05).

*Cuadro 15. Análisis de Varianza*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	49.42	6.178	3.58	0.012
Lineal	4	29.53	7.382	4.28	0.013
Alcalase**	2	11.14	5.571	3.23	0.063
Flavourzyme*	2	18.39	9.194	5.33	0.015
Interacciones de 2 términos	4	19.89	4.974	2.88	0.052
Alcalase*Flavourzyme**	4	19.89	4.974	2.88	0.052
Error	18	31.05	1.725		
Total	26	80.48			

\* La variable influye en la variable de respuesta

\*\* La variable no influye en la variable de respuesta

El comportamiento de las variables y su influencia se resalta en la Figura 20, correspondiente al diagrama de Pareto para efectos estandarizados, observándose claramente el mayor efecto de la enzima Flavourzyme<sup>®</sup> sobre la hidrólisis enzimática. Esto debido a que la barra B que representó a la concentración de enzima Flavourzyme<sup>®</sup> cruzó la línea de referencia con un valor de 2.101 dada por el efecto estandarizado y, por lo tanto, la enzima Flavourzyme presentó una significancia estadística sobre el GH. El efecto positivo de la concentración de Flavourzyme<sup>®</sup> agregada al final favorece el incremento del GH debido a su doble actividad de endo-peptidasa y exo-peptidasa (di-peptidil peptidasas y aminopeptidasas) (Ozón et al., 2022). Por otro lado, las barras A y AB que representaron a la concentración de enzima Alcalase<sup>®</sup> y la interacción Alcalase<sup>®</sup>-Flavourzyme<sup>®</sup> respectivamente, no cruzaron la línea de referencia y, por lo tanto, no presentaron una significancia estadística sobre el GH.

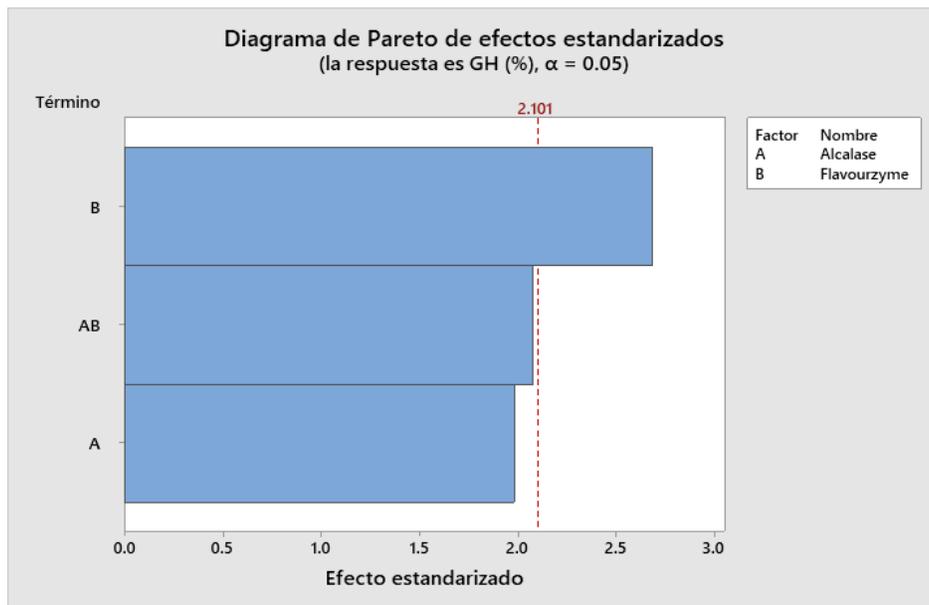


Figura 20. Diagrama de Pareto efecto Alcalase<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup>.

En el Cuadro 16 se muestran los resultados de la predicción de la respuesta de acuerdo con el análisis de deseabilidad llevado a cabo en Minitab® 19, considerando maximizar el GH.

*Cuadro 16. Predicción de respuesta múltiple.*

Variable	Valor de configuración			
Alcalase®	8			
Flavourzyme®	6			
Respuesta	Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
GH (%)	32.344	0.758	(30.751, 33.937)	(29.158, 35.531)

En el Cuadro 17 se muestran los resultados obtenidos para la validación del GH (%) cuando se utilizaron para la hidrólisis 8 % de Alcalase® y 6 % de Flavourzyme® considerando un intervalo de probabilidad en el rango de 29.158 - 35.531. De acuerdo con la validación, los resultados obtenidos quedaron dentro del rango superior con un error promedio mínimo del 0.68 %, lo que implica la reproducibilidad de los resultados.

*Cuadro 17. GH (%) obtenidos en la validación de la optimización de respuesta GH (%) para tres diferentes hidrólisis.*

Hidrólisis	GH (%)
1	35.98 ± 1.62
2	35.99 ± 1.22
3	33.35 ± 0.43

En la Figura 21 se muestra la gráfica de deseabilidad observándose el valor de deseabilidad de 0.7868 cercano a 1, considerándose aceptable.

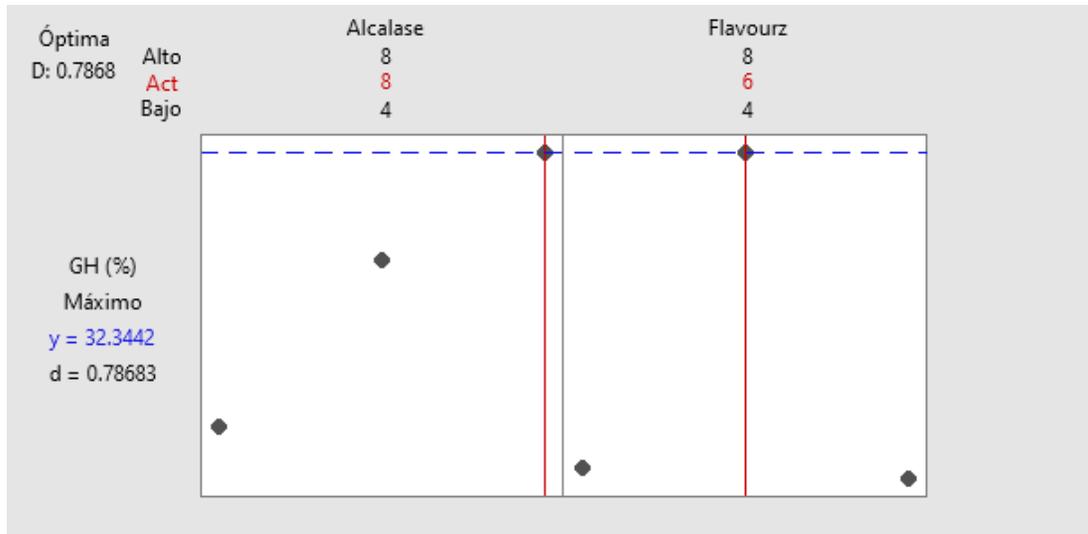


Figura 21. Grafica de deseabilidad.

Después de realizado el análisis de varianza para los resultados de la validación del método, se realizó una prueba de Tukey para diferenciación de medias, no encontrándose diferencia entre los resultados obtenidos. Lo que lleva a confirmar que las concentraciones de enzima utilizadas fueron reproducibles en relación con el GH. Estos resultados demostraron la importancia de determinar la mejor combinación de enzimas Alcalase® y Flavourzyme® para maximizar el GH.

Cuadro 18. Resultados de la prueba de Tukey.

Hidrolizado	N	Media	Agrupación
2	3	35.986	A**
1	3	35.977	A**
3	3	33.348	A**

\*\* Si las medias comparten la misma letra son significativamente iguales.

En la Figura 22, se muestran las diferencias de las medias para el GH según el gráfico de Tukey. Como los intervalos 2-1, 3-1 y 3-2 contienen a cero entonces, las medias de los hidrolizados 1, 2 y 3 se consideraron iguales.

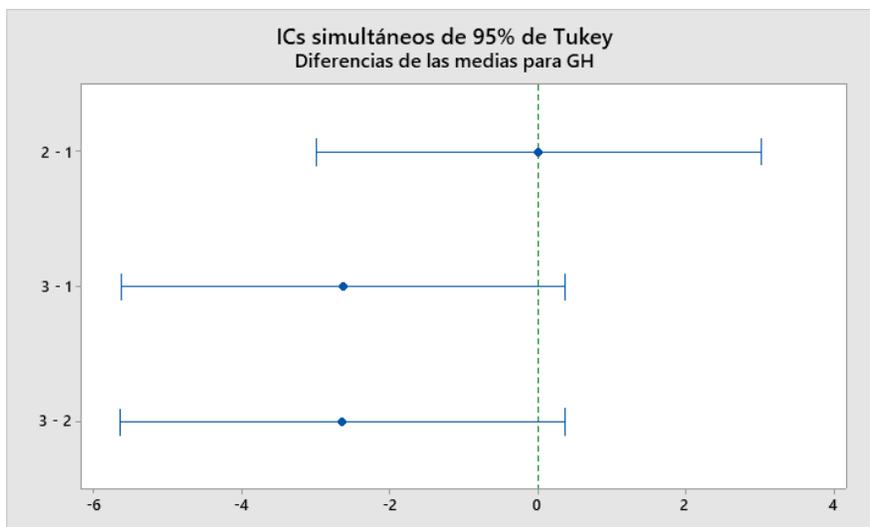


Figura 22. Gráfico de Tukey

## 6.2 Selección del mejor tratamiento de ultrasonido con base a las velocidades de hidrólisis a Alcalase® y Flavourzyme® y el GH

La tolerancia de una enzima al ultrasonido depende de las propiedades fisiológicas de la enzima, así como de los parámetros operativos del ultrasonido, como la potencia/intensidad, frecuencia del ultrasonido, y los ciclos de trabajo que afectan directamente la actividad catalítica de la enzima (Nadar & Rathod, 2017; Rokhina et al., 2009). Razón por la que fue necesario explorar el comportamiento de las enzimas utilizadas al someterlas a pulsos de ultrasonido considerando incrementar la velocidad de inicial de reacción ( $V_i$ ) y el GH al final del tratamiento. Como se mencionó, se realizaron tres hidrólisis enzimáticas secuenciales, empleando una concentración de 8 % Alcalase y 6 % Flavourzyme, una de ellas asistida con el T1U (3 pulsos de 60 s on / 60 s off durante cada periodo de 5 min), otra asistida con el T2U (5 pulsos de 40 s on / 20 s off durante cada periodo de 5 min) y un control sin tratamiento de ultrasonido. En las Figuras 23 y 24 se muestran los resultados de las cinéticas enzimáticas en relación con el GH para los tratamientos T1U y T2U, mientras que en la Figura 25 se muestra la cinética enzimática de la hidrólisis control, de tal manera que el comportamiento cinético sigue las mismas tendencias, es decir, el GH aumentó con respecto al tiempo.

En el caso del control, el valor de GH asociado a la primera etapa fue de  $22.89 \pm 0.15$  % aumentando a  $30.77 \pm 0.46$  % asociado a la segunda etapa. Por otro lado, el valor de

GH asociado a la primera etapa de la hidrólisis asistida con el T1U fue de  $25.54 \pm 12.79$  % aumentando notablemente al  $36.32 \pm 1.64$  % para la segunda etapa. Lo mismo sucedió para la hidrólisis asistida T2U, que paso de un valor de GH de  $32.70 \pm 0.12$  % asociado a la primera etapa, a  $40.39 \pm 2.82$  % para la segunda etapa de la hidrólisis. Esta fuerte alteración en el valor de GH puede atribuirse en parte a la acción de Flavourzyme<sup>®</sup> que hidrolizó efectivamente los péptidos resultantes de la hidrólisis por Alcalase<sup>®</sup> y a su doble actividad de endo-peptidasa y exo-peptidasa, lo cual facilitó la segunda etapa de hidrólisis y favoreció el GH (Justus et al., 2019; Kou et al., 2013). Por otro lado, al comparar los GH asociados a la primera y segunda etapa del control con los GH asociados a la primera y segunda etapa del T1U y T2U, se encontró que, el T1U y T2U presentaron mayores GH asociados a la primera y segunda etapa en comparación con los GH de las etapas del control. Este aumento en los GH se debió principalmente a los efectos mecánicos, cavitacionales y térmicos del tratamiento de ultrasonido que promovieron la hidrólisis de las proteínas (Kadam et al., 2015).

En el caso de las curvas de hidrólisis del T1U y T2U: en la primera etapa, el GH aumentó por la acción de la enzima Alcalase<sup>®</sup> y la aplicación del tratamiento de ultrasonido, después del ultrasonido con Alcalase<sup>®</sup> y Flavourzyme<sup>®</sup> (tiempo =75 min) el GH disminuyó lo cual en parte se debió a la pérdida de actividad de la enzima Alcalase<sup>®</sup> por la potencia ultrasónica empleada de 50 W y el tiempo total de exposición de ultrasonido el cual fue de 720s y 800s para el T1U y T2U, respectivamente. Ma et al. (2011) encontró que cuando la potencia ultrasónica superaba los 80 W y el tiempo total de ultrasonido era mayor a 240s, la actividad de Alcalase<sup>®</sup> disminuía gradualmente debido a la presión excesiva, temperatura y fuerzas de cizallamiento generadas por el tratamiento de ultrasonido y también a la generación de radicales libres a partir de la sonólisis del agua que daban paso a cambios en la estructura de la enzima afectando la actividad enzimática. En otro estudio, Yin et al., (2022) encontraron que, al emplear una frecuencia ultrasónica de  $40 \pm 2$  kHz y un tiempo de ultrasonido mayor a 900 s, la actividad de la enzima Alcalase<sup>®</sup> disminuía, lo cual atribuyeron a cambios en la estructura terciaria y secundaria de la enzima que afectaban la actividad enzimática. Por otro lado, también se ha reportado que la pérdida de la actividad de Alcalase<sup>®</sup> se debe a la saturación del medio por los productos de la hidrólisis, los cuales inhiben competitivamente a la enzima

(Apar & Özbek, 2010; Sousa et al., 2004). Tardioli et al., (2005) encontraron que la actividad hidrolítica de Alcalase® disminuía cuando el número de productos de la hidrólisis aumentaba, dado que estos productos actuaban como inhibidores competitivos de la enzima Alcalase® al unirse al sitio activo de la enzima impidiendo la unión enzima-sustrato.

Finalmente, en la segunda etapa de la hidrólisis, a partir del tiempo  $t = 80$  min, el GH aumentó nuevamente con el tiempo hasta que se terminó la hidrólisis, lo cual se atribuyó a la hidrólisis de los productos de Alcalase® catalizada por Flavourzyme® y al tratamiento de ultrasonido que promovió la actividad de Flavourzyme® (Vioque et al., 2001).

En la cinética del control (GH vs. tiempo) no se detectó ninguna disminución en el GH ya que no se empleó un tratamiento de ultrasonido que afectara la actividad de la enzima Alcalase®. Tanto en la primera como segunda etapa, el GH aumentó solamente por la acción de las enzimas Alcalase® y Flavourzyme®, respectivamente.

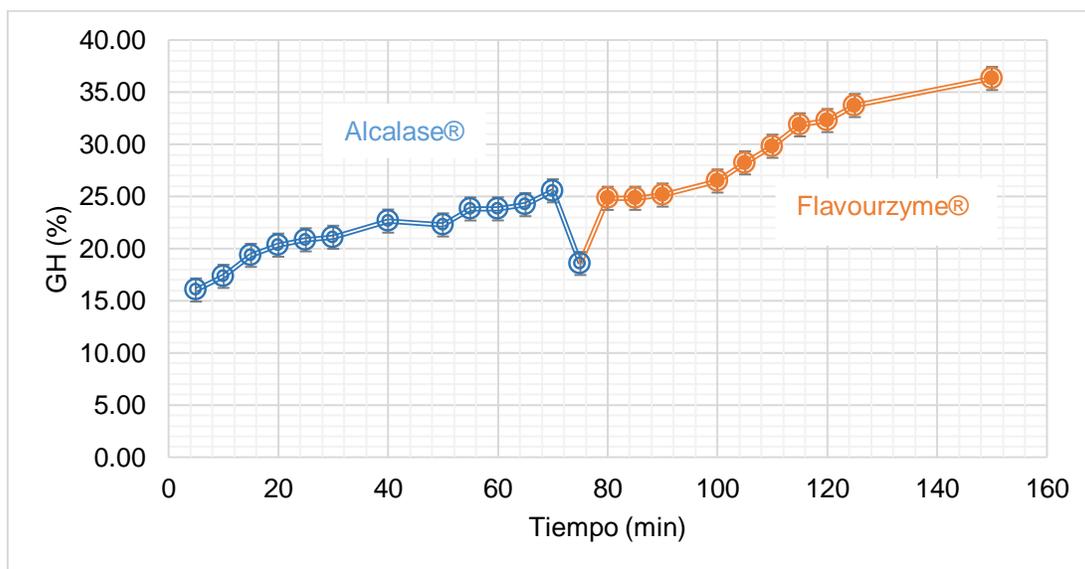


Figura 23. Cinética en relación con el GH para el T1U.

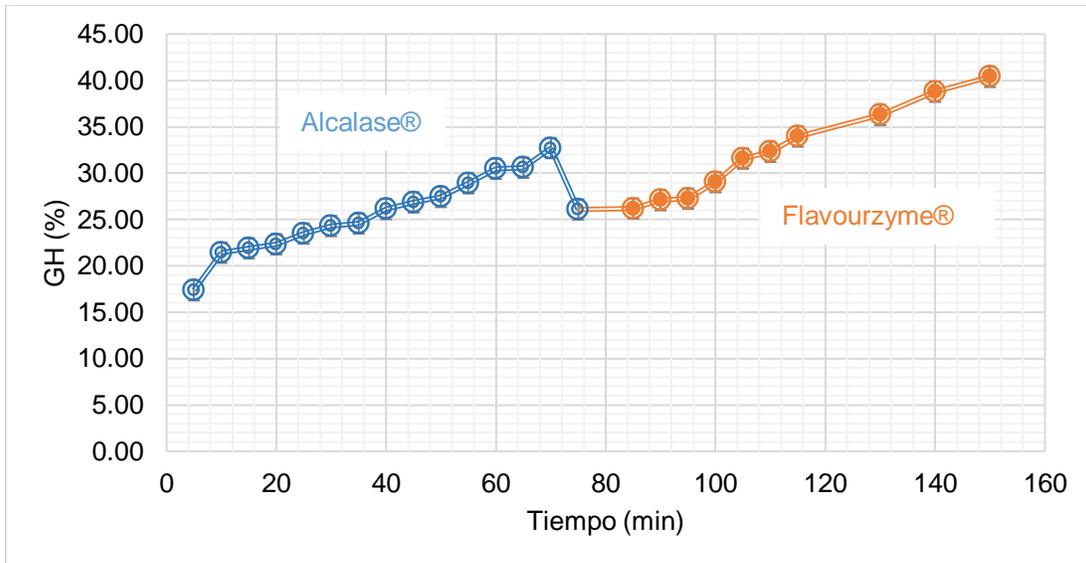


Figura 24. Cinética en relación con el GH para el T2U.

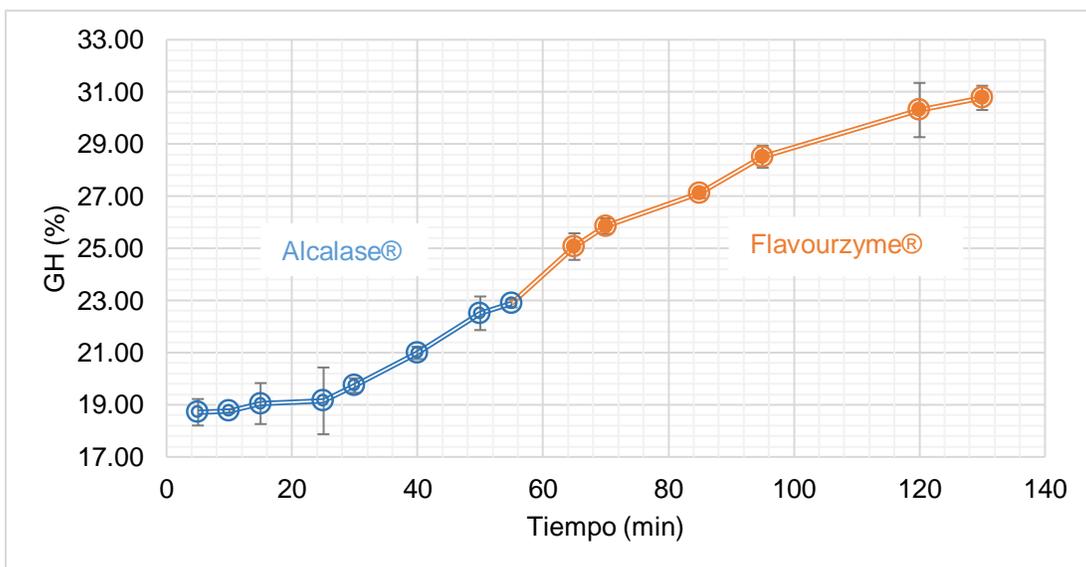


Figura 25. Cinética en relación con el GH para el control.

En las Figuras 26 a 31 se muestran los cambios en la velocidad inicial de reacción ( $V_i$ ) de Alcalase® y Flavourzyme®, que se obtuvieron a partir de las pendientes de las ecuaciones de las rectas de las gráficas de las cinéticas de estas enzimas en relación con el contenido de proteína, en función a cada experimento y que se considerarán en comparación con el tratamiento control. Se observa en las gráficas de contenido de

proteína vs. tiempo que la concentración de proteína en el medio aumentó con el tiempo debido a la generación de péptidos durante la hidrólisis de las proteínas catalizada por las enzimas Alcalase® y Flavourzyme®.

De acuerdo con las Figuras 26 y 27 las pendientes de las rectas tienen un valor de  $10.81 \pm 0.86 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$  y  $18.12 \pm 2.04 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$  los cuales, corresponde a las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® respectivamente, empleado el T1U durante la hidrólisis enzimática. Las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® del T1U se consideraron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) ya que la  $V_i$  de Alcalase® fue menor que la  $V_i$  de Flavourzyme lo cual se atribuyó a la capacidad de Flavourzyme® de actuar como endo-peptidasa y exo-peptidasa lo cual favorece la hidrólisis de las proteínas pre-hidrolizadas por Alcalase® y, en consecuencia, la  $V_i$  aumentó.

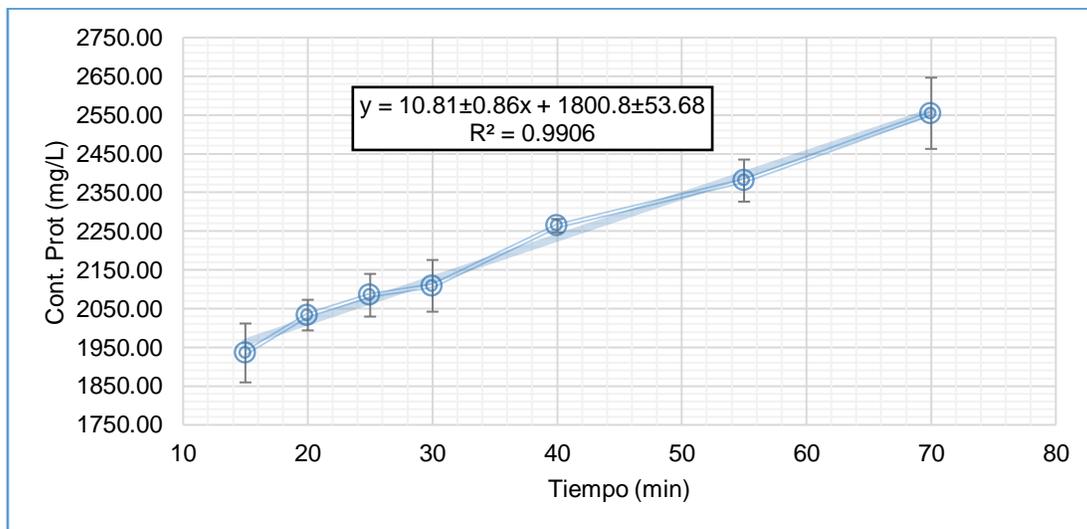


Figura 26. Cinética de Alcalase® para el T1U.

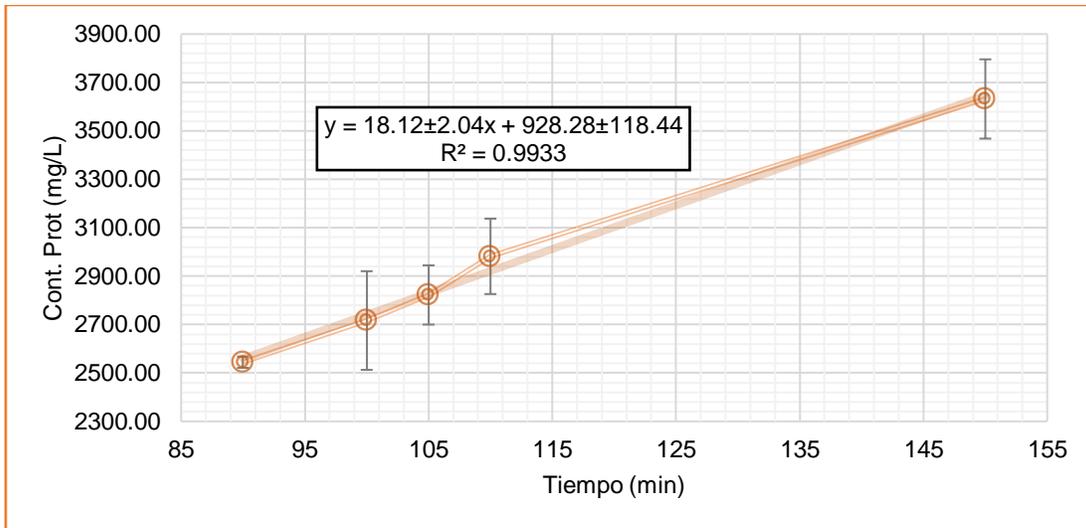


Figura 27. Cinética de Flavourzyme® para el T1U.

En las Figuras 28 y 29 se observa que las pendientes de las rectas tienen un valor de  $19.27 \pm 1.32 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$  y  $22.99 \pm 2.56 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$  los cuales, corresponde a la  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® respectivamente, empleado el T2U durante la hidrólisis enzimática. Las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® del T1U se consideraron estadísticamente iguales ( $P > 0.05$ ) lo cual se debió al tiempo de exposición de Alcalase® al ultrasonido empleando el T2U que promovió su  $V_i$ .

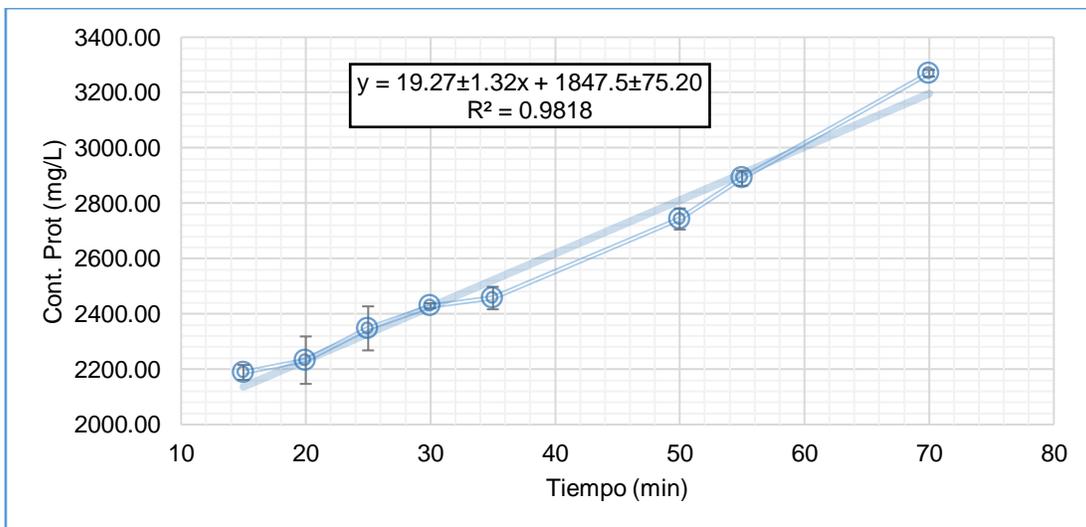


Figura 28. Cinética de Alcalase® para el T2U.

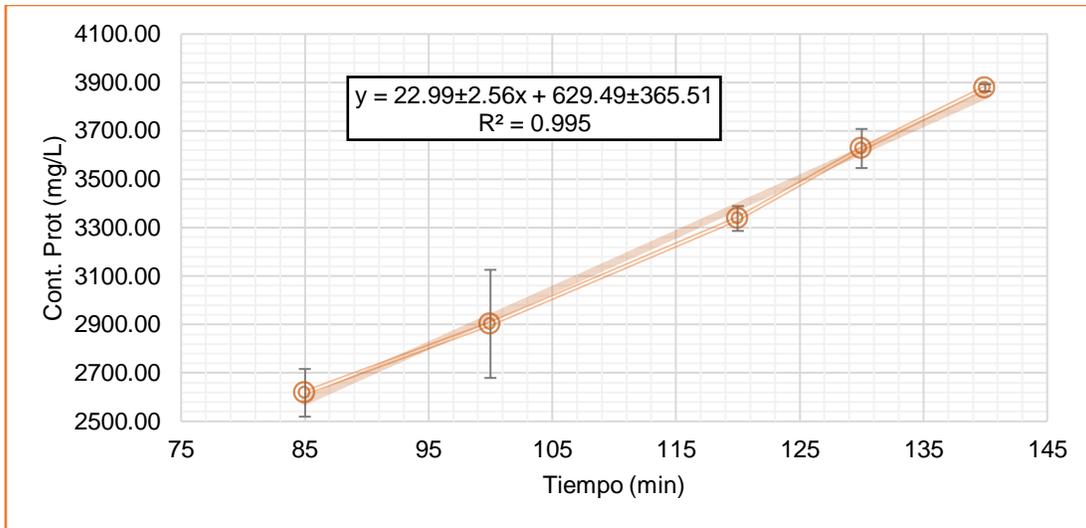


Figura 29. Cinética de Flavourzyme® para el T2U.

En las Figuras 30 y 31 se muestran las pendientes de las rectas con un valor de  $9.56 \pm 0.13 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$  y  $8.16 \pm 0.87 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$ , los cuales, corresponde a la  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® respectivamente, empleado un control que no empleó un tratamiento de ultrasonido durante la hidrólisis enzimática. Las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® del T1U se consideraron estadísticamente iguales ( $P > 0.05$ ).

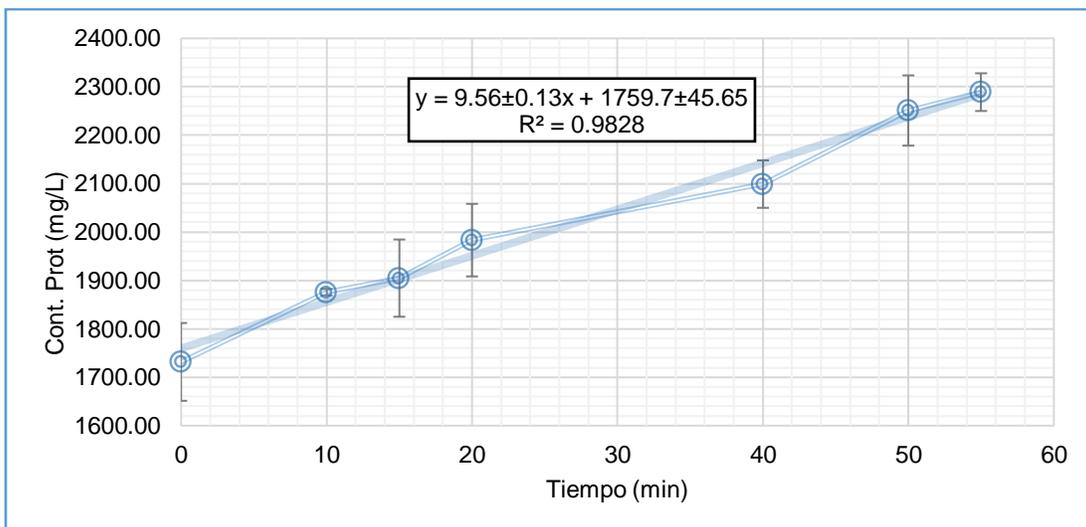
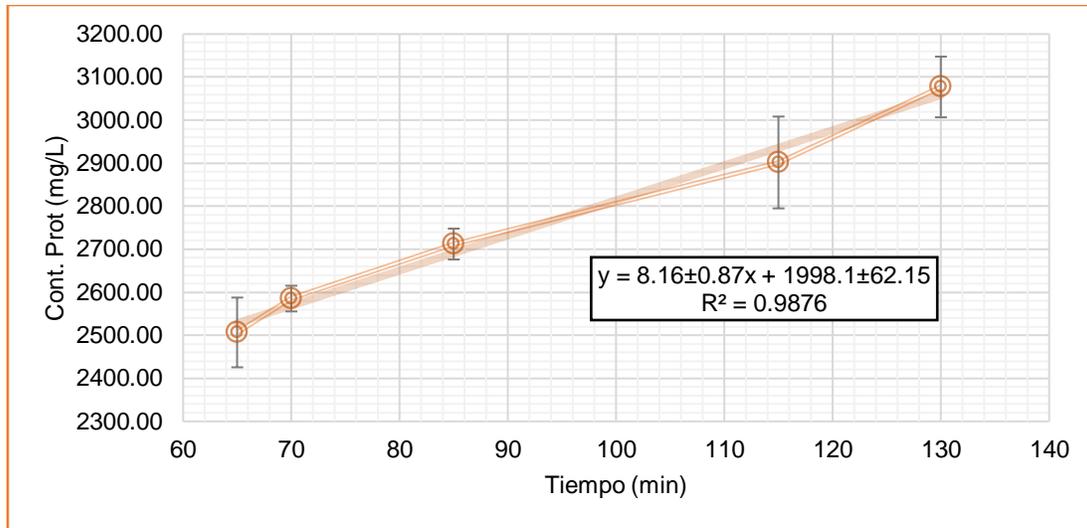


Figura 30. Cinética de Alcalase® para el control.



*Figura 31. Cinética de Flavourzyme® para el control.*

En el Cuadro 19 se presentan las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® y el GH final para el T1U, T2U y el control. En esta se observa que, en el T1U, no existió diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $P > 0.05$ ) con un incremento de apenas  $27.62 \pm 15.98\%$ , mientras en el T2U, la diferencia inicial con Alcalase® fue estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) con un incremento del  $116.27 \pm 11.46 \%$  con respecto al control para la primera etapa. En el Cuadro 19, también se evidencia que en la segunda etapa existió diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) cuando se utiliza Flavourzyme®, observándose que  $V_i$  en la segunda etapa para los T2U y T1U se incrementó considerablemente con respecto al control. La  $V_i$  de Flavourzyme® para el T1U y T2U incrementó  $125.40 \pm 48.63 \%$  y  $183.37 \pm 35.43 \%$  respectivamente, en comparación con el control.

Cuadro 19. Velocidades de hidrólisis y GH finales para el tratamiento 1 y 2 de ultrasonido, y el control.

	Tratamiento 1 de ultrasonido (T1U)	Tratamiento 2 de ultrasonido (T2U)	Control
<b>Velocidad inicial de reacción (<math>V_i</math>) de Alcalase® (mg/L · min)</b>	10.81 ± 0.86	19.26 ± 1.32	9.56 ± 0.13
<b>Incremento (%)</b>	27.62 ± 15.98	116.27 ± 11.46	
<b>Velocidad inicial de reacción (<math>V_i</math>) de Flavourzyme® (mg/L · min)</b>	18.12 ± 2.04	22.99 ± 2.56	8.16 ± 0.87
<b>Incremento (%)</b>	125.40 ± 48.63	183.37 ± 35.43	
<b>GH final (%)</b>	36.32 ± 1.64	40.39 ± 2.82	30.77 ± 0.70
<b>Incremento (%)</b>	18.12 ± 7.20	31.18 ± 6.46	

El incremento de las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® con los tratamientos de ultrasonido se atribuyó a la generación de efectos mecánicos y cavitacionales por el ultrasonido. Durante la cavitación, las microburbujas liberan energía al colapsar por su aumento de tamaño o implosionar durante la compresión de las ondas ultrasónicas. Esta energía liberada produce ondas de choque que se propagan, fuerzas de cizallamiento y fuertes turbulencias en el medio que mejoran la transferencia de calor y masa. El aumento del transporte de masas es el principal responsable de que el movimiento de las moléculas de sustrato y enzima en el medio, las interacciones enzima-sustrato y el acceso del sustrato al sitio activo aumenten, ocasionando que la  $V_i$  también aumente. Además, estos efectos cavitacionales y mecánicos reducen el tamaño de partícula de la proteína lo cual, también facilita la interacción enzima-sustrato y promueve la hidrólisis enzimática y  $V_i$  (Jian et al., 2008; Su & Cavaco-Paulo, 2021; Wang et al., 2018).

Al comparar las  $V_i$  de Alcalase® y Flavourzyme® obtenidas por el T1U y T2U encontramos que, el T2U proporcionó un mayor incremento de la  $V_i$  de Alcalase®. De acuerdo con esto, la  $V_i$  de Alcalase® del T2U (19.26 ± 1.32 mg/L · min) fue mayor que la  $V_i$  de Alcalase®

del T1U ( $10.81 \pm 0.86$  mg/L · min). Por otro lado, el T2U también proporcionó un mayor incremento de la  $V_i$  de Flavourzyme®. Es decir, la  $V_i$  de Flavourzyme® para T2U ( $22.99 \pm 2.56$  mg/L · min) es mayor que la  $V_i$  de Alcalase® para T1U ( $18.12 \pm 2.04$  mg/L · min). El mayor incremento de  $V_i$  de Flavourzyme® y Alcalase® para el T2U se debe al mayor tiempo de exposición de ultrasonido con este tratamiento. El tiempo total de exposición de ultrasonido para el T2U fue de 800 s mientras que, para el T1U fue de 720 s. Según Delgado-Povedano & Luque de Castro (2015) entre mayor sea el tiempo de exposición de ultrasonido, mayor será la formación e implosión de burbujas que promoverá el transporte de masas y por lo tanto, aumentarán la hidrólisis de las proteína y la  $V_i$ . Sin embargo, esto se cumple siempre y cuando el tiempo de ultrasonido no sea excesivo, de tal manera que no afecte negativamente la actividad de la enzima.

Al igual que las  $V_i$ , los GH finales de las hidrólisis asistidas con ultrasonido fueron mayores que el GH del control, lo cual se debió también, al tratamiento de ultrasonido que promovió la hidrólisis de las proteínas al incrementar la interacción enzima-sustrato que genero un mayor número de péptidos hidrolizados. Resultados similares se han reportado por Jian et al., (2008); Liang et al., (2017); y Ren et al., (2014) en los cuales, el GH aumento al aplicar un tratamiento de ultrasonido durante la hidrólisis enzimática. Adicionalmente, el mayor incremento en el GH final se obtuvo con el T2U ( $31.18 \pm 6.46$  %) el cual también presentó las  $V_i$  de Alcalase y Flavourzyme mayores en comparación con el T1U. Lo anterior fue congruente, ya que entre mayor sea el porcentaje del número de enlaces peptídicos hidrolizados o GH, mayor será el número de péptidos hidrolizados y mayor, la concentración de péptidos hidrolizados por minuto ( $V_i$ ) (Baharuddin et al., 2016; Wang et al., 2016).

Para validar el T2U y confirmar su repetibilidad fue necesario determinar por triplicado el GH de tres diferentes hidrólisis enzimáticas asistidas por T2U. En el Cuadro 20 se muestran los resultados que se obtuvieron en esta validación del método.

Cuadro 20. GH (%) obtenidos en la validación del T2U.

Hidrólisis	GH (%)	% error
1	43.24 ± 0.98	6.59
2	39.05 ± 3.29	3.44
3	42.47 ± 0.99	4.91

De acuerdo con los porcentajes de error, los tres GH son aceptables y cercanos al GH final de T2U mostrado en el Cuadro 19, por lo que podemos decir que el T2U es válido y repetible. Al realizar la prueba de Tukey con un 95% de confianza, se encontró que las medias del GH de los hidrolizados 1, 2 y 3 fueron iguales. Los resultados de la prueba de Tukey se muestran en el Cuadro 31.

Cuadro 21. Resultados de la prueba de Tukey.

Hidrolizado	N	Media	Agrupación
1	3	43.240	A**
3	3	42.474	A**
2	3	39.05	A**

\*\* Las medias comparten la misma letra son significativamente iguales.

En la Figura 32, se muestran las diferencias de las medias para el GH según el gráfico de Tukey. Como los intervalos 2-1, 3-1 y 3-2 contienen a cero, entonces las medias de los hidrolizados 1, 2 y 3 se consideraron iguales.

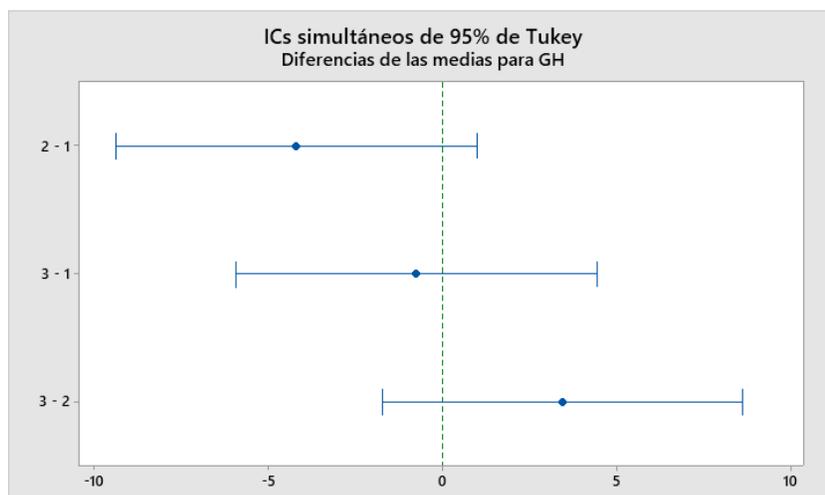


Figura 32. Gráfico de Tukey

### 6.3 Fraccionamiento de los péptidos bioactivos

En el Cuadro 22, se muestran los resultados de eficiencia de filtración (EF) en porcentaje para el fraccionamiento de los péptidos bioactivos recuperados de la hidrólisis asistida por el T2U comparada con el control. Se obtuvieron 4 fracciones diferentes (> 10 kD, < 10kD, > 5kD y < 5kD) al emplear dos tipos de unidades de filtración para centrifugado, con tamaño de poro de 5kD y 10 kD.

*Cuadro 22. Eficiencias de filtración (%) de cada una de las fracciones peptídicas.*

Fracción peptídica	T2U	Control
<b>&gt; 10 kD</b>	65.53 ± 4.00	66.40 ± 10.06
<b>&lt; 10 kD</b>	34.47 ± 4.00	33.60 ± 10.06
<b>&gt; 5 kD</b>	91.13 ± 3.08	92.85 ± 2.34
<b>&lt; 5 kD</b>	8.87 ± 3.08	7.15 ± 2.34

En la Figura 33 se muestran las EF de las fracciones <10 y <5 kD del T2U que fueron mayores al control y las EF de las fracciones >10 y >5 kD del T2U, fueron menores al control, lo que implica que se recuperó un mayor número de péptidos correspondientes a las fracciones de una masa molecular <10 y <5 kD. La producción de péptidos de bajo masa molecular se facilitó por el tratamiento de ultrasonido y la hidrólisis secuencial con Alcalase® y Flavourzyme®. Por un lado, el empleo de Alcalase® en la primera parte de la hidrólisis secuencial genera péptidos de alta masa molecular, los cuales sirven de sustrato a Flavourzyme® en la segunda etapa de la hidrólisis, que por su doble actividad (endo- y exo-peptidasa) genera péptidos de masa molecular baja. Por otro lado, el tratamiento de ultrasonido durante la hidrólisis enzimática promueve la interacción enzima-sustrato y, en consecuencia la hidrólisis de la proteína, lo cual facilita la producción de péptidos de baja masa molecular (Kadam et al., 2015; Ramírez Fuentes et al., 2021). Además, como el T2U presentó un GH final más grande que el control se esperaba que se obtuvieran más péptidos de menor masa molecular en comparación con el control (Abeynayake et al., 2022).

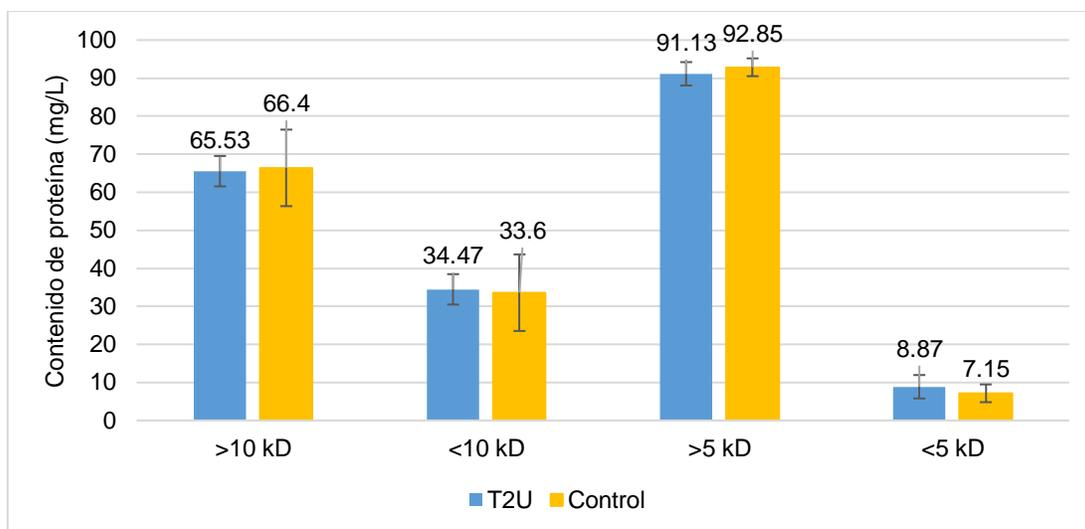


Figura 33. Eficiencias de filtración de las fracciones peptídicas.

#### 6.4 Efecto del tratamiento de ultrasonido en la actividad de captación de radicales DPPH<sup>•</sup> de las fracciones peptídicas

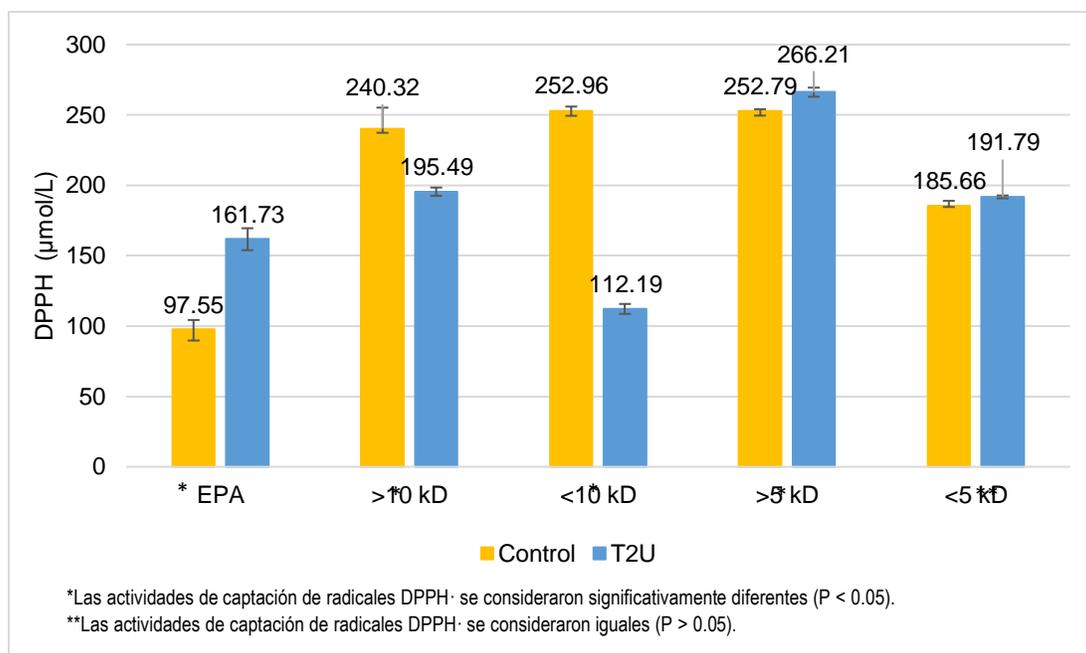
Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad antioxidante de cada una de las fracciones de péptidos bioactivos obtenidas se muestran en el Cuadro 23, observándose que la fracción > 5 kD del T2U tuvo la mayor actividad de captación de radicales DPPH<sup>•</sup>, de igual forma la EPA del T2U mostró un incremento significativo en la capacidad para captar radicales DPPH<sup>•</sup> en comparación con las fracciones del control. Sin embargo, las fracciones < 10 kD y >10kD mostraron una mayor actividad de capacidad de captación de radicales DPPH<sup>•</sup> en las muestras control.

Cuadro 23. Actividad de captación de radicales DPPH<sup>•</sup> de cada una de las fracciones peptídicas.

Fracción peptídica	DPPH <sup>•</sup> (μmol/L)		%incremento
	T2U	Control	
EPA	161.73 ± 7.81*	97.55 ± 6.79	66.34 ± 14.47
> 10 kD	195.49 ± 2.97	240.32 ± 14.92	--
< 10 kD	112.19 ± 3.55	252.96 ± 3.03	--
> 5 kD	266.21 ± 3.23*	252.79 ± 1.31	5.31 ± 1.68
< 5 kD	191.79 ± 1.04	185.66 ± 3.35	--

\*Presentó un incremento significativo (P < 0.05) en la actividad de captación de radicales DPPH<sup>•</sup> en comparación con el control.

En la Figura 34, se representan gráficamente las variaciones en la actividad antioxidante para la misma fracción en relación con el tratamiento realizado para obtenerlas.

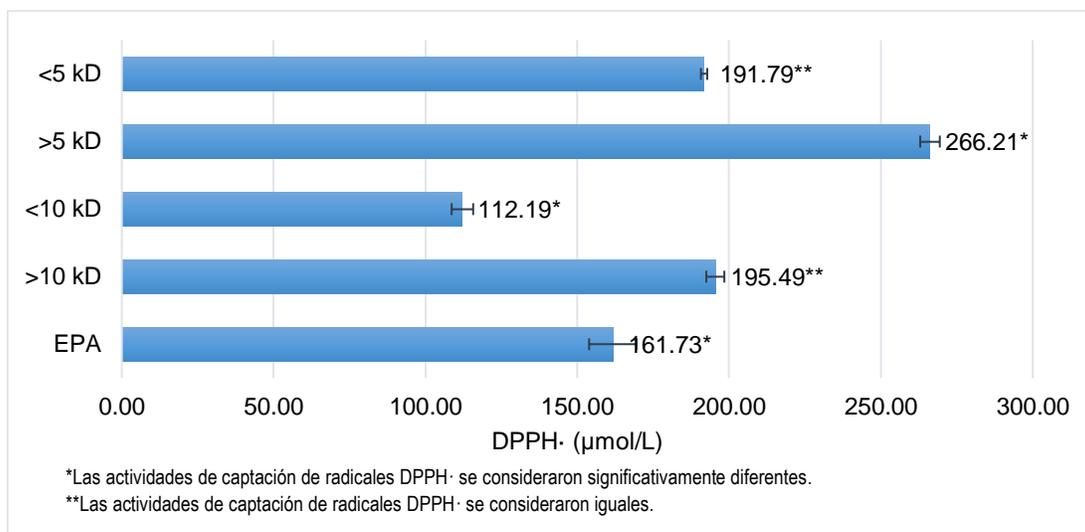


*Figura 34. Comparación de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U y el control en base a la actividad de captación de radicales DPPH·.*

Se realizó una prueba T de dos muestras para comparar las actividades de captación de radicales DPPH· de una misma fracción peptídica o EPA y diferente tratamiento (control y T2U). Se encontró que para el EPA ambas actividades antioxidantes fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mejor captación de radicales la presentó el T2U ( $161.73 \pm 7.81 \mu\text{mol/L}$ ). Las actividades antioxidantes de la fracción  $> 10 \text{ kD}$  para el control y el T2U fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mejor captación de radicales la presentó el control ( $240.32 \pm 14.92 \mu\text{mol/L}$ ). En el caso de la fracción  $<10 \text{ kD}$ , la actividad antioxidante de esta fracción para el control y el T2U fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mejor captación de radicales DPPH· la presentó el control ( $252.96 \pm 3.03 \mu\text{mol/L}$ ). Las actividades antioxidantes de la fracción  $> 5 \text{ kD}$  para el control y el T2U fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mejor captación de radicales la presentó el T2U ( $266.21 \pm 3.23 \mu\text{mol/L}$ ). Mientras que, las actividades antioxidantes de la fracción  $<5 \text{ kD}$  para el control y el T2U se consideraron

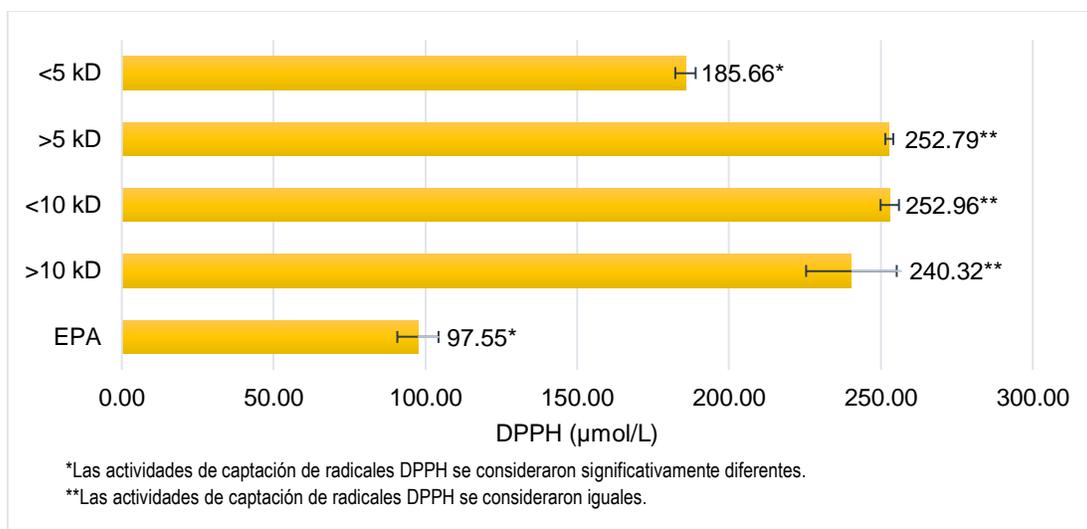
iguales ( $P > 0.05$ ) y sus valores fueron  $185.66 \pm 3.35 \mu\text{mol/L}$  para el control y  $191.79 \pm 1.04 \mu\text{mol/L}$  para el T2U. Con base en estas diferencias, podemos decir que el T2U incrementó significativamente la actividad de captación de radicales DPPH del EPA un  $66.34 \pm 14.47 \%$  y de la fracción peptídica  $> 5\text{kD}$  un  $5.31 \pm 1.68 \%$ . Este incremento se debió a los fenómenos de cavitación y físicos del ultrasonido que favoreció la interacción enzima-sustrato generando un mayor número de péptidos capaces de captar radicales DPPH. También, es posible que la fuerza de cizallamiento y los radicales libres generados durante la cavitación provocaran cambios físicos y químicos en la proteína de semilla de yaca (ruptura de interacciones hidrofóbicas y desdoble de la proteína), que expusieron más grupos hidrofóbicos y aminoácidos aromáticos fuera de la proteína, lo cual mejoró la capacidad de captación de radicales DPPH (Wen et al., 2019; Yang et al., 2017). Por otro lado, el T2U no incrementó la actividad de captación de radicales DPPH de las fracciones  $> 10\text{kD}$ ,  $< 10\text{kD}$  y  $< 5\text{kD}$ , ya que las actividades de captación de radicales DPPH de la fracción  $< 5\text{kD}$  para el control y el T2U se consideraron iguales y, las fracciones  $> 10\text{kD}$  y  $< 10\text{kD}$  del control presentaron una mayor actividad de captación de radicales DPPH en comparación con las fracciones de una misma masa molecular. Entonces, podemos decir que la actividad de captación de radicales DPPH asociada a las fracciones  $> 10\text{kD}$ ,  $< 10\text{kD}$  y  $< 5\text{kD}$  del control se debió solamente a la aplicación de diferentes proteasas como Alcalase® y Flavourzyme®. La diferente especificidad de estas enzimas por sus sustratos y sus mecanismos de acción de endo- y exo-peptidasas ocasionaron que se generaran péptidos de diferente actividad antioxidante. Alcalase® tiene una alta especificidad de hidrólisis en los enlaces peptídicos con aminoácidos que contienen residuos aromáticos (Trp, Phe y Tyr), ácidos (Glu), con sulfuro -S- (Met), alifáticos (Leu, Ala), con un grupo hidroxilo -OH (Ser) y básicos (Lys) (Doucet et al., 2003). Por otro lado, Flavourzyme® hidroliza el enlace peptídico del residuo C terminal entre los aminoácidos hidrofóbicos Leu y Pro o Pro y Pro (Wang et al., 2021). En tal caso, es posible que las fracciones  $> 10\text{kD}$  y  $< 10\text{kD}$  del control contuvieran péptidos con una mayor proporción de aminoácidos hidrofóbicos, aromáticos o con grupos -SH que favorecieron la actividad antioxidante (Magalhães et al., 2022).

La variación de la actividad antioxidante con la masa molecular de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U y el control se pueden observar en las Figuras 35 y 36, respectivamente. Se observa en la Figura 35 que las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas para el T2U siguieron el comportamiento: menor a 10 kD < EPA < menor a 5 kD = mayor a 10 kD < mayor a 5 kD. La fracción >5 kD fue la que presentó la mayor actividad de captación de radicales DPPH·.



*Figura 35. Actividad de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U.*

En la Figura 36 se aprecia que las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas para el control siguieron el orden: EPA < menor que 5 kD < mayor a 10 kD = mayor a 5 kD = menor a 10 kD. Siendo las fracciones > 10 kD, > 5 kD y < 10 kD las que presentaron la mayor captación de radicales DPPH·.



*Figura 36. Actividad de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas del control.*

Se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas del control y del T2U. Los Cuadros 24 y 25 muestran estos resultados para el T2U y el control, respectivamente.

*Cuadro 24. Prueba de Tukey para el T2U.*

Muestra	Fracción	N	Media	Agrupación
4	>5 kD	3	266.21*	A
2	>10 kD	3	195.49**	B
5	<5 kD	3	191.790**	B
1	EPA	3	161.73*	C
3	<10 kD	3	112.19*	D

\* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

\*\* Las medias comparten la misma letra son significativamente iguales.

De acuerdo con los resultados de la prueba de Tukey para el T2U, las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones > 10kD y < 5 kD no mostraron diferencia estadísticamente significativa, mientras que las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones > 5 kD y < 10 kD y, el EPA fueron significativamente diferentes. En la Figura 37 se aprecia este comportamiento; por ejemplo, el intervalo 5-2 contiene a cero, entonces las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las

fracciones > 10kD y < 5 kD se consideraron iguales. Además, como los demás intervalos no contiene a cero entonces, las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones > 5 kD y < 10 kD y, el EPA fueron diferentes.

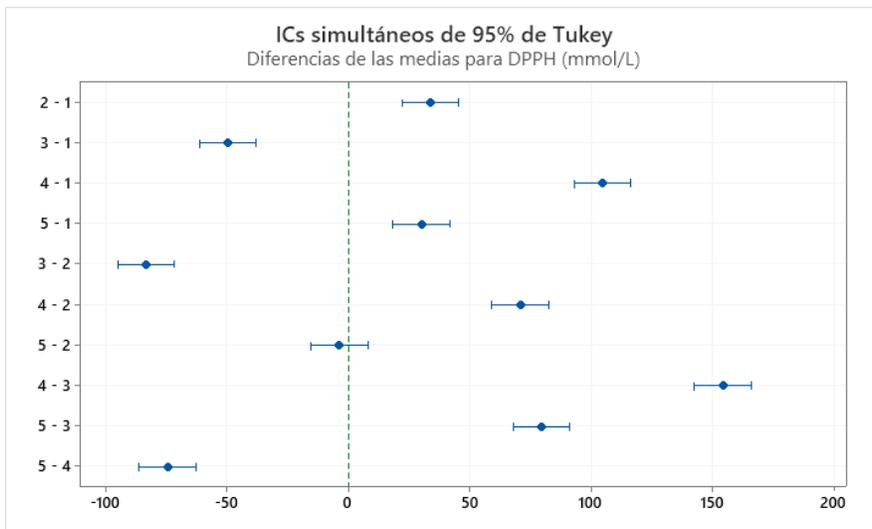


Figura 37. Gráfica de Tukey.

Cuadro 25. Prueba de Tukey para el control.

Muestra	Fracción	N	Media	Agrupación
3	< 10 kD	3	252.96**	A
4	> 5 kD	3	252.793**	A
2	>10 kD	3	240.32**	A
5	< 5 kD	3	185.66*	B
1	EPA	3	97.55*	C

\* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

\*\* Las medias comparten la misma letra son significativamente iguales.

De acuerdo con los resultados de la prueba de Tukey para el control, reportados en el Cuadro 25, las actividades de captación de radicales DPPH de las fracciones > 10 kD, < 10kD y > 5 kD fueron significativamente iguales, mientras que las actividades de captación de radicales DPPH· de la fracción < 5 kD y el EPA fueron estadísticamente diferentes. Lo anterior se puede apreciar en la Figura 38. Como los intervalos 4-2,4-3 y 3-2 contienen a cero, entonces las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones > 10 kD, > 10kD y < 5 kD se consideraron iguales. Además,

como los demás intervalos no contiene a cero, entonces las medias de las actividades de captación de radicales DPPH· de la fracción < 5 kD y el EPA fueron diferentes.

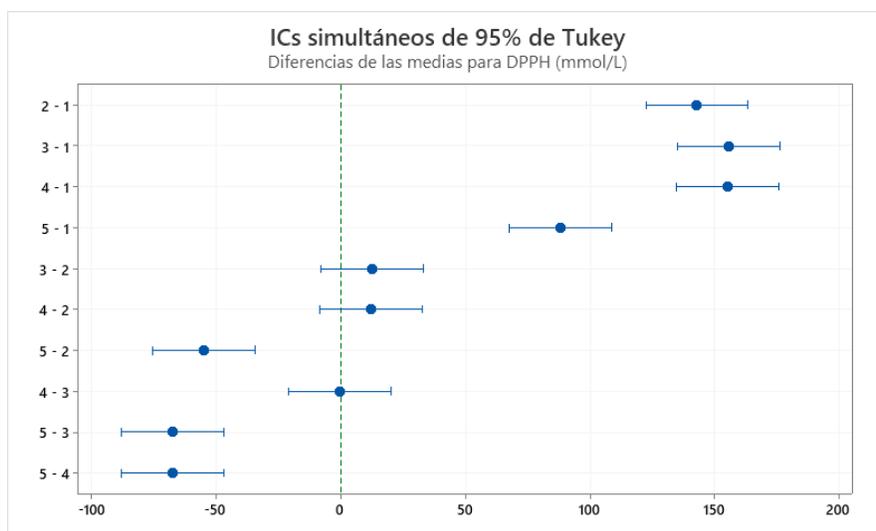


Figura 38. Gráfica de Tukey.

Estas variaciones en la actividad de captación de radicales DPPH· de las fracciones peptídicas para el control y el T2U se debieron principalmente a la secuencia, composición y posición de los diferentes aminoácidos que componen a las cadenas polipeptídicas de los péptidos y, también a la masa molecular de los péptidos (Yang et al., 2021). Tian et al.(2020); L. Yang et al. (2021); y Zou et al., (2016) reportaron en sus estudios que los péptidos de baja masa molecular fueron más efectivos como captadores de radicales DPPH que los péptidos de alta masa molecular. Sin embargo, en este estudio no todas las fracciones peptídicas de menor masa molecular presentaron una mejor actividad de captación de radicales DPPH en comparación con las fracciones peptídicas de mayor masa molecular. Por ejemplo, la fracción peptídica > 5 kD del T2U presentó una mayor actividad de captación de radicales DPPH· en comparación con la fracción < 5 kD, de menor masa molecular, obtenida por este mismo tratamiento. También, las fracciones peptídicas > 10 kD, < 10 kD y > 5 kD del control presentaron una mayor actividad de captación de radicales DPPH en comparación con la fracción < 5 kD, de menor masa molecular, del control.

Yi et al., (2017) y Fathi et al., (2021) al extraer péptidos de la carne de jurel de aletas amarillas y de la proteína de salvado de arroz respectivamente, encontraron que los

péptidos de tamaño medio, presentaban una mayor actividad de captación de radicales que los péptidos de menor tamaño. Se ha demostrado que la actividad antioxidante de los péptidos depende principalmente de la composición de aminoácidos y su secuencia (Chen et al., 1998; Wu et al., 2003). Además, la actividad antioxidante de los péptidos también depende de las proteasas y condiciones de hidrólisis como el tiempo-potencia de ultrasonido. Por ejemplo, dependiendo la especificidad de la enzima, se genera una gran variedad de péptidos con diferente composición y secuencia de aminoácidos que, en consecuencia, afecta su actividad antioxidante (Klompong et al., 2007). Por otro lado, He et al., (2021) encontraron que los péptidos de masa molecular media obtenidos al emplear una potencia ultrasónica de 300 W por 20 min poseían una actividad de captación de radicales DPPH· mayor que aquellos péptidos de menor masa molecular obtenidos empleando una potencia de 400 W por 20 min. La mayor actividad antioxidante de los péptidos de tamaño medio se atribuyó a su composición de aminoácidos, ya que contenían en mayor proporción aminoácidos aromáticos (Trp, Phe y Tyr) y básicos (Lys, His y Arg) que promovían su actividad antioxidante (He et al., 2021).

Las actividades de captación de radicales DPPH· de las fracciones de mayor masa molecular obtenidas por el T2U y el control se debieron probablemente a la composición y secuencia de aminoácidos de los péptidos correspondientes a estas fracciones. Quizá éstas las fracciones contenían péptidos con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (Leu, Val, Ala y Pro), aminoácidos aromáticos (Trp, Phe y Tyr), aminoácidos con un grupo sulfhídrico (-SH) (Cys) o residuos N- y C- terminales con aminoácidos como Pro, Val, Phe, e His principalmente, que facilitaron la captación de los radicales DPPH. Los aminoácidos hidrofóbicos presentan actividad antioxidante debido a su habilidad de interactuar con los ácidos grasos y captar radicales libres que se generan en la lipo-oxidación; los aminoácidos aromáticos, por sus grupos fenólicos, y la Cys, por su grupo -SH, donan un protón al radical libre estabilizándolo e inhibiendo la cadena de peroxidación, y los aminoácidos N- y C- terminales como la Pro, Val, Phe, Tyr, Met e His, por la posición en la que se encuentran interactúan más con los ácidos grasos y presentan una mejor captación de radicales libres generados por la lipo-oxidación (Dávalos et al., 2004; Fan et al., 2022; Wen, Zhang, Zhou, Cai, et al., 2020).

Por otro lado, algunas fracciones peptídicas de menor masa molecular si presentaron mejor captación de radicales DPPH·. La actividad de captación de radicales DPPH· de la fracción < 10 kD del T2U fue menor que la actividad de captación de radicales DPPH· de la fracción < 5 kD del T2U y la actividad de captación de radicales DPPH· del EPA del control fue menor que la actividad de captación de radicales DPPH· de la fracción <5 kD del control. Estos incrementos en la actividad de captación de radicales DPPH· se pudieron deber principalmente a la masa molecular de los péptidos. Como ya se mencionó anteriormente, los péptidos de menor masa molecular son más efectivos como captadores de radicales DPPH· que los péptidos de mayor masa molecular (Ledesma et al., 2005) .

Como la mayor actividad de captación de radicales DPPH· la obtuvo la fracción peptídica >5kD del T2U, entonces esta fracción se empleó posteriormente en las pruebas de encapsulamiento para preparar NLS de péptidos bioactivos de la semilla de yaca. También se empleó la fracción <5 kD ya que corresponde a la fracción más pequeña.

### **6.5 Efecto del tratamiento de ultrasonido en la concentración de proteína de las fracciones peptídicas**

Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad antioxidante de cada una de las fracciones de péptidos bioactivos obtenidas se muestran en el Cuadro 26, observándose que la fracción <5 kD del T2U obtuvo la mayor concentración de proteína, de igual forma la EPA del T2U mostró un incremento significativo en la concentración de proteína en comparación con las fracciones del control. Sin embargo, la fracción >10kD mostró una mayor concentración de proteína en la muestra control.

Cuadro 26. Concentración de proteína de cada una de las fracciones peptídicas.

Fracción peptídica	Concentración de proteína (mg/L)	
	T2U	Control
EPA	4324 ± 97.86*	3510.41 ± 168.33
> 10 kD	3908.93 ± 198.37	3357.69 ± 142.63
< 10 kD	2999.61 ± 213.21	2860.98 ± 160.23
> 5 kD	2700.62 ± 59.09	2650.85 ± 40.56
< 5 kD	1980.49 ± 83.15*	1533.58 ± 79.82

\*Presentó un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) en la concentración de proteína en comparación con el control.

Las variaciones de la concentración de proteína para una misma fracción y diferente tratamiento se pueden apreciar en la Figura 39.

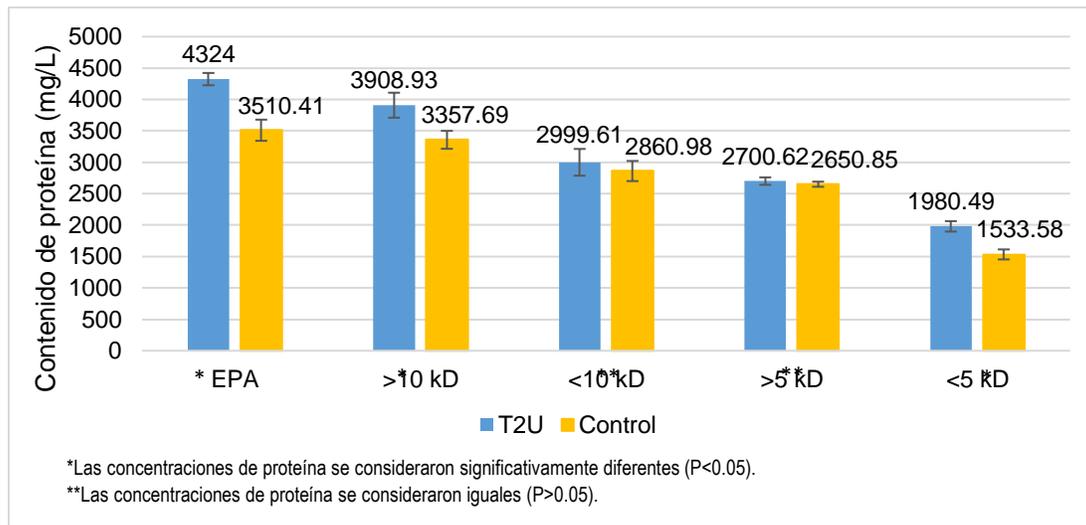


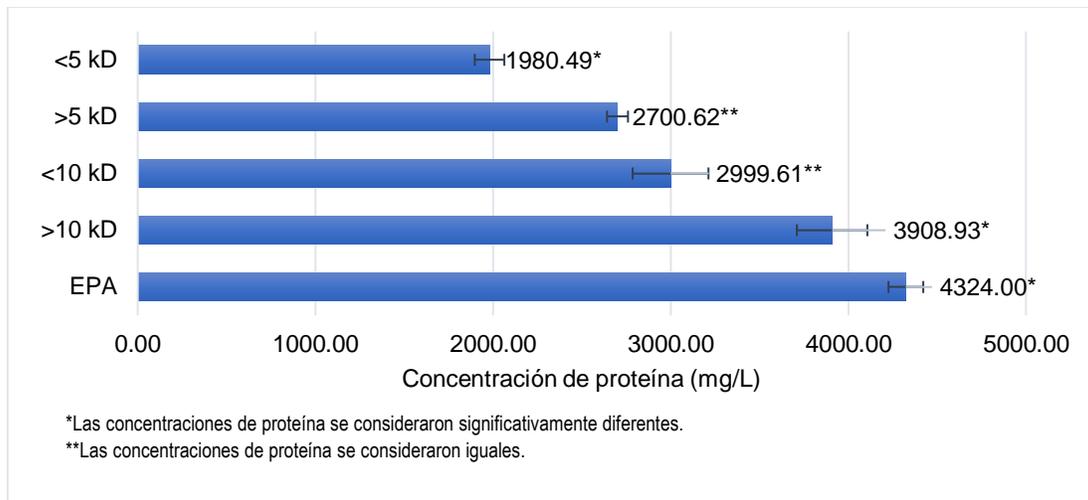
Figura 39. Concentración de proteína de las fracciones peptídicas.

Al comparar la concentración de proteína de una misma fracción peptídica o EPA y diferente tratamiento (control y T2U) se encontró que, para el EPA, ambas concentraciones de proteína fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mayor concentración de proteína la presentó el T2U ( $4324.00 \pm 97.86$  mg/L). Las concentraciones de proteína de la fracción >10 kD para el control y el T2U fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mayor concentración de proteína la presentó el T2U ( $3908.93 \pm 198.37$  mg/L). En el caso de la fracción < 10k D, las concentraciones de proteína de esta fracción para el control y el T2U se consideraron iguales ( $P > 0.05$ ) y

sus valores fueron  $2860.98 \pm 160.23$  mg/L y  $2999.61 \pm 213.21$  mg/L, respectivamente. Las concentraciones de proteína de la fracción  $> 5$  kD para el control y el T2U también se consideraron iguales ( $P > 0.05$ ) y sus valores fueron  $2650.85 \pm 40.56$  mg/L y  $2700.62 \pm 59.09$  mg/L, respectivamente. Mientras que las concentraciones de proteína de la fracción  $< 5$  kD para el control y el T2U fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y la mayor concentración de proteína la presentó el T2U ( $1980.49 \pm 83.15$  mg/L). De acuerdo con lo anterior, podemos decir que el tratamiento de ultrasonido afectó significativamente la concentración de proteína de todas las fracciones peptídicas ya que las fracciones obtenidas por el T2U presentaron, en la mayoría de los casos, una mayor concentración de proteína en comparación con las fracciones del control. Esto probablemente se debió a los efectos físicos generados durante la cavitación que aumentaron la interacción enzima-sustrato e incrementaron la  $V_i$  de Alcalase y Flavourzyme lo cual favoreció la producción de un mayor número de péptidos y, en consecuencia, la concentración de proteína aumentó (Wen, Zhang, Zhou, Feng, et al., 2020).

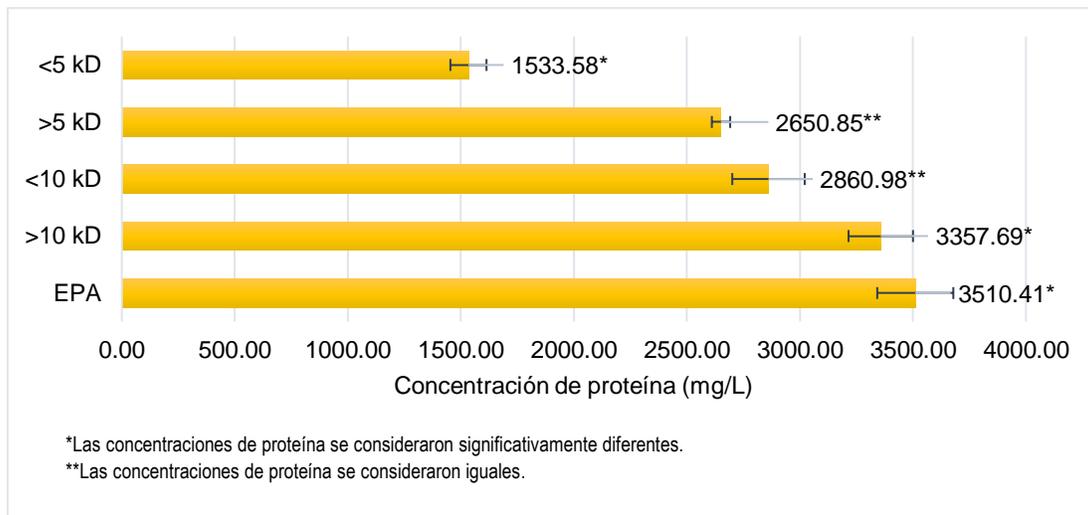
La variación de la concentración de proteína con la masa molecular de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U y el control se pueden observar en las Figuras 40 y 41.

En la Figura 40 se aprecia que de manera creciente las concentraciones de proteína de las fracciones peptídicas para el T2U siguieron el orden: menor a 5 kD  $<$  mayor a 5 kD = menor a 10 kD  $<$  mayor a 10 kD  $<$  EPA.



*Figura 40. Concentración de proteína de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U.*

En la Figura 41 se aprecia que las concentraciones proteína de las fracciones peptídicas del control presentaron el siguiente orden: menor que 5 kD < mayor a 5 kD = menor a 10 kD < mayor a 10 kD = EPA.



*Figura 41. Concentración de proteína de las fracciones peptídicas del control.*

Si se comparan las concentraciones de proteína de las fracciones peptídicas del control y del T2U, encontramos, según la prueba de Tukey con un 95% de confianza que, para el T2U, las concentraciones de proteína de las fracciones > 10 kD, y < 5 kD, y el EPA

fueron significativamente diferentes y las fracciones <10 kD y > 5 kD se consideraron iguales. Los resultados de la prueba de Tukey del control se muestran en la Cuadro 27.

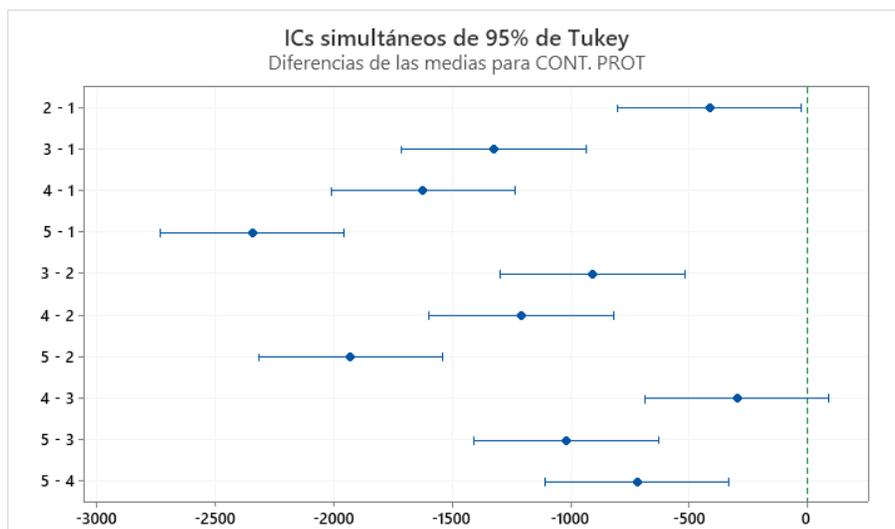
*Cuadro 27. Prueba de Tukey para el T2U.*

Muestra	Fracción	N	Media	Agrupación
1	EPA	3	4324*	A
2	> 10kD	3	3909*	B
3	< 10 kD	3	3000**	C
4	> 5 kD	3	2700.06**	C
5	< 5 kD	3	1980.05*	E

\* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

\*\*Las medias que comparten una letra son iguales.

En la Figura 42 se muestra la gráfica de Tukey obtenida de la comparación de medias de las fracciones proteicas del T2U. Según la gráfica sólo el intervalo 4-3 contiene a cero y entonces, las medias de las concentraciones de proteínas de las fracciones < 10 kD y > 5 kD se consideraron iguales. Los demás intervalos no contienen a cero y, por lo tanto, sus medias de las concentraciones de proteínas se consideraron diferentes.



*Figura 42. Gráfica de Tukey para el T2U.*

Para el control, según los resultados de la prueba de Tukey que se muestran en el Cuadro 28, las concentraciones de proteína de las fracciones < 10kD y > 5 kD y, el EPA

y la fracción > 10kD no mostraron diferencia estadísticamente significativa, mientras que, la concentración de proteína de la fracción < 5 kD fue menor.

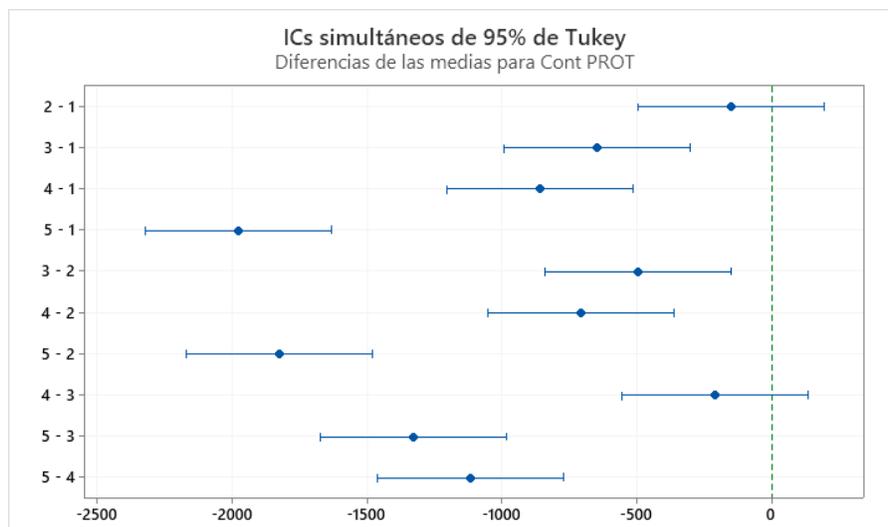
*Cuadro 28. Prueba de Tukey para el control.*

Muestra	Fracción	N	Media	Agrupación
1	EPA	3	3510.4*	A
2	> 10 kD	3	3357.7*	A
3	< 10 kD	3	2861**	B
4	> 5 kD	3	2650.9**	B
5	< 5 kD	3	1533.6*	C

\* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

\*\* Las medias que comparten una letra son iguales

De acuerdo con el diagrama de Tukey de la Figura 43, obtenido al comparar las medias de las concentraciones de las fracciones proteicas del control, los intervalos 2-1 y 4-3 contienen a cero y entonces, las medias de las concentraciones de proteína de las fracciones > 5 kD y < 10kD y, el EPA y la fracción > 10 kD se consideraron iguales. Por otro lado, los demás intervalos no contienen a cero y entonces, la media de la concentración de proteína de la fracción < 5 kD fue diferente a las demás concentraciones de las fracciones peptídicas.



*Figura 43. Gráfica de Tukey para el control.*

Como se observa en las Figuras 40 y 41, en la mayoría de los casos la concentración de proteína de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U y el control aumentó con la masa molecular de las fracciones, lo cual probablemente se debió al número de enlaces peptídicos capaces de formar el complejo tetra dentado de  $\text{Cu}^+$  durante la reacción de Lowry. Es decir, las fracciones de mayor masa molecular contenían péptidos con una cadena polipeptídica más grande y un mayor número de enlaces peptídicos que participaron en la reacción de Lowry y favorecieron la producción del complejo colorido que aumentó la absorbancia y la concentración de proteína (Martina & Vojtech, 2015).

### 6.6 Selección de la formulación de NLS en base a la concentración de cera de abeja y manteca de cacao para estandarizar el método de doble emulsión

Las de NLS de colágeno hidrolizado preparadas con base en las tres formulaciones se caracterizaron en función al tamaño de partícula (TP), índice de polidispersidad (IP) y eficiencia de encapsulación (EE). En el Cuadro 29 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de las NLS de colágeno hidrolizado, en el cual se observa que la Formulación 3 de NLS con 4.5 % manteca de cacao y 0.5 % cera de abeja presentó el mejor tamaño de partícula ( $200.9 \pm 2.902$  nm), IP ( $0.254 \pm 0.006$ ) y EE ( $85.96 \pm 1.13$ ) en comparación con la Formulación 1 y 2 de NLS.

*Cuadro 29. Resultados de la caracterización de las NLS-1, NLS-2 y NLS-3.*

	Tamaño de partícula (nm)	Índice de polidispersidad	EE (%)
<b>NLS-1 (5 %cacao)</b>	$218 \pm 5.301$	$0.300 \pm 0.008$	$65.44 \pm 5.16$
<b>NLS-2 (4.75 % cacao, 0.25 % abeja)</b>	$216.4 \pm 1.833$	$0.280 \pm 0.015$	$70.18 \pm 4.01$
<b>NLS-3 (4.5 % cacao, 0.5 % abeja)</b>	$200.9 \pm 2.902$	$0.254 \pm 0.006$	$85.96 \pm 1.13$

### 6.6.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersidad (IP)

Los tamaños de partícula de las tres formulaciones de NLS fueron inferiores a 300 nm. Se ha reportado que los tamaños de partícula obtenidos mediante el procedimiento de doble-emulsión se encuentran entre los (200 - 600) nm dependiendo de diferentes factores como el tipo y concentración de lípido(s), el tipo y concentración de estabilizante, el tipo y concentración del componente activo encapsulado y el método de preparación y sus condiciones (Gallarate et al., 2009; Hecq et al., 2016; Liu et al., 2008). Entonces, los tamaños de partículas de las NLS-1 ( $218 \pm 5.301$  nm), NLS-2 ( $216 \pm 1.833$  nm) y NLS-3 ( $200.9 \pm 2.902$  nm) fueron aceptables, ya que presentaron un tamaño de partícula entre (200 - 600) nm.

El IP es un factor importante que muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas y su estabilidad durante el tiempo de almacenamiento. Generalmente, un IP entre 0 y 0.4, se considera aceptable y representa una distribución de tamaño estrecha y homogénea y, una mayor estabilidad de las nanopartículas durante la formación y el almacenamiento (Sahraee et al., 2022). Los IP de las NLS-1 ( $0.300 \pm 0.008$ ), NLS-2 ( $0.280 \pm 0.015$ ) y NLS-3 ( $0.254 \pm 0.006$ ) fueron menores a 0.4 y, por lo tanto, se consideran como aceptables.

En las Figuras 44, 45 y 46 se muestran los perfiles DLD de las NLS-1, NLS-2 y NLS-3 respectivamente. Estos perfiles muestran la distribución de tamaño de las nanopartículas en términos de %intensidad (número de partículas que se miden cuando ocurre la dispersión de luz). De acuerdo con el perfil DLD de las NLS-1 (Figura 44), la media de las tres mediciones repetidas reveló un tamaño de partícula de  $218 \pm 5.301$  nm. Además, debido a la aparición de dos picos de diferente porcentaje de intensidad (2.5 % y 96.2%), podemos decir que se trató de una distribución de tamaño bimodal. En el perfil DLD de las NLS-2 (Figura 45) también se apreciaron dos picos de diferente porcentaje de intensidad (11.2 % y 88.8 %). Por lo tanto, se trató de una distribución bimodal. La media de las tres mediciones repetidas reveló un tamaño de partícula de  $216.4 \pm 1.833$  nm para este perfil. Por otro lado, el perfil DLD de las NLS-3 (Figura 46) presentaron una distribución monomodal, ya que solamente se observó un solo pico (97 % intensidad). La media de las tres mediciones repetidas reveló un tamaño de partícula de  $200.9 \pm 2.902$

nm. Las NLS-3 presentaron la distribución de tamaño de partícula más estrecha ya que su IP fue el menor ( $0.254 \pm 0.006$ ). Mientras que las NLS-1, con un IP de  $0.300 \pm 0.008$  resultaron en la distribución de tamaño menos estrecha (Nobmann & Morfesis, 2009).

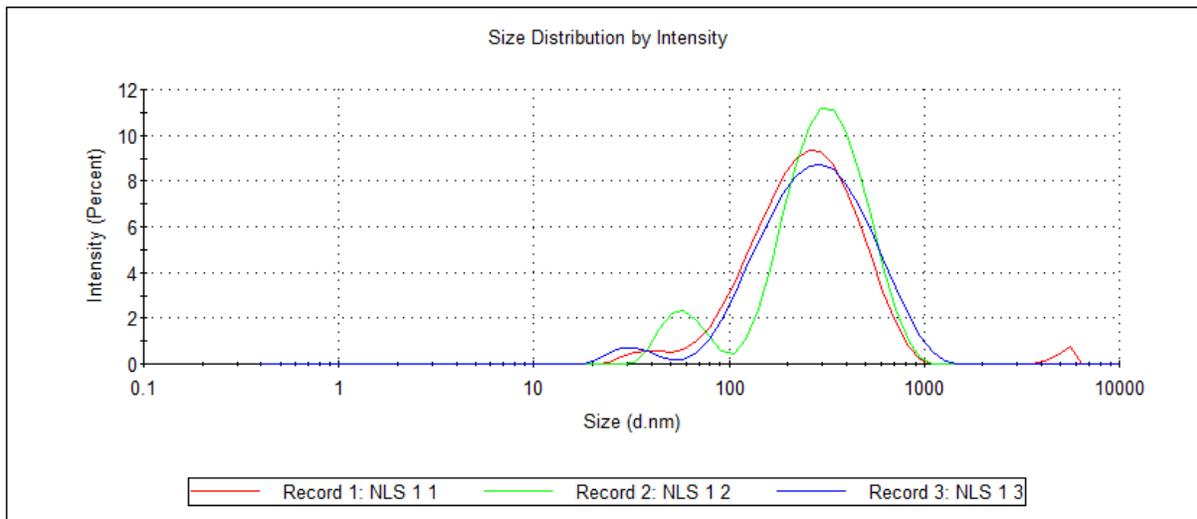


Figura 44 Perfil DLD de las NLS-1.

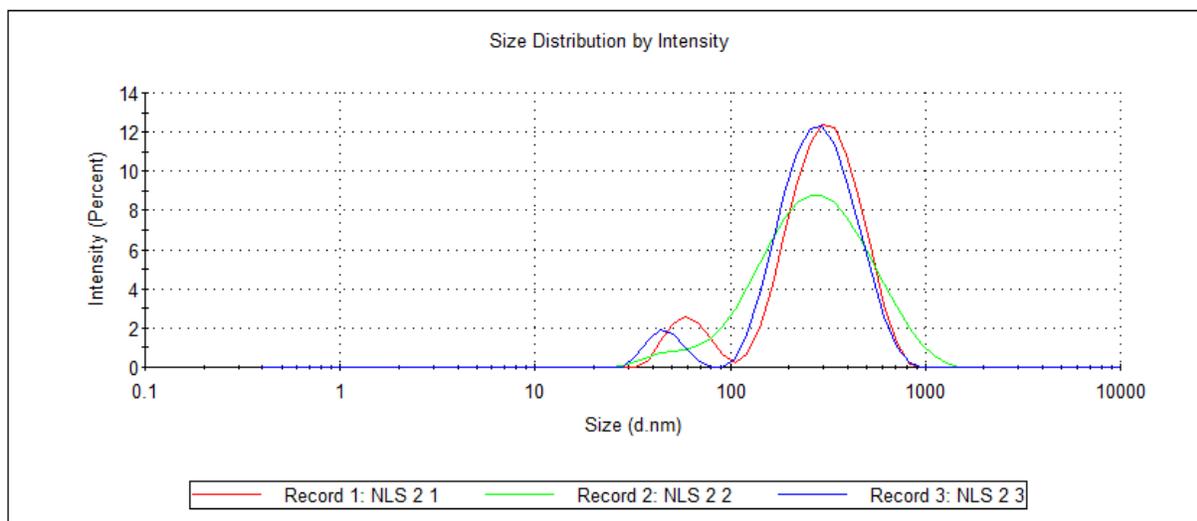
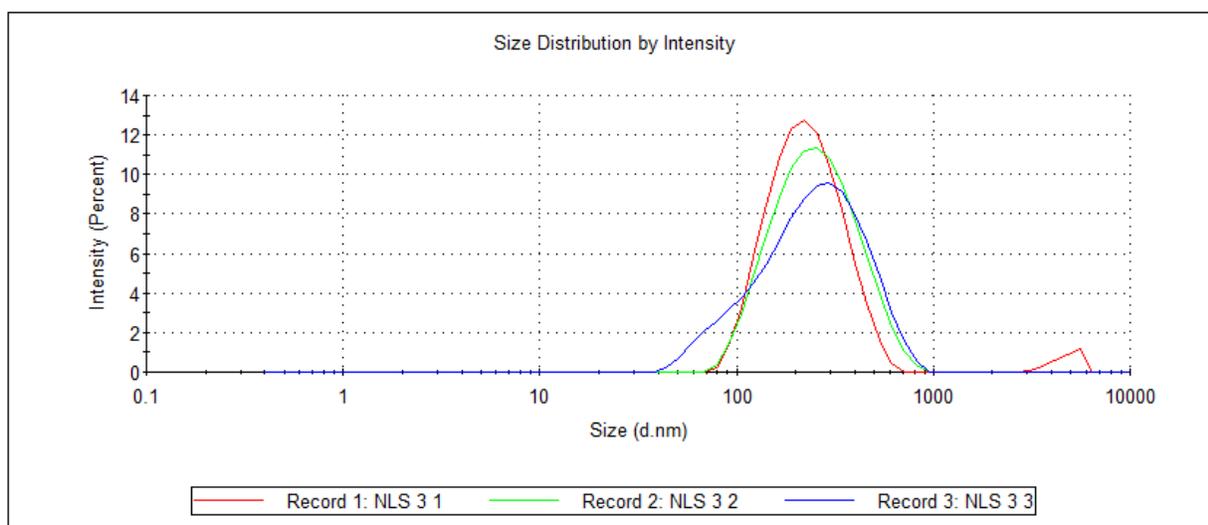


Figura 45. Perfil DLD de las NLS-2.



*Figura 46. Perfil DLD de las NLS-3.*

El IP se relaciona con una distribución normal de tamaños de partícula, ya que se obtendrá una distribución de tamaño más estrecha (IP menor) al disminuir el tamaño de partícula y obtener tamaños de partícula homogéneos. De esta manera, al tener un IP menor se evita la aglomeración de las nanopartículas, ya que la superficie de contacto entre las nanopartículas disminuye. Entonces, como las tres diferentes NLS presentaron un TP pequeño, podemos decir que será menor la aglomeración de las NLS (Espinosa de los Monteros Vega, 2016). Los cambios en el TP e IP se asocian al efecto de la mezcla de estabilizantes, lecitina de soya y Tween 80<sup>®</sup>. De acuerdo con Rostamkalei et al., (2019), el uso de una mezcla de tensioactivos compuesta de un tensoactivo de bajo valor HLB, como la lecitina de soya (HLB de 9), y otro de un valor HLB alto, como el Tween 80<sup>®</sup> (HLB de 15), generalmente asegura una mayor estabilidad de la doble nanoemulsión agua/aceite/agua y menores TP. En este caso, la lecitina de soya estabilizó la nanoemulsión agua en aceite y por su naturaleza lipofílica y se dispersó en la fase lipídica de esta nanoemulsión mientras que, el Tween 80<sup>®</sup> por ser hidrofílico, se dispersó en la fase acuosa de la doble nanoemulsión agua/aceite/agua y ayudó a estabilizarla. Los valores HLB de la lecitina de soya y Tween 80<sup>®</sup> fueron suficientes para estabilizar las nanoemulsiones, ya que la manteca de cacao y la cera de abeja requieren un valor HLB de 6 y 9 respectivamente para estabilizar su nanoemulsión (Garti & Widlak, 2012; Kheradmandnia et al., 2010) .

Por otro lado, la mezcla de la MC y la CA también favorecieron los menores TP y los IP de las diferentes NLS debido a su diferente composición química y puntos de fusión. La cera de abeja con un punto de fusión de (60 - 65)°C consiste principalmente en hidrocarburos C27 - C33; ácidos grasos libres C24 - C32; alcoholes C28 - C35; mono ésteres e hidroxí mono ésteres de cera lineales C40 - C48 y ester de cera complejos, mientras que la composición química de manteca de cacao consiste principalmente en ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico y, su punto de fusión es de (34 - 38)°C (Mitsutake et al., 2019; Shirvani et al., 2022).

La aplicación del ultrasonido en el método de preparación de las NLS también contribuyó a la generación de tamaños de partícula menores. Silva et al., (2011) reportó que la técnica de ultrasonido produce NLS de tamaño más pequeño en comparación con la técnica de homogenización a alta presión. La reducción del tamaño de gota de las nanoemulsiones precursoras de NLS se debe principalmente a los fenómenos de cavitación acústica generados por el ultrasonido (Gordillo-Galeano & Mora-Huertas, 2018).

### **6.6.2 Eficiencia de encapsulación (EE)**

Las NLS-1, NLS-2 y NLS-3 presentaron una eficiencia de encapsulación de  $65.44 \pm 5.16$  %,  $70.18 \pm 4.01$  % y  $85.96 \pm 1.13$  % respectivamente. Con base en estos resultados podemos decir que la EE aumentó al aumentar la concentración de CA de 0 % a 0.5 % m/v. Resultados similares encontraron Kuo et al., (2021) al estudiar cómo la EE del ácido retinoico en las NLS de tricaprín y cera de abeja variaba con la concentración de cera de abeja. Encontró que la EE de ácido retinoico en las NLS incrementaba con el aumento en la concentración de cera de abeja de un 0 % a 0.75 %, lo cual atribuyó a la composición química de los dos lípidos empleados que favoreció el TP de las NLS y la EE. Las NLS-3 (4.5 % MC y 0.5 % CA) tuvieron la mayor EE en comparación con las demás NLS. La alta EE de péptidos de colágeno hidrolizado en las NLS-3 sugirió que, al aumentar la concentración de CA, probablemente se obtuvo una estructura cristalina lipídica menos ordenada con mayores imperfecciones que permitieron la incorporación de las moléculas del bioactivo en la matriz lipídica. Además, una estructura cristalina menos ordenada también puede resultar en NLS estables y poca expulsión de las

moléculas de bioactivo de la matriz lipídica durante el tiempo de almacenamiento (Kheradmandnia et al., 2010). El método de doble emulsión también favoreció la EE ya que permitió la incorporación de bioactivos hidrofílicos en la fase lipídica interna de las NLS (Almeida & Souto, 2007; Arpicco et al., 2016; Gallarate et al., 2009).

Debido a que el tamaño de partícula e IP de las tres NLS se consideró aceptable, la elección de la mejor formulación de NLS se basó en la EE. Como la formulación de NLS-3 produjo nanopartículas con una mayor EE ( $85.96 \pm 1.13$  %) en comparación con las otras dos formulaciones entonces, se empleó a la formulación 3 para preparar, con base en ella, NLS capaces de encapsular péptidos bioactivos de la semilla de yaca.

### 6.7 Caracterización de las NLS con péptidos bioactivos de la semilla de yaca

Los resultados obtenidos de la caracterización de las NLS con péptidos > 5 kD y péptidos < 5 kD y, sin péptidos bioactivos de la semilla de yaca se muestran en el Cuadro 30. De acuerdo con estos resultados, los TP de las NLS con péptidos > 5kD y péptidos < 5kD se consideraron estadísticamente iguales mientras que, el TP de las NLS sin péptidos fue estadísticamente diferente a los TP de las NLS con péptidos > 5kD y péptidos < 5 kD siendo, los TP de las NLS con péptidos > 5kD y < 5 kD mayores en comparación con el TP de las NLS sin péptidos. Sin embargo, los IP de las NLS sin péptidos, con péptidos > 5 kD y péptidos < 5kD se consideraron significativamente iguales. Los PZ de las tres NLS se consideraron diferentes, siendo las NLS con péptidos < 5 kD las que presentaron el PZ más alto seguido del PZ de las NLS con péptidos > 5kD. Las EE de las NLS de péptidos > 5kD y < 5 kD se consideraron significativamente iguales ( $P > 0.05$ ).

*Cuadro 30. Caracterización de las NLS con y sin péptidos.*

Parámetro	NLS sin péptidos	NLS > 5kD	NLS < 5kD
Tamaño de partícula (nm)	$218.7 \pm 4.980$	$228.8 \pm 2.501$	$235.2 \pm 3.993$
Índice de polidispersidad	$0.258 \pm 0.037$	$0.336 \pm 0.055$	$0.412 \pm 0.094$
Potencial Z (mV)	$-30.7 \pm 0.458$	$-34.8 \pm 0.100$	$-36.0 \pm 0.651$
Eficiencia de encapsulación (%)	--	$89.43 \pm 7.44$	$81.68 \pm 8.31$

### 6.7.1 Tamaño de partícula e Índice de polidispersidad (IP)

En las Figuras 47, 48 y 49 se muestran los perfiles DLD de las NLS con péptidos > 5kD, < 5 kD y sin péptidos respectivamente. Estos perfiles muestran la distribución de tamaño de las nanopartículas en términos de % intensidad. Con base en el perfil DLD de las NLS sin péptidos, la media de las tres mediciones repetidas reveló un tamaño de partícula de  $218.7 \pm 4.980$  nm. La distribución del tamaño de partícula de estas NLS se consideró monomodal, ya que se apreció un solo pico con un porcentaje de intensidad del 100 %. En el perfil DLD de las NLS con péptidos > 5 kD se apreciaron dos picos: uno de menor porcentaje de intensidad (6 %) y otro de mayor porcentaje de intensidad (94 %). Por lo tanto, se trató de una distribución bimodal. La media de las tres mediciones repetidas reveló un tamaño de partícula de  $228.8 \pm 2.501$  nm para este perfil. El perfil DLD de las NLS con péptidos < 5 kD también presentó una distribución bimodal, ya que se muestran dos picos con diferente porcentaje de intensidad (91.2 % y 8.8 %). Para este perfil, la media de las tres mediciones repetidas reveló un tamaño de partícula de  $235.2 \pm 3.993$  nm.

Los IP de las NLS con péptidos > 5 kD y péptidos < 5 kD fueron ligeramente más grandes en comparación con el IP de las NLS sin péptidos debido a su distribución bimodal. Sin embargo, estadísticamente, sus IP se consideraron significativamente iguales. Por lo tanto, las NLS sin péptidos, con péptidos > 5kD y péptidos < 5 kD presentaron una distribución de tamaño de partícula igual de estrecha. La aparición de un segundo pico de menor porcentaje de intensidad en los perfiles DLD de las NLS con péptidos > 5 kD y péptidos < 5 kD no afectó en gran medida sus IP, ya que estos picos de menor %intensidad correspondían a TP menores ( $42.64 \pm 9.11$  nm y  $48.14 \pm 8.8$  nm respectivamente) en comparación con los TP ( $315.8 \pm 122$  nm y  $350.4 \pm 127.5$  nm respectivamente) correspondientes a los picos de mayor porcentaje de intensidad en sus perfiles.

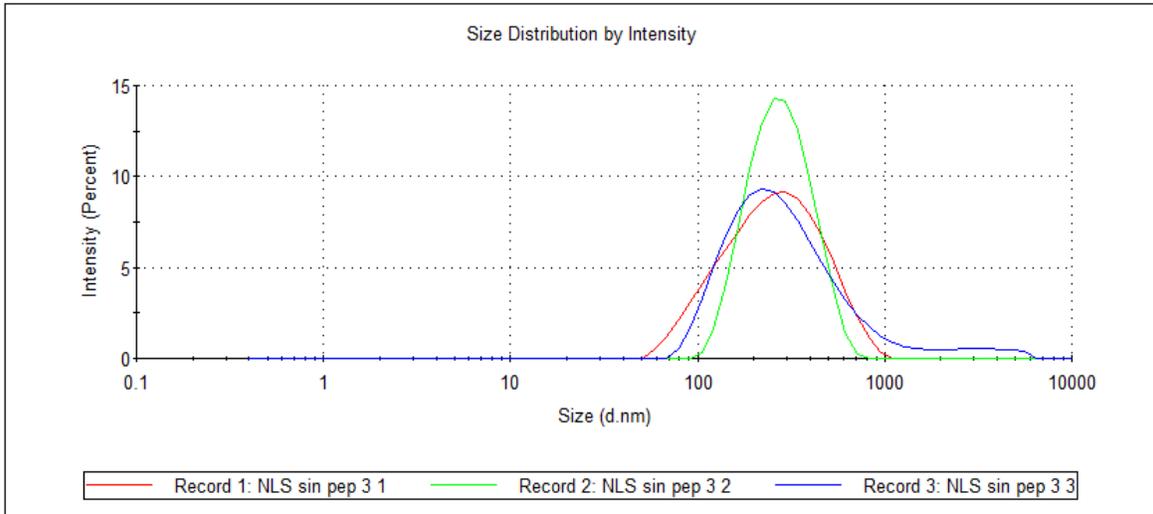


Figura 47. Perfil DLD de las NLS sin péptidos bioactivos

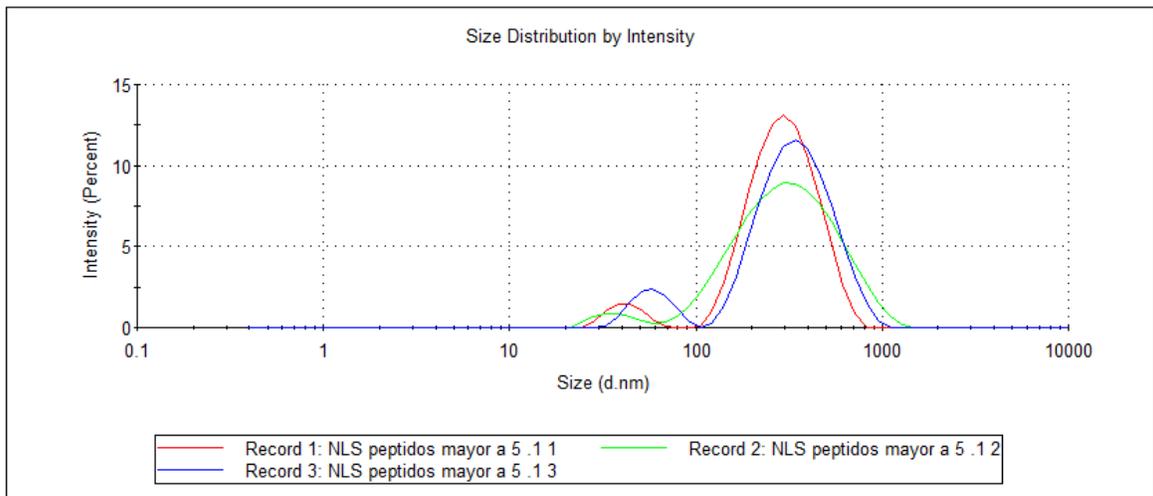
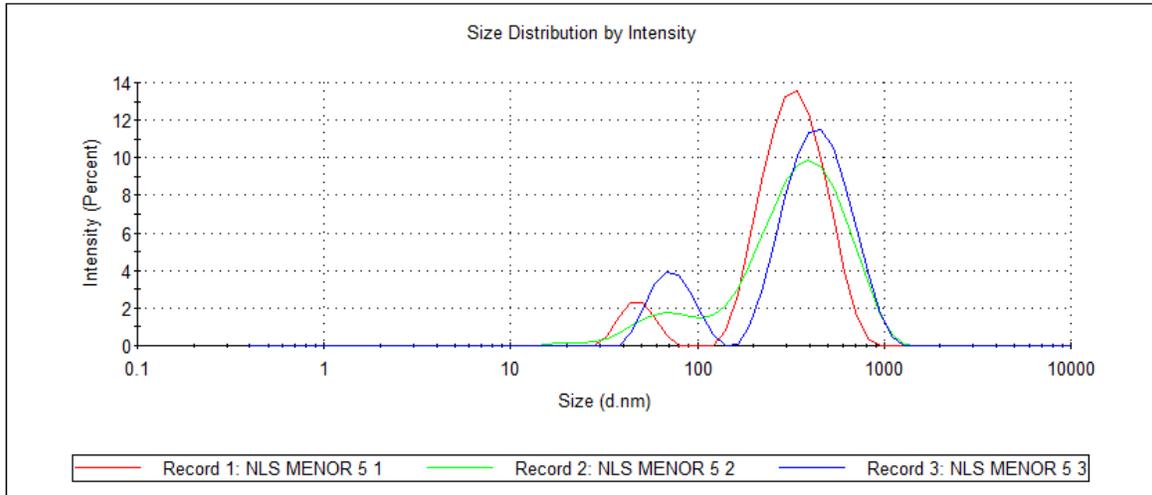


Figura 48. Perfil DLD de las NLS con péptidos bioactivos correspondientes a la fracción >5 kD.



*Figura 49. Perfil DLD de las NLS con péptidos bioactivos correspondientes a la fracción < 5 kD.*

Los IP de las NLS con péptidos > 5 kD ( $0.336 \pm 0.055$ ), péptidos < 5 kD ( $0.412 \pm 0.094$ ) y sin péptidos ( $0.258 \pm 0.037$ ) se consideraron aceptables a pesar de que el IP de las NLS con péptidos < 5 kD no fue menor a 0.4, ya que no presentaron un IP > 0.5 relacionado con la tendencia de las nanopartículas a agregarse o coalescer y sedimentar, lo cual afecta negativamente su estabilidad (Mohan et al., 2018). Por lo tanto, se puede decir que las tres NLS presentaron una distribución de tamaño homogénea.

Los tamaños de partícula de las NLS con péptidos > 5 kD ( $228.8 \pm 2.501$  nm), péptidos < 5 kD ( $235.2 \pm 3.993$  nm) y sin péptidos ( $218.7 \pm 4.980$  nm) se consideraron aceptables, ya que presentaron un tamaño de partícula entre (200 -600) nm. Sin embargo, los TP de partícula más grandes de las NLS con péptidos > 5 kD y péptidos < 5 kD se debieron principalmente a los diferentes tipos de aminoácidos que componen a los péptidos y sus posibles interacciones con la matriz lipídica. Mohan et al., (2016) encontraron al estudiar la influencia de la masa molecular de los péptidos bioactivos del suero de leche en su encapsulación empleando nanoliposomas de lecitina de soya, que la masa molecular de los péptidos no impactaba en el tamaño de partícula, sino que los diferentes aminoácidos que componían a los péptidos eran los que influían en el tamaño de partícula debido a sus interacciones con la matriz lipídica.

### **6.7.2 Potencial Z**

El potencial Z (PZ) es un valor teórico relacionado con el potencial electrostático de la superficie de las nanopartículas cargadas y refleja la fuerza de repulsión entre éstas. Su medición se utiliza actualmente como indicador de la estabilidad de nanopartículas en dispersiones coloidales. Por lo general, se requiere un potencial zeta mínimo de  $\pm 30$  mV para lograr una buena estabilidad para una nanosuspensión estabilizada electrostáticamente (Attama & Müller, 2008; Ribeiro et al., 2017). Los PZ de las NLS con péptidos  $> 5$  kD ( $-34.8 \pm 0.100$  mV), péptidos  $< 5$  kD ( $-36.0 \pm 0.651$  mV) y sin péptidos ( $-30.7 \pm 0.458$  mV) se consideraron aceptables, ya que son mayores a  $-30$  mV, lo cual indicó una solución coloidal de NLS estables físicamente que se confirmó por la ausencia de agregación de partículas visibles. Este potencial Z negativo se debió principalmente a la lecitina de soya que posee un extremo hidrofílico con grupos fosfato ( $\text{PO}^-$ ) en la superficie de NLS (Soleimanian et al., 2018).

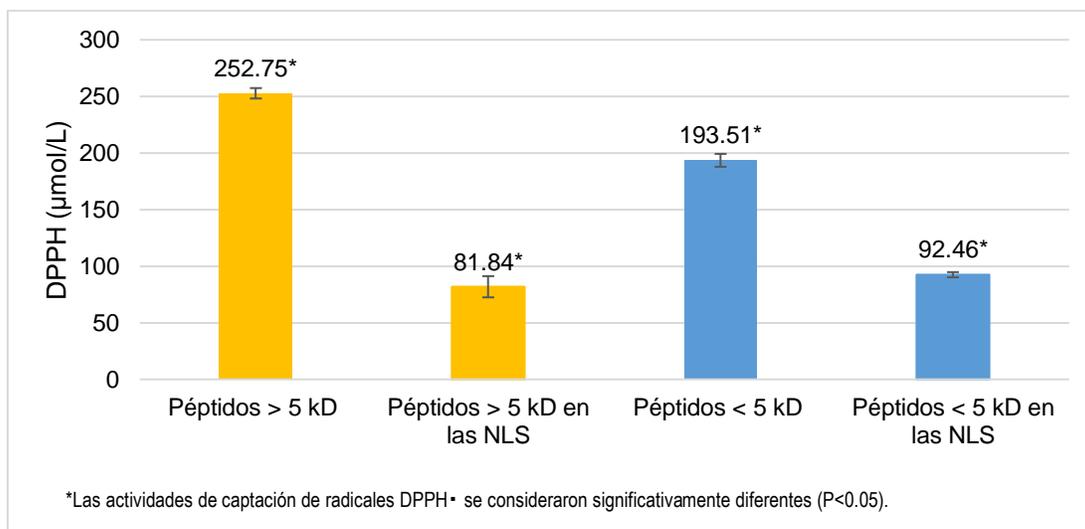
El PZ de las NLS con péptidos  $> 5$  kD y péptidos  $< 5$  kD fue diferente al PZ de las NLS sin péptidos, lo cual probablemente se debió a que algunos péptidos atrapados en las NLS expusieron residuos de aminoácidos cargados negativamente en la superficie de las nanopartículas aumentando el potencial negativo y las repulsiones electrostáticas (Su et al., 2020).

### **6.7.3 Eficiencia de encapsulación (EE) y evaluación de la actividad antioxidante de los péptidos bioactivos de la semilla de yaca encapsulados en las NLS**

Las NLS presentaron una EE de péptidos  $> 5$  kD y  $< 5$  kD del  $89.43 \pm 7.44$  % y  $81.68 \pm 8.31$  % respectivamente. Se han reportado EE del péptido insulina en las NLS preparadas por la técnica de doble nanoemulsión en un rango de (40 - 52) % (Mirchandani et al., 2021), por lo tanto, las EE obtenidas fueron aceptables. Las EE de las NLS con péptidos  $> 5$  kD y  $< 5$  kD se consideraron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) y, las NLS con péptidos  $< 5$  kD fueron las que presentaron la EE más baja. Con base en el PZ de las NLS con péptidos  $< 5$  kD, fue probable que sus péptidos encapsulados presentaran en mayor proporción aminoácidos con carga negativa, lo cual

promovió las interacciones repulsivas entre los extremos hidrofílicos con grupos fosfato (PO<sup>-</sup>) de la lecitina afectando negativamente la EE (Mohan et al., 2015)

Los resultados de la actividad antioxidante de los péptidos > 5 kD y < 5 kD encapsulados y sin encapsular en las NLS se muestran en la Figura 50. Ahí se observa que la mayor actividad de captación de radicales DPPH· la presentaron las fracciones > 5 kD y < 5 kD sin encapsular.



*Figura 50. Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas > 5 kD y < 5kD encapsuladas y sin encapsular.*

La actividad de captación de radicales DPPH· es significativa diferente ( $P < 0.05$ ) para los péptidos > 5 kD y los péptidos > 5 kD en las NLS y, también para los péptidos < 5 kD y los péptidos < 5 kD en las NLS, ya que los péptidos > 5 kD y < 5 kD en las NLS presentaron una menor actividad de captación de radicales DPPH· en comparación con los controles (péptidos < 5 kD y péptidos < 5 kD). Esta disminución del  $67.65 \pm 3.19\%$  y  $52.21 \pm 1.15\%$  en la actividad antioxidante de los péptidos > 5 kD y < 5 kD en las NLS respectivamente, se relaciona con la EE. Al tener una EE alta, gran número de los péptidos encapsulados en las NLS se incorporaron en el núcleo de la nanopartícula disminuyendo el número de péptidos con actividad antioxidante capaces de ser detectados por el método de DPPH·. Por lo tanto, se esperaba que la actividad de captación de radicales DPPH· de los péptidos en las NLS disminuyera, ya que esto quiere decir, que la encapsulación de los péptidos ayudó a conservar y proteger su actividad

antioxidante. Agrawal et al., (2022), con la finalidad de proteger la actividad antioxidante de la curcumina, la encapsulo en NLS obteniendo una EE del  $81.49 \pm 1.17$  %. Al comparar la actividad de captación de radicales DPPH· de la curcumina y de la curcumina en las NLS, encontró que la actividad antioxidante de la curcumina en las NLS disminuyó. Concluyeron, que tal reducción no indicó la disminución de la actividad antioxidante de la curcumina por su encapsulación en las NLS, sino que, la curcumina se cargó en la nanopartícula con el objetivo de obtener una propiedad indetectable y garantizar su actividad antioxidante al momento de su liberación (Agrawal et al., 2022).

#### **6.7.4 Estabilidad de las NLS**

La estabilidad de las nanodispersiones de las NLS se estudió empleando un método basado en la retrodispersión múltiple de luz para detectar los fenómenos de desestabilización de las dispersiones diluidas y concentradas en una etapa muy temprana (Zaragoza et al., 2020).

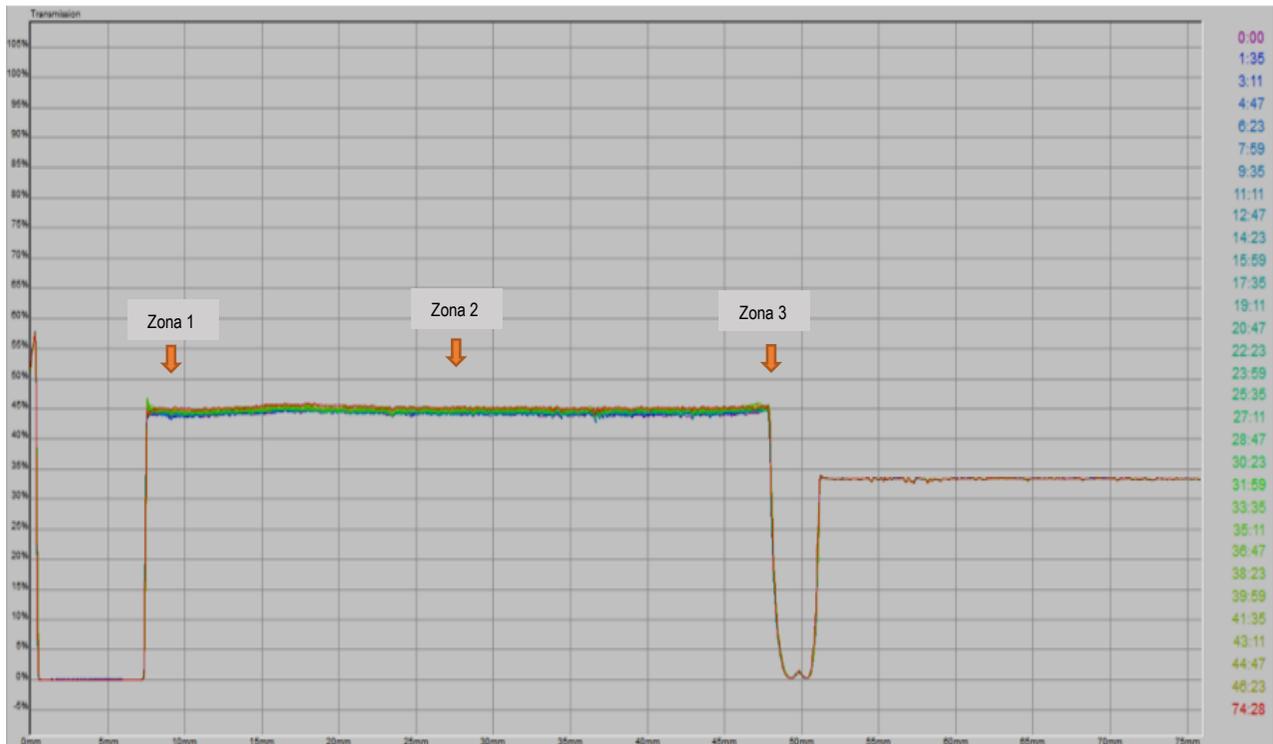
Las Figuras 51 y 52 muestran los perfiles del comportamiento de la retrodispersión ( $\Delta BS$ ) de la nanodispersión de NLS medido en un analizador óptico tipo *Turbiscan* y obtenido después de 48 h. En los perfiles de retrodispersión se observan tres zonas: zona 1 que corresponde al fondo de la celda de medición, la zona 2; parte media de la celda y la zona 3; parte superior de la celda.

La Figura 51 corresponde al perfil de retrodispersión de las NLS con péptidos > 5 kD. En la zona 1 se observó un pequeño aumento y descenso de la retrodispersión  $\Delta BS$ , que pudo haberse dado por un aumento y disminución de la concentración de nanopartículas. Lo anterior no afectó la estabilidad de las nanodispersión de NLS, ya que la zona 2 no presentó grandes fluctuaciones en la señal que afectaran la estabilidad. En la zona 2 del perfil se observaron pequeños fenómenos de desestabilización (pequeñas fluctuaciones en la señal  $\Delta BS$ ) en la zona de (35 – 40) mm; sin embargo, estas desviaciones no significaron una nanodispersión de NLS inestable, ya que fueron inferiores al 2 % (Galindo, 2019; Silva et al., 2011).



*Figura 51. Perfil de retrodispersión de una nanodispersión de NLS con péptidos > 5kD (% Transmisión vs. mm).*

La Figura 52 corresponde al perfil de retrodispersión de las NLS con péptidos > 5 kD. El perfil de retrodispersión fue resultado de una nanodispersión estable de NLS, ya que no se observan fluctuaciones en la señal de porcentaje de transmisión a lo largo de las tres zonas del perfil (Celia et al., 2009).



*Figura 52. Perfil de retrodispersión de una nanodispersión de NLS con péptidos < 5kD (% Transmisión vs. mm).*

Por lo tanto, se consideró que no se observaron fenómenos de desestabilización significativos a dos días de producción en la nanodispersión de NLS con péptidos > 5 kD y péptidos < 5kD. Estos resultados concordaron con los obtenidos para el tamaño de partícula, IP y PZ, y confirmaron el logro de nanodispersiones coloidales de tipo lechoso de NLS estables con péptidos > 5 kD y péptidos < 5kD.

## 7. CONCLUSIONES

- La mejor combinación de concentraciones de enzima Alcalase® y Flavourzyme® en función al grado de hidrólisis fue Alcalase 8% enzima/sustrato y Flavourzyme 6% enzima/sustrato.
- La hidrólisis asistida por ultrasonido favoreció el GH y las  $V_i$  de las enzimas Alcalase® y Flavourzyme®, sin embargo, el mayor GH final ( $40.39 \pm 2.82$  %) y, las  $V_i$  de Flavourzyme ( $19.26 \pm 1.32$  mg/L·min) y Alcalase ( $22.99 \pm 2.56$  mg/L·min) más grandes se obtuvieron mediante el T2U debido al mayor tiempo de exposición de ultrasonido con este tratamiento.
- El T2U favoreció la generación de péptidos con actividad de captación de radicales DPPH· durante la hidrólisis enzimática secuencial, lo cual provocó un incremento del 65.80 % y 5.04 % en la actividad de captación de radicales DPPH· del EPA y la fracción > 5 kD, respectivamente. La mayor actividad de captación de radicales DPPH· la obtuvo la fracción peptídica > 5kD del T2U.
- La actividad de captación de radicales DPPH· de los péptidos bioactivos obtenidos por el T2U y el control probablemente dependió de la secuencia, composición y posición de los diferentes aminoácidos que componen a las cadenas polipeptídicas de los péptidos y, en algunos casos, de la masa molecular de los péptidos.
- Las concentraciones de proteína de las fracciones peptídicas obtenidas por el T2U fueron mayores en comparación con el control debido a los efectos del ultrasonido que favorecieron la hidrólisis de la proteína.
- La formulación 3 de NLS con 4.5% de manteca de cacao y 0.5% cera de abeja se seleccionó para preparar NLS capaces de encapsular péptidos bioactivos de la semilla de yaca, ya que las NLS presentaron un tamaño de partícula ( $200.9 \pm 2.902$  nm) e IP ( $0.254 \pm 0.006$ ) aceptable y una mayor EE ( $85.96 \pm 1.13$  %) en comparación con las otras dos formulaciones.
- Las NLS con péptidos > 5 kD y con péptidos < 5 kD presentaron un TP e IP de  $228.8 \pm 2.501$  nm y  $0.336 \pm 0.055$  y,  $235.2 \pm 3.993$  nm y  $0.412 \pm 0.094$  respectivamente, los cuales se consideraron aceptables. Las EE obtenidas para las NLS con péptidos > 5 kD y con péptidos < 5 kD fueron altas y con un valor de

89.43 ± 7.44 % y 81.68 ± 8.31%. Los PZ de las NLS con péptidos > 5 kD y con péptidos < 5 kD fueron de -34.8 ± 0.100 mV y -36.0 ± 0.651 mV, lo cual indicó una solución coloidal de NLS estables físicamente por medio de interacciones tipo electrostático. En los perfiles de retrodispersión no se observaron fenómenos de desestabilización significativos después de dos días de producción en las nanodispersiones de NLS con péptidos > 5 kD y con péptidos < 5 kD.

- Los resultados obtenidos en los perfiles de retrodispersión, los TP, IP y PZ, confirmaron el logro de obtener dispersiones coloidales de tipo lechoso de NLS con péptidos > 5 kD y con péptidos < 5 kD estables.
- La actividad de captación de radicales DPPH· de los péptidos > 5 kD y < 5 kD en las NLS disminuyó un 67.65 ± 3.19 % y 52.21 ± 1.15 % respectivamente en comparación con la actividad de captación de radicales DPPH de los péptidos > 5 kD y < 5 kD lo cual se atribuyó a las altas EE obtenidas, ya que mayor parte de los péptidos > 5 kD y < 5 kD se atrapó en las NLS, logrando mantener y proteger su actividad antioxidante hasta el momento de su liberación.

## 8. REFERENCIAS

- Abeynayake, R., Zhang, S., Yang, W., & Chen, L. (2022). Development of antioxidant peptides from brewers' spent grain proteins. *Food Science and Technology*, 158, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113162>
- Agrawal, M., Pradhan, M., Singhvi, G., Patel, R., Ajazuddin, & Alexander, A. (2022). Thermoresponsive in situ gel of curcumin loaded solid lipid nanoparticle: Design, optimization and in vitro characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 71, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103376>
- Ajayi, I. A. (2008). Comparative study of the chemical composition and mineral element content of *Artocarpus heterophyllus* and *Treculia africana* seeds and seed oils. *Bioresource Technology*, 99(11), 5125–5129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.027>
- Ajayi, I. A. (2011). Use of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Seeds in Health. *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, 677–683. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10079-9>
- Alanchari, M., Mohammadi, M., Yazdian, F., Ahangari, H., Ahmadi, N., Emam-Djomeh, Z., Homayouni-Rad, A., & Ehsani, A. (2021). Optimization and antimicrobial efficacy of curcumin loaded solid lipid nanoparticles against foodborne bacteria in hamburger patty. *Journal of Food Science*, 86(6), 2242–2254. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15732>
- Almeida, A. J., & Souto, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.007>
- Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., & Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- Apar, D. K., & Özbek, B. (2010). Corn gluten hydrolysis by alcalase: Kinetics of hydrolysis.

Chemical Engineering Communications, 197(7), 963–973.  
<https://doi.org/10.1080/00986440903359368>

Arpicco, S., Battaglia, L., Brusa, P., Cavalli, R., Chirio, D., Dosio, F., Gallarate, M., Milla, P., Peira, E., Rocco, F., Sapino, S., Stella, B., Ugazio, E., & Ceruti, M. (2016). Journal of Drug Delivery Science and Technology Recent studies on the delivery of hydrophilic drugs in nanoparticulate systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 32, 298–312. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.004>

Ashaolu, T. (2021). Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 3381–3395. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01216-9>

Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2019). Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3(95), 1–21. <https://doi.org/10.3389/FSUFS.2019.00095>

Attama, A. A., & Müller, C. C. (2008). Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid lipid nanoparticle crystallinity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.035>

Baharuddin, N. A., Halim, N. R. A., & Sarbon, N. M. (2016). Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus* sp.) protein hydrolysate. *International Food Research Journal*, 23(4), 1424–1431.

Baliga, M. S., Shivashankara, A. R., Haniadka, R., Dsouza, J., & Bhat, H. P. (2011). Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. *Food Research International*, 44(7), 1800–1811. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.035>

Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2017). Bioactives from fruit processing wastes: Green approaches to valuable chemicals. *Food Chemistry*, 225, 10–22.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.093>

Banwo, K., Olojede, Ayoyinka Olufunke, Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh, S., Patel, A. R., Gupta, A. K., Aguilar, C. N., & Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, 43, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101320>

Barroso, L., Viegas, C., Vieira, J., Ferreira-Pêgo, C., Costa, J., & Fonte, P. (2021). Lipid-based carriers for food ingredients delivery. *Journal of Food Engineering*, 295, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110451>

Basi, Z., & Turkoglu, V. (2019). In vitro effect of oxidized and reduced glutathione peptides on angiotensin converting enzyme purified from human plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1104, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.11.023>

Battaglia, L., Trotta, M., Gallarate, M., Carlotti, M. E., Zara, G. P., & Bargoni, A. (2007). Solid lipid nanoparticles formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique: Development and influence on insulin stability. *Journal of Microencapsulation*, 24(7), 672–684. <https://doi.org/10.1080/02652040701532981>

Berton-Carabin, C. C., Ropers, M. H., & Genot, C. (2014). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945–977. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>

Boligon, A. A. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, 4(7), 517–522. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000188>

Caglar, M. Y., Demirci, M., Bayrambas, K., Cakır, B., & Gülseren, İ. (2017). Nanoencapsulation of Enzymes, Bioactive Peptides, and Biological Molecules. In *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients* (pp. 297–332). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809740-3.00008-8>

Campos, J. R., Severino, P., Santini, A., Silva, A. M., Shegokar, R., Souto, S. B., & Souto, E. B. (2020). Solid lipid nanoparticles (SLN): Prediction of toxicity, metabolism, fate

and physicochemical properties. prediction of toxicity, metabolism, fate and physicochemical properties. In *Nanopharmaceuticals: Volume 1: Expectations and Realities of Multifunctional Drug Delivery Systems* (pp. 1–15). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817778-5.00001-4>

Casas, D. E., Aguilar, C. N., Valdés, J. A., Herrera, R., González, M. L., & Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>

Castro, R. J. S., Cason, V. G., & Sato, H. H. (2017). Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.04.003>

Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: An approach based on enzymes specificities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.012>

Celia, C., Trapasso, E., Cosco, D., Paolino, D., & Fresta, M. (2009). Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.007>

Chai, K. F., Voo, A. Y. H., & Chen, W. N. (2020). Bioactive peptides from food fermentation: A comprehensive review of their sources, bioactivities, applications, and future development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3825–3885. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12651>

Chai, T. T., Xiao, J., Mohana Dass, S., Teoh, J. Y., Ee, K. Y., Ng, W. J., & Wong, F. C. (2021). Identification of antioxidant peptides derived from tropical jackfruit seed and investigation of the stability profiles. *Food Chemistry*, 340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127876>

- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49–53. <https://doi.org/10.1021/jf970649w>
- Chin, J., Foyez Mahmud, K. A., Kim, S. E., Park, K., & Byun, Y. (2016). Insight of current technologies for oral delivery of proteins and peptides. *Drug Discovery Today: Technologies*, 9(2), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.04.005>
- Christopher, E., He, R., Ren, W., Xu, H., & Ma, H. (2021). Ultrasonic-assisted enzymolysis: Principle and applications. *Process Biochemistry*, 100, 59–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.033>
- D.L. Gutnick, H. B. (2017). Biosurfactants. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 731–757). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09184-6>.
- Daliri, E. B. M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Daneshmand, S., Golmohammadzadeh, S., Jaafari, M. R., Movaffagh, J., Rezaee, M., Sahebkar, A., & Malaekheh-Nikouei, B. (2018). Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4251–4264. <https://doi.org/10.1002/jcb.26617>
- Das, S., Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2021). Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 191, 899–917. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.060>
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food*

- Protection, 67(9), 1939–1944. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1939>
- Diana, M., Sales, C., Costa, H. B., & Meira, D. D. (2016). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine pineapple. 6(1), 26–31.
- Dima, C., Assadpour, E., Dima, S., & Jafari, S. M. (2020). Characterization and analysis of nanomaterials in foods. In Handbook of Food Nanotechnology. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815866-1.00015-7>
- Doktorovova, S., Shegokar, R., & Souto, E. B. (2017). Role of Excipients in formulation development and biocompatibility of lipid nanoparticles (SLNs/NLCs). In Nanostructures for Novel Therapy (pp. 811–843). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9.00030-X>
- Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., & Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: Peptide identification and determination of enzyme specificity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(21), 6300–6308. <https://doi.org/10.1021/jf026242v>
- Duan, Y., Dhar, A., Patel, C., Khimani, M., Neogi, S., Sharma, P., Siva Kumar, N., & Vekariya, R. L. (2020). A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems. Royal Society of Chemistry, 10, 26777–26791. <https://doi.org/10.1039/d0ra03491f>
- Dukhin, A. S., & Xu, R. (2020). Zeta-potential measurements. In Characterization of Nanoparticles (pp. 213–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00014-6>
- Ebru, D. (2020). PROTEINS (LOWRY) PROTOCOL. In Proteins (pp. 1–5).
- Espinosa de los Monteros Vega, M. E. (2016). Desarrollo, Caracterización y Aplicación de Nanopartículas Lipídicas Sólidas para la Conservación de Granos y Semillas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fan, H., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, S., Liu, T., & Wang, D. (2022). Review on plant-derived bioactive peptides: biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. Journal of Future Foods, 2(2), 143–159.

<https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.003>

Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2017). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 23(1), 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>

Fathi, P., Nasab, M., Kouhdasht, A., & Khalesi, M. (2021). Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. *Food Bioscience*, 42, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101110>

Fernandes, F., Ferreres, F., Izquierdo, A., Oliveira, A. P., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2017). Accumulation of primary and secondary metabolites in edible jackfruit seed tissues and scavenging of reactive nitrogen species. *Food Chemistry*, 233, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.068>

Galali, Y., Omar, Z. A., & Sajadi, S. M. (2020). Biologically active components in by-products of food processing. *Food Science and Nutrition*, 8(7), 3004–3022. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1665>

Galindo, P. M. J. (2019). Desarrollo y evaluación de nanopartículas poliméricas para la conservación de alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gallarate, M., Trotta, M., Battaglia, L., & Chirio, D. (2009). Preparation of solid lipid nanoparticles from W/O/W emulsions: Preliminary studies on insulin encapsulation. *Journal of Microencapsulation*, 26(5), 394–402. <https://doi.org/10.1080/02652040802390156>

Garti, N., & Widlak, N. R. (2012). Cocoa Butter and Related Compounds. In *Cocoa Butter and Related Compounds*. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-02409-1>

Giudice, F. (2017). Caracterización estructural de liposomas y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico. [Universidad Nacional de Córdoba]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.23952.00005>

Gordillo-Galeano, A., & Mora-Huertas, C. E. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 133(October),

285–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.017>

Gordillo-Galeano, A., & Mora-Huertas, C. E. (2021). Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: Emphasizing some parameters for correct measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 620(1–11). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126610>

Goswami, C., & Chacrabati, R. (2015). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). Nutritional Composition of Fruit Cultivars, 317–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00014-3>

Greiner, R., Oey, I., Roohinejad, S., & Jingyuan, W. (2018). Solid Lipid Nanoparticles. In *Emulsion-based Systems for delivery of Food Active Compounds: Formation, Application, Health and Safety*. (pp. 121–138). John Wiley & Sons Ltd.

Guiné, R. P. F., & Florenca, S. (2019). *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit): Composition, nutritional value and products. In *Wild Fruits: Composition, Nutritional Value and Products* (pp. 313–332). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31885-7\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31885-7_25)

Hajj Ali, H., Michaux, F., Bouelet Ntsama, I. S., Durand, P., Jasniewski, J., & Linder, M. (2016). Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(8), 1168–1178. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500348>

He, L., Gao, Y., Wang, X., Han, L., Yu, Q., Shi, H., & Song, R. (2021). Ultrasonication promotes extraction of antioxidant peptides from oxtail gelatin by modifying collagen molecule structure. *Ultrasonics Sonochemistry*, 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105738>

Hecq, J., Amighi, K., & Goole, J. (2016). Development and evaluation of insulin-loaded cationic solid lipid nanoparticles for oral delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.012>

Ho, Y., Wang, S. H., Chen, Y. R., Li, Z. L., Chin, Y. T., Yang, Y. C. S. H., Wu, Y. H., Su, K. W., Chu, H. R., Chiu, H. C., Crawford, D. R., Shih, Y. J., Grasso, P., Tang, H. Y., Lin, H. Y., Davis, P. J., Whang-Peng, J., & Wang, K. (2019). Leptin-derived peptides

- block leptin-induced proliferation by reducing expression of pro-inflammatory genes in hepatocellular carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110808>
- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., Xiong, F., He, R., & Ma, H. (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>
- Islam, M. N., Zhang, M., & Adhikari, B. (2014). The Inactivation of Enzymes by Ultrasound-A Review of Potential Mechanisms. *Food Reviews International*, 30(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.853772>
- Jian, S., Wenyi, T., & Wuyong, C. (2008). Ultrasound-accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste. *Journal of Cleaner Production*, 16(5), 591–597. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2006.12.005>
- Justus, A., Pereira, D. G., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2019). Combined uses of an endo- and exopeptidase in okara improve the hydrolysates via formation of aglycone isoflavones and antioxidant capacity. *Lwt*, 115(July), 108467. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108467>
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Álvarez, C., & O'Donnell, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>
- Karthik, P., Ezhilarasi, P. N., & Anandharamakrishnan, C. (2017). Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 1435–1450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006767>
- Katouzian, I., Faridi Esfanjani, A., Jafari, S. M., & Akhavan, S. (2017). Formulation and application of a new generation of lipid nano-carriers for the food bioactive ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 68, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.017>
- Khafagy, E. S., Kamei, N., Fujiwara, Y., Okumura, H., Yuasa, T., Kato, M., Arime, K.,

- Nonomura, A., Ogino, H., Hirano, S., Sugano, S., & Takeda-Morishita, M. (2020). Systemic and brain delivery of leptin via intranasal coadministration with cell-penetrating peptides and its therapeutic potential for obesity. *Journal of Controlled Release*, 319, 397–406. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.016>
- Kheradmandnia, S., Vasheghani-Farahani, E., Nosrati, M., & Atyabi, F. (2010). Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(6), 753–759. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.06.003>
- Khorasani, S., Ghandehari Yazdi, A. P., Taghavi, E., Alipour Amro Abadi, M., Ghobadi, H., Zihayat, B., Rasti, B., & Mozafari, M. R. (2021). Recent Trends in the Nanoencapsulation Processes for Food and Nutraceutical Applications. *Innovative Food Processing Technologies*, 3, 532–545. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22940-5>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Kou, X., Gao, J., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.002>
- Kuo, Y. C., Shih-Huang, C. Y., & Rajesh, R. (2021). Enhanced integrin affinity and neural differentiation of induced pluripotent stem cells using Ln5-P4-grafted amphiphilic solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 118, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111339>
- Lakshmi Tamma, S. M., Oyaizu, N., McCloskey, T. W., Kalyanaraman, V. S., & Pahwa, S. (1996). HIV-1 gp120 blocks jacalin-induced proliferative response in CD4+ T cells: Jacalin as a useful surrogate marker for qualitative and quantitative deficiency of CD4+ T cells in HIV-1 infection. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80(3),

290–297. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0126>

Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588–593. <https://doi.org/10.1021/jf048626m>

Lee, L. L., Niknafs, N., Hancocks, R. D., & Norton, I. T. (2013). Emulsification : Mechanistic. 31, 72–78.

Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., & Oladejo, A. O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2784146>

Liu, J., Gong, T., Fu, H., Wang, C., Wang, X., Chen, Q., Zhang, Q., He, Q., & Zhang, Z. (2008). Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 356, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.008>

López, A., Peñaloza, A., Juárez, V. M., Torres, A., Zeugolis, D. I., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. *Molecules*, 24, 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24224031>

Lucarini, A. C., & Kilikian, B. V. (1999). Comparative study of Lowry and Bradford methods: Interfering substances. *Biotechnology Techniques*, 13(2), 149–154. <https://doi.org/10.1023/A:1008995609027>

Ma, H., Huang, L., Jia, J., He, R., Luo, L., & Zhu, W. (2011). Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.014>

Magalhães, I. S., Guimarães, A. D. B., Tribst, A. A. L., Oliveira, E. B. de, & Leite Júnior, B. R. de C. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. *Food Research International*, 157, 1–9.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111310>

Mahanta, C. L., & Kalita, D. (2015). Processing and Utilization of Jackfruit Seeds. Processing and Impact on Active Components in Food, 395–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00047-0>

Mahgoub, S., Alagawany, M., Nader, M., Omar, S. M., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A., Elnesr, S. S., Khafaga, A. F., Taha, A. E., Farag, M. R., Tiwari, R., Marappan, G., El-Sayed, A. S., Patel, S. K., Pathak, M., Michalak, I., Al-Ghamdi, E. S., & Dhama, K. (2021). Recent Development in Bioactive Peptides from Plant and Animal Products and Their Impact on the Human Health. Food Reviews International. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1923027>

Marciniak, A., Suwal, S., Naderi, N., Pouliot, Y., & Doyen, A. (2018). Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. Trends in Food Science and Technology, 80, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.013>

Martina, V., & Vojtech, K. (2015). A Comparison of Biuret, Lowry and Bradford Methods for Measuring the Egg's Proteins. MendelNet, 394–398.

Martinez-Villaluenga, C., Peñas, E., & Frias, J. (2017). Bioactive Peptides in Fermented Foods: Production and Evidence for Health Effects. Fermented Foods in Health and Disease Prevention, 23–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00002-9>

Matougui, N., Boge, L., Groo, A. C., Umerska, A., Ringstad, L., Bysell, H., & Saulnier, P. (2016). Lipid-based nanoformulations for peptide delivery. International Journal of Pharmaceutics, 502(1–2), 80–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.019>

McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. Advances in Colloid and Interface Science, 234, 3–26. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>

McClements, D. J., & Öztürk, B. (2021). Utilization of nanotechnology to improve the handling, storage and biocompatibility of bioactive lipids in food applications. Foods,

10(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods10020365>

Merck. (2022a). Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit Ultracel-10 regenerated cellulose membrane, 4 mL sample volume | Sigma-Aldrich. [https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/mm/ufc8010?gclid=Cj0KCQjwmPSSBhCNARIsAH3cYgaoDf1DE2tHio0VFXcyO\\_bvddwOgxWfLuhuT8LoBXorMSZurfpfWMAowsEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/mm/ufc8010?gclid=Cj0KCQjwmPSSBhCNARIsAH3cYgaoDf1DE2tHio0VFXcyO_bvddwOgxWfLuhuT8LoBXorMSZurfpfWMAowsEALw_wcB)

Merck. (2022b). Corning SPIN-X UF concentrators Spin-X UF 6 for samples up to 6mL; 5K MWCO desalting columns. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/cls431482>

Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682–5693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>

Minitab 19. (2020). Introducción a Minitab 19 para Windows. Minitab 19, 38–65. [https://www.minitab.com/content/dam/www/en/uploadedfiles/documents/getting-started/Minitab19GettingStarted\\_ESES.pdf](https://www.minitab.com/content/dam/www/en/uploadedfiles/documents/getting-started/Minitab19GettingStarted_ESES.pdf)

Minitab 19. (2022). Interpretar los resultados clave para Optimizador de respuestas - Minitab. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/19/help-and-how-to/statistical-modeling/using-fitted-models/how-to/response-optimizer/interpret-the-results/key-results/>

Mirchandani, Y., Patravale, V. B., & Brijesh, S. (2021). Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, 335, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.032>

Mitsutake, H., Ribeiro, L. N. M., Silva, G. H., Castro, S. R., Paula, E., Poppi, R. J., & Breitkreitz, M. C. (2019). Evaluation of miscibility and polymorphism of synthetic and natural lipids for nanostructured lipid carrier (NLC) formulations by Raman mapping and multivariate curve resolution (MCR). *European Journal of Pharmaceutical*

- Sciences, 135, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.05.002>
- Mittal, R., Sankaran, K., & Achar, P. (2016). MARKET FEASIBILITY STUDY FOR JACKFRUIT VALUE ADDED PRODUCTS. 89.
- Mohan, A., McClements, D. J., & Udenigwe, C. C. (2016). Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chemistry*, 213, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.075>
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., He, Q. S., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: A review. *RSC Advances*, 5(97), 79270–79278. <https://doi.org/10.1039/c5ra13419f>
- Mohan, A., Rajendran, S. R. C. K., Thibodeau, J., Bazinet, L., & Udenigwe, C. C. (2018). Liposome encapsulation of anionic and cationic whey peptides: Influence of peptide net charge on properties of the nanovesicles. *Food Science and Technology*, 87, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.072>
- Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. In Limusa Wiley.
- Mora, L., Aristoy, M. C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 2, 381–389. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22397-4>
- Mudalige, T., Qu, H., Van Haute, D., Ansar, S. M., Paredes, A., & Ingle, T. (2018). Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In *Nanomaterials for Food Applications* (pp. 313–353). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>
- Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2017). Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2322-6>
- Naseri, N., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2017). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(3), 305–313. <https://doi.org/10.15171/apb.2015.043>

- Ngoc. Lien, Brillard, M., & Hoebeke, J. (1993). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the jacalins are cleavage products from a 17-kDa precursor. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1156, 219–222. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90139-Y](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90139-Y)
- Nobari Azar, F. A., Pezeshki, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., & Mohammadi, M. (2020). Nanostructured lipid carriers: Promising delivery systems for encapsulation of food ingredients. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100084>
- Nobbmann, U., & Morfesis, A. (2009). Light scattering and nanoparticles. *Materials Today*, 12(5), 52–54. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(09\)70164-6](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(09)70164-6)
- Novozymes. (2001). Flavourzyme. <https://biosolutions.novozymes.com/en/animal-protein/products/flavourzyme>
- Novozymes. (2014). Enzymes for Biocatalysis. [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)
- Novozymes. (2021). Protamex® | Novozymes. <https://biosolutions.novozymes.com/en/plant-protein/products/protamex>
- Ozón, B., Cotabarren, J., Valicenti, T., Graciela Parisi, M., & David Obregón, W. (2022). Chia expeller: A promising source of antioxidant, antihypertensive and antithrombotic peptides produced by enzymatic hydrolysis with Alcalase and Flavourzyme. *Food Chemistry*, 380, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132185>
- Ozuna, C., Martínez, I., Tostado, E., Ozimek, L., & Llano, S. L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77, 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.015>
- Parhi, R., & Suresh, P. (2016). Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles-A Review. *Current Drug Discovery Technologies*, 9(1), 2–16. <https://doi.org/10.2174/157016312799304552>
- Pascacio, V. G., Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Murcia, Á., & Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–2196.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>

- Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Tsatsanis, C., Domínguez, R., Zhang, W., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2020). Evaluation of the protein and bioactive compound bioaccessibility/bioavailability and cytotoxicity of the extracts obtained from aquaculture and fisheries by-products. *Advances in Food and Nutrition Research*, 92, 97–125. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.12.002>
- Pavel, C.-I., Marghitas, La., Bonta, V., Mihai, C. M., & Tomos, L. I. (2013). Determination of Total Protein Content in Royal Jelly: A Comparison of the Kjeldahl, the Bradford and the Lowry Methods. *Scientific Papers - Animal Husbandry Series*, 59(1), 209–211. [http://www.uaiasi.ro/zootehnie/Pdf/Pdf\\_Vol\\_59/Crenguta\\_Pavel.pdf](http://www.uaiasi.ro/zootehnie/Pdf/Pdf_Vol_59/Crenguta_Pavel.pdf)
- Pereira, D. G., Justus, A., Falcão, H. G., Rocha, T. de S., Ida, E. I., & Kurozawa, L. E. (2019). Enzymatic hydrolysis of okara protein concentrate by mixture of endo and exopeptidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(10), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14134>
- Peres, Luana, Peres, L., Araújo, P. H., & Sayer, C. (2016). Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.033>
- Ponce, A. G., & Marcovich, N. E. (2018). Industry: Recent Developments, Risks and Regulation. In *Impact of Nanoscience in the Food Industry* (pp. 113–141). Elsevier Inc.
- Povedano, M. M., & Castro, M. D. (2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, 889, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.004>
- Prombutara, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I., & Chareonpornwattana, S. (2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*, 24(1–2), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.025>

- Pund, S., Joshi, A., & Banerjee, R. (2021). Engineered Nanomaterials in Functional Foods. *Innovative Food Processing Technologies*, 3, 546–564. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22981-8>
- Ramírez Fuentes, L., Richard, C., & Chen, L. (2021). Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein. *Journal of Functional Foods*, 87, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104829>
- Ramteke K.H, Joshi S.A, & Dhole S.N. (2011). Solid Lipid Nanoparticle: A Review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(6), 34–44. [www.iosrphr.org](http://www.iosrphr.org)
- Ranasinghe, R. A. S. N., Maduwanthi, S. D. T., & Marapana, R. A. U. J. (2019). Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.): A Review. *International Journal of Food Science and Technology*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/4327183>
- Ravera, F., Dziza, K., Santini, E., Cristofolini, L., & Liggieri, L. (2021). Emulsification and emulsion stability: The role of the interfacial properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102344>
- Ren, X., Ma, H., Mao, S., & Zhou, H. (2014). Effects of sweeping frequency ultrasound treatment on enzymatic preparations of ACE-inhibitory peptides from zein. *European Food Research and Technology*, 238(3), 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2118-3>
- Rezvankhah, A., Yarmand, M. S., Ghanbarzadeh, B., & Mirzaee, H. (2021). Characterization of bioactive peptides produced from green lentil (*Lens culinaris*) seed protein concentrate using Alcalase and Flavourzyme in single and sequential hydrolysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(11), 1–16. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15932>
- Ribeiro, L. N. M., Breikreitz, M. C., Guilherme, V. A., da Silva, G. H. R., Couto, V. M., Castro, S. R., de Paula, B. O., Machado, D., & de Paula, E. (2017). Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. *European*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 106, 102–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.060>

Rokhina, E. V., Lens, P., & Virkutyte, J. (2009). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*, 27(5), 298–306.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.02.001>

Rostamkalaei, S. S., Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., & Nokhodchi, A. (2019). Topical gel of Metformin solid lipid nanoparticles: A hopeful promise as a dermal delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 150–157.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.072>

Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Tabatt, K., Plank, C., Müller, R. H., & Rosenecker, J. (2004). Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Research*, 21(9), 1662–1669. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000041463.56768.ec>

Sahraee, S., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., Pezeshki, A., & Hoseini, M. (2022). Development of heat-stable gelatin-coated nanostructured lipid carriers (NLC): Colloidal and stability properties. *Food Science and Technology*, 160, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113265>

Santos, Valeria, Ribeiro, A. P., & Santana, M. H. (2019). Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. *Food Research International*, 122, 610–626. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.032>

Saranghi, M. K., & Padhi, S. (2016). Solid Lipid Nanoparticles-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 3(3), 5–12.

Sastri, K. T., Radha, G. V., Pidikiti, S., & Vajjhala, P. (2020). Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(6), 126–141.  
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.10617>

Saxena, A., Bawa, A. S., & P. S. Raju. (2011). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 276–

297). Woodhead.

Selvamani, V. (2018). Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 425–444. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00015-5>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Jackfruit, jaca, yaca... ¿la conoces? | Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/siap/articulos/jackfruit-jaca-yaca-la-conoces?idiom=es>

Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive peptides: A review. *International Journal Bioautomation*, 15(4), 223–250. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>

Shirvani, A., Goli, S. A. H., Varshosaz, J., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2022). Fabrication of edible solid lipid nanoparticle from beeswax/propolis wax by spontaneous emulsification: Optimization, characterization and stability. *Food Chemistry*, 387, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132934>

Silva, A. C., González-Mira, E., García, M. L., Egea, M. A., Fonseca, J., Silva, R., Santos, D., Souto, E. B., & Ferreira, D. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.035>

Sivakamasundari, S. K., Leena, M., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2021). Solid Lipid Nanoparticles: Formulation and Applications in Food Bioactive Delivery. In *Innovative Food Processing Technologies* (pp. 580–604). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23028-X>

Smith, J., & Charter, E. (2010). *Functional Food Product Development*. In *Functional Food Science and Technology Series*. Wiley-Blackwell.

Soleimanian, Y., Goli, S. A. H., Shirvani, A., Elmizadeh, A., & Marangoni, A. G. (2020). Wax-based delivery systems: Preparation, characterization, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2994–3030. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12614>

- Soleimanian, Y., Goli, S. A. H., Varshosaz, J., & Sahafi, S. M. (2018). Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. *Food Chemistry*, 244, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.010>
- Soquetta, M. B., Terra, L. de M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA - Journal of Food*, 16(1), 400–412. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1411978>
- Sosalagere, C., Adesegun Kehinde, B., & Sharma, P. (2022). Isolation and functionalities of bioactive peptides from fruits and vegetables: A reviews. *Food Chemistry*, 366, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130494>
- Sousa, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(2), 147–153. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322004000200003>
- Sreeja Devi, P. S., Kumar, N. S., & Sabu, K. K. (2021). Phytochemical profiling and antioxidant activities of different parts of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae): A review on current status of knowledge. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(30), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00178-7>
- Srivastava, R., & Singh, A. (2020). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) Biggest Fruit with High Nutritional and Pharmacological Values: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(8), 764–774. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.908.082>
- Su, J., & Paulo, A. (2021). Effect of ultrasound on protein functionality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105653>
- Su, L., Zhou, F., Yu, M., Ge, R., He, J., Zhang, B., Zhang, Y., & Fan, J. (2020). Solid lipid nanoparticles enhance the resistance of oat-derived peptides that inhibit dipeptidyl peptidase IV in simulated gastrointestinal fluids. *Journal of Functional Foods*, 65, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103773>

- Sun, H., Liang, Y., Li, G., Zhang, X., Wang, S., & Huang, C. (2021). Antimicrobial peptides-unleashing their therapeutic potential using nanotechnology. *Pharmacology and Therapeutics*, 21, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.159155>
- Sun, R., Zhao, G., Ni, S., & Xia, Q. (2014). Lipid based nanocarriers with different lipid compositions for topical delivery of resveratrol: Comparative analysis of characteristics and performance. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(6), 591–600. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50124-4](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50124-4)
- Swami, S. B., & Kalse, S. B. (2019). Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*): Biodiversity, Nutritional Contents, and Health. *Reference Series in Phytochemistry*, 2237–2259. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6\\_87](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_87)
- Swami, S. B., Thakor, N. J., Haldankar, P. M., & Kalse, S. B. (2012). Jackfruit and Its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 565–576. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2012.00210.X>
- Tardioli, P. W., Sousa, R., Giordano, R. C., & Giordano, R. L. C. (2005). Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase® immobilized on 10% glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.002>
- Tian, R., Feng, J., Huang, G., Tian, B., Zhang, Y., Jiang, L., & Sui, X. (2020). Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 68, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105202>
- Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., & Mickowska, B. (2020). The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *Food Science and Technology*, 117, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108616>
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). *Ultrasound Technologies for Food Bioprocessing*. Springer.
- Toma, M. (2017). The Use of Ultrasound as an Enhancement Aid to Food Extraction. In

- Ingredients Extraction by Physico-Chemical Methods in Food (pp. 399–440). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811521-3/00010-7>
- Torley, P., & Bhandari, B. (2007). Ultrasound in Food Processing and Preservation. 713–739. <https://doi.org/10.1201/9781420017373.ch29>
- Trapani, A., Tripodo, G., Mandracchia, D., Cioffi, N., Ditaranto, N., De Leo, V., Cordero, H., & Esteban, M. A. (2018). Glutathione-loaded solid lipid nanoparticles based on Gelucire® 50/30: Spectroscopic characterization and interactions with fish cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.08.013>
- Ugazio, E., Cavalli, R., & Gasco, M. R. (2002). Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 241(2), 341–344. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00268-5)
- Veljkovic, N., Branch, D. R., Metlas, R., Prljic, J., Vlahovicek, K., Pongor, S., & Veljkovic, V. (2003). Design of peptide mimetics of HIV-1 gp120 for prevention and therapy of HIV disease. *Journal of Peptide Research*, 62(4), 158–166. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2003.00081.x>
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M., & Millán, F. (2001). Alcalase rapeseed inhibitors: Purification and partial characterization. *Journal of Enzyme Inhibition*, 16(1), 81–87. <https://doi.org/10.1080/14756360109162357>
- Waghmare, R., Memon, N., Gat, Y., Gandhi, S., Kumar, V., & Panghal, A. (2019). Jackfruit seed: An accompaniment to functional foods. *Brazilian Journal of Food Technology*, 22, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.20718>
- Wang, B., Meng, T., Ma, H., Zhang, Y., Li, Y., Jin, J., & Ye, X. (2016). Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on rapeseed protein by immobilized Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.023>
- Wang, D., Yan, L., Ma, X., Wang, W., Zou, M., Zhong, J., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2018).

- Ultrasound promotes enzymatic reactions by acting on different targets: Enzymes, substrates and enzymatic reaction systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.133>
- Wang, Y. Y., Wang, C. Y., Wang, S. T., Li, Y. Q., Mo, H. Z., & He, J. X. (2021). Physicochemical properties and antioxidant activities of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed protein hydrolysates obtained with different proteases. *Food Chemistry*, 345, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128765>
- Wen, C., Zhang, J., Yao, H., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2019). Advances in renewable plant-derived protein source: The structure, physicochemical properties affected by ultrasonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 83–98. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2018.12.036>
- Wen, C., Zhang, J., Zhou, J., Cai, M., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2020). Antioxidant activity of arrowhead protein hydrolysates produced by a novel multi-frequency S-type ultrasound-assisted enzymolysis. *Natural Product Research*, 34(20), 3000–3003. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1601192>
- Wen, C., Zhang, J., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2018). Effects of slit divergent ultrasound and enzymatic treatment on the structure and antioxidant activity of arrowhead protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 49, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.018>
- Wen, C., Zhang, J., Zhou, J., Feng, Y., Duan, Y., Zhang, H., & Ma, H. (2020). Slit divergent ultrasound pretreatment assisted watermelon seed protein enzymolysis and the antioxidant activity of its hydrolysates in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 328, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127135>
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., & Dass, C. R. (2021). Fabrication techniques for the preparation of orally administered insulin nanoparticles. *Journal of Drug Targeting*, 29(4), 365–386. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1817042>
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*).

Food Research International, 36(9–10), 949–957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)

Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Ren, S., Mersha, Z., Lynch, P., & Almutaimi, A. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis using endo- and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 343–352. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00296-0>

Yadav, S. C., Kumari, A., & Yadav, R. (2015). Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation. *Peptides*, 32(1), 173–187. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.003>

YANG, F. jia, CHEN, X., HUANG, M. chen, YANG, Q., CAI, X. xi, CHEN, X., DU, M., HUANG, J. lian, & WANG, S. yun. (2021). Molecular characteristics and structure–activity relationships of food-derived bioactive peptides. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9), 2313–2332. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63463-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63463-3)

Yang, L., Guo, Z., Wei, J., Han, L., Yu, Q. li, Chen, H., Chen, Y., & Zhang, W. (2021). Extraction of low molecular weight peptides from bovine bone using ultrasound-assisted double enzyme hydrolysis: Impact on the antioxidant activities of the extracted peptides. *Food Science and Technology*, 146(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111470>

Yang, S., Yan, D., Zou, Y., Mu, D., Li, X., Shi, H., Luo, X., Yang, M., Yue, X., Wu, R., & Wu, J. (2021). Fermentation temperature affects yogurt quality: A metabolomics study. *Food Bioscience*, 42, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101104>

Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Ruan, S., Wang, Y., Huang, S., & Ma, H. (2017). Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.026>

Yi, J., De Gobba, C., Skibsted, L. H., & Otte, J. (2017). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of bioactive peptides produced by enzymatic

- hydrolysis of skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203932>
- Yin, H., Jiang, Y., Zhou, X., Zhong, Y., Wang, D., Deng, Y., & Xue, H. (2022). Effect of radio frequency, ultrasound, microwave-assisted papain, and alcalase hydrolysis on the structure, antioxidant activity, and peptidomic profile of *Rosa roxburghii* Tratt. seed protein. *Journal of Food Science*, 87, 4040–4055. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16266>
- Zaragoza, M. L., Guerrero, D., Muñoz, N., & Gómez, G. (2020). Nanoemulsions and nanosized ingredients for food formulations. In *Handbook of Food Nanotechnology: Applications and Approaches* (pp. 207–256). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815866-1.00006-6>
- Zheng, L., Lin, L., Su, G., Zhao, Q., & Zhao, M. (2015). Pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. *Food Research International*, 76, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.045>
- Zhu, J., & Huang, Q. (2019). Nanoencapsulation of functional food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 88, 129–165. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.005>
- Zou, Y., Wang, W., Li, Q., Chen, Y., Zheng, D., Zou, Y., Zhang, M., Zhao, T., Mao, G., Feng, W., Wu, X., & Yang, L. (2016). Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing. *Process Biochemistry*, 51(3), 431–443. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.12.011>