

**Obtención y caracterización de hidrolizados proteicos de *Eisenia fetida* con actividad  
inhibidora de enzimas amilolíticas y su aplicación en la digestión *in vitro* de productos  
alimentarios enriquecidos**

Carlos Andrés Caro Vélez

Asesor

Leidy Johanna Gómez Sampedro

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD  
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnologías e Ingenierías ECBTI  
Ingeniería de Alimentos  
2025

Leidy Johanna Gómez Sampedro

---

Directora del Trabajo de Grado

Claudia Lorena Calvo Rodríguez

---

Jurado

2025

*“Estoy entre aquellos que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es solo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”*

Marie Curie

## Agradecimientos

Este proyecto fue desarrollado gracias al apoyo de los grupos de investigación en Nutrición y Tecnología de Alimentos (NUTEC) de la Universidad de Antioquia y de Ciencias Básicas Aplicadas a la Ingeniería (SECIBAIN) de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), con el respaldo de los recursos propios de ambos grupos.

Expreso mi más sincero agradecimiento al doctor José Edgar Zapata, director del laboratorio NUTEC, por haberme permitido realizar este trabajo en el marco de su grupo de investigación, brindándome acceso a los recursos humanos y materiales necesarios para su desarrollo.

Mi más profundo reconocimiento a la doctora Leidy Gómez Sampedro, no solo por haber asumido la dirección de este proyecto, sino también por ser una guía constante, comprometida y entusiasta. Su experiencia, orientación y acompañamiento fueron fundamentales para llevar esta investigación a buen término. Extiendo igualmente mi gratitud al doctor Johan Sebastián Gaviria, quien, al frente del laboratorio del grupo NUTEC, desempeñó un papel esencial en la ejecución experimental de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, muchas gracias por su colaboración, su disposición para compartir conocimientos y por crear un ambiente de trabajo tan agradable. En especial, a Juliana Arbeláez, quien me recibió con amabilidad en el laboratorio y fue mi guía en los primeros días, cuando todo era nuevo para mí. Su ayuda y compañerismo fueron invaluable.

A mi familia, mi pilar más fuerte: a mi esposa María Fernanda, gracias por tu apoyo inquebrantable, especialmente en los momentos más difíciles, por tu paciencia y por creer siempre en mí. A mis padres y a mis hermanos, quienes, pese a la distancia, han estado presentes con su amor, su escucha y su apoyo incondicional. Gracias por su fortaleza, por ser un ejemplo constante de esfuerzo y por inspirarme cada día a seguir adelante con determinación.

A la Universidad de Antioquia, mi alma máter, por formarme como profesional en Ciencia y Tecnología de Alimentos, y a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), por brindarme la oportunidad de culminar la homologación en Ingeniería de Alimentos. En la UNAD aprendí a pensar, sentir y actuar como ingeniero; allí comprendí la esencia de la ingeniería aplicada a los alimentos. Mi más sincero agradecimiento a los tutores por su orientación y compromiso, y de manera especial a la ingeniera Carolina León Virgüez, cuyo conocimiento, apoyo y gestión fueron decisivos para articularme a la investigación y hacer realidad este proyecto. Sin su ayuda, este logro no habría sido posible.

Finalmente, a todas las personas que, con sus palabras, enseñanzas o gestos de aliento, contribuyeron a que pudiera culminar esta etapa. No fue sencillo emprender el reto de cursar un segundo pregrado, pero gracias a su respaldo, el camino fue más llevadero.

Y a ti, querido lector, gracias por tu atención e interés en este trabajo.

## Resumen

Las enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus tipo 2, representan un problema creciente de salud pública asociado con dietas ricas en carbohidratos de rápida digestión. En este contexto, la búsqueda de inhibidores naturales de enzimas digestivas y de compuestos antioxidantes derivados de fuentes no convencionales cobra especial relevancia. Este estudio evaluó las propiedades bioactivas de un hidrolizado proteico de *Eisenia fetida* (lombriz roja californiana), con énfasis en su potencial antidiabético y antioxidante, así como su comportamiento fisiológico durante la digestión *in vitro* y su modulación por matrices alimenticias. El hidrolizado se obtuvo mediante hidrólisis secuencial con Alcalasa y Flavourzyme, alcanzando un grado de hidrólisis moderado (~10 %) y un perfil peptídico predominante de 2–6 kDa. Se registraron valores elevados de actividad antioxidante, especialmente en ABTS ( $2138,3 \pm 42,2 \mu\text{mol ET/g proteína}$ ) y capacidad quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $25,6 \pm 0,2 \%$ ). En los ensayos enzimáticos, el hidrolizado presentó una inhibición significativa de la  $\alpha$ -amilasa ( $\text{IC}_{50} = 3,6 \text{ mg/mL}$ ) con un modo de inhibición no competitivo, caracterizado por la reducción de  $V_{max}$  y una leve variación en  $K_m$ , mientras que la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa fue baja. La digestión *in vitro* demostró que su incorporación en matrices alimenticias puede modular la liberación de péptidos activos durante el tránsito gastrointestinal simulado. En conjunto, los resultados respaldan el potencial nutracéutico del hidrolizado de *E. fetida* como fuente de péptidos antioxidantes e inhibidores enzimáticos aplicables en el desarrollo de alimentos funcionales orientados al control de la glucemia postprandial.

**Palabras clave:** Péptidos, antioxidantes, nutracéuticos, bioactividad, digestibilidad

## Abstract

Metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus represent an increasing public health concern associated with diets rich in rapidly digestible carbohydrates. In this context, the search for natural inhibitors of digestive enzymes and antioxidant compounds derived from unconventional sources has gained special relevance. This study evaluated the bioactive properties of a protein hydrolysate from *Eisenia fetida* (red Californian earthworm), focusing on its antidiabetic and antioxidant potential, as well as its physiological behavior during *in vitro* digestion and modulation by food matrices. The hydrolysate was obtained through sequential hydrolysis using Alcalase and Flavourzyme, achieving a moderate degree of hydrolysis (~10%) and a predominant peptide profile of 2–6 kDa. High antioxidant activity was observed, particularly in the ABTS assay ( $2138.3 \pm 42.2 \mu\text{mol TE/g protein}$ ) and in  $\text{Fe}^{2+}$ -chelating capacity ( $25.6 \pm 0.2\%$ ). In enzymatic assays, the hydrolysate exhibited significant inhibition of  $\alpha$ -amylase ( $\text{IC}_{50} = 3.6 \text{ mg/mL}$ ) with a noncompetitive inhibition mode characterized by a reduction in  $V_{max}$  and a slight variation in  $K_m$ , whereas  $\alpha$ -glucosidase inhibition was low. The *in vitro* digestion assay demonstrated that its incorporation into food matrices can modulate the release of active peptides during simulated gastrointestinal transit. Overall, the results support the nutraceutical potential of *E. fetida* hydrolysate as a source of antioxidant and enzyme-inhibitory peptides applicable to the development of functional foods aimed at postprandial glycemic control.

**Keywords:** Peptides, antioxidants, nutraceuticals, bioactivity, digestibility.

## Tabla de Contenido

Introducción .....	15
Justificación .....	19
Marco teórico .....	21
Hidrólisis de proteínas y péptidos bioactivos.....	21
Lumbricultura y aplicaciones en biotecnología .....	25
Digestión del almidón .....	27
Estado del arte.....	31
Hidrolizados proteicos de <i>Eisenia fetida</i> y sus aplicaciones.....	31
Digestión <i>in vitro</i> .....	33
Acarbosa como estándar comparativo.....	35
Objetivos.....	37
Objetivo general .....	37
Objetivos específicos.....	37
Metodología .....	38
Obtención y preparación del sustrato de <i>Eisenia fetida</i> .....	38
Determinación del contenido proteico de <i>Eisenia fetida</i> .....	39
Hidrólisis enzimática secuencial de <i>Eisenia fetida</i> .....	40
Determinación de grado de hidrólisis (GH %).....	41

Preparación de hidrolizados y diluciones.....	42
Ensayo <i>in vitro</i> para la determinación de la inhibición de la $\alpha$ -amilasa .....	42
Modelado de la relación dosis-respuesta y determinación del IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> .....	47
Determinación de parámetros cinéticos de la $\alpha$ -amilasa en presencia y ausencia de HLRC.....	48
Determinación de la inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa por el HLRC .....	51
Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC .....	55
Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS .....	55
Determinación de la capacidad quelante de hierro (Fe <sup>2+</sup> -ferrozina).....	56
Cromatografía de exclusión molecular .....	56
Liofilización del hidrolizado proteico de <i>Eisenia fetida</i> .....	57
Elaboración de galletas enriquecidas con hidrolizado liofilizado de <i>Eisenia fetida</i> (HLRC-L)	57
Digestión <i>in vitro</i> empleando el protocolo INFOGEST.....	59
Determinación de azúcares reductores y digestibilidad del almidón .....	61
Resultados y discusión.....	64
Obtención y preparación del sustrato de <i>Eisenia fetida</i> .....	64
Cuantificación de proteínas en <i>Eisenia fetida</i> .....	64
Hidrólisis enzimática secuencial de proteínas de <i>Eisenia fetida</i> .....	68
Actividad biológica de los hidrolizados proteicos de <i>Eisenia fetida</i> .....	70

Actividad inhibitoria sobre la $\alpha$ -amilasa.....	71
Análisis cinético del modo de inhibición del HLRC sobre $\alpha$ -amilasa.....	81
Actividad inhibitoria sobre la $\alpha$ -glucosidasa .....	83
Perfil de distribución de masa molecular del hidrolizado proteico de <i>Eisenia fetida</i> .....	91
Actividad antioxidante del hidrolizado de <i>Eisenia fetida</i> .....	94
Evaluación de la digestibilidad del almidón en productos horneados enriquecidos con HLRC-L .....	96
Impacto del HLRC-L sobre la liberación de azúcares .....	99
Digestibilidad <i>in vitro</i> del almidón en galletas funcionales enriquecidas con HLRC-L.....	100
Conclusiones.....	104
Recomendaciones .....	106
Referencias bibliográficas.....	108

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Diluciones del hidrolizado proteico de Eisenia fetida (HLRC)</i> .....	42
<b>Tabla 2</b> <i>Formulación base de la masa de galletas previa al enriquecimiento con hidrolizado proteico de LRC</i> .....	58
<b>Tabla 3</b> <i>Formulación de galletas con distintos niveles de enriquecimiento con HLRC</i> .....	59
<b>Tabla 4</b> <i>Composición química de las soluciones empleadas en la digestión in vitro</i> .....	60
<b>Tabla 5</b> <i>Contenido de proteína total en LRC y sus derivados</i> .....	65
<b>Tabla 6</b> <i>Inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa por el hidrolizado proteico de LRC</i> .....	71
<b>Tabla 7</b> <i>Parámetros estimados mediante el modelo 4PL para la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa por HLRC</i> .....	75
<b>Tabla 8</b> <i>Concentraciones efectivas (EC) estimadas para el HLRC en la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa</i> .....	76
<b>Tabla 9</b> <i>Valores de <math>IC_{50}</math> reportados para la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa por distintos hidrolizados proteicos</i> .....	80
<b>Tabla 10</b> <i>Parámetros cinéticos de la <math>\alpha</math>-amilasa con y sin HLRC estimados mediante el modelo de Michaelis-Menten</i> .....	83
<b>Tabla 11</b> <i>Inhibición de la <math>\alpha</math>-glucosidasa por el hidrolizado proteico de Eisenia fetida (HLRC)</i> .....	84
<b>Tabla 12</b> <i>Inhibición de la <math>\alpha</math>-glucosidasa por acarbosa</i> .....	87

<b>Tabla 13</b> <i>Perfil de peso molecular del HLRC determinado mediante cromatografía de exclusión molecular</i> .....	91
<b>Tabla 14</b> <i>Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de Eisenia fetida</i> .....	94

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	
<i>Mecanismo de acción de la acarbosa en la digestión de carbohidratos</i> .....	29
<b>Figura 2</b>	
<i>Proceso de beneficio de la lombriz roja californiana</i> .....	39
<b>Figura 3</b>	
<i>Esquema general del procedimiento para la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa</i> .....	44
<b>Figura 4</b>	
<i>Hidrólisis del almidón y detección de azúcares reductores mediante PAHBAH</i> .....	45
<b>Figura 5</b>	
<i>Esquema general del procedimiento para la inhibición de la <math>\alpha</math>-glucosidasa</i> .....	52
<b>Figura 6</b>	
<i>Mecanismo enzimático de la hidrólisis del p-NPG por la <math>\alpha</math>-glucosidasa</i> .....	53
<b>Figura 7</b>	
<i>Galletas con diferentes niveles de adición de hidrolizado proteico liofilizado de</i> <i>Eisenia fetida (HLRC)</i> .....	58
<b>Figura 8</b>	
<i>Evolución del grado de hidrólisis (%GH) de la proteína de Eisenia fetida en función</i> <i>del tiempo</i> .....	69
<b>Figura 9</b>	
<i>Curva dosis-respuesta de la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa por HLRC</i> .....	73
<b>Figura 10</b>	
<i>Curva dosis-respuesta de la inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa empleando acarbosa</i> <i>acarbosa</i> .....	78
<b>Figura 11</b>	
<i>Cinética de la <math>\alpha</math>-amilasa con y sin HLRC: Ajustes mediante el modelo de Michaelis-</i> <i>Menten</i> .....	82
<b>Figura 12</b>	
<i>Curva dosis-respuesta del HLRC sobre la <math>\alpha</math>-glucosidasa ajustada mediante un</i> <i>modelo 4PL</i> .....	85

<b>Figura 13</b> <i>Curva dosis-respuesta de la acarbosa frente a la <math>\alpha</math>-glucosidasa ajustada mediante un modelo 4PL</i> .....	88
<b>Figura 14</b> <i>Perfil cromatográfico de exclusión molecular del HLRC en comparación con un estándar de proteínas</i> .....	92
<b>Figura 15</b> <i>Contenido de azúcares reductores en galletas enriquecidas con hidrolizado proteico de <i>Eisenia fetida</i> (HLRC-L)</i> .....	99
<b>Figura 16</b> <i>Porcentaje de almidón digerido en galletas enriquecidas con hidrolizado proteico de <i>Eisenia fetida</i> (HLRC-L)</i> .....	101

## Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico caracterizado por la resistencia a la insulina y la hiperglucemia crónica, y se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial. Su prevalencia creciente está estrechamente relacionada con factores como la obesidad, el sedentarismo y una dieta alta en carbohidratos refinados, lo que ha llevado a un incremento sostenido de su incidencia tanto en países desarrollados como en desarrollo (OPS-OMS, 2023). La hiperglucemia posprandial, es decir, el aumento de glucosa en sangre después de las comidas constituye un factor determinante en el deterioro metabólico y en la progresión de complicaciones micro y macrovasculares asociadas con la enfermedad.

Una estrategia ampliamente explorada para mitigar la hiperglucemia posprandial consiste en modular la digestión y absorción de carbohidratos. En este sentido, enzimas como la  $\alpha$ -amilasa pancreática y las  $\alpha$ -glucosidasas intestinales desempeñan un papel central al catalizar la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos, liberando unidades de glucosa que posteriormente son absorbidas a nivel intestinal (Chi et al., 2022; Alqahtani et al., 2019; Li et al., 2021; Wang et al., 2020). La inhibición de estas enzimas permite ralentizar la liberación de glucosa, disminuyendo así los picos posprandiales en sangre.

En este contexto, uno de los fármacos de referencia es la acarbosa, un oligosacárido complejo que actúa como inhibidor competitivo y reversible tanto de la amilasa pancreática como de diversas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales. Su mecanismo consiste en unirse al sitio activo de las enzimas, compitiendo directamente con los sustratos (almidón y oligosacáridos), y de este modo retrasa la formación de maltosa, maltotriosa y glucosa libre (Rosak & Mertes, 2012). Este efecto ha demostrado ser eficaz para atenuar la glucemia posprandial y, por tanto, constituye un

modelo terapéutico ampliamente utilizado. Sin embargo, sus limitaciones (como la aparición de efectos gastrointestinales adversos y la variabilidad en la respuesta clínica; Brown et al., 2024) han motivado la búsqueda de alternativas de origen natural, particularmente péptidos bioactivos derivados de alimentos, con similar potencial de inhibición enzimática, pero con menor impacto secundario.

En este sentido, el estudio de inhibidores de origen proteico, especialmente los péptidos generados a partir de procesos de hidrólisis enzimática, representa una vía prometedora para el desarrollo de ingredientes funcionales y nutraceuticos. Estas moléculas podrían ofrecer un doble beneficio: modular la digestión del almidón y, al mismo tiempo, aportar efectos adicionales como actividad antioxidante o antihipertensiva (Sun et al., 2024). Por lo tanto, comprender la interacción de dichos hidrolizados con las enzimas digestivas se convierte en un paso fundamental para el diseño de estrategias dietarias innovadoras frente a la DM2.

En los últimos años, los hidrolizados proteicos han emergido como una fuente importante de péptidos bioactivos con potencial nutraceutico. Si bien la mayoría de las investigaciones se han enfocado en proteínas convencionales como las de origen lácteo, soya o pescado, resulta de particular interés explorar fuentes no convencionales que aporten nuevas oportunidades de innovación. En este sentido, la lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*; LRC) se ha consolidado como una alternativa promisoriosa y poco estudiada para la obtención de hidrolizados proteicos con propiedades biológicas.

Estudios recientes han demostrado que los hidrolizados de *E. fetida* poseen actividad antioxidante significativa, tanto en condiciones de laboratorio como a nivel de escalado piloto, mostrando altos valores de captura de radicales libres y capacidad reductora (Gaviria & Zapata, 2023). De manera complementaria, se ha reportado que las fracciones peptídicas de bajo peso

molecular (<3 kDa) presentan un efecto citoprotector en células intestinales Caco-2 expuestas a estrés oxidativo, reduciendo especies reactivas de oxígeno, restaurando los niveles intracelulares de glutatión y modulando vías moleculares como Keap-1/Nrf2 (Gaviria et al., 2024). Asimismo, otros trabajos han evidenciado un efecto antihipertensivo de estos hidrolizados, con resultados positivos *in vitro* sobre la enzima convertidora de angiotensina (ACE), en modelos *ex vivo* de relajación vascular y en ensayos *in vivo* que mostraron reducciones significativas de la presión arterial comparables a las obtenidas con Captopril (Gaviria et al., 2024). Estos hallazgos posicionan a *E. fetida* como una fuente novedosa de compuestos bioactivos con aplicaciones potenciales en la prevención y manejo de enfermedades crónicas no transmisibles.

El aprovechamiento de esta biomasa no solo aporta valor agregado a los procesos de vermicultura, tradicionalmente enfocados en la producción de abonos orgánicos, sino que también conecta con la necesidad de generar alternativas alimentarias sostenibles capaces de responder a desafíos globales como la DM2. Así, el uso de *E. fetida* integra de manera innovadora aspectos de sostenibilidad ambiental, desarrollo biotecnológico y funcionalidad nutricional.

Por otro lado, la validación del efecto de estos compuestos en matrices alimentarias reales resulta fundamental para su potencial aplicación en el diseño de alimentos funcionales. La incorporación de hidrolizados proteicos en productos como galletas permite evaluar su capacidad de modular la digestión del almidón en condiciones simuladas. En este contexto, el protocolo INFOGEST de digestión *in vitro* se ha consolidado como un estándar internacional para predecir la bioaccesibilidad de nutrientes y estimar la respuesta glucémica, proporcionando un puente entre estudios básicos y aplicaciones clínicas en el manejo dietario de la DM2 (Briceño-Islas et al., 2024; Coelho et al., 2021).

En consecuencia, este estudio tiene como objetivo desarrollar y caracterizar hidrolizados proteicos obtenidos de *Eisenia fetida* mediante hidrólisis enzimática, así como evaluar de manera integral su capacidad para inhibir la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa. Además, se busca analizar su impacto en la digestión *in vitro* del almidón al ser incorporados en matrices alimentarias modelo (galletas), empleando el protocolo INFOGEST como referencia internacional. Con ello, se pretende aportar evidencia científica sobre el potencial de fuentes proteicas no convencionales en la generación de compuestos bioactivos con aplicaciones tanto en el ámbito alimentario como en el farmacéutico, abriendo nuevas oportunidades de innovación, formulación y transferencia tecnológica hacia productos funcionales y nutracéuticos sostenibles.

## Justificación

Los residuos agroindustriales representan un desafío ambiental significativo, y su revalorización mediante procesos biotecnológicos constituye una estrategia clave para mitigar su impacto (Vargas & Pérez, 2018). Entre estas alternativas, la lumbricultura destaca por acelerar la degradación de materia orgánica y producir abonos de alta calidad, además de proveer proteínas no convencionales como la derivada de *Eisenia fetida* (Vielma et al., 2003).

La harina de *E. fetida* sobresale por su alto contenido proteico, aminoácidos esenciales, minerales y ácidos grasos omega-3, con un perfil comparable al de otras harinas animales y especialmente rica en lisina (Bahadori et al., 2017). Paralelamente, extractos de lombrices han mostrado propiedades terapéuticas diversas, incluyendo efectos antioxidantes, antihipertensivos, antimicrobianos y antiinflamatorios (Balamurugan et al., 2008). En particular, el fluido celómico de *E. fetida* presenta actividades citotóxicas, antibacterianas y fibrinolíticas, lo que respalda su potencial biomédico (Bruhn et al., 2006; Wang et al., 2007; Yanqin et al., 2007).

Otras especies como *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus* y *Eudrilus eugeniae* también han sido estudiadas por su capacidad para generar péptidos bioactivos con efectos antioxidantes y antimicrobianos (Rodrigues et al., 2017; Azmi et al., 2014; Aldarraji et al., 2013). Sin embargo, aún son limitadas las investigaciones que exploran hidrolizados enzimáticos de *E. fetida* y sus propiedades biológicas (Lin et al., 2010), lo que abre un campo valioso para la obtención de nuevos productos de alto valor agregado.

Los compuestos bioactivos de *E. fetida* podrían emplearse en el diseño de alimentos funcionales orientados al manejo de enfermedades metabólicas como la DM2. El creciente interés en productos de bajo índice glucémico resalta la importancia de evaluar la digestión del

almidón, cuya velocidad de degradación se asocia directamente con la respuesta glucémica. En este sentido, las simulaciones *in vitro* constituyen una herramienta accesible y reproducible para predecir el comportamiento digestivo y apoyar la formulación de alimentos para la nutrición clínica (Payeras-Perelló, 2022).

Así, esta investigación resulta pertinente en tres dimensiones: (a) ambiental, al aprovechar la lombricultura como estrategia de valorización sostenible de residuos; (b) biotecnológica, al contribuir al desarrollo de péptidos bioactivos con potencial nutracéutico; y (c) clínica, al generar evidencia preliminar para el diseño de alternativas alimentarias que apoyen el control de la DM2. De esta manera, el presente trabajo busca no solo ampliar el conocimiento científico sobre los hidrolizados proteicos de *E. fetida*, sino también sentar bases sólidas para su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales, integrando sostenibilidad, innovación y beneficio nutricional.

## Marco Teórico

### Hidrólisis de proteínas y péptidos bioactivos

Los compuestos bioactivos son nutrientes y no nutrientes que se encuentran en diferentes matrices, capaces de ejercer efectos benéficos en el organismo más allá de su valor nutricional.

Dentro de estos, los derivados proteicos han ganado atención debido a sus propiedades funcionales y biológicas.

Las proteínas pueden ser modificadas por medios físicos, químicos o biológicos con el fin de mejorar sus propiedades tecnológicas (solubilidad, emulsificación, formación de espuma y gelificación), nutricionales (digestibilidad) y biológicas (actividad antioxidante, antihipertensiva, antidiabética y antimicrobiana). La hidrólisis enzimática es una de las estrategias más utilizadas para mejorar la funcionalidad proteica, ya que permite la ruptura de enlaces peptídicos mediante la acción del agua y la catálisis enzimática o química, generando fragmentos de menor peso molecular con nuevas propiedades bioactivas (Benítez et al., 2008). Por medio de este proceso, las proteínas sufren modificaciones en sus propiedades moleculares y funcionales, dando lugar a fragmentos de menor peso molecular, aumento de carga y liberación de grupos hidrofóbicos (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Estas modificaciones pueden mejorar la funcionalidad de las proteínas en términos de textura y sabor, reducir su alergenicidad y generar péptidos bioactivos con propiedades beneficiosas para la salud (Tavano, 2013).

El proceso de hidrólisis se lleva a cabo en condiciones controladas de agitación, pH, temperatura y tiempo. Inicialmente, la proteína se disuelve o suspende en agua y se añade una proteasa. Conforme avanza la reacción, el pH disminuye debido a la liberación de grupos amino, lo que requiere la adición de una base diluida para mantener condiciones óptimas de actividad

enzimática. La reacción se detiene mediante inactivación térmica de la enzima, ajuste del pH a valores extremos o la separación física de la enzima del medio de reacción (Benítez et al., 2008).

El grado de hidrólisis (GH) es un parámetro crucial que determina tanto las propiedades funcionales como biológicas de los hidrolizados proteicos. Un GH bajo, entre 1% y 10%, suele mejorar características tecnológicas como la viscosidad y la textura, lo que favorece su aplicación en alimentos con fines funcionales (Benítez et al., 2008). En cambio, un GH elevado puede emplearse en dietas especializadas o como agente saborizante, ya que mejora la digestibilidad de las proteínas y reduce su potencial alergénico; sin embargo, también puede afectar negativamente propiedades como la emulsificación, la capacidad espumante y la formación de geles (Yin et al., 2008; Yu et al., 2018). Un ejemplo de ello son los hidrolizados de proteína de cacahuete con un GH del 40%, los cuales muestran menor capacidad emulsionante y espumante que la proteína original, pero una mayor actividad antioxidante y de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Jamdar et al., 2010).

Además de su potencial inhibitorio sobre enzimas digestivas, los péptidos bioactivos derivados de la hidrólisis proteica presentan una destacada capacidad antioxidante, atribuida a la presencia de aminoácidos con cadenas laterales capaces de donar electrones o protones, tales como tirosina, triptófano, histidina, metionina y cisteína (Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Zhang et al., 2022). Estas moléculas pueden actuar mediante diversos mecanismos, incluyendo la neutralización directa de radicales libres, la quelación de iones metálicos prooxidantes y la interrupción de reacciones en cadena asociadas con el estrés oxidativo (Udenigwe & Aluko, 2012). Se ha reportado que hidrolizados obtenidos mediante la acción combinada de Alcalasa y Flavourzyme exhiben mayor actividad antioxidante que aquellos tratados con una sola enzima, debido a la liberación de péptidos de bajo peso molecular y a la exposición de residuos

aromáticos reactivos (Rezvankhah et al., 2021). En este sentido, la evaluación de la capacidad antioxidante mediante ensayos como ORAC, ABTS o DPPH constituye un criterio esencial para valorar el potencial nutracéutico de los hidrolizados proteicos destinados a aplicaciones funcionales en alimentos (Chen et al., 2020).

Las proteasas utilizadas en la hidrólisis proteica pueden clasificarse según su origen (animal, vegetal o microbiano), su especificidad (endopeptidasas y exopeptidasas) y la naturaleza de su centro catalítico (serina, cisteína, ácido aspártico o metaloproteasas) (Benítez et al., 2008). En la industria alimentaria, se emplean enzimas comerciales como Alcalasa® y Flavourzyme®. La Alcalasa 2.4L, es una endopeptidasa de tipo serina producida por *Bacillus licheniformis*, exhibe su máxima actividad a temperaturas entre 45 y 65°C y pH de 7,5 – 9,5. Por su parte, Flavourzyme 500MG, producida por *Aspergillus oryzae*, posee actividad endopeptidasa y exopeptidasa, con un pH óptimo de 5 - 8 y temperaturas entre 50 y 60°C (Zapata et al., 2019). Esta última se usa principalmente para reducir el amargor en hidrolizados proteicos (Xu et al., 2020).

Se ha observado que la hidrólisis enzimática con una sola enzima puede resultar en un bajo GH y la formación de péptidos con un alto grado de amargor. Para mitigar este problema, se ha propuesto la hidrólisis secuencial, que emplea dos o más enzimas con especificidades diferentes. Esta estrategia ha demostrado ser efectiva para generar péptidos de menor peso molecular con mejor perfil sensorial y mayor bioactividad. Por ejemplo, la combinación de Alcalasa y Flavourzyme ha mostrado mejorar significativamente las propiedades bioactivas de los hidrolizados (Rezvankhah et al., 2021).

Los péptidos bioactivos resultantes de la hidrólisis proteica exhiben diversas actividades biofuncionales dependiendo de su estructura y secuencia. En particular, se han identificado como

inhibidores naturales de la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, enzimas clave en la digestión de carbohidratos (Chandimali et al., 2024). Estos interactúan con los sitios activos y alostéricos de la enzima, alterando su funcionalidad. En particular, los hidrolizados de proteínas de lombriz (*Perionyx excavatus*) han mostrado una capacidad inhibitoria significativa, alcanzando niveles comparables a los de inhibidores comerciales como la acarbosa (Bui et al., 2023). Estas propiedades se atribuyen a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y alifáticos, como leucina, metionina y alanina, que favorecen las interacciones hidrofóbicas críticas para la inhibición enzimática (Siahbalaei et al., 2021).

Dado que estos péptidos provienen de fuentes alimentarias, se consideran seguros para el consumo humano (Siow & Gan, 2016). La creciente demanda de alimentos funcionales ha impulsado la investigación y aplicación industrial de hidrolizados proteicos con propiedades biológicas específicas, consolidando la hidrólisis enzimática como una herramienta clave en el desarrollo de ingredientes con valor añadido (Dullius et al., 2018).

La gran variedad de sustancias naturales aún sin explorar ofrece una posibilidad de cambio al tratamiento de enfermedades como la DM2 que tradicionalmente han estado abastecidas por fármacos costosos, poco activos y con efectos secundarios no deseados (Lozada, 2023).

Los péptidos bioactivos están clasificados como una droga contemporánea, que presentan diferentes ventajas sobre otras categorías. Por ejemplo, comparado con otras moléculas pequeñas usadas convencionalmente como drogas, los péptidos tienen el potencial para una mayor especificidad, junto con mejores perfiles de seguridad. En comparación con los productos biológicos grandes, los péptidos pequeños son más baratos de producir debido a una mayor facilidad para su estandarización y control de calidad. Más de 7000 péptidos, con diversos roles

en la fisiología humana, han sido identificados a partir de una amplia variedad de fuentes naturales. Así, la versatilidad en las actividades biológicas que presentan los péptidos, sumado a su alta especificidad, potencia, seguridad y baja toxicidad, han llevado a que actualmente más de 60 péptidos estén aprobados o en proceso final de aprobación para el tratamiento de enfermedades humanas, y más de 600 moléculas peptídicas estén actualmente en desarrollo clínico y preclínico (Li et al., 2018).

### **Lumbricultura y aplicaciones en biotecnología**

Los residuos agroindustriales representan un desafío ambiental significativo a nivel global, requiriendo soluciones sostenibles que permitan su revaloración para mitigar los efectos negativos derivados de su vertido (Corredor & Pérez, 2018). En este contexto, la lumbricultura surge como una alternativa biotecnológica de gran potencial, al emplear lombrices de tierra para acelerar la degradación y mineralización de residuos orgánicos, transformándolos en abonos de alta calidad. Este método no solo contribuye al manejo de residuos, sino también al enriquecimiento del suelo agrícola y a la producción de proteínas no convencionales, destacándose entre estas la carne y la harina de lombriz (Vielma et al., 2003).

La LRC pertenece al grupo de los macroinvertebrados (*Oligochaeta*), es ampliamente conocida por su capacidad de mejorar la fertilidad y productividad del suelo a través del vermicompostaje. Esta especie posee un alto contenido proteico, que varía entre el 60 y 70% en peso seco (Gaviria & Zapata, 2024), lo que la convierte en una fuente alternativa de proteínas con aplicaciones potenciales tanto en la alimentación animal como humana.

La harina de lombriz, especialmente elaborada a partir de LRC, es valorada por su perfil nutricional, que incluye proteínas de alta calidad, aminoácidos esenciales, minerales, ácidos grasos esenciales y vitaminas. Su composición nutricional se compara favorablemente con

fuentes proteicas tradicionales como la harina de pescado y la harina de carne y hueso, sobresaliendo por su alto contenido de lisina, esencial para el desarrollo y engorde de diversos animales (Bahadori et al., 2017).

Aunque el uso más conocido de las lombrices de tierra está relacionado con la producción de abono orgánico (Karsten & Drake, 1997), su aplicación terapéutica también ha sido documentada desde tiempos antiguos, particularmente en culturas como la china e hindú, y su uso persiste en la actualidad, principalmente en forma de polvo (Pan et al., 2010). Además, se ha informado que los péptidos de las lombrices de tierra actúan como agentes bacteriostáticos (Wang et al., 2007), y sus proteínas y nutrientes poseen un gran potencial para la nutrición animal (Sun & Jiang, 2017). Las lombrices poseen propiedades medicinales que incluyen efectos antipiréticos, diuréticos, antiespasmódicos, antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, entre otros (Balamurugan et al., 2008; Pan et al., 2010). En la actualidad, diversos compuestos bioactivos derivados de lombrices, como glicolipoproteínas, polisacáridos y enzimas fibrinolíticas, están siendo investigados por su potencial farmacológico (Zhao et al., 2005; Sun, 2015).

Específicamente, el fluido celómico de *E. fetida* y otras especies como *Lumbricus rubellus* y *Eudrilus eugeniae* han mostrado propiedades antimicrobianas, antioxidantes y citolíticas, atribuibles a la presencia de proteínas, péptidos y compuestos bioactivos (Rodriguez et al., 2017; Azmi et al., 2014; Aldarraji et al., 2013). Además, los estudios modernos han identificado componentes como lumbrofebrina, terrestrolumbrilysina, y diversas purinas y pirimidinas, que son de interés en el ámbito biomédico por sus posibles aplicaciones terapéuticas (Takei et al., 2004; Augustine et al., 2019; Sun & Jiang, 2017).

Yanqin y col. (2007) han reportado la inhibición de la viabilidad e inducción de la apoptosis de células HeLa, y Dinesh y col. (2013) investigaron los extractos obtenidos de lombrices de tierra y sus diversas actividades biológicas. Los autores reportaron que estos extractos poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. Además, se observó que los extractos de lombriz de tierra pueden inducir mecanismos de defensa en plantas, mejorando su resistencia a patógenos. En cuanto a la salud humana, los extractos mostraron potencial en la promoción de la cicatrización de heridas y en la modulación del sistema inmunológico. Estos hallazgos sugieren que los derivados de lombrices de tierra podrían tener aplicaciones tanto en la agricultura sostenible como en la medicina.

La lumbricultura no solo representa una herramienta eficaz para la gestión de residuos y la producción de abono, sino que también abre la puerta a aplicaciones innovadoras en la industria alimentaria y farmacéutica. La creciente investigación en torno a los compuestos bioactivos derivados de lombrices de tierra destaca su relevancia en campos como la nutrición, la medicina y la sostenibilidad ambiental.

### **Digestión del almidón**

La digestión humana es un proceso mecánico y químico complejo que transforma los alimentos en nutrientes absorbibles. El almidón, principal carbohidrato de la dieta, constituye una fuente esencial de energía en la alimentación humana y está formado por cadenas lineales de amilosa y ramificadas de amilopectina. Este polisacárido inicia su hidrólisis en la cavidad bucal por acción de la  $\alpha$ -amilasa salival, y continúa en el intestino delgado mediante la  $\alpha$ -amilasa pancreática, produciendo oligosacáridos, disacáridos (como la maltosa) y finalmente glucosa libre. Esta es absorbida por el epitelio intestinal y utilizada en el metabolismo energético o almacenada en forma de glucógeno.

Además de la  $\alpha$ -amilasa, otras enzimas situadas en el borde estriado del intestino delgado, como la maltasa-glucoamilasa y la isomaltasa-sucrasa, completan la degradación de los productos intermedios de la hidrólisis del almidón. La eficiencia de este proceso no solo depende de la fuente del almidón (trigo, maíz, arroz, papa), sino también de su estructura molecular (p. ej., proporción de enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, organización helicoidal, cristalinidad), del procesamiento térmico aplicado y de la interacción con otros macronutrientes, como lípidos y proteínas, que pueden formar complejos o barreras físicas. Estas interacciones afectan la accesibilidad de las enzimas digestivas al sustrato, alterando la tasa de digestión y el perfil de liberación de glucosa (Payeras-Perelló, 2023; Talibov, 2017).

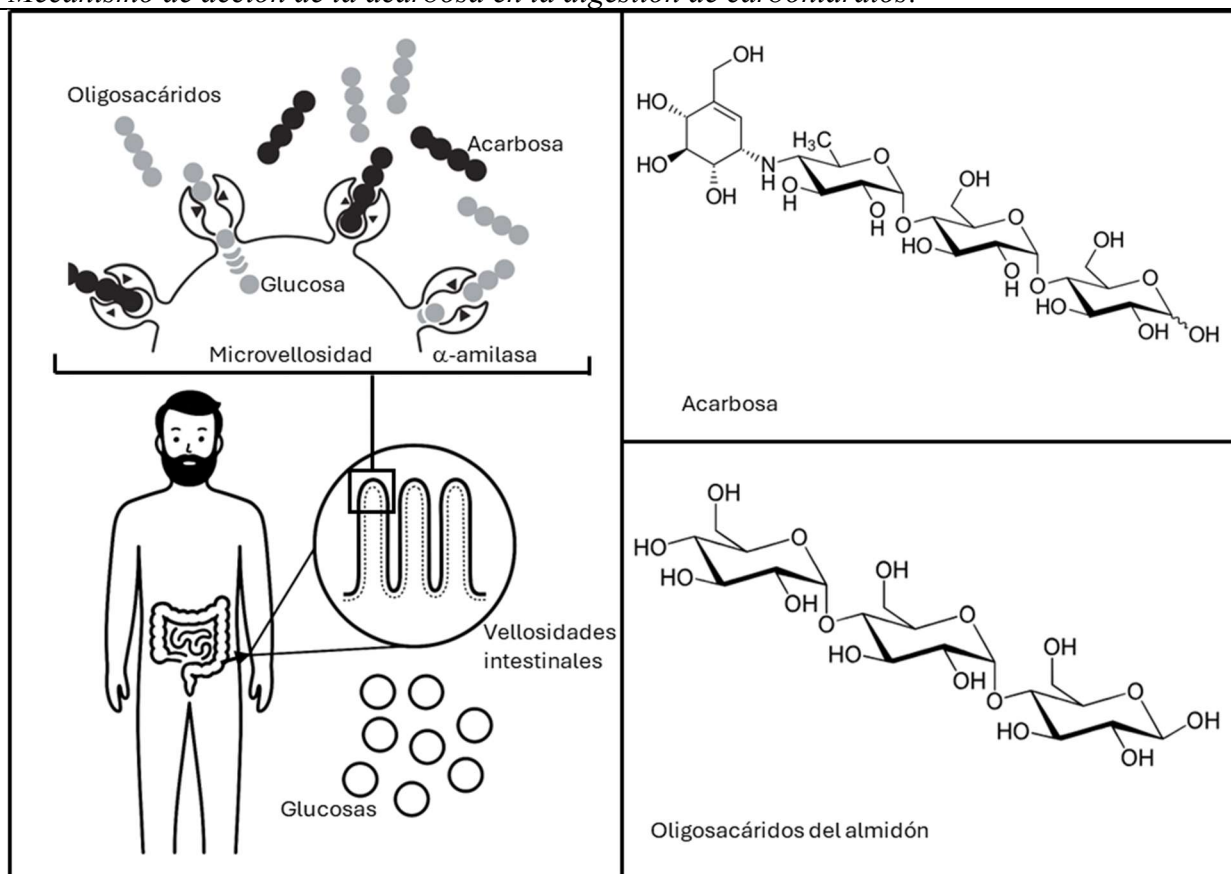
Una digestión rápida del almidón se asocia con picos hiperglucémicos postprandiales, lo que puede contribuir a un deterioro progresivo en la secreción de insulina y al desarrollo de enfermedades crónicas como obesidad y diabetes tipo 2 (Lu et al., 2023). Por esta razón, se han propuesto diversas estrategias dietarias orientadas a reducir o retardar la digestión del almidón. Estas estrategias incluyen la incorporación de compuestos no amiláceos (proteínas, polifenoles, lípidos o fibras no digeribles) que modulan la digestibilidad del almidón por diferentes mecanismos: (i) formando complejos fisicoquímicos con el almidón que impiden la acción enzimática, (ii) alterando la estructura fina del almidón, (iii) interfiriendo con la actividad de las enzimas digestivas (Chi et al., 2022).

En este contexto, un referente ampliamente estudiado es la acarbosa, un oligosacárido complejo utilizado clínicamente como antidiabético oral. La acarbosa actúa como inhibidor competitivo y reversible de la  $\alpha$ -amilasa pancreática y de diversas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales, uniéndose al sitio activo de estas enzimas y bloqueando el acceso del sustrato natural (almidón y derivados). De esta manera, reduce la velocidad de liberación de glucosa absorbible y contribuye

a atenuar la hiperglucemia postprandial (Chiasson et al., 2002; Van de Laar, 2008). La Figura 1 ilustra este mecanismo, destacando cómo la acarbosa ocupa el sitio catalítico en la superficie de las vellosidades intestinales, interfiriendo con la hidrólisis enzimática de los oligosacáridos.

**Figura 1.**

*Mecanismo de acción de la acarbosa en la digestión de carbohidratos.*



*Nota.* La figura muestra cómo la acarbosa y los oligosacáridos del almidón interactúan con el sitio activo de la  $\alpha$ -amilasa pancreática y de las  $\alpha$ -glucosidasas del borde en cepillo intestinal. Elaboración propia a partir de Rosak y Mertes (2012). Estructura química de la acarbosa: imagen de dominio público tomada de Wikimedia Commons (Yikrazuul, 2009). Estructura química de la maltotriosa: imagen de dominio público tomada de Wikimedia Commons (Yikrazuul, 2010).

En este punto, los métodos de digestión *in vitro* se han posicionado como herramientas clave para estudiar la digestibilidad del almidón, estimar su índice glicémico potencial y predecir la bioaccesibilidad de glucosa. Los modelos *in vitro* pueden clasificarse en estáticos, semi-

dinámicos o dinámicos. Aunque los modelos dinámicos imitan de forma más precisa las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal (secreción enzimática, cambios de pH, peristaltismo), los modelos estáticos, como el protocolo INFOGEST, son ampliamente utilizados por su simplicidad, reproducibilidad y validación interlaboratorio (Brodkorb et al., 2019).

Comprender los factores estructurales del almidón y las interacciones con otros componentes dietarios es esencial para el diseño de alimentos funcionales con bajo índice glicémico. Los estudios actuales destacan el potencial de ciertos hidrolizados proteicos para modular la digestión del almidón al formar complejos con este polisacárido, reduciendo así su tasa de digestión en condiciones gastrointestinales simuladas (Lu et al., 2023).

### **Estado del arte**

La gestión sostenible de residuos agroindustriales ha cobrado relevancia en las últimas décadas, enfocándose en su revalorización para mitigar impactos ambientales y generar productos de alto valor añadido. La lumbricultura, en particular, se ha destacado como una técnica eficaz para transformar residuos orgánicos en abonos de calidad y proteínas alternativas.

La LRC es ampliamente utilizada en procesos de vermicompostaje debido a su capacidad para descomponer materia orgánica y producir humus rico en nutrientes. Además, su biomasa es una fuente prometedora de proteínas y péptidos bioactivos. Estudios recientes han evaluado la hidrólisis enzimática de proteínas de *E. fetida* utilizando diferentes proteasas comerciales, como Alcalasa 2.4L, Flavourzyme y Neutrasa. Los resultados indican que Alcalasa 2.4L es la más eficiente, alcanzando un grado de hidrólisis del 13,02%, lo que sugiere su potencial para producir hidrolizados proteicos aplicables en la industria alimentaria (Gómez-Sampedro et al., 2022).

### **Hidrolizados proteicos de *Eisenia fetida* y sus potenciales aplicaciones**

El interés en los hidrolizados proteicos de *E. fetida* ha crecido debido a la diversidad de compuestos bioactivos que pueden obtenerse mediante hidrólisis enzimática. Investigaciones previas realizadas por Gaviria (2024), quien evaluó la actividad biológica de hidrolizados proteicos obtenidos de *E. fetida* y sus fracciones separadas por ultrafiltración tangencial. Sus resultados mostraron que tanto los hidrolizados como sus fracciones poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, lo que sugiere su potencial aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

Gaviria y Zapata, (2023) investigaron cómo el fraccionamiento mediante membranas influye en la actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteínas de *E. fetida*. Se encontró que las fracciones obtenidas presentaron diferentes niveles de actividad antioxidante y

capacidad de quelación de hierro, destacando la importancia del fraccionamiento para potenciar las propiedades bioactivas de los hidrolizados.

Gómez-Sampedro y col. (2022) exploraron la eficiencia de la hidrólisis enzimática de proteínas de *E. fetida* utilizando varias proteasas, entre ellas Alcalasa 2.4L y Flavourzyme 500MG. Los resultados indicaron que es posible obtener hidrolizados con propiedades tecnofuncionales y biológicas relevantes, lo que sugiere su potencial uso en la industria alimentaria.

Por su parte, Vielma y col., (2003) evaluaron el contenido proteico de la harina de *E. fetida*, encontrando que supera el 60% en base seca. Además, se identificó que proporciona aminoácidos esenciales para la dieta humana, posicionándola como una fuente proteica alternativa y económica

A pesar del creciente interés en los hidrolizados proteicos de *E. fetida*, su aplicación en la industria nutracéutica y farmacéutica sigue siendo limitada. Estudios recientes han sugerido su potencial en la formulación de suplementos alimenticios y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Sin embargo, hasta la fecha, no existen investigaciones que evalúen su actividad sobre enzimas amilolíticas como la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa, las cuales desempeñan un papel clave en la regulación de la glucosa en sangre. La exploración de esta posible actividad inhibitoria podría abrir nuevas oportunidades para el uso de estos hidrolizados en el manejo de enfermedades como la DM2, lo que resalta la necesidad de estudios adicionales que profundicen en su mecanismo de acción y aplicaciones terapéuticas.

La obtención de péptidos bioactivos a partir de proteínas animales y vegetales ha sido objeto de investigación debido a sus propiedades beneficiosas para la salud. En particular, la

inhibición de enzimas como  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa es una estrategia para controlar la hiperglucemia posprandial en pacientes diabéticos. Aunque se han identificado péptidos con capacidad inhibitoria de estas enzimas en algunas proteínas alimentarias como las proteínas de soya germinada (Pizaña-Cisneros, 2023), la investigación sobre hidrolizados enzimáticos de *E. fetida* y sus propiedades inhibitorias es limitada. No obstante, la actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de péptidos derivados de otras fuentes sugiere un potencial similar en hidrolizados de *E. fetida* (López-Martínez et al., 2014).

Por lo tanto, la integración de residuos agroindustriales en procesos de lombricultura para la producción de proteínas y péptidos bioactivos representa una estrategia sostenible y prometedora. La hidrólisis enzimática de proteínas de *E. fetida* ha mostrado resultados alentadores en la obtención de hidrolizados con potencial aplicación en la industria alimentaria.

### **Digestión *in vitro***

Diversos estudios han empleado modelos *in vitro* para estudiar la digestión del almidón, especialmente con fines de predicción del índice glucémico. Sin embargo, la mayoría de estos modelos utilizan enzimas en condiciones no fisiológicas (pH no ajustado, temperatura inferior a 37 °C, ausencia de electrolitos digestivos) y rara vez consideran la interacción del almidón con otros macronutrientes. El modelo INFOGEST ha proporcionado un protocolo estándar para digestiones *in vitro*. Payeras-Perelló (2022) realizó comparación entre digestión estática y dinámica, así como la evaluación de fuentes alternativas de enzimas digestivas como  $\alpha$ -amilasa, pepsina y lipasa. La autora valida su modelo comparando el IG *in vitro* con valores *in vivo* publicados. Además, explora cómo la presencia de lípidos o proteínas en la matriz alimentaria puede modular significativamente la digestibilidad del almidón, mostrando que el grado de

solubilización y desintegración del alimento impacta directamente en la disponibilidad de glucosa.

En los últimos años, se ha intensificado el uso de protocolos de digestión *in vitro* para evaluar cómo los hidrolizados proteicos modulan la digestión del almidón y la bioaccesibilidad nutricional en matrices alimentarias reales. Por ejemplo, Agba y col. (2024) demostraron que agregar *Moringa oleífera* en polvo descolorido a galletas de trigo mejoró su composición nutricional y alteró su digestibilidad *in vitro* de proteínas. Por su parte, Moretton y col. (2024) evaluaron pan enriquecido con concentrado de proteína de alverja tratado mediante homogeneización a alta presión, encontrando cambios significativos en la digestibilidad proteica y en la fermentabilidad colónica simulada, especialmente diseñados para población adulta mayor. Además, Pérez-Gálvez y col. (2024), exploraron hidrolizados proteicos derivados de subproductos agroindustriales y evaluaron, bajo digestión gastrointestinal simulada, su capacidad para inhibir la enzima DPP-IV, asociada a la regulación glucémica. Por último, Dávila-León y col. (2023) revisaron críticamente la evolución de los métodos estáticos de digestión *in vitro* aplicados a alimentos ricos en carbohidratos, destacando el uso creciente del protocolo INFOGEST como estándar en investigación actual.

El modelo de digestión *in vitro* se ha consolidado como una herramienta clave para evaluar la bioaccesibilidad y la estabilidad de compuestos bioactivos a lo largo del tránsito gastrointestinal (Briceño-Islas et al., 2024; Coelho et al., 2021). Diversos estudios han evidenciado que los hidrolizados proteicos, cuando son incorporados en matrices alimentarias como panes, galletas y bebidas funcionales, pueden liberar péptidos bioactivos durante la digestión, los cuales mantienen su capacidad de inhibir enzimas como la  $\alpha$ -amilasa (Coelho et al., 2021). Esta propiedad resulta especialmente relevante en alimentos con alto contenido de

almidón, ya que la modulación de la actividad enzimática podría contribuir al control de la respuesta glucémica postprandial. Estas investigaciones han aportado evidencia de que los péptidos liberados durante la hidrólisis enzimática no solo conservan su bioactividad durante el tránsito gastrointestinal, sino que también pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre enzimas amilolíticas en condiciones simuladas. De esta manera, la digestión *in vitro* se perfila como una herramienta confiable para predecir el impacto fisiológico de alimentos enriquecidos con proteínas bioactivas.

### **Acarbosa como estándar comparativo**

Diversos estudios han empleado la acarbosa como estándar de comparación en la evaluación de inhibidores naturales de enzimas digestivas. Por ejemplo, extractos de leguminosas, algas y productos marinos han sido contrastados con la eficacia inhibitoria de este fármaco, que actúa como inhibidor competitivo de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasas (Rosak & Mertes, 2012; Kwon et al., 2008). Esta práctica experimental permite establecer un marco de referencia cuantitativo y clínicamente validado, de modo que los resultados de los compuestos bioactivos puedan compararse con un inhibidor reconocido. En este sentido, la inclusión de la acarbosa como control positivo en el presente trabajo se alinea con estrategias metodológicas previamente reportadas en la literatura.

A pesar de los avances mencionados, la mayoría de los trabajos se han enfocado en fuentes convencionales de proteínas (soya, lácteos, pescado), mientras que el uso de proteínas derivadas de *E. fetida* se ha limitado principalmente a la caracterización de su bioactividad antioxidante, antihipertensiva o antimicrobiana en sistemas modelo (Gaviria & Zapata, 2023; Gaviria et al., 2024). Hasta la fecha, son escasos los estudios que han evaluado el efecto de los hidrolizados de *E. fetida* sobre la digestión del almidón en matrices alimentarias reales. Este

vacío en la literatura justifica la necesidad de investigaciones como la presente, que buscan integrar la obtención de hidrolizados proteicos de lombriz roja californiana con su aplicación en alimentos de consumo habitual, como las galletas, a fin de determinar su influencia en la liberación de azúcares reductores y su potencial efecto modulador del índice glucémico.

## Objetivos

### Objetivo General

Desarrollar y caracterizar hidrolizados proteicos obtenidos de *Eisenia fetida* mediante hidrólisis enzimática, evaluando su actividad antioxidante, su capacidad inhibidora sobre enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa) y su efecto sobre la digestión *in vitro* del almidón en matrices alimentarias enriquecidas.

### Objetivos Específicos

Obtener hidrolizados proteicos de *Eisenia fetida* mediante hidrólisis enzimática secuencial con Alcalasa® y Flavourzyme®.

Caracterizar los hidrolizados obtenidos mediante la determinación de su grado de hidrólisis, perfil peptídico y propiedades fisicoquímicas relevantes.

Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los hidrolizados proteicos mediante los ensayos ABTS, DPPH y capacidad quelante de hierro.

Determinar la capacidad inhibitoria *in vitro* de los hidrolizados y de la acarbosa (control positivo) sobre la actividad de  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa

Analizar parámetros cinéticos ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ) para establecer el tipo y mecanismo de inhibición ejercido por los hidrolizados sobre la  $\alpha$ -amilasa.

Evaluar el efecto de los hidrolizados sobre la digestión *in vitro* del almidón en galletas enriquecidas, utilizando el protocolo estático INFOGEST.

## Metodología

### Obtención y preparación del sustrato de *Eisenia fetida*

La LRC fue adquirida de manera comercial a través de un proveedor especializado (Lombricultura de Tenjo, Cundinamarca, Colombia) y transportada en su sustrato original de crianza hasta el laboratorio. Una vez recibidas, las lombrices fueron separadas manualmente del sustrato y sometidas a un proceso de limpieza para remover partículas sólidas, residuos orgánicos y otros contaminantes.

Para llevar a cabo la purga intestinal, las lombrices fueron sumergidas en una solución acuosa de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ , 1% m/v) durante 4 horas a una temperatura de 25 °C. Este paso permitió reducir el contenido intestinal y minimizar posibles interferencias durante las etapas posteriores de procesamiento. A continuación, se realizó un segundo lavado con agua corriente para eliminar los residuos de la solución de bicarbonato.

Posteriormente, se aplicó un tratamiento de beneficio mediante inmersión en una solución salina de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$  al 7% m/v) durante 30 minutos a 25 °C, con el fin de facilitar la desnaturalización superficial de tejidos y mejorar la recuperación de biomasa proteica.

Finalmente, se efectuó un tercer lavado exhaustivo con agua potable para retirar cualquier residuo salino.

El material biológico obtenido fue escurrido para eliminar el exceso de humedad, envasado en bolsas de polietileno estériles y almacenado a  $-20$  °C hasta su posterior utilización en los procesos de hidrólisis enzimática (Fig. 1).

**Figura 2.***Proceso de beneficio de la lombriz roja californiana.*

**A. Beneficio** (NaCl 7% m/v) 30 min. 25°C



**B. Lavado**



**C. Ecurrido**



**D. Envasado y almacenamiento**

*Nota.* A) Beneficio en solución de NaCl al 7 % m/v durante 30 min a 25 °C; B) lavado; C) escurrido; y D) envasado y almacenamiento. Fotografías de elaboración propia.

### **Determinación del contenido proteico de *Eisenia fetida***

El contenido de proteína total se determinó mediante el método de Kjeldahl, siguiendo las condiciones establecidas por la AOAC (2005). La digestión de las muestras se realizó en un sistema especializado (Velp, Italia) y los resultados se expresaron como porcentaje de proteína total, aplicando el factor de conversión 6,25.

### **Hidrólisis enzimática secuencial de proteínas de *Eisenia fetida***

El sustrato de LRC se descongeló y se preparó en agua desionizada hasta alcanzar una concentración final de 15 g/L de proteína. La hidrólisis enzimática secuencial se efectuó en un reactor de vidrio de borosilicato con capacidad de 0,5 L y provisto de camisa para circulación de agua, manteniendo la temperatura constante en 47 °C mediante un recirculador termostatado (PolyScience, EUA). La mezcla reaccionante se mantuvo bajo agitación a 240 rpm con un agitador magnético (Radleys, Reino Unido).

El pH y la temperatura del medio se monitorearon y controlaron en tiempo real mediante un sistema pH-Stat constituido por un electrodo combinado de vidrio acoplado a un titulador automático TitroLine 7000® (SI Analytics, Alemania), operado con el software tiamo® 1.2.1 (Metrohm, Suiza). Este sistema permitió sostener un pH constante durante la hidrólisis a través de la adición automática de la solución titulante en respuesta a las variaciones detectadas, lo cual resulta crítico en reacciones enzimáticas de hidrólisis proteica debido a la liberación progresiva de grupos carboxilo que acidifican el medio.

La hidrólisis se inició con la adición de 0,0838603 unidades de actividad (UA) de Flavourzyme® 500L (500 LAPU/g, Sigma-Aldrich, EUA) a pH 7,0 y manteniendo la reacción durante 900 s. Finalizado este periodo, el pH se reajustó a 8,5 e inmediatamente se adicionaron 0,195674 UA de Alcalasa® 2.4 L (Novozymes, Dinamarca), permitiendo su acción por 3100 s. Concluida la hidrólisis, las enzimas se inactivaron térmicamente elevando la temperatura del sistema a 85 °C durante 10 min en un baño de agua termostático.

El hidrolizado resultante se centrifugó en tubos Falcon de 50 mL a 8500 rpm (6462,04 RCF) durante 5 min a 4 °C en una centrífuga de mesa (Boeco, Alemania), separándose el sobrenadante del material particulado insoluble. El sobrenadante, correspondiente al hidrolizado

proteico clarificado, se recuperó cuidadosamente y se transfirió a un recipiente plástico con tapa de rosca apto para uso alimentario, previamente higienizado y desinfectado. Finalmente, las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización experimental.

### Determinación del grado de hidrólisis (%GH)

Para cuantificar el avance de la hidrólisis enzimática se determinó el grado de hidrólisis (GH), definido como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos respecto del total presente en la proteína original. Se empleó el sistema *pH-stat* como herramienta cuantitativa, calculando el GH a partir del volumen de hidróxido de sodio 1,0 N requerido para mantener constante el pH del medio durante la reacción. La cantidad de base añadida es proporcional a los grupos amino liberados por la ruptura de enlaces peptídicos, por lo que el GH se estimó con la ecuación propuesta por Adler-Nissen (1986) (ec. 1), enfoque validado previamente para hidrólisis proteica (Gómez y Zapata, 2017).

$$GH(\%) = \frac{B N_B}{M_p \alpha h_t} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $B$  corresponde al volumen total consumido de álcali (L),  $N_B$  a la normalidad de la base ( $\text{Eq}\cdot\text{L}$ ),  $M_p$  a la masa de proteína (kg),  $\alpha$  al grado de disociación de los grupos amino liberados y  $h_t$  al número total de enlaces peptídicos por unidad de masa de proteína ( $\text{Eq}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Se adoptó un  $h_t = 8\text{ Eq}\cdot\text{kg}^{-1}$ , reportado previamente (Noreña, 2022). El parámetro  $\alpha$  se calculó en función del pH operativo y de la temperatura de reacción, de acuerdo con las Ecuaciones 2 y 3, respectivamente (Forghani et al., 2012):

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{(1 + 10^{pH-pK})} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T(K)}{298 * T(K)} * 2400 \quad \text{Ecuación 3}$$

## Preparación de hidrolizados y diluciones

El HLRC, obtenido mediante hidrólisis enzimática secuencial con Flavourzyme y Alcalasa, fue descongelado previamente a su uso. A partir de la solución madre, se prepararon diluciones sucesivas en un rango de 1,31 a 0,09 g de proteína/100 mL, empleando como disolvente un buffer fosfato de sodio (0,02 mol/L) suplementado con 6,7 mM de NaCl (Merck, Alemania; véase la Tabla 1)

**Tabla 1.**

*Diluciones del hidrolizado proteico de Eisenia fetida (HLRC).*

Concentración del hidrolizado (%)	Concentración de proteína (g/100 mL)
100,0	1,31
50,0	0,66
37,0	0,48
25,0	0,33
12,5	0,17
7,0	0,09

*Nota.* Las diluciones se prepararon a partir de una concentración inicial del hidrolizado de 1,31 g de proteína por cada 100 mL de solución.

## Ensayo *in vitro* para la determinación de la inhibición de la $\alpha$ -amilasa

La actividad inhibitoria frente a la enzima  $\alpha$ -amilasa se evaluó siguiendo el procedimiento descrito por Wan y col. (2023), con modificaciones adaptadas a las condiciones del laboratorio.

En tubos Eppendorf de 1,5 mL se dispusieron 100  $\mu$ L de la muestra de HLRC (o de sus respectivas diluciones; véase Tabla 1), junto con 100  $\mu$ L de una solución de  $\alpha$ -amilasa (5 U/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) preparada en buffer fosfato de sodio (0,02 mol/L) suplementado con 6,7

mM de NaCl. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min en un baño seco (Labnet, EUA) con el fin de estabilizar la temperatura de reacción.

Posteriormente, se añadieron 100 µL de una solución de almidón soluble (0,5 g/100 ml) (Carlo Erba, Italia), incubándose nuevamente a 37 °C durante 20 min. La reacción enzimática fue detenida mediante calentamiento a 100 °C durante 15 min, seguido de un enfriamiento rápido hasta la temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 12000 rpm (12879,36 RCF) durante 1 min y del sobrenadante se recuperaron 250 µL para la determinación de azúcares reductores.

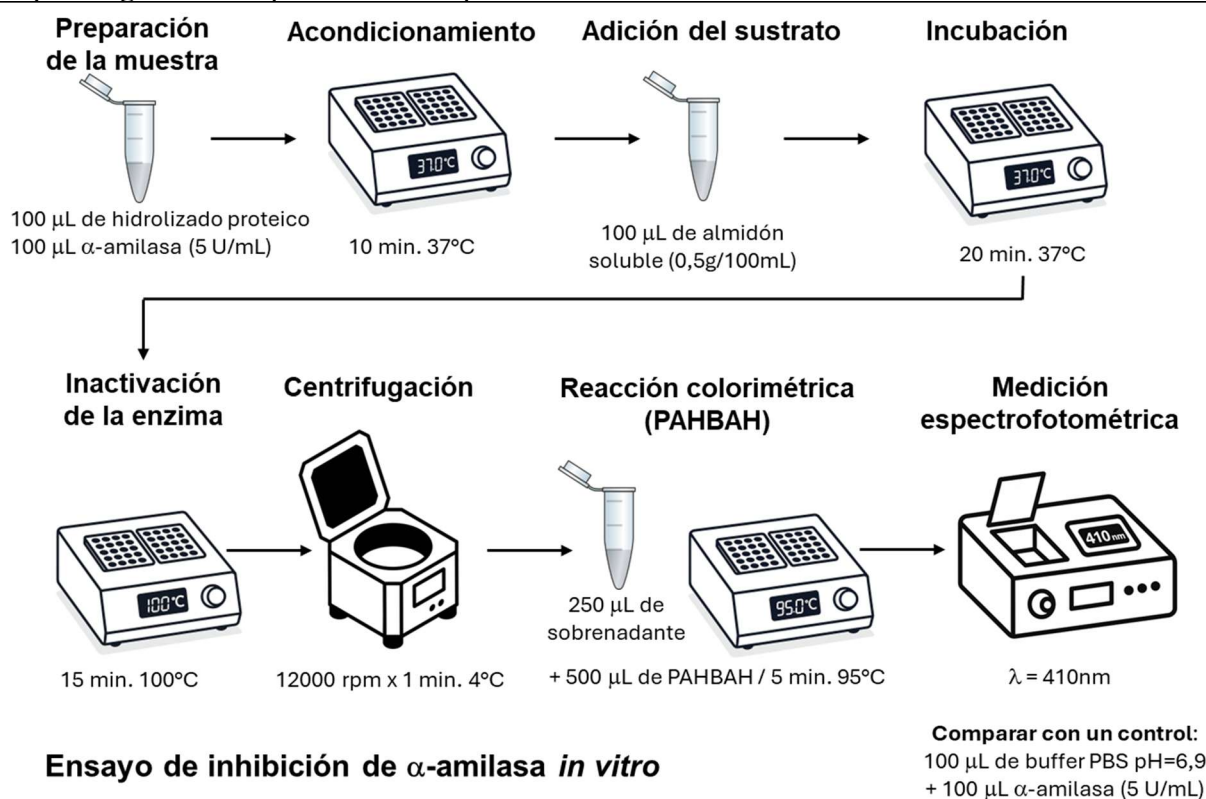
La cuantificación se realizó en tubos Eppendorf de 2,0 mL, mezclando los 250 µL de sobrenadante con 500 µL de una solución de p-hidroxibenzoato de hidrazida (PAHBAH) (Sigma-Aldrich, EUA), preparada disolviendo 0,5 g en 20 mL de HCl 0,5 M y completando el volumen a 100 mL con NaOH 0,5 M. Las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 min y posteriormente se enfriaron con rapidez hasta temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 410 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, EUA) empleando celdas desechables. El esquema general del procedimiento se muestra en la Fig. 3.

El método propuesto por Lever (1972) para la cuantificación de azúcares reductores mediante el reactivo PAHBAH se basa en la capacidad del grupo carbonilo libre ( $-C=O$ ) presente en la forma abierta de azúcares como la glucosa o la maltosa para actuar como agente reductor. Durante la reacción, el grupo carbonilo del azúcar se condensa con el grupo hidrazida del PAHBAH para formar una hidrazona intermedia. Luego, se produce una reacción redox en la que el azúcar se oxida a ácido carboxílico y el PAHBAH se reduce, originando un compuesto aromático amarillo (Fig. 4). La intensidad de este producto reducido, medido espectrofotométricamente, es directamente proporcional a la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra. El ensayo PAHBAH se utiliza comúnmente para cuantificar

azúcares reductores liberados por la  $\alpha$ -amilasa (glucosas y maltosas) debido a su alta sensibilidad, baja interferencia con matrices alimentarias y linealidad en un amplio rango de concentraciones.

**Figura 3.**

*Esquema general del procedimiento para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa.*



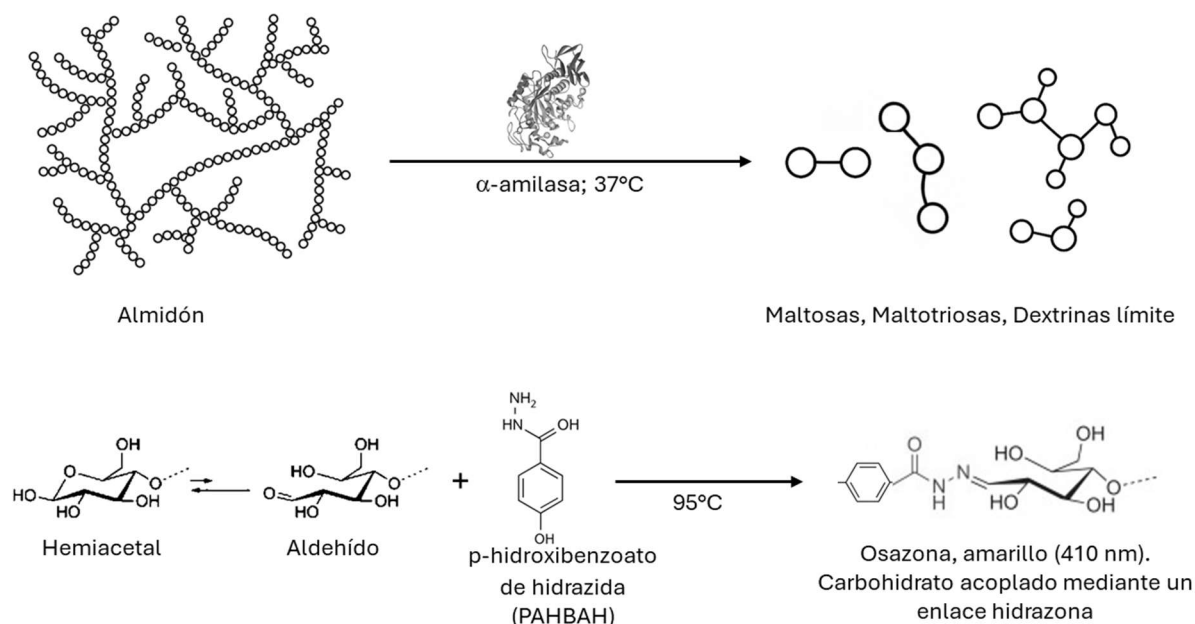
*Nota.* El esquema muestra las etapas experimentales empleadas para evaluar la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa en condiciones *in vitro*, desde la preparación de la muestra hasta la lectura espectrofotométrica. Fuente: elaboración propia.

Para asegurar la validez del ensayo de inhibición de  $\alpha$ -amilasa, se incluyeron tres controles: (i) control negativo, en el que 100  $\mu$ L de tampón fosfato reemplazaron a la muestra de hidrolizado para establecer la actividad máxima de la enzima (100 %); (ii) blanco de reacción, constituido por 100  $\mu$ L de hidrolizado (o su dilución) y 100  $\mu$ L de tampón, sometido a las mismas condiciones experimentales que las muestras, con el fin de corregir posibles

interferencias de absorbancia; y (iii) control positivo, empleando acarbosa ( $\geq 95$  % grado HPLC; Sigma-Aldrich, USA) como inhibidor de referencia. Para este último, se preparó una solución madre (1 mg/mL) disolviendo 50 mg de acarbosa en un balón aforado con 50 mL de tampón fosfato de sodio 0,02 mol/L, pH 6,9, agitando hasta su completa disolución. A partir de la solución madre se obtuvieron soluciones de trabajo de 70, 50, 40, 20 y 10  $\mu\text{g/mL}$  mediante diluciones volumétricas sucesivas en el mismo tampón, verificando la homogeneidad antes de su uso. De cada solución de trabajo se empleó un volumen de 100  $\mu\text{L}$  y se procesó de manera idéntica al hidrolizado de LRC (véase Fig. 3)

#### Figura 4.

*Hidrólisis del almidón y detección de azúcares reductores mediante PAHBAH.*



*Nota.* La  $\alpha$ -amilasa degrada el almidón en maltosa y otros azúcares reductores, los cuales reaccionan con el reactivo PAHBAH formando un compuesto coloreado cuya absorbancia es proporcional a su concentración. Elaboración propia. Diagrama en cinta de la  $\alpha$ -amilasa (PDB 1SMD), imagen en dominio público tomada de Wikimedia Commons (Fvasconcellos, 2007).

Se incluyó acarbosa como control positivo por ser un inhibidor competitivo ampliamente caracterizado de la  $\alpha$ -amilasa. Se estimaron las concentraciones inhibitorias medias ( $\text{IC}_{50}$ ) tanto

de la acarbosa como del HLRC a partir de sus curvas dosis–respuesta; para el HLRC, las diluciones se expresaron como concentración de proteína (g/100 g). Esta estrategia permitió validar la sensibilidad del método. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa por parte del HLRC y los controles positivos (acarbosa) fue determinado a partir de las lecturas de absorbancia obtenidas tras el tratamiento con el reactivo cromogénico PAHBAH. Para dicho cálculo, se empleó la ecuación 4, la cual considera las correcciones necesarias por interferencia de color tanto del reactivo como de las muestras evaluadas y se expresó como porcentaje de inhibición relativa.

$$\% \text{ de inhibición} = \left[ 1 - \frac{(M - BK_M)}{(C_{neg} - BK_{neg})} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde,

$C_{neg}$  = Absorbancia del control negativo, correspondiente a la reacción sin inhibidor (100  $\mu$ L de buffer fosfato en lugar de la muestra).

$BK_{neg}$  = Absorbancia del blanco del control negativo, obtenido al mezclar 250  $\mu$ L de buffer fosfato (pH 6,9) con 500  $\mu$ L del reactivo PAHBAH, sin enzima ni sustrato.

$M$  = Absorbancia de la muestra test (hidrolizado, diluciones o control acarbosa, 100  $\mu$ L).

$BK_M$  = Absorbancia del blanco de la muestra, que incluye la muestra en buffer, tratada de la misma forma, pero sin enzima.

La fórmula permite corregir la absorbancia neta de la muestra ( $M - BK_M$ ) frente a la absorbancia neta del control negativo ( $C_{neg} - BK_{neg}$ ), para así obtener el porcentaje de inhibición relativa.

Esta corrección es especialmente relevante en hidrolizados proteicos de *E. fetida*, los cuales presentan pigmentaciones naturales que pueden alterar la lectura espectrofotométrica. En ausencia de dicha corrección, los valores de inhibición enzimática podrían ser sobrestimados o subestimados, comprometiendo la validez del análisis.

### **Modelado de la relación dosis-respuesta y determinación del IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>**

La relación dosis-respuesta entre la concentración del hidrolizado proteico de *E. fetida* (así también como de la acarbosa) y su capacidad inhibitoria sobre las enzimas amilolíticas fue modelada mediante un ajuste no lineal utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL, por sus siglas en inglés: *Four-Parameter Logistic*), de acuerdo con lo reportado por Sebaugh (2011). Los datos experimentales de porcentaje de inhibición (% inhibición) frente a la concentración de proteína (g/100 mL) fueron ajustados de acuerdo con la ecuación 5.

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde  $y$  es la respuesta (% de inhibición),  $x$  es la concentración del inhibidor (g/100mL),  $a$  es la asíntota superior (respuesta máxima),  $d$  es la asíntota inferior (respuesta mínima),  $b$  es la pendiente de la curva (*slope*) y  $c$  es el valor calculado del IC<sub>50</sub>, es decir, la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática.

El modelo fue ajustado mediante el método de mínimos cuadrados no lineales, y los parámetros fueron estimados empleando el software Sigmaplot®12,0 (Grafiti LLC, EUA). Además, se evaluaron los errores estándar asintóticos a partir de la matriz de covarianzas del ajuste.

El valor estimado del IC<sub>50</sub> se extrajo directamente de los parámetros del modelo y se empleó como indicador cuantitativo de la potencia inhibitoria del hidrolizado proteico, permitiendo su comparación con resultados previamente reportados en la literatura científica.

Para estimar las dosis efectivas (EC<sub>p</sub>) EC<sub>60</sub>, EC<sub>70</sub>, EC<sub>80</sub> y EC<sub>90</sub> de la inhibición de las enzimas amilolíticas por el HLRC (o de acarbosa), se partió de los parámetros ajustados del modelo 4PL (Ec.5). El valor de EC<sub>p</sub> corresponde a la concentración que alcanza una fracción  $p$  del rango dinámico de la curva sigmoidea ajustada, definido por  $(a - d)$  y no por el 100 % absoluto del efecto. A partir de la ecuación logística (4PL) y su forma inversa, la concentración EC<sub>p</sub> se obtiene mediante la siguiente la ecuación 6.

$$x = c \left( \frac{1 - p}{p} \right)^{1/b} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $x$  corresponde a la concentración asociada al efecto fraccional  $p$ ,  $c$  es el parámetro que define el punto de inflexión de la curva y  $b$  el coeficiente de la pendiente.

### **Determinación de parámetros cinéticos de la $\alpha$ -amilasa en presencia y ausencia de HLRC**

Se determinó la cinética de la  $\alpha$ -amilasa mediante ensayos de velocidad inicial empleando almidón soluble a diferentes concentraciones como sustrato. Se trabajó a pH (6,9) y temperatura controlados en tampón fosfato de sodio 0,02 mol/L con 6,7 mM de NaCl; todas las soluciones se precalentaron a 37 °C. La  $\alpha$ -amilasa se diluyó en el mismo tampón hasta 1 U/mL. Se siguió el procedimiento previamente descrito para la evaluación de la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (Fig. 3),

variando únicamente la concentración inicial de almidón (0; 2,5; 5; 10; 20 y 40 mg/mL) y empleando como inhibidor el HLRC a una concentración de 0,655 g de proteína/100 mL.

En los ensayos control sin inhibidor, el hidrolizado se reemplazó por el tampón y se siguió el mismo procedimiento. Adicionalmente, se construyó una curva de calibración de maltosa (Sigma-Aldrich, EUA) en el rango 0–1,2 mg/mL, preparada a partir de una solución madre de 200 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Las absorbancias obtenidas para cada concentración de sustrato fueron convertidas a concentraciones de azúcares reductores (mg/mL de maltosa equivalente) mediante interpolación en la curva de calibración.

Las concentraciones de maltosa producida fueron divididas por el tiempo de incubación (20 minutos) para calcular la velocidad inicial de la reacción ( $v_0$ , expresada en  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Esto se hizo para cada una de las cinco concentraciones de sustrato, tanto en condición control (sin inhibidor) como en presencia del HLRC (inhibidor).

Los valores de  $v_0$  fueron graficados contra  $[S]$  (concentración de sustrato) y se ajustaron al modelo no lineal de Michaelis–Menten (Ecuación 7).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ecuación 7}$$

El ajuste se realizó en Microsoft Excel, utilizando el complemento Solver para minimizar la suma de los errores al cuadrado (SSE) entre los valores experimentales y los valores predichos ( $v_{pred}$ ) por el modelo y encontrar los mejores valores de  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $K_i$ .

Para ello se establecieron valores iniciales para  $V_{max}$  y  $K_m$  y se usó la ecuación 7 para calcular  $v_{pred}$ . Luego, se calcularon los residuos como  $v_{obs} - v_{pred}$  y sus cuadrados. Estos se minimizaron mediante Solver, restringiendo los parámetros a valores positivos.

Para interpretar el tipo de inhibición, los valores de velocidad inicial en diferentes concentraciones de sustrato, se ajustaron también modelos cinéticos extendidos (competitiva, acompetitiva y no competitiva), según las ecuaciones 8, 9 y 10.

Competitiva:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad \text{Ecuación 8}$$

Acompetitiva:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Ecuación 9}$$

No competitiva:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Ecuación 10}$$

Se aplicó de nuevo Solver en Excel, minimizando la SSE entre valores observados y predichos, ajustando simultáneamente  $V_{max}$ ,  $K_m$  y  $K_i$  bajo cada modelo.

La comparación de la SSE ponderada de cada modelo permitió determinar el ajuste más adecuado.

La incertidumbre de los parámetros se obtuvo a partir de la matriz de covarianzas del ajuste. Sea  $r_i = v_{0,i} - v_{0,i}$  el residuo y  $RSS = \sum_{i=1}^n r_i^2$ . La varianza residual se estimó como  $\hat{\sigma}^2 = RSS/(n - p)$  y la matriz de covarianzas como  $Cov(\hat{\theta}) = \hat{\sigma}^2 (J^T J)^{-1}$ , donde  $J$  es el

jacobiano evaluado en la solución y  $\hat{\theta} = (V_{max}, K_m)$ . Los errores estándar se obtuvieron como la raíz de la diagonal de  $Cov$ . Los intervalos de confianza al 95% (IC95%) se calcularon por aproximación de Wald (Ecuación 11).

$$\hat{\theta} \pm t_{0,975,(n-p)}SE(\hat{\theta}_j) \quad \text{Ecuación 11}$$

con  $gl = n - p = 3$  y distribución  $t$  de Student.

La calidad del ajuste se resumió mediante el RMSE (*root mean squared error*), definido de acuerdo con la Ecuación 12.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i^2}, \quad \text{Ecuación 12}$$

Expresado en las mismas unidades de  $v_0$ . Todos los cálculos se realizaron en el espacio original de  $v_0$  (no en la forma recíproca), para evitar sesgos de la transformación  $1/v$  y mantener la interpretación directa de  $V_{max}$  y  $K_m$ .

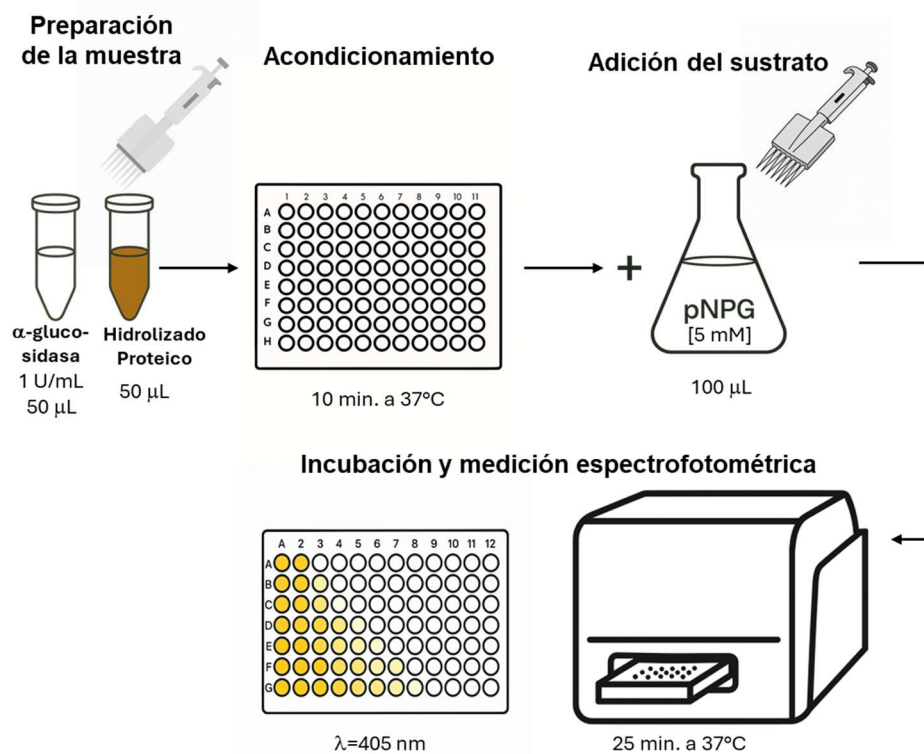
### **Determinación de la inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa por el HLRC**

La actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa por el HLRC se evaluó adaptando el procedimiento descrito por Li y col. (2023) con algunas modificaciones. En un microplato de 96 pocillos se mezclaron 50  $\mu$ L de HLRC a distintas concentraciones de proteína (1,31; 0,66; 0,49; 0,33; 0,16 y 0,096 g/100 mL) con 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -glucosidasa (1 U/mL) (Sigma-Aldrich, EUA). La mezcla se preincubó 10 min a 37 °C en un lector multimodal Varioskan™ LUX (Thermo Scientific, EUA), programado para el precalentamiento de la placa. A continuación, se adicionaron 100  $\mu$ L de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG, 5 mM; Sigma-Aldrich, EUA) preparado en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,8), utilizando micropipeta multicanal.

La reacción se incubó 25 min a 37 °C en el mismo equipo y, transcurrido ese tiempo, se registró la absorbancia a 405 nm. El esquema general del procedimiento se muestra en la Figura 5.

**Figura 5.**

*Esquema general del procedimiento para la inhibición de la  $\alpha$  glucosidasa.*



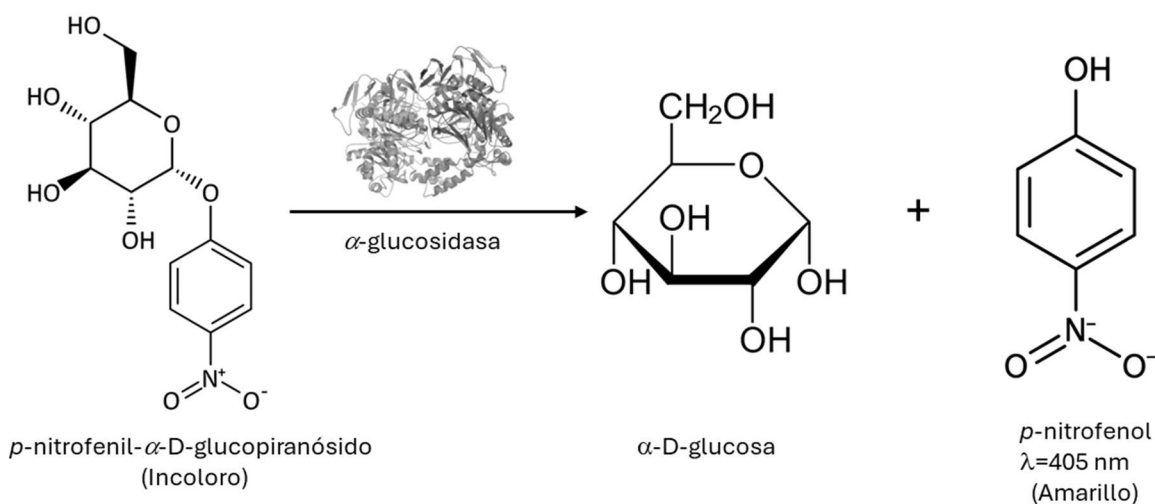
*Nota.* El esquema representa el procedimiento del ensayo en microplaca para evaluar la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa en condiciones in vitro, incluyendo la preparación de la muestra, la adición del sustrato, la incubación y la medición espectrofotométrica a 405 nm. Elaboración propia.

El p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG) es un sustrato sintético comúnmente utilizado para medir la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. Su estructura imita la de los disacáridos naturales, al presentar un enlace glucosídico tipo  $\alpha$  entre una molécula de glucosa y un grupo p-nitrofenilo. La  $\alpha$ -glucosidasa reconoce este enlace y lo hidroliza, tal como ocurre con

los carbohidratos en el proceso digestivo, liberando una molécula de glucosa y otra de p-nitrofenol (pNP; Kumar et al., 2011; Sugimoto et al., 2012; Fig. 6).

**Figura 6.**

*Mecanismo enzimático de la hidrólisis del pNPG por la  $\alpha$ -glucosidasa.*



*Nota.* Representación del mecanismo de hidrólisis del sustrato sintético p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG) por la  $\alpha$ -glucosidasa, empleado como indicador cromogénico para evaluar la actividad enzimática. La enzima fue ilustrada mediante una imagen generada con inteligencia artificial (OpenAI, 2023) a partir de una descripción textual, utilizada únicamente como apoyo esquemático.

La utilidad del pNPG radica no solo en su especificidad estructural para esta enzima, sino también en que el p-nitrofenol liberado posee propiedades cromogénicas: presenta una fuerte absorbancia a 405 nm en medio alcalino, lo cual permite detectar y cuantificar la actividad enzimática de forma sencilla mediante espectrofotometría (Zhang et al., 2024). En presencia de un inhibidor como el HLRC o la acarbosa, la velocidad de hidrólisis del pNPG disminuye, lo cual se refleja en una reducción de la cantidad de p-nitrofenol formado y, en consecuencia, en una menor absorbancia. Por ello, el pNPG funciona como un sustrato indicador que permite

evaluar cuantitativamente la eficacia inhibitoria de diferentes compuestos frente a la  $\alpha$ -glucosidasa (Li et al., 2023; Tadera et al., 2006).

Como control negativo, se sustituyó el hidrolizado por 50  $\mu$ L de buffer fosfato (0,1 M; pH 6,8). Para corregir la interferencia de color del HLRC se incluyó un blanco del hidrolizado (HLRC + pNPG, sin enzima; la enzima se reemplazó por buffer). Adicionalmente, se empleó un blanco de reactivos (buffer en lugar de HLRC y enzima + pNPG).

El porcentaje de inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa por el HLRC se calculó en función de las lecturas de absorbancia registradas a 405 nm tras la incubación con el sustrato cromogénico pNPG. Para ello, se empleó la ecuación 13.

$$\% \text{ inhibición} = \left[ 1 - \frac{(A - C)}{(B - D)} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde:

$A$  = Absorbancia de la muestra con HLRC (a distintas concentraciones) junto con la enzima y el sustrato.

$B$  = Absorbancia promedio del control negativo, con enzima y sustrato, pero sin HLRC.

$C$  = Absorbancia del blanco del hidrolizado, que contiene HLRC con pNPG pero sin enzima (la enzima fue sustituida por buffer).

$D$  = Absorbancia del blanco de reactivos, que incluye solo el buffer fosfato con el sustrato pNPG (sin enzima ni muestra).

Cabe destacar que el mismo procedimiento de cálculo se aplicó a las muestras de acarbose, utilizada como inhibidor positivo de referencia. Esta inclusión permitió evaluar la eficacia y reproducibilidad del método bajo condiciones experimentales idénticas.

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y, para el ajuste de los datos, se empleó un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL), ponderado por la varianza ( $1/DE^2$ ), considerando el eje de concentración ( $x$ ) en escala logarítmica.

Asimismo, con el propósito de validar el procedimiento experimental y establecer una referencia comparativa, se ajustó el modelo 4PL a los datos obtenidos con acarbosa frente a la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa, siguiendo el mismo enfoque estadístico. La determinación del valor de concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) para la acarbosa permitió comprobar la aplicabilidad del modelo y definir un punto de referencia para los análisis comparativos posteriores. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **Determinación de la capacidad antioxidante por ORAC**

La capacidad antioxidante de los hidrolizados se evaluó mediante el ensayo de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), siguiendo el procedimiento descrito por Gómez y col. (2019). Se mezclaron 25  $\mu$ L de muestra o estándar (Trolox) con 150  $\mu$ L de fluoresceína 1  $\mu$ M y se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 25  $\mu$ L de AAPH 250 mM y se registró la intensidad de fluorescencia cada 2 min durante 120 min ( $\lambda_{exc} = 485$  nm;  $\lambda_{em} = 520$  nm) utilizando un lector multimodo Varioskan™ LUX. Para la calibración, se emplearon soluciones acuosas de Trolox 0 a 200  $\mu$ M, y los resultados se expresaron como  $\mu$ mol ET·g<sup>-1</sup> de proteína.

#### **Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS**

La capacidad antioxidante se evaluó mediante el ensayo ABTS, siguiendo el procedimiento de Gómez y col. (2019), con modificaciones menores. El radical ABTS•+ se generó por reacción entre ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. A continuación, se mezclaron 20  $\mu$ L de la muestra diluida en buffer fosfato 5 mM, pH 7,4 (o del estándar Trolox)

con 180  $\mu\text{L}$  de la solución de ABTS $\bullet^+$  (en el mismo buffer) y se incubó 30 min en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia a 730 nm en un lector multimodal Varioskan<sup>TM</sup> LUX. Para la calibración, se utilizaron soluciones acuosas de Trolox 0 a 200  $\mu\text{M}$ , y los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína.

### **Determinación de la capacidad quelante de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina)**

La capacidad de unión al hierro se evaluó mediante la formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina, siguiendo el procedimiento descrito por Zapata y Gómez (2024), con modificaciones menores. Se mezclaron 7,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$  2 mM con 15  $\mu\text{L}$  de ferrozina 5 mM y 277  $\mu\text{L}$  de la muestra ( $0,03 \text{ mg proteína}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) o agua destilada para el control. La mezcla se homogenizó e incubó 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se registró la absorbancia a 562 nm en un lector multimodo Varioskan<sup>TM</sup> LUX. La capacidad quelante de hierro (CQI) se calculó según la ecuación 14, donde  $A_1$  es la absorbancia de la muestra y  $A_0$  la absorbancia del control:

$$\text{Capacidad quelante de Fe(\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{A_1}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

### **Cromatografía de exclusión molecular**

El perfil de distribución de masa molecular del HLRC se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular. Para ello, se analizaron 0,2 mg de cada muestra en un sistema HPLC UltiMate 3000, equipado con una columna Biosep-SEC-s2000 (300 x 7,8 mm, 5 $\mu\text{M}$ ; Phenomenex, California-EUA.), con un rango de separación entre 1 a 600 kDa. Antes de la inyección de las muestras, se utilizó como referencia el estándar Protein Mix 15 a 600 kDa (Sigma, EUA). La elución se llevó a cabo con buffer fosfato 50 mM (0,3 M NaCl, pH 6,8) a un flujo de 0,7 mL/min y 25 °C, registrando la detección a 215 nm.

### **Liofilización del hidrolizado proteico de *Eisenia fetida***

El producto obtenido a partir de la hidrólisis secuencial con las enzimas Alcalasa y Flavourzyme se sometió a un proceso de liofilización con el fin de estabilizar el material, facilitar su conservación y permitir su posterior incorporación en productos alimentarios.

Previamente al proceso de liofilización, los hidrolizados fueron congelados a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas. Posteriormente, se trasladaron al equipo liofilizador de sobremesa (Muller Scientific, China), donde se sometieron a un ciclo completo de 31 horas de sublimación bajo vacío.

Durante el proceso, se mantuvieron condiciones controladas de presión ( $< 0,1\text{ mbar}$ ) y temperatura de condensador a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar, se obtuvieron polvos secos homogéneos (HLRC-L), que fueron almacenados en recipientes herméticos a temperatura ambiente, protegidos de la luz y humedad, hasta su utilización en las siguientes etapas experimentales.

### **Elaboración de galletas enriquecidas con hidrolizado liofilizado de *Eisenia fetida* (HLRC-L)**

Con el propósito de evaluar el efecto del hidrolizado proteico de LRC sobre la digestión del almidón, se elaboraron galletas enriquecidas mediante la incorporación del hidrolizado previamente liofilizado (HLRC-L). Se empleó como base una formulación de galleta (Tabla 2), adaptada de Pędziwiatr et al. (2024), compuesta por harina de trigo, aceite vegetal, leche entera, huevo, polvo de hornear y sal; las proporciones se expresan por cada 100 g de harina de trigo.

A partir de la formulación base se obtuvo una masa total de 263,16 g, la cual se dividió en tres fracciones experimentales: control (0 % HLRC-L), enriquecida al 5 % y enriquecida al 10 %. Los porcentajes de adición del hidrolizado proteico liofilizado (HLRC-L) se calcularon en relación con la cantidad de harina de trigo presente en la mezcla base (Tabla 3).

**Tabla 2.**

*Formulación base de la masa de galletas previa al enriquecimiento con hidrolizado proteico de LRC.*

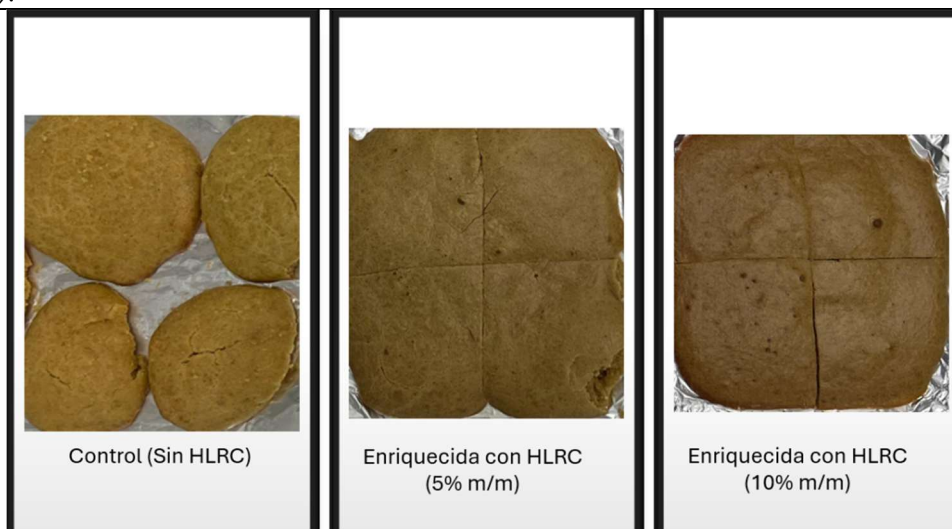
Insumo	% (m/m)	Cantidad (g)
Harina de trigo	38	100
Aceite vegetal	18	47,37
Leche entera	20	52,63
Huevo	17	44,73
Polvo de hornear	1,6	4,21
Sal	0,4	1,05

*Nota.* La formulación base se definió considerando que la harina de trigo corresponde al 38 % de la masa total de la mezcla. Con esta proporción, 100 g de harina equivalen a 263,16 g de masa total, relación utilizada como referencia para los cálculos de composición y contenido teórico de almidón. Esta masa se empleó como punto de partida para la preparación de las muestras experimentales.

Cada muestra fue homogenizada manualmente hasta lograr una masa uniforme. Las galletas fueron formadas y horneadas de manera individual en una estufa de convección forzada a 170 °C durante 16 minutos. Luego de enfriar a temperatura ambiente, las muestras (Fig.7) fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso en el ensayo de digestión *in vitro*.

**Figura 7.**

*Galletas con diferentes niveles de adición de hidrolizado proteico liofilizado de Eisenia fetida (HLRC-L).*



*Nota.* Muestras representativas de galletas elaboradas en condiciones de control (0 % HLRC-L) y con adición del 5 % y 10 % de hidrolizado proteico liofilizado de *Eisenia fetida*. Fotografías de elaboración propia.

**Tabla 3.**

*Formulación de galletas con distintos niveles de enriquecimiento con HLRC-L.*

<b>Muestra</b>	<b>Harina de trigo equivalente (g)</b>	<b>HLRC-L añadido (g)</b>	<b>Masa final aproximada (g)</b>
Control (0 % HLRC)	30,00	0,0	78,95
Enriquecida 5 %	40,00	2,0	105,26
Enriquecida 10 %	30,00	3,0	78,95

*Nota.* En las formulaciones enriquecidas, el HLRC-L se incorporó directamente a la masa base previamente elaborada. Las cantidades se calcularon para obtener niveles de adición del 5 % y 10 % (m/m) con respecto a la harina de trigo. Este procedimiento permitió mantener la proporción original de ingredientes y evaluar específicamente el efecto de la incorporación del hidrolizado proteico liofilizado.

### **Digestión *in vitro* empleando el protocolo INFOGEST**

Para evaluar la digestión del almidón y el efecto modulador de compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados proteicos, se empleó un modelo de digestión *in vitro* estático basado en el protocolo reportado por el consorcio INFOGEST (*International Network on Food Digestion*), y propuesto por Brodkorb y col. (2019), con algunas modificaciones para ajustarse a los requerimientos específicos del presente estudio. Este método fue seleccionado por su amplia aceptación en la comunidad científica, ya que permite reproducir condiciones gastrointestinales estandarizadas (fase oral, gástrica e intestinal) y facilita la comparación entre diferentes estudios. Además, su implementación práctica y reproducibilidad lo hacen adecuado para evaluar la liberación de glucosa durante la digestión de productos alimentarios enriquecidos.

Para esta investigación, se prepararon 400 mL de cada sistema digestivo simulado, utilizando reactivos y soluciones en concentraciones estandarizadas, ajustadas al volumen total empleando agua desionizada (tabla 3). Las muestras para evaluar (galletas enriquecidas con hidrolizado proteico de *Eisenia fetida*) fueron molidas y pesadas para garantizar una distribución

homogénea durante la digestión. Todos los ensayos de digestibilidad fueron realizados por duplicado.

**Tabla 4.**

*Composición química de las soluciones empleadas en la digestión in vitro.*

	g/L	M	SSF (mL)	SGF (mL)	SIF (mL)
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0,5	3,7	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	6,8	12,5	42,5
NaCl	117	2	-	11,8	9,6
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,15	0,5	0,4	1,1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,5	0,06	0,5	-
HCl	-	6	0,09	1,3	0,7
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	44,1	0,3	0,025*	0,005*	0,04*

*Nota.* SSF, *Simulated Salivary Fluid* (Fluido oral simulado); SGF, *Simulated Gastric Fluid* (Fluido gástrico simulado); SIF, *Simulated Intestinal Fluid* (Fluido intestinal simulado). \*La adición de CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> se realizó exclusivamente el día de su empleo.

Fase oral: Para iniciar la digestión *in vitro*, se pesaron 5,0 g de cada una de las galletas elaboradas (Tabla 3) en botellas Schott de 100 mL con tapa. Dado que las muestras de galletas presentaban baja humedad, se adicionaron 15 mL de agua desionizada con el fin de facilitar la mezcla inicial. Ésta se homogenizó manualmente hasta lograr una distribución uniforme de la muestra. Esta dilución fue necesaria para obtener una consistencia pastosa similar a una papilla o salsa, tal como lo establece el protocolo INFOGEST, que recomienda reproducir la textura del bolo alimenticio masticado antes de la digestión oral simulada. A esta mezcla se agregó 5,0 mL del fluido oral simulado (SSF) precalentado y ajustando el pH  $7,0 \pm 0,1$  (Thermo Fisher Scientific, EUA), y que contenía la enzima  $\alpha$ -amilasa (75 U/mL). Esta mezcla fue incubada durante 2 minutos a 37 °C en un agitador orbital a 200 × rpm (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Fase gástrica: Inmediatamente después de completada la fase oral, el bolo fue mezclado con la solución electrolítica gástrica simulada (SGF), previamente calentada a 37 °C, en una

proporción final de 1:1 (v/v). Se adicionaron 10 mL de SGF conteniendo 2000 U/mL de pepsina gástrica (Sigma-Aldrich, EUA) y 60 U/mL de lipasa gástrica (Sigma-Aldrich, EUA) a cada muestra. El pH de la mezcla fue previamente ajustado a  $\text{pH } 3,0 \pm 0,1$  utilizando HCl 1 M, para simular la acidez gástrica fisiológica. Las muestras fueron incubadas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 120 minutos con agitación constante a  $200 \times \text{rpm}$ , empleando el agitador orbital para mantener la homogeneidad de la digestión enzimática.

Fase intestinal: Al finalizar la fase gástrica, se procedió inmediatamente a ajustar el pH de la mezcla a  $7,0 \pm 0,1$  mediante la adición gradual de una solución de hidróxido de sodio (NaOH; 0,1N), a fin de simular el ambiente del intestino delgado. Posteriormente, se incorporaron 20 mL de fluido intestinal simulado (SIF), previamente calentado a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , el cual contenía pancreatina (Sigma-Aldrich, EUA) a una concentración de 0,833 mg/mL (m/v; 100 U/mL) y sales biliares (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,584 mg/mL (10 mM). La mezcla resultante (quimo gástrico + SIF) se mantuvo en agitación constante a  $200 \times \text{rpm}$  y a una temperatura controlada de  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 120 minutos, simulando la etapa intestinal de la digestión.

Cada muestra digerida (2,5 mL) fue inmediatamente transferida a un tubo de centrifuga de 15 mL de capacidad (Falcon) que contenían 10 mL de una solución de carbonato de sodio 0,3 M, con el fin de detener la actividad enzimática. Las muestras fueron luego centrifugadas a  $9000 \times \text{rpm}$  ( $\approx 7247 \times g$ ) durante 10 minutos y el sobrenadante se recolectó y almacenó en refrigeración para su posterior análisis de liberación de glucosa.

### **Determinación de azúcares reductores y digestibilidad del almidón**

Para evaluar la digestibilidad del almidón, los valores de azúcares reductores obtenidos en cada muestra a lo largo del ensayo de digestión fueron corregidos mediante la sustracción de

la media de los valores correspondientes a los blancos analizados en los mismos intervalos de tiempo. Esta corrección permitió estimar exclusivamente los azúcares generados como resultado de la hidrólisis enzimática del almidón, atribuible a la acción combinada de las enzimas digestivas y los fluidos simulados empleados en el modelo de digestión *in vitro*.

Cabe resaltar que, dado que el protocolo no contempló una etapa previa de eliminación de azúcares libres naturalmente presentes en la matriz alimentaria, especialmente aquellos provenientes de la harina de trigo, existe el riesgo de sobreestimación de la digestibilidad aparente del almidón. Por esta razón, el uso de muestras en blanco fue una estrategia fundamental para corregir posibles sesgos y mejorar la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos.

La determinación de azúcares reductores se llevó a cabo tomando 100  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante previamente centrifugado, los cuales fueron diluidos en 250  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. El análisis se realizó mediante el método espectrofotométrico utilizando el reactivo PAHBAH. Los resultados fueron inicialmente expresados como concentración de azúcares reductores, interpolados desde una curva estándar de maltosa, y posteriormente convertidos a porcentaje de almidón digerido.

En la construcción de la curva estándar se utilizó una solución patrón de maltosa, preparada en concentraciones entre 0,0 y 1,2 mg/mL.

Las absorbancias (corregidas con el blanco) fueron graficadas en función de la cantidad de maltosa (mg) presente en cada tubo estándar, lo que permitió la interpolación de los datos experimentales de cada muestra.

El porcentaje de almidón digerido durante la digestión *in vitro* fue determinado a partir de la cantidad de maltosa equivalente liberada. Como la maltosa está compuesta por dos unidades de glucosa, se asumió que un mol de maltosa (342 g/mol) corresponde a la hidrólisis de dos unidades anhidras de glucosa del almidón ( $2 \times 162 \text{ g/mol} = 324 \text{ g/mol}$ ), lo que da lugar a una masa molar ligeramente mayor debido a la incorporación de una molécula de agua durante la hidrólisis. Esta relación estequiométrica se expresa según la ecuación 15.

$$\text{maltosa} \left( 342 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) = \left( 2 \times \text{anhidroglucosa} \left( 162 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \right) + \text{agua} \left( 18 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \quad \text{Ecuación 15}$$

Con base en esta relación, el cociente 324/342 se utilizó para convertir la masa de maltosa liberada en almidón digerido, de acuerdo con lo propuesto por Peng y col. (2023). En consecuencia, el porcentaje de almidón digerido se calculó empleando la ecuación 15.

$$\% \text{ Almidón digerido} = \left( \frac{\text{mg de maltosa/g de muestra}}{\text{mg de almidón teórico en la muestra}} \right) \times \frac{324}{342} \times 100 \quad \text{Ecuación 16}$$

El contenido de almidón teórico en cada muestra se estimó en función de la proporción de harina de trigo empleada en la formulación de las galletas, asumiendo que la harina contiene entre un 72 % y 75 % de almidón en base seca, siendo este el principal carbohidrato estructural (FAO, 2001; USDA, 2024). Para este estudio se empleó una formulación base que incluía 100 g de harina de trigo en un total de 263,16 g de masa, lo que corresponde al 38 % de la formulación final. A partir de esta relación, el almidón teórico presente en 100 g de galleta se estimó mediante la ecuación 17.

$$\text{Almidón teórico total por 100 g de galleta} = \frac{100 \text{ g harina}}{263,16 \text{ g total}} * 100 \text{ g de muestra} * 0,75 \quad \text{Ecuación 17}$$

## Resultados y Discusión

### Obtención y preparación del sustrato de *Eisenia fetida*

El protocolo utilizado fue eficaz para preparar a las LRC, eliminando residuos externos e internos. La purga con bicarbonato de sodio permitió limpiar el tracto intestinal, mientras que la solución salina ayudó a desinfectar externamente las lombrices. Este enfoque es consistente con métodos documentados para el manejo de anélidos en estudios experimentales (Corredor & Pérez, 2018; Bahadori et al., 2017).

La congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  permitió preservar las propiedades bioactivas de las lombrices, lo cual es esencial para su posterior uso en estudios experimentales, nutricionales o farmacológicos. La utilización de bolsas estériles minimizó el riesgo de contaminación cruzada, alineándose con buenas prácticas de manejo biológico.

La preparación adecuada de las lombrices es crucial para evitar interferencias en ensayos experimentales, como la presencia de microorganismos no deseados o compuestos orgánicos residuales. Este proceso también optimiza el rendimiento en la extracción de compuestos bioactivos, ampliamente estudiadas por sus aplicaciones farmacológicas (Zhao et al., 2005; Sun, 2015).

### Cuantificación de proteínas en *Eisenia fetida*

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para el contenido de proteína en lombriz roja californiana (LRC) fresca, su hidrolizado (HLRC) y el hidrolizado liofilizado (HLRC-L). El contenido proteico de la biomasa fresca fue de  $16,59 \pm 0,62$  g/100 g en base húmeda, valor superior a los reportados por Gómez-Sampedro et al. (2022), quienes informaron 12,2 %, y por Gaviria y Zapata (2024), con 13,04 %. Estas discrepancias pueden deberse a

factores como las condiciones de crianza y el sustrato de alimentación de las lombrices, aunque no puede descartarse el papel de diferencias analíticas asociadas al método empleado.

El método de micro-Kjeldahl, el cual estima el contenido total de nitrógeno y lo convierte en proteína mediante un factor de corrección (generalmente 6,25), presenta limitaciones importantes que condicionan la interpretación de los resultados. En primer lugar, no discrimina entre nitrógeno proteico y nitrógeno no proteico (NNP), como aminoácidos libres, amonio, urea, péptidos cortos y otras fracciones nitrogenadas liberadas durante la hidrólisis. Esto implica que los valores reportados no reflejan exclusivamente proteínas intactas, sino la suma de diferentes compuestos nitrogenados, lo que puede sobreestimar o subestimar la proteína real dependiendo del grado de hidrólisis y de la naturaleza de los productos generados.

**Tabla 5.**  
*Contenido de proteína total en LRC y sus derivados*

<b>Muestra</b>	<b>g/100g</b>
LRC	16,59 ± 0,62
HLRC	1,31 ± 0,04
HLRC-L	68,44 ± 0,18

*Nota.* LRC = lombriz roja californiana; HLRC = hidrolizado de lombriz roja californiana; HLRC-L = hidrolizado de lombriz roja californiana liofilizado. (n=3; ± desviación estándar).

El hidrolizado líquido presentó un contenido proteico de  $1,31 \pm 0,04$  g/100 g, ligeramente inferior al valor estimado teóricamente (1,5 g/100 g) a partir de la relación de disolución inicial (15 g/L). Aunque esta diferencia podría atribuirse a la eficiencia incompleta de la hidrólisis o a pérdidas de fracciones solubles, también es probable que el método Kjeldahl haya subestimado la proteína disponible por la presencia de compuestos nitrogenados no recuperados de forma óptima durante el análisis. Es decir, la disminución observada no necesariamente refleja una

menor cantidad de proteína funcional, sino una limitación metodológica en la detección de productos de bajo peso molecular generados tras la acción enzimática.

En contraste, el hidrolizado liofilizado alcanzó un valor proteico de 68,44 g/100 g, reflejando el efecto de concentración tras la eliminación del agua. Este resultado confirma la utilidad de la liofilización como estrategia de estabilización y concentración, al generar un producto con alta densidad proteica y mejor estabilidad frente al almacenamiento. Estudios similares respaldan estos hallazgos. Coşkun y col. (2024) demostraron que el secado por congelación retiene significativamente los compuestos bioactivos y las propiedades físicas en matrices alimentarias, debido al control térmico que minimiza la degradación. Asimismo, Dabbour y col. (2021) reportaron que la liofilización previene la desnaturalización proteica y la reacción de Maillard, preservando mejor la funcionalidad de hidrolizados proteicos, en comparación con técnicas de secado por convección.

Por tanto, si bien los valores aquí obtenidos permiten establecer un marco comparativo entre las distintas fracciones (fresca, hidrolizado líquido y liofilizado), la discusión debe considerar que el método Kjeldahl mide nitrógeno total, no proteína funcional. Esto implica que los resultados cuantitativos sirven como referencia de concentración relativa, pero no necesariamente reflejan la fracción bioactiva de péptidos que será determinante en los ensayos de inhibición enzimática y digestión *in vitro*.

En este punto, es importante subrayar la diferenciación en la aplicabilidad de ambos derivados. Por un lado, el hidrolizado líquido (HLRC) fue seleccionado como la muestra base para los ensayos de bioactividad, dado que su estado facilita la manipulación experimental, la preparación de diluciones y la interacción directa con las enzimas diana en los análisis *in vitro*. Por otro lado, el hidrolizado liofilizado (HLRC-L) constituye un producto más concentrado y

versátil, con un perfil proteico notablemente superior, que no solo lo hace idóneo para su incorporación en matrices alimentarias funcionales, sino que también representa una muestra clave para los análisis de digestión *in vitro* que se discutirán más adelante. Estos ensayos permitirán establecer hasta qué punto la mayor densidad de proteínas y péptidos influye en la liberación de compuestos bioactivos bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

En conjunto, los resultados obtenidos en este apartado muestran tres aspectos relevantes: (i) el contenido proteico de la LRC fresca es superior a los valores reportados previamente, lo que confirma su potencial como fuente alternativa de proteína animal no convencional; (ii) el HLRC evidenció una ligera disminución respecto al valor esperado, lo que puede reflejar tanto pérdidas durante la hidrólisis como limitaciones de recuperación del método frente a compuestos de bajo peso molecular; y (iii) el HLRC-L representa un producto altamente concentrado, con ventajas para la estabilidad, el almacenamiento y su aplicación en el desarrollo de ingredientes funcionales.

Finalmente, disponer de este perfil cuantitativo claro resulta esencial para interpretar los procesos de transformación enzimática posteriores. Esta caracterización inicial no solo establece la calidad de la materia prima, sino que constituye el punto de referencia frente al cual se evaluarán los cambios inducidos por la hidrólisis secuencial. En este sentido, el análisis del comportamiento del grado de hidrólisis bajo la acción combinada de Flavourzyme y Alcalasa se convierte en el siguiente paso crítico para comprender cómo la desestructuración progresiva de las proteínas impacta en la generación de péptidos bioactivos y en su potencial aplicación en el diseño de alimentos funcionales y nutracéuticos.

### **Hidrólisis enzimática secuencial de proteínas de *Eisenia fetida***

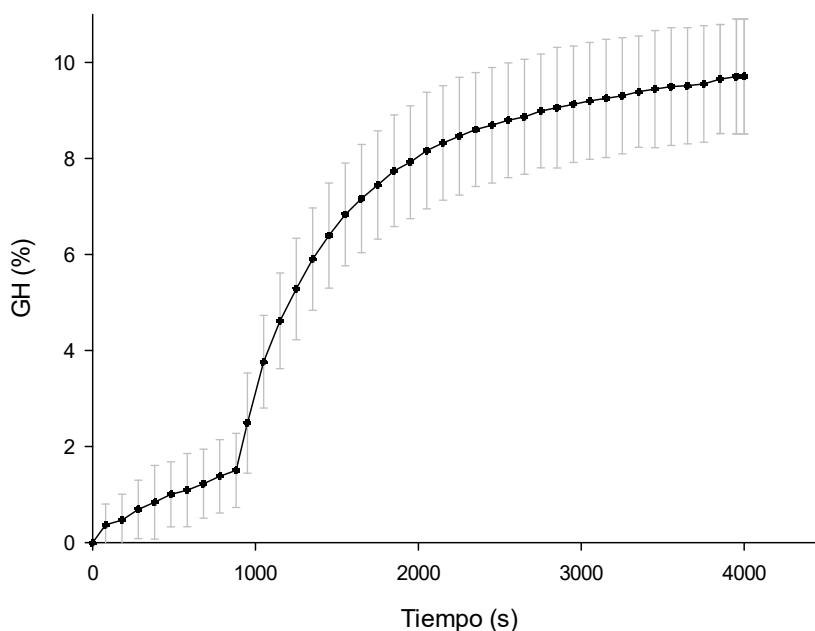
Se realizaron cuatro ensayos independientes de hidrólisis enzimática, a partir de los cuales se calculó el valor medio de grado de hidrólisis (GH). La prueba de Grubbs no identificó valores atípicos, por lo que todas las réplicas fueron consideradas en el análisis.

Algunos autores han asociado GH superiores al 10 % con un incremento en la funcionalidad bioactiva, incluyendo capacidad antioxidante, efectos antihipertensivos o inhibición de enzimas digestivas (Baba et al., 2021; Jiménez-Suaste et al., 2023). En este caso, el valor de GH obtenido, está un poco inferior al umbral bibliográfico de 10 %, lo que sugiere que la metodología utilizada tiene potencial de optimización y que ajustes en variables como el tiempo, la concentración enzimática o la relación enzima-sustrato podrían favorecer incrementos consistentes del GH y, en consecuencia, mejorar las propiedades funcionales de los hidrolizados.

La figura 8 presenta la evolución temporal del GH en las proteínas de LRC durante el proceso enzimático secuencial con Flavourzyme y Alcalasa. Se observa una primera fase (0–~900 s) de incremento progresivo y relativamente lento, atribuible a la acción inicial de Flavourzyme, que al poseer actividades endo- y exopeptidasa libera aminoácidos y péptidos desde posiciones terminales de las proteínas (Ramírez, 2017). Esta fase parece alcanzar una meseta parcial alrededor de los 900 s, lo que indica saturación de los sustratos accesibles para esta enzima. Posteriormente, con la adición de Alcalasa, se produce un nuevo y más pronunciado incremento en el GH, coherente con la naturaleza endoproteasa de esta enzima, capaz de atacar enlaces peptídicos internos y menos expuestos de la matriz proteica (Noreña, 2022). Hacia los 3000 s (~50 min), la curva tiende nuevamente a estabilizarse, sugiriendo que la Alcalasa alcanzó su máxima capacidad catalítica bajo las condiciones experimentales.

**Figura 8.**

*Evolución del grado de hidrólisis de la proteína de Eisenia fetida en función del tiempo.*



*Nota.* La curva presenta el promedio del grado de hidrólisis (%GH) obtenido a partir de cuatro réplicas independientes del proceso enzimático secuencial empleando Flavourzyme y Alcalasa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El comportamiento observado concuerda con patrones reportados en otros estudios. Gómez (2013) describe curvas de hidrólisis típicas con fases iniciales rápidas seguidas de mesetas de estabilización, lo cual refleja la progresiva reducción de enlaces disponibles. Asimismo, Noreña (2022) reportó un GH de 13,02 % en hidrolizados de lombriz roja californiana con Alcalasa, valor superior al observado aquí, pero obtenido bajo condiciones diferentes de tiempo y concentración enzimática. En la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris, Zapata y col. (2019) encontraron que Alcalasa produce valores más altos de GH que Flavourzyme o Neutrasa, lo que confirma la mayor eficacia de esta enzima como endoproteasa. Por otro lado, Rao y col. (2020) reportaron que la aplicación secuencial de Alcalasa y Flavourzyme sobre caseína alcanzó un GH de 37,5 % en 150 min, significativamente mayor al

logrado con cada enzima de forma individual y con tiempos más prolongados (240 min). Aunque el GH alcanzado en nuestro estudio (9–11 %) es menor, debe resaltarse que el tiempo de reacción fue considerablemente más corto y que la naturaleza del sustrato (lombriz vs. caseína) introduce diferencias sustanciales en accesibilidad y composición proteica.

La hidrólisis secuencial de proteínas de *E. fetida* permitió obtener un GH cercano al umbral de referencia del 10 % y mostró un patrón cinético coherente con lo descrito en la literatura para otros sustratos, destacando un efecto sinérgico entre Flavourzyme y Alcalasa. Aunque el promedio no superó significativamente dicho valor, la tendencia observada en varias réplicas refuerza la viabilidad de esta estrategia y la necesidad de optimizar parámetros para alcanzar mayores niveles de hidrólisis. Estos resultados constituyen un punto de partida sólido para la caracterización bioactiva de los hidrolizados, la cual se abordará en el siguiente apartado mediante ensayos de inhibición enzimática ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa), capacidad antioxidante (ensayos ORAC, TEAC y de quelación de iones  $\text{Fe}^{2+}$ ), con el fin de relacionar el GH alcanzado con el perfil funcional obtenido.

### **Actividad biológica de los hidrolizados proteicos de *Eisenia fetida***

El análisis funcional del HLRC se abordó de manera integrada, considerando dos ejes complementarios: (a) la inhibición de carbohidrasas involucradas en el control glucémico postprandial ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa) y (b) la capacidad antioxidante (ORAC, ABTS y quelación de  $\text{Fe}^{2+}$ ), relevante para mitigar el estrés oxidativo que coevoluciona con los desórdenes metabólicos. Esta aproximación dual permite valorar no solo la potencia inhibitoria ( $\text{IC}_{50}$ ,  $\text{EC}_p$  y modo de acción) sino también la capacidad de secuestro de radicales y iones metálicos, atributos que, en conjunto, perfilan el potencial nutracéutico del HLRC. Para cada bioactividad se emplearon ensayos *in vitro* validados, con controles positivos (acarbose), ajuste

logístico 4PL para la caracterización dosis–respuesta y, cuando correspondió, análisis cinético para inferir el modo de inhibición. Los resultados se presentan a continuación, articulando las evidencias de actividad antidiabética con las de capacidad antioxidante a fin de sostener una interpretación mecanística y aplicada coherente

### **Actividad inhibitoria sobre la $\alpha$ -amilasa**

Se presenta y analiza la actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -amilasa inducida por el HLRC, una matriz no reportada previamente como inhibidora enzimática. Se realizó la estimación del  $IC_{50}$ , se caracterizó la curva dosis–respuesta mediante un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL), se verificó la tendencia concentración-dependiente y la reproducibilidad experimental, y se establecieron comparaciones de potencia con acarbosa y con sistemas análogos informados en la literatura. En términos fenomenológicos, se confirmó que el HLRC inhibió la  $\alpha$ -amilasa y que la concentración proteica máxima ensayada produjo la mayor inhibición observada, lo que sustentó un efecto biológico consistente. En la tabla 6 se muestran los resultados de la inhibición alcanzada con el hidrolizado concentrado (1,31g/100 mL de proteína), y sus diluciones.

**Tabla 6.**

*Inhibición de la  $\alpha$ -amilasa por el hidrolizado proteico de LRC.*

<b>Concentración de Proteína (g/100ml)</b>	<b>inhibición <math>\alpha</math>-amilasa (%)</b>	<b>DE</b>	<b>CV (%)</b>
1,31	96,30	1,63	1,69
0,66	86,47	0,59	0,68
0,48	68,57	2,18	3,18
0,33	55,71	1,84	3,30
0,17	33,43	3,53	10,56
0,09	19,97	2,70	13,56

*Nota.* Los valores corresponden al promedio de réplicas (n=3) independientes  $\pm$  desviación estándar (DE). CV = coeficiente de variación.

La respuesta inhibitoria del HLRC fue claramente concentración-dependiente a lo largo del rango evaluado. La inhibición máxima se observó en la concentración más alta (1,31 g/100 mL), con  $96,30 \pm 1,63$  %, mientras que la mínima correspondió a la concentración más baja (0,09 g/100 mL), con  $19,97 \pm 2,70$  %. En conjunto, el sistema mostró un rango dinámico de 76 puntos porcentuales ( $\approx 20$  % a  $\approx 96$  %), lo que evidenció un efecto inhibitorio robusto del hidrolizado.

En términos de precisión, la variabilidad (DE) fue baja a moderada en la mayor parte del rango y tendió a disminuir conforme aumentó la inhibición. Los coeficientes de variación (CV) fueron  $< 3,5$  % en las concentraciones intermedias y altas (0,33–1,31 g/100 mL; CV  $\approx 0,68$ – $3,30$  %), lo que indica consistencia experimental en esa zona de la curva. En las dos concentraciones más bajas, la variabilidad relativa fue mayor (0,165 g/100 mL: CV  $\approx 10,6$  %; 0,0917 g/100 mL: CV  $\approx 13,5$  %), patrón esperable en regiones de señal débil cercanas al límite de cuantificación del ensayo.

De manera descriptiva, los datos delinearón una transición progresiva desde inhibiciones modestas en el extremo inferior hasta una meseta alta próxima al 100 % en el extremo superior, compatible con una curva sigmoideal dosis–respuesta. Esta caracterización sustenta el uso de modelos no lineales para la estimación del  $IC_{50}$  y la comparación formal de potencias.

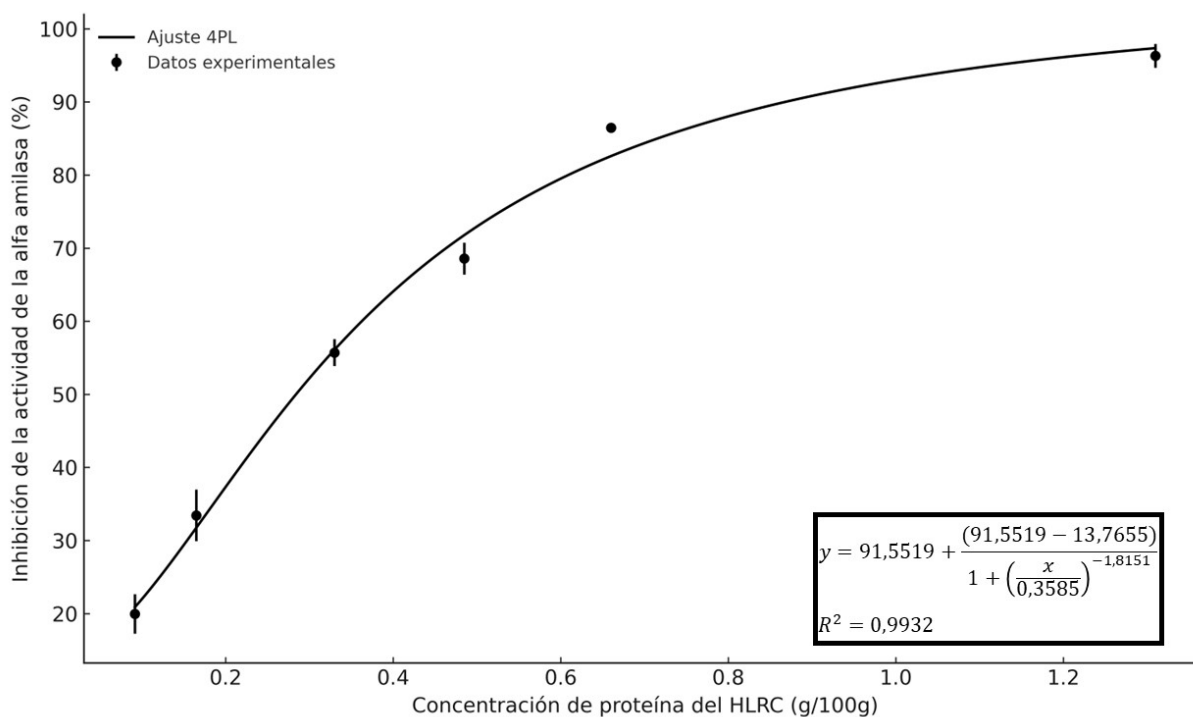
La Figura 9 muestra la curva dosis-respuesta obtenida a partir de la evaluación de la actividad inhibitoria del hidrolizado proteico sobre la enzima  $\alpha$ -amilasa. La gráfica evidencia el incremento de la inhibición conforme aumentó la concentración del hidrolizado (g/100 mL), con una morfología sigmoideal bien definida. Visualmente, el punto de inflexión se ubicó en el intervalo medio ( $\approx 0,3$ – $0,5$  g/100 mL), consistente con el valor de  $IC_{50}$  estimado por el ajuste no lineal. La región de mayor sensibilidad analítica, donde pequeños cambios de concentración

produjeron variaciones marcadas en la respuesta, se concentró en ese tramo medio, mientras que en los extremos se apreciaron pendientes reducidas compatibles con limitación de sitios de unión (arriba) y señal cercana al umbral del ensayo (abajo).

Esto es coherente con otros estudios en los que se ha reportado que la inhibición enzimática por péptidos bioactivos tiende a estabilizarse en un umbral por debajo del 100%, posiblemente debido a efectos como la formación de agregados o la limitación de accesibilidad al sitio activo de la enzima (Dickinson & Leser, 2007).

### Figura 9.

*Curva dosis-respuesta para la inhibición de la actividad de  $\alpha$ -amilasa con HLRC.*



*Nota.* La curva representa el porcentaje de inhibición de la actividad de la  $\alpha$ -amilasa en función de la concentración de proteína del hidrolizado de lombriz roja californiana (HLRC). Los puntos corresponden al promedio de réplicas independientes, y las barras de error indican la desviación estándar.

Para interpretar adecuadamente los datos experimentales obtenidos en la evaluación de la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa por el hidrolizado proteico, se comparó la regresión lineal y el modelo

logístico no lineal de cuatro parámetros (4PL). La regresión lineal mostró un coeficiente de determinación ( $R^2 \approx 0,81$ ), lo que sugiere una correlación moderada entre la concentración y la respuesta. Sin embargo, este ajuste resultó insuficiente, ya que la relación biológica entre concentración e inhibición sigue típicamente un patrón sigmoideal, no lineal. Por su parte, en el ajuste no lineal 4PL, el coeficiente de correlación fue  $R^2 = 0.993$ , indicando un excelente ajuste a los datos experimentales.

El ajuste 4PL superpuesto describió con precisión la trayectoria central de los puntos, sin indicios visuales de sesgos sistemáticos u *outliers*. Las barras de error fueron proporcionalmente más estrechas en el segmento medio-alto de la curva y tendieron a ampliarse en el extremo inferior, patrón típico de heterocedasticidad en ensayos de inhibición cuando la señal se aproxima al límite de cuantificación. En conjunto, la representación gráfica corroboró una relación concentración–respuesta bien comportada, justificó el uso de un modelo logístico para la estimación de parámetros y evidenció una meseta superior compatible con la saturación del efecto inhibitorio.

Esta dinámica no lineal es coherente con los mecanismos de inhibición enzimática, donde la respuesta biológica depende del número de sitios activos ocupados por los compuestos presentes en el hidrolizado.

El uso del modelo 4PL está ampliamente documentado y recomendado en estudios de inhibición enzimática y farmacología, ya que permite describir con mayor fidelidad el comportamiento no lineal de este tipo de sistemas. A diferencia del modelo lineal, el 4PL considera los niveles de saturación, la pendiente de la curva (pendiente de *Hill*) y los límites superior e inferior, mejorando así la estimación de parámetros clave como el  $IC_{50}$ . Diversos autores destacan que el uso de ajustes lineales puede subestimar o sobreestimar la eficacia del

inhibidor, especialmente en las zonas de mayor o menor respuesta (Rodbard, 1974; Sebaugh, 2011; Gottschalk & Dunn, 2005).

En conjunto, estos resultados no solo evidencian la capacidad inhibitoria del hidrolizado proteico de *Eisenia fetida*, sino que también destacan la calidad y confiabilidad de los datos experimentales, fundamentales para sustentar la estimación precisa de parámetros como el IC<sub>50</sub>.

**Tabla 7.**

*Parámetros estimados mediante el modelo 4PL para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa por HLRC.*

Parámetro	HLRC
Inhibición máxima ( <i>a</i> )	91,55%
Pendiente ( <i>b</i> )	-1,82
IC <sub>50</sub> ( <i>c</i> )	0.36 g/100mL
Inhibición mínima ( <i>d</i> )	13,77%

*Nota.* Los parámetros se estimaron mediante el ajuste al modelo de regresión logística de cuatro parámetros (4PL).

En la Tabla 7 se encuentran los parámetros estimados del modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa empleando el HLRC. El modelo estimó un IC<sub>50</sub> de 0,36 g/100 mL, correspondiente a la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la actividad enzimática, valor que evidencia una potencia inhibitoria elevada, especialmente considerando que no se realizó fraccionamiento del hidrolizado ni purificación de péptidos. Este valor posiciona al extracto como un prometedor candidato para el desarrollo de ingredientes funcionales antidiabéticos, y destaca la relevancia de usar ajustes no lineales apropiados.

El límite superior del modelo ( $a = 91,55\%$ ) indicó que, aun en condiciones de saturación, la inhibición tendió a estabilizarse por debajo del 100 %, lo que fue consistente con una inhibición incompleta propia de matrices peptídicas complejas. El límite inferior ( $d = 13,77\%$ ) reflejó una inhibición residual en el extremo de bajas concentraciones, compatible con el “piso”

experimental del sistema. El rango dinámico ( $a - d$ ) fue de 77,78 puntos porcentuales, cuantificando la capacidad de modulación del HLRC sobre la  $\alpha$ -amilasa en el intervalo ensayado.

En coherencia con ello, las dosis efectivas estimadas se reportan en la Tabla 8. Donde se observa que la zona de mayor sensibilidad se concentró alrededor de  $IC_{50} = 0,36$  g/100 mL y se extendió aproximadamente entre  $EC_{60}$ – $EC_{80}$  (0,45–0,77 g/100 mL). A partir de  $\sim 0,9$ – $1,2$  g/100 mL ( $\approx EC_{85}$ – $EC_{90}$ ) la curva ingresó en meseta (saturación): la pendiente disminuyó e incrementos de dosis produjeron pocas ganancias en el porcentaje de inhibición.

**Tabla 8.**

*Concentraciones efectivas (EC) estimadas para HLRC en la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa.*

Métrica	Valor (g/100 mL)
$EC_{60}$	0,45
$EC_{70}$	0,57
$EC_{80}$	0,77
$EC_{90}$	1,20

*Nota.*  $EC_p$  corresponde a la concentración del hidrolizado de lombriz roja californiana (HLRC) necesaria para alcanzar el  $p$  % del efecto máximo de inhibición de la  $\alpha$ -amilasa, calculado a partir del modelo logístico de cuatro parámetros (4PL).

Cabe señalar que el valor ajustado de  $a$  (91,55 %) subestimó la inhibición máxima observada experimentalmente ( $\sim 96$  %), un comportamiento esperable cuando el ajuste global modera valores extremos para reducir el error total. En general el conjunto de datos obtenidos en el laboratorio capturó la sigmoidalidad, localizó con precisión el  $IC_{50}$  y definió el intervalo operativo del inhibidor con solidez.

Por otro lado, el  $IC_{50}$  de 0,36 g/100 mL (equivalente a 3,6 mg/mL) frente a la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa identificado en este estudio, se ubica dentro del rango reportado para otros hidrolizados proteicos, aunque con diferencias notables según el origen de la proteína y las condiciones de hidrólisis. Por ejemplo, los hidrolizados de lupino obtenidos con Alcalasa y

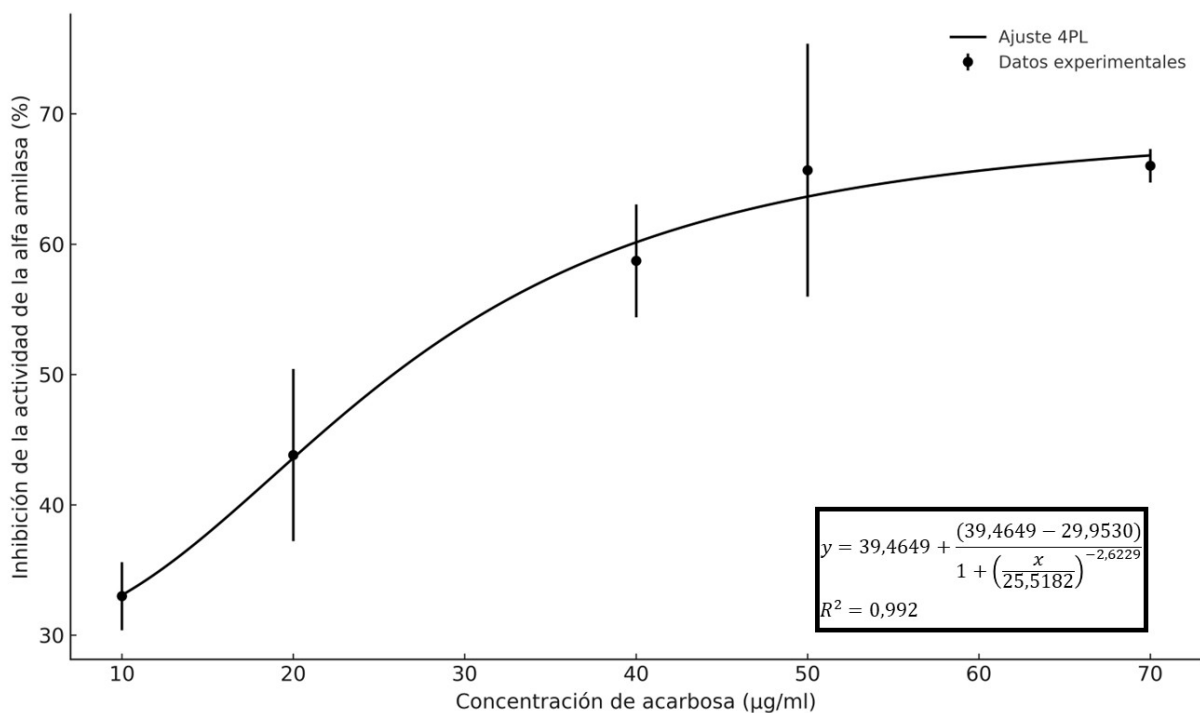
Flavourzyme mostraron  $IC_{50}$  de 1,66 mg/mL y 1,98 mg/mL, respectivamente (Fadimu et al., 2022). De manera similar, los hidrolizados de algas tratados con pepsina reportaron un  $IC_{50}$  de 1,86 mg/mL (Admassu et al., 2018). En contraste, otros hidrolizados exhibieron menor potencia inhibitoria: los obtenidos de semillas de papaya alcanzaron un  $IC_{50}$  de 6,49 mg/mL (James, et al., 2020), mientras que los de *Cucumeropsis mannii* mostraron valores aún más altos, en el rango de 8,77 a 14,80 mg/mL (Babatunde et al., 2025).

De este modo, el HLRC obtenido mostró una eficacia intermedia: menos potente que los de lupino o algas, pero más activo que los de papaya y *C. mannii*. Estas diferencias reflejan la influencia del origen proteico, el tipo de enzima empleada en la hidrólisis y las condiciones del ensayo enzimático, por lo cual la comparación entre estudios debe interpretarse con cautela. No obstante, los resultados sugieren que el hidrolizado obtenido presenta un potencial bioactivo relevante, con posibilidades de aplicación como ingrediente funcional o nutraceutico.

Con el fin de respaldar y calibrar el desempeño del ensayo, se incluyó acarbosa como control positivo, dado que es un fármaco ampliamente utilizado por su capacidad de inhibir la  $\alpha$ -amilasa. La Figura 10 muestra la curva dosis–respuesta obtenida, y el modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) permitió estimar un valor de  $IC_{50}$  de 25,52  $\mu$ g/mL, consistente con lo reportado en la literatura para este inhibidor estándar. Estos resultados confirman la confiabilidad del ensayo y proporcionan una referencia sólida para la comparación con la actividad inhibitoria de los hidrolizados proteicos evaluados.

**Figura 10.**

*Curva dosis–respuesta de la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa empleando acarbosa.*



*Nota.* Los puntos representan los datos experimentales de porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones del inhibidor; las barras de error corresponden a la desviación estándar de las mediciones.

No obstante, esta comparación debe interpretarse con cautela. La acarbosa es un inhibidor puro con una masa molar definida (~645 Da), mientras que los hidrolizados corresponden a mezclas complejas de péptidos y proteínas de diferentes tamaños y bioactividades. Esta diferencia de naturaleza química implica que, aunque la comparación en términos de concentración en masa es útil para dimensionar la potencia relativa, no existe un punto de comparación directo en términos molares, ya que el hidrolizado carece de una masa molecular única que permita expresarlo en concentración molar.

El valor de  $IC_{50}$  de la acarbosa obtenido en el presente estudio (25,52 µg/mL) se encuentra dentro del rango reportado en la literatura para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa, aunque es inferior al descrito en varios trabajos previos. Por ejemplo, Narkhede y col. (2012) informaron

un valor de 52,2  $\mu\text{g/mL}$  para la  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina, mientras que Patwekar y col. (2022) registraron 90,35  $\mu\text{g/mL}$  bajo condiciones experimentales similares. En contraste, Meza y Valdés (2015) reportaron un  $\text{IC}_{50}$  de  $1,9 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ , un resultado notoriamente menor y probablemente atípico al compararse con la mayoría de los estudios disponibles.

Estas discrepancias entre investigaciones pueden atribuirse a diferencias metodológicas en los ensayos enzimáticos, tales como el tipo y origen de la enzima empleada (pancreática porcina o recombinante humana), el sustrato utilizado, las condiciones de pH y temperatura o incluso el método de detección colorimétrica aplicado. En este contexto, el valor de 25,52  $\mu\text{g/mL}$  determinado en este trabajo es coherente con los reportes de la literatura y confirma la idoneidad de la acarbosa como inhibidor de referencia en estudios de actividad frente a carbohidrasas (Tabla 9).

Comparativamente, el presente estudio evidencia una inhibición máxima superior a la registrada en la mayoría de los sistemas proteicos previamente reportados. Bui y col. (2023) informaron una inhibición del  $91,3 \pm 2,5 \%$  en hidrolizados de *Perionyx excavatus*, aunque sin especificar el valor de  $\text{IC}_{50}$ . Si bien señalaron una actividad superior a la de la acarbosa, los resultados obtenidos en este trabajo superan dicha inhibición máxima, lo que sugiere una mayor eficiencia del sistema evaluado.

**Tabla 9.**

Valores de  $IC_{50}$  reportados para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa por distintos hidrolizados proteicos.

Fuente / Origen	Enzima utilizada	$IC_{50}$ (mg/mL)	Equivalente (g/100 mL)	Referencia
Este estudio (HLRC, hidrolizado concentrado)	Flavourzyme– Alcalasa	3,6	0,36	Este estudio
Lupino (alcalasa)	Alcalasa	1,66	0,166	Fadimu et al., 2022
Lupino (flavourzyme)	Flavourzyme	1,98	0,198	Fadimu et al., 2022
Alga ( <i>Porphyra</i> sp.)	Pepsina	1,86	0,186	Admassu et al., 2018
Semilla de papaya	No especificada	6,49	0,649	James et al., 2020
<i>Cucumeropsis mannii</i> (semilla)	No especificada	8,77–14,80	0,877–1,480	Babatunde et al., 2025

*Nota.* HLRC = hidrolizado de lombriz roja californiana.  $IC_{50}$  corresponde a la concentración de inhibidor necesaria para reducir la actividad enzimática al 50 %.

Asimismo, estudios con fuentes vegetales han mostrado niveles de inhibición inferiores: Islam y col. (2021) reportaron un máximo de 76,9 % para hidrolizados de soya, mientras que Jiménez-Suaste y col. (2023) obtuvieron inhibiciones entre 28,1 % y 45,8 % en hidrolizados de maíz *Sac-Beh*, dependiendo de la enzima utilizada. En todos los casos, se observa un patrón dosis-dependiente de incremento en la inhibición con la concentración, aunque el sistema del presente estudio presenta una eficiencia global más alta.

Estas diferencias podrían relacionarse tanto con la naturaleza de la fuente proteica como con el proceso de hidrólisis empleado. Además, como proponen Dickinson y Leser (2007), la formación de agregados peptídicos a altas concentraciones puede limitar la disponibilidad de

péptidos activos, fenómeno que explicaría la meseta observada en concentraciones superiores al 50 %.

En conjunto, el análisis estructural, bioquímico y comparativo de estos resultados indica que el HLRC presenta una actividad inhibitoria sobresaliente frente a la  $\alpha$ -amilasa, con una curva dosis-respuesta sigmoïdal bien ajustada y una potencia cuantificada mediante un  $IC_{50}$  de 0,36 g/100 g. Esto los posiciona como prometedor candidato en el diseño de alimentos funcionales o ingredientes con potencial antidiabético.

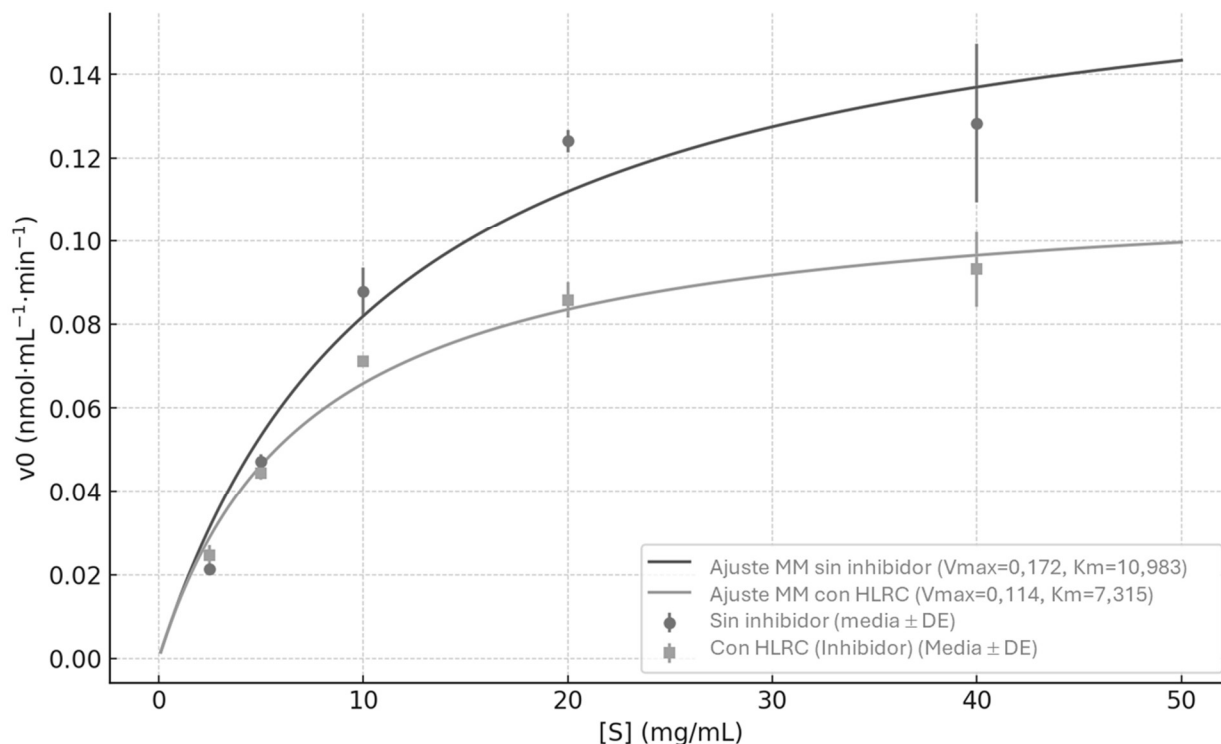
### **Análisis cinético del modo de inhibición del HLRC sobre la $\alpha$ -amilasa**

Sobre la base anterior, y para ir más allá de la potencia global reflejada por el  $IC_{50}$ , se abordó la elucidación del modo de inhibición del HLRC sobre la  $\alpha$ -amilasa mediante análisis cinético. En concreto, se evaluó la velocidad inicial ( $v_0$ ) a concentraciones crecientes de sustrato en ausencia y en presencia del inhibidor, con el fin de comparar los parámetros aparentes  $V_{max}$  y  $K_m$  y, a partir de sus variaciones, inferir el mecanismo de interacción enzima-inhibidor que subyace a la respuesta dosis-efecto previamente observada.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante ajuste no lineal al modelo de Michaelis-Menten, lo que permitió estimar  $V_{max}$  y  $K_m$  sin introducir sesgos derivados de transformaciones lineales. Las variaciones observadas en estos parámetros permitieron identificar el tipo de inhibición ejercida por el hidrolizado: un aumento de  $K_m$  con  $V_{max}$  constante sugiere un mecanismo competitivo, mientras que reducciones en  $V_{max}$  o en ambos parámetros indican componentes no competitivos o mixtos (Copeland, 2013). Estos resultados se analizan en función de la magnitud de los cambios cinéticos y su relación con el potencial inhibitorio del HLRC.

**Figura 11.**

*Cinética de la  $\alpha$ -amilasa con y sin HLRC: ajustes mediante el modelo de Michaelis–Menten.*



*Nota.* Los puntos corresponden a los valores experimentales expresados como media  $\pm$  desviación estándar, mientras que las curvas muestran los ajustes obtenidos con el modelo de Michaelis–Menten.

La Figura 11 presenta la cinética de la  $\alpha$ -amilasa  $v_0$  vs.  $[S]$  en ausencia y en presencia del HLRC. Los puntos muestran la media  $\pm$  DE y las curvas corresponden a ajustes no lineales de Michaelis–Menten, a partir de los cuales se estimaron los parámetros aparentes  $V_{\max}$  y  $K_m$  para cada condición. Se observa que la presencia del HLRC desplaza la curva hacia menores velocidades en todo el rango de  $[S]$ , con una saturación más temprana.

El ajuste de Michaelis–Menten mostró que tanto  $V_{\max}$  como  $K_m$  disminuyeron en presencia de HLRC. La Tabla 10 resume los parámetros estimados y sus intervalos de confianza (IC95 %), evidenciando reducciones consistentes en ambos valores y la conservación de la

relación  $V_{max}/K_m$ , lo que indica que la eficiencia inicial de la enzima a bajas concentraciones de sustrato se mantiene prácticamente inalterada.

**Tabla 10.**

*Parámetros cinéticos de la  $\alpha$ -amilasa con y sin HLRC estimados mediante el modelo de Michaelis–Menten.*

Condición	$V_{max}$	IC95% $V_{max}$	$K_m$ (mg/mL)	IC95% $K_m$	$V_{max}/K_m$	n	RMSE
Sin HLRC	0,17	0,16 – 0,19	10,98	7,40 – 11,59	0,018	3	0,164
Con HLRC	0,11	0,11 – 0,12	7,32	5,92 – 9,16	0,019	3	0,053

*Nota.* Valores estimados mediante ajuste no lineal de Michaelis–Menten (no ponderado) usando las medias en cinco niveles de concentración de sustrato ([S]). IC95%: intervalo de confianza al 95 % obtenido por el método Wald (gl = 3).  $n$  = número de réplicas por punto. RMSE = *root mean squared error* (raíz del error cuadrático medio).

La comparación de los modelos de inhibición mediante ajuste global ponderado identificó al modelo no competitivo como el que mejor describe los datos (SSE = 13,53), frente al acompetitivo (22,13) y competitivo (27,79). Bajo este modelo, el HLRC reduce de forma marcada  $V_{max}$  y, en menor medida,  $K_m$ , aunque la relación  $V_{max}/K_m$  permanece prácticamente constante en el rango de trabajo. Las pequeñas variaciones adicionales de  $K_m$  observadas en el ajuste no ponderado pueden atribuirse a la correlación entre parámetros y al mayor peso relativo de los puntos de alta [S].

### Actividad inhibitoria sobre la $\alpha$ -glucosidasa

Los valores medios de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa para el HLRC se reportan en la Tabla 11.

El HLRC mostró una inhibición muy baja de la  $\alpha$ -glucosidasa, con efectos apreciables únicamente en la concentración más alta de proteína (1,31 g/100 mL). En las demás concentraciones, las respuestas fueron pequeñas y acompañadas de una alta dispersión, lo que las hace indistinguibles de una inhibición efectiva.

**Tabla 11.**  
*Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa por el hidrolizado proteico de Eisenia fetida (HLRC).*

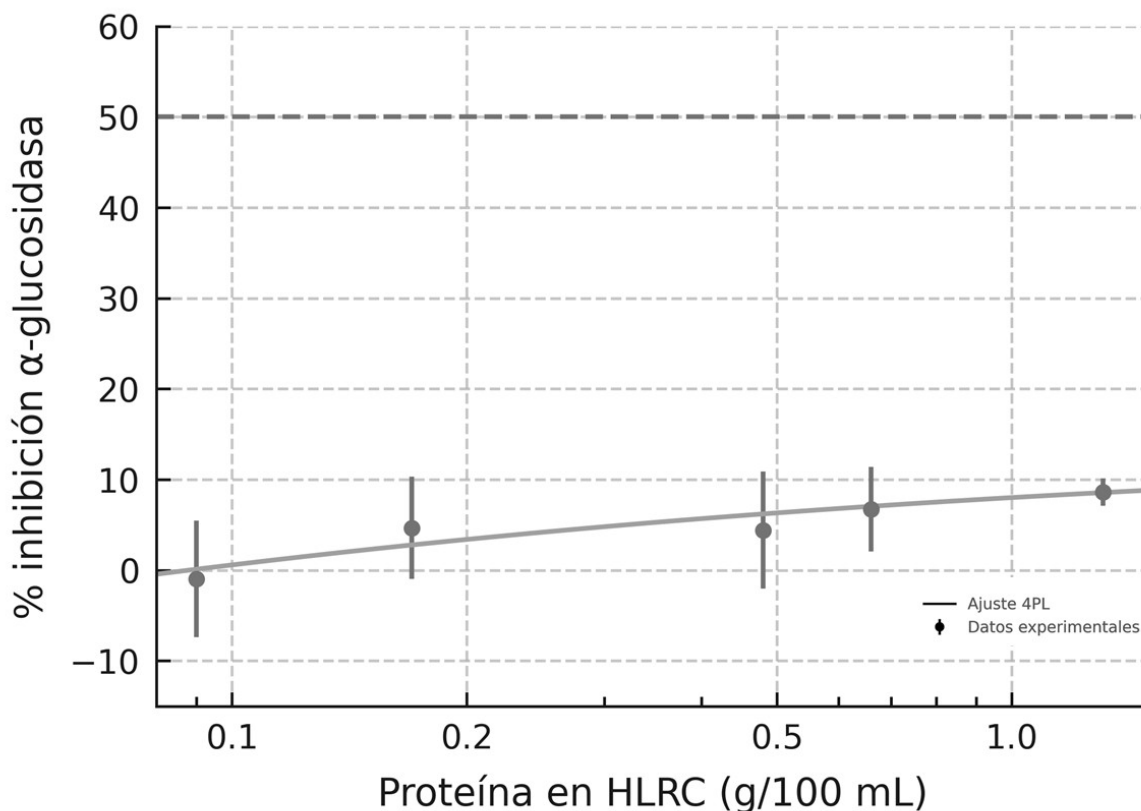
Proteína en HLRC (g/100 mL)	Media de inhibición $\pm$ DE (%)
1,31	8,61 $\pm$ 1,54
0,66	6,69 $\pm$ 4,67
0,48	4,41 $\pm$ 6,48
0,17	4,66 $\pm$ 5,65
0,09	-0,98 $\pm$ 6,40

*Nota.* Los valores corresponden al promedio (n=3) de inhibición (%)  $\pm$  desviación estándar (DE) obtenidos en el ensayo enzimático *in vitro*.

Expresando la respuesta en función del contenido proteico, se observa una tendencia positiva suave: el incremento desde 0,09 hasta 1,31 g/100 mL se traduce en un aumento de la inhibición de apenas ~9,6 puntos porcentuales. Esta pendiente global baja, junto con la heterogeneidad de la precisión (menor DE relativa en 1,31 g/100 mL y mayor dispersión en niveles intermedios y bajos), indica que la actividad inhibitoria del HLRC sobre la  $\alpha$ -glucosidasa es limitada en el rango analizado y solo se manifiesta de forma reproducible en la condición más concentrada. En consecuencia, los datos de la Tabla 11 respaldan que el HLRC, tal como se obtuvo y evaluó, no ejerce una inhibición relevante sobre la enzima en concentraciones inferiores a 1,31 g/100 mL de proteína. Como se muestra en la Figura 12, el ajuste logístico (4PL) confirmó que, en el rango analizado, el HLRC no ejerció una inhibición relevante sobre esta enzima. Con una respuesta sigmoïdal de baja amplitud, y con un *plateau* dentro del rango ensayado cercano a 9–10 %. En ninguna condición se alcanzó el 50 % de inhibición, por lo que el  $IC_{50}$  no es estimable en el rango probado; de forma conservadora se reporta  $IC_{50} > 100$  % v/v (equivalente a  $IC_{50} > 1,31$  g de proteína/100 mL bajo estas condiciones).

**Figura 12.**

*Curva dosis–respuesta del HLRC sobre la  $\alpha$ -glucosidasa ajustada mediante un modelo 4PL.*



*Nota.* Los puntos representan los valores experimentales ( $n = 3$ ; media  $\pm$  DE), mientras que la curva corresponde al ajuste del modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) ponderado por la varianza. El eje  $x$  se muestra en escala logarítmica según la concentración de proteína del HLRC (g/100 mL).

Las barras de error indican variabilidad mayor en las concentraciones intermedias (37–12,5 %), donde la señal es próxima al fondo (DE del mismo orden que el efecto), y menor en 100 %, donde el efecto (aunque modesto) es consistente. El uso de ponderación  $1/DE^2$  en el ajuste 4PL minimizó la influencia de puntos con alta dispersión; aun así, el ajuste confirmó un techo de efecto bajo y una potencia insuficiente ( $IC_{50}$  fuera de rango). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que, en las condiciones del ensayo (pH 6,8; 37 °C; pNPG 5 mM; 25 min), el HLRC mostró una actividad inhibitoria limitada frente a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa. La inhibición

fue estadísticamente consistente únicamente a la concentración más alta ensayada (1,31 g/100 mL de proteína), donde alcanzó un valor medio de  $8,61 \pm 1,54$  %. A concentraciones intermedias y bajas, la inhibición no se distinguió del ruido experimental, y el modelo 4PL ajustado no permitió estimar un valor de  $IC_{50}$  dentro del rango de concentraciones probado.

Este comportamiento contrasta marcadamente con el observado en el mismo HLRC al ser evaluado frente a  $\alpha$ -amilasa, donde sí se evidenció una actividad inhibitoria significativa y sostenida. Esta divergencia sugiere que los péptidos generados durante la hidrólisis secuencial presentan una afinidad diferencial hacia cada enzima blanco, lo cual puede explicarse a partir de diversos factores estructurales y mecanísticos.

En síntesis, el HLRC evidenció una inhibición limitada de la  $\alpha$ -glucosidasa en el rango evaluado, con efectos modestos y elevada variabilidad en concentraciones intermedias, lo que impidió estimar un  $IC_{50}$  confiable. Para contextualizar estos resultados y respaldar la validez del procedimiento analítico, se empleó acarbosa como control positivo de referencia. Este inhibidor estándar permitió verificar la sensibilidad del ensayo bajo las mismas condiciones experimentales y, al mismo tiempo, establecer un punto de comparación cuantitativo respecto a la potencia y eficacia observadas con el HLRC. De esta manera, la inclusión de la acarbosa proporciona un marco sólido para interpretar el alcance real de la actividad inhibitoria atribuida al hidrolizado.

Los resultados (Tabla 12) muestran una clara relación dosis–dependiente de la acarbosa frente a la  $\alpha$ -glucosidasa. A la concentración de 1,0 mg/mL se alcanzó la inhibición más alta, con baja dispersión relativa entre réplicas, lo que refleja un efecto estable y reproducible. En 0,50 mg/mL se observó una inhibición intermedia, aunque con mayor variabilidad experimental, mientras que en 0,25 mg/mL la respuesta fue mínima y estadísticamente indistinguible de cero.

En conjunto, estos datos confirman que el ensayo discrimina de manera adecuada entre concentraciones efectivas y no efectivas, y que la acarbosa actúa como un inhibidor positivo robusto en este sistema.

**Tabla 12.**

*Inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa por acarbosa.*

Concentración (mg/mL)	% inhibición (media)	DE
1,00	68,95	1,54
0,50	55,56	9,55
0,25	1,99	1,63

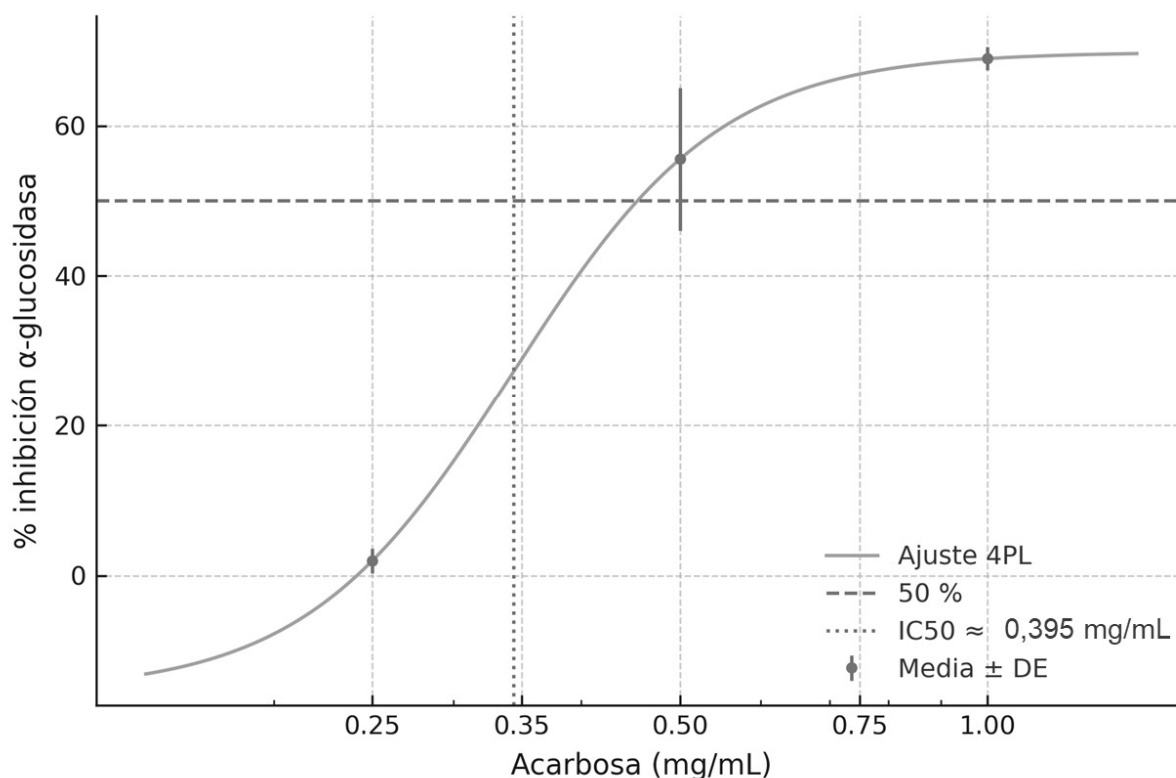
*Nota.* Los valores corresponden a la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa por acarbosa, expresados como media (n=3)  $\pm$  desviación estándar (DE). Se realizaron tres réplicas por nivel de concentración.

La curva dosis–respuesta de la acarbosa frente a la  $\alpha$ -glucosidasa (Figura 13) mostró un comportamiento sigmoidal típico, con inhibición baja en 0,25 mg/mL, un aumento marcado en 0,50 mg/mL cercano al punto de inflexión, y una aproximación al *plateau* en 1,0 mg/mL. El ajuste logístico (4PL) arrojó un IC<sub>50</sub> de 0,395 mg/mL, valor consistente con lo esperado para este inhibidor estándar y que respalda la sensibilidad y confiabilidad del ensayo.

El resultado obtenido para la acarbosa coincide con lo descrito en la literatura, lo que refuerza la validez metodológica y la confiabilidad del ensayo; por ejemplo, Flores-Bocanegra (2013) reportó un IC<sub>50</sub> de aproximadamente 0.5 mM (equivalente a 0,266 mg/mL), utilizando  $\alpha$ -glucosidasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como modelo enzimático de referencia. De forma concordante, Treviño-Moreno (2024) obtuvo un valor de 0,370 mg/mL, empleando extractos naturales comparados con acarbosa como control positivo. Veas-Albornoz (2015) indicó un IC<sub>50</sub> de  $0.251 \pm 0.034$  mg/mL también usando la enzima fúngica, mostrando ligera mayor potencia inhibitoria, aunque bajo condiciones experimentales específicas.

**Figura 13.**

*Curva dosis–respuesta de la acarbosa frente a la  $\alpha$ -glucosidasa ajustada mediante un modelo 4PL.*



*Nota.* Puntos experimentales (media  $\pm$  DE) con barras de error y ajuste logístico de cuatro parámetros (4PL) ponderado por  $1/DE^2$  en eje  $x$  logarítmico. Se muestran líneas de referencia al 50 % y el  $IC_{50}$  estimado por el ajuste ( $\approx 0,395$  mg/mL).

Chaturanga y col. (2024) determinaron un valor de 0,045 mg/mL para acarbosa contra  $\alpha$ -glucosidasa extraída de tejido de rata, mientras que Andhiarto y col. (2025) y Arif y col. (2025) reportaron  $IC_{50}$  de 0,046 mg/mL y 0,030 mg/mL respectivamente, utilizando enzimas de origen mamífero (recombinante o porcino). Aunque estos valores parecen más bajos que los aquí reportados, es importante considerar el origen enzimático, el tipo de sustrato (pNPG vs maltosa), la fuente de la enzima y la especie de origen (porcina, ratón, humana recombinante, etc.), factores que impactan directamente en la afinidad y cinética de la inhibición. que tienden a tener mayor afinidad por la acarbosa y, por lo tanto, requieren menor concentración para alcanzar una inhibición del 50%. Además, los ensayos que emplean enzimas recombinantes presentan mayor

sensibilidad que aquellos con extractos crudos o parcialmente purificados, lo que también explica las diferencias.

Un estudio adicional de Waseem y col. (2025) compararon acarbosa ( $IC_{50} = 0.521 \mu\text{M} \approx 0.336 \mu\text{g/mL}$ ) con nuevos compuestos sintéticos en un modelo enzimático humano recombinante, demostrando la eficacia de acarbosa dentro de rangos que coinciden en magnitud molar con los observados en nuestro modelo experimental, si se considera la masa molar de acarbosa ( $\sim 645 \text{ g/mol}$ ). Al convertir nuestro valor de  $0,395 \text{ mg/mL}$  a unidades molares, se obtiene un  $IC_{50} \approx 612 \mu\text{M}$ , lo que, si bien no es idéntico, coincide en orden de magnitud con los valores citados en la literatura para la acarbosa bajo diferentes condiciones. Esta coincidencia respalda la consistencia y validez de nuestros resultados dentro del contexto experimental y farmacodinámico esperado para este tipo de inhibidor.

Por tanto, el valor de  $IC_{50} = 0,395 \text{ mg/mL}$  obtenido en este trabajo se encuentra dentro del intervalo esperado según múltiples referencias y válida el uso de acarbosa como inhibidor estándar de  $\alpha$ -glucosidasa para futuras comparaciones con compuestos bioactivos experimentales, y permite una base cuantitativa confiable para la evaluación de alternativas terapéuticas orientadas al control glicémico postprandial.

Con base en los resultados presentados, puede sintetizarse que el hidrolizado proteico de *Eisenia fetida* evidenció una actividad inhibitoria significativa, reproducible y dosis-dependiente frente a la  $\alpha$ -amilasa, caracterizada por una curva dosis–respuesta de morfología sigmoideal, un  $IC_{50}$  estimado de  $0,36 \text{ g/100 mL}$ , y una inhibición máxima experimental próxima al 96 %. El ajuste mediante un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL) permitió caracterizar con precisión la relación concentración–efecto y estimar métricas comparativas como  $EC_{60}$ – $EC_{90}$ , que definieron el intervalo de acción más sensible. Aunque la potencia del HLRC fue

considerablemente inferior a la acarbosa cuando se comparó en términos de concentración másica ( $\approx 140\times$  menor), los datos respaldan que el efecto observado no es fortuito ni débil, sino que refleja una modulación real de la actividad enzimática. El análisis cinético confirmó que el HLRC actúa principalmente por inhibición no competitiva con posible componente mixto, reduciendo  $V_{max}$  sin alterar significativamente la relación  $V_{max}/K_m$ . Esta caracterización bioquímica complementa la evaluación de potencia y posiciona al HLRC como un inhibidor funcionalmente activo con un mecanismo distinto al de la acarbosa. En contraste, frente a la  $\alpha$ -glucosidasa el HLRC evidenció una inhibición reducida, observable únicamente en la concentración más alta analizada y sin que fuera posible determinar un  $IC_{50}$  dentro del rango evaluado. Este comportamiento diferenciado sugiere una afinidad enzimática selectiva, posiblemente explicada por la composición peptídica generada durante la hidrólisis.

En este contexto, investigaciones como la presente resultan estratégicamente relevantes, ya que contribuyen a la identificación de nuevos agentes bioactivos derivados de fuentes no convencionales, con capacidad para modular enzimas clave en el metabolismo de carbohidratos. Dada la centralidad de la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa en la digestión de almidones y en la regulación de la glicemia postprandial, el hallazgo de inhibidores naturales con efecto comprobado, representa una vía prometedora para el desarrollo de ingredientes funcionales y nutracéuticos orientados a la prevención o tratamiento complementario de la diabetes. Este tipo de abordajes es especialmente valioso ante la creciente prevalencia global de la DM2 y la necesidad de alternativas terapéuticas que sean más accesibles, seguras y culturalmente integrables.

### Perfil de distribución de masa molecular del hidrolizado proteico de *Eisenia fetida*

El perfil de distribución de masa molecular del HLRC se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular. El cromatograma reveló cinco fracciones principales con pesos moleculares comprendidos entre 0,08 y 14,85 kDa (Tabla 13). La fracción predominante correspondió a péptidos de 2,60 kDa (46,85 %), seguida por otra de 6,24 kDa (37,05 %); en conjunto, ambas representaron aproximadamente el 84 % del total. Las fracciones inferiores a 1 kDa constituyeron alrededor del 4 %, lo que indica un predominio de péptidos de tamaño intermedio y, en consecuencia, una hidrólisis incompleta del sustrato proteico, coherente con el grado de hidrólisis moderado (~10 %) observado previamente.

**Tabla 13.**

*Perfil de peso molecular del HLRC determinado mediante cromatografía de exclusión molecular.*

Pico	Tiempo de retención (min)	Peso molecular (kDa)	Porcentaje relativo (%)
1	9,80	14,85	0,98
2	10,74	6,24	37,05
3	11,68	2,60	46,85
4	12,54	1,17	10,77
5	15,38	0,08	4,35

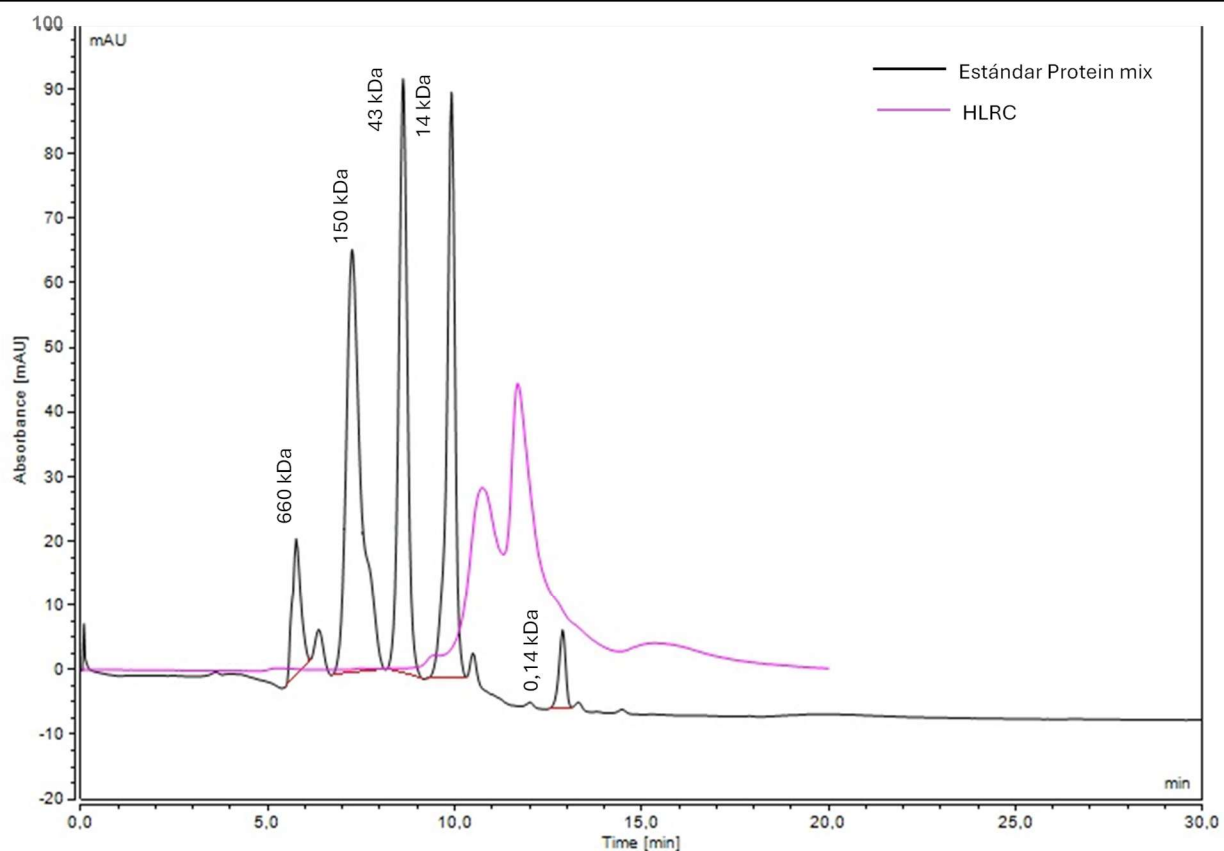
*Nota.* Los porcentajes relativos corresponden al área bajo la curva de cada pico en el cromatograma de exclusión molecular, reflejando la proporción de péptidos presentes en cada intervalo de masa molecular.

Esto sugiere una liberación parcial de péptidos a partir de las proteínas originales de *E. fetida*, concordante con la baja proporción de fragmentos pequeños (< 1 kDa; Figura 14). En términos funcionales, esta distribución ayuda a explicar la asimetría observada entre las dos enzimas diana: mientras la  $\alpha$ -amilasa presentó una inhibición marcada y reproducible, la  $\alpha$ -glucosidasa mostró una inhibición limitada en el rango evaluado. En la literatura, los péptidos inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa suelen tener masas moleculares menores a 3 kDa y estar

enriquecidos en residuos hidrofóbicos o aromáticos, características que favorecen su acceso y anclaje al sitio catalítico (Lu et al., 2023; Khakhariya et al., 2023). Por tanto, la predominancia de fracciones de 2–6 kDa en el HLRC (junto con la escasa presencia de péptidos < 1 kDa) podría restringir el acceso eficaz al microambiente activo de la  $\alpha$ -glucosidasa y reducir su afinidad inhibitoria, en contraste con la cavidad más accesible y menos restringida de la  $\alpha$ -amilasa.

### Figura 14.

*Perfil cromatográfico de exclusión molecular del HLRC en comparación con un estándar de proteínas.*



*Nota.* El cromatograma muestra el perfil de elución del hidrolizado de *Eisenia fetida* (HLRC, línea magenta) obtenido por cromatografía de exclusión molecular, en comparación con el estándar de proteínas (*Protein Mix*, línea negra).

Desde una perspectiva estructural, la composición aminoacídica también puede contribuir a esta selectividad. Se ha descrito que los péptidos inhibidores de  $\alpha$ -amilasa tienden a presentar

residuos como Leu y Met en los extremos N- o C-terminales (Baba et al., 2021), y que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Leu, Val, Gly) e hidrofílicos (Met, His) favorece la interacción con la cavidad catalítica (Balderas-León et al., 2021). Adicionalmente, residuos como Arg, Glu y Asp muestran altas afinidades por  $\alpha$ -amilasa debido a bajas energías de unión (Siahbalaeei et al., 2021). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el HLRC contiene motivos peptídicos con afinidad preferencial por  $\alpha$ -amilasa, coherente con la mayor potencia inhibitoria observada frente a esta enzima.

La naturaleza de las proteínas precursoras refuerza esta interpretación. Las proteínas mayoritarias en *E. fetida* (colágeno, actina y miosina) difieren de caseínas o  $\beta$ -lactoglobulinas lácteas, conocidas por generar péptidos antidiabéticos tras hidrólisis dirigida (Patil et al., 2015). Una composición rica en glicina, prolina y alanina, junto con un patrón de clivaje más limitado, podría originar péptidos menos compatibles con los determinantes de unión de la  $\alpha$ -glucosidasa.

En el plano estructural-funcional, las diferencias intrínsecas entre  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa son notables: la primera posee un sitio activo más accesible y una cavidad catalítica amplia, mientras que la segunda presenta una topología más restringida y un ambiente electrostático distinto (Connolly et al., 2014; Patil et al., 2015). En consecuencia, es plausible que los péptidos de 2–6 kDa predominantes en el HLRC interactúen eficazmente con la  $\alpha$ -amilasa, pero carezcan de la conformación/cargas óptimas para inhibir de forma significativa a la  $\alpha$ -glucosidasa.

Por último, comparaciones con otros hidrolizados que exhiben mayor GH o fermentación dirigida (p. ej., leche de camello: Khakhariya et al., 2023; quesos: Wei et al., 2022; quinua germinada: Guo et al., 2023) muestran inhibiciones más altas (30–80 %), atribuidas a una mayor proporción de péptidos pequeños y a una optimización del perfil peptídico por selección

enzimática o fraccionamiento. Tales estrategias de proceso podrían considerarse en etapas futuras para potenciar la bioactividad del HLRC y mejorar su desempeño como ingrediente funcional con potencial antidiabético.

### Actividad antioxidante del hidrolizado de *Eisenia fetida*

Los resultados de la actividad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos de *E. fetida* obtenidos mediante una combinación secuencial de Flavourzyme y Alcalasa se presentan en la Tabla 14. El grado de hidrólisis (GH) alcanzado fue del 10 %, lo cual indica una hidrólisis moderada, adecuada para la generación de péptidos bioactivos sin una excesiva fragmentación que comprometa la funcionalidad antioxidante (Sarmadi & Ismail, 2010).

**Tabla 14.**

*Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos de Eisenia fetida.*

Método	Actividad Antioxidante
ORAC ( $\mu\text{mol ET/g proteína}$ )	$448,4 \pm 13,3$
ABTS ( $\mu\text{mol ET/g proteína}$ )	$2138,3 \pm 42,2$
QUELANTE $\text{Fe}^{2+}$ (%)	$25,6 \pm 0,2$

*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno; ABTS: capacidad de captura del radical catión ABTS<sup>+</sup>; Quelante  $\text{Fe}^{2+}$ : porcentaje de inhibición de la formación del complejo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina. ET: Equivalentes de Trolox.

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) evalúa la habilidad de los antioxidantes presentes en el hidrolizado para donar átomos de hidrógeno y neutralizar radicales peroxilo. El valor obtenido ( $448,4 \pm 13,3 \mu\text{mol ET/g proteína}$ ) evidencia una capacidad antioxidante significativa, comparable con la reportada por Gaviria (2024), quien utilizó únicamente Alcalasa. La incorporación de Flavourzyme en la hidrólisis podría haber favorecido la generación de una mezcla más diversa de péptidos y aminoácidos libres, lo que, según

Pasupuleti y col. (2010), contribuye a potenciar la actividad antioxidante por la variedad estructural y funcional de los péptidos resultantes.

El ensayo ABTS mostró una actividad antioxidante superior ( $2138,3 \pm 42,2$   $\mu\text{mol ET/g}$  proteína), lo que sugiere la presencia de compuestos bioactivos capaces de neutralizar radicales catiónicos hidrosolubles. Este valor supera significativamente el reportado por Gaviria (2024) para hidrolizados de *E. fetida* obtenidos únicamente con Alcalasa (aproximadamente  $1700$   $\mu\text{mol ET/g}$  proteína). La mayor actividad observada en el presente estudio podría atribuirse a la acción complementaria de Flavourzyme, cuya actividad exopeptidasa favorece la liberación de aminoácidos aromáticos y péptidos de bajo peso molecular con elevada capacidad reductora. Asimismo, este resultado es superior a los descritos para otros subproductos animales, como los hidrolizados viscerales de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) evaluados por Gómez y col. (2019), lo que resalta el potencial de la LRC como fuente alternativa de péptidos antioxidantes. En conjunto, la combinación enzimática empleada parece haber promovido la exposición de residuos aromáticos (particularmente tirosina y fenilalanina), incrementando la reactividad del hidrolizado frente a radicales libres (Karami & Akbari-Adergani, 2019).

El hidrolizado presentó una capacidad quelante del  $25,6 \pm 0,2$  %, lo que indica su potencial para secuestrar iones  $\text{Fe}^{2+}$  y prevenir reacciones de tipo Fenton, responsables de la generación de especies reactivas de oxígeno. Este comportamiento se asocia con la presencia de residuos polares como ácido aspártico, glutámico e histidina, conocidos por su afinidad con metales de transición (Tang et al., 2022).

En comparación con los resultados obtenidos por Gaviria (2024), quien reportó valores de capacidad quelante entre 18 % y 22 % en fracciones peptídicas de *E. fetida* obtenidas mediante Alcalasa y posterior ultrafiltración, el valor observado en el presente estudio es notablemente

superior. Este incremento sugiere que la hidrólisis combinada con Alcalasa y Flavourzyme no solo favorece la liberación de péptidos funcionales, sino que también expone grupos carboxílicos e imidazólicos con alta capacidad de coordinación metálica (Lu & Dong, 2022). De esta forma, la estrategia enzimática empleada podría ofrecer ventajas funcionales sin necesidad de etapas adicionales de fraccionamiento o purificación.

Al relacionar estos resultados con el grado de hidrólisis obtenido (~10 %) se encuentra dentro del rango para la generación de péptidos bioactivos con propiedades funcionales (Zou et al., 2016). Un GH moderado permite conservar estructuras peptídicas complejas con actividad antioxidante, mientras que valores más altos pueden degradarlas en exceso, reduciendo su efectividad biológica. Por tanto, la estrategia enzimática aplicada resultó adecuada para producir fracciones con potencial antioxidante y capacidad quelante, relevantes en el desarrollo de ingredientes nutracéuticos.

Los resultados obtenidos concuerdan con los hallazgos de Gaviria (2024), quien reportó una alta actividad antioxidante en hidrolizados de *E. fetida* tratados únicamente con Alcalasa. No obstante, la combinación enzimática empleada en este estudio parece haber incrementado la liberación de péptidos funcionales, lo que sugiere una sinergia entre las actividades endo- y exopeptidasas de Alcalasa y Flavourzyme.

En conjunto, los resultados respaldan la potencial aplicación industrial del hidrolizado proteico de *E. fetida* como fuente sostenible de péptidos antioxidantes. Este enfoque podría extenderse a las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, donde se buscan ingredientes naturales con capacidad para prevenir el daño oxidativo y mejorar la estabilidad de formulaciones bioactivas.

## **Evaluación de la digestibilidad del almidón en productos horneados enriquecidos con HLRC-L**

Con el fin de avanzar hacia la aplicación funcional del HLRC en sistemas alimentarios reales, se evaluó su impacto sobre la digestión de carbohidratos complejos mediante un modelo estandarizado de digestión gastrointestinal *in vitro*, basado en el protocolo INFOGEST. Para ello, se formularon galletas utilizando harina de trigo comercial como matriz de referencia, en tres versiones: control (sin HLRC-L), y enriquecidas con hidrolizado proteico de *E. fetida* al 5 % y 10 % (m/m, base harina). Este enfoque experimental permitió simular de manera reproducible las condiciones fisiológicas de las fases oral, gástrica e intestinal, y cuantificar la liberación de azúcares reductores y la fracción de almidón digerido a lo largo del proceso. El objetivo fue determinar si la incorporación del HLRC en una matriz compleja como la galleta modula la disponibilidad de carbohidratos durante la digestión, lo que aportaría evidencia funcional complementaria sobre su potencial como ingrediente inhibidor de carbohidrasas con aplicación nutracéutica.

Los resultados obtenidos representan el porcentaje de almidón efectivamente hidrolizado bajo las condiciones simuladas de digestión gastrointestinal *in vitro*, permitiendo evaluar y comparar el efecto del hidrolizado proteico de *E. fetida* sobre la digestibilidad del almidón en las diferentes formulaciones ensayadas.

En relación con los blancos utilizados en el análisis de digestibilidad del almidón (es decir, ensayos de digestión que contenían únicamente las soluciones enzimáticas y reactivos del protocolo INFOGEST, sin adición de galleta), se observaron niveles bajos y estables de absorbancia (0,014–0,016). Estos valores confirman que no se produjo liberación significativa de glucosa durante el ensayo, lo que indica que las enzimas empleadas no contenían azúcares libres

y que no hubo actividad enzimática residual o interferencias que comprometieran la especificidad del método. Esta estabilidad en los blancos refuerza la confiabilidad de las mediciones realizadas en las muestras con galleta, ya que cualquier cambio en los niveles de azúcares reductores puede atribuirse directamente a la hidrólisis del almidón presente en las formulaciones, en concordancia con lo reportado por Lunn y col. (2001).

No obstante, se identificó una posible interferencia cromática atribuida al color naturalmente oscuro del hidrolizado proteico de *E. fetida*, el cual confirió una tonalidad marrón notable a las galletas enriquecidas, especialmente en aquellas con mayores niveles de adición (5 % y 10 %), afectando visiblemente su intensidad de color (ver Figura 7). Durante el ensayo colorimétrico con el reactivo PAHBAH, este efecto visual se tradujo en un aumento aparente de la absorbancia incluso en ausencia de digestión enzimática. Para corregir esta interferencia óptica, se realizaron controles específicos: galletas al 5 % y 10 % de hidrolizado que no fueron sometidas al proceso de digestión, pero sí fueron mezcladas con los fluidos simulados del protocolo INFOGEST (SSF, SGF y SIF), ajustadas a sus respectivos pH y temperaturas, y sometidas a las mismas condiciones térmicas de incubación.

Las absorbancias registradas en estas muestras sin digestión fueron considerablemente más altas que en los blancos sin galleta (0,031 a 0,043 para 5 % y 0,09 a 0,124 para 10 %), confirmando que el color del hidrolizado genera una respuesta espectrofotométrica independiente de la liberación real de azúcares reductores. Por esta razón, los valores de absorbancia obtenidos en las muestras digeridas con hidrolizado al 5 % y al 10 % fueron corregidos por sustracción con sus respectivos blancos cromáticos, permitiendo así una comparación más precisa y justa con la muestra control. Esta estrategia metodológica fue fundamental para evitar una sobreestimación en la cuantificación de azúcares reductores y asegurar que los resultados reflejaran

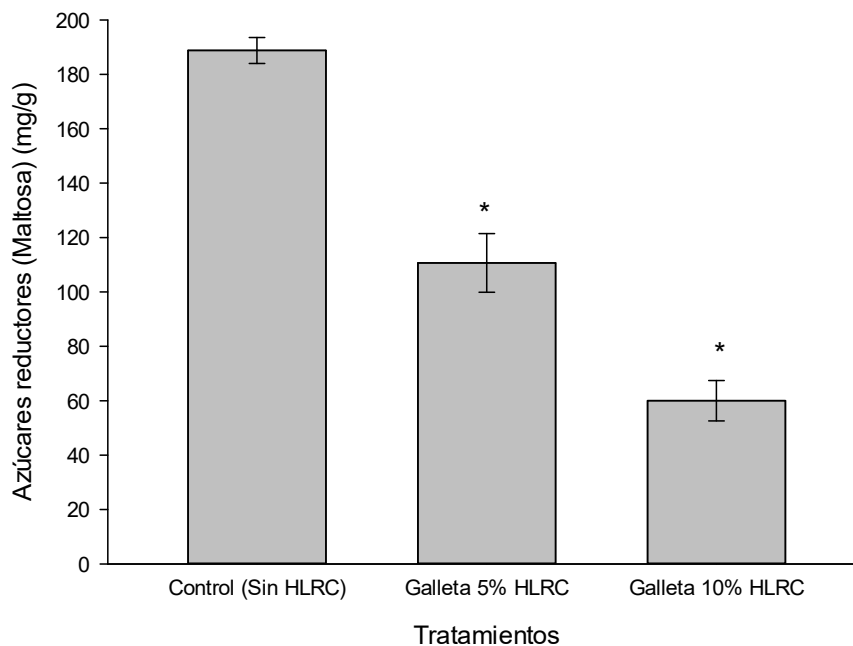
exclusivamente la hidrólisis enzimática del almidón, y no artefactos ópticos generados por el hidrolizado proteico liofilizado.

### Impacto del HLRC-L sobre la liberación de azúcares reductores en galletas funcionales

El contenido de azúcares reductores medido como maltosa evidenció una disminución significativa en las galletas enriquecidas con HLRC-L en comparación con el grupo control (Figura 15). Las galletas sin HLRC-L (control) presentaron un contenido promedio de maltosa de  $188,78 \pm 4,82$  mg/g, mientras que las galletas con 5 % y 10 % de hidrolizado mostraron reducciones notables con promedios de  $110,66 \pm 10,54$  mg/g y  $59,34 \pm 7,43$  mg/g, respectivamente.

#### Figura 15.

*Contenido de azúcares reductores en galletas enriquecidas con hidrolizado proteico de *Eisenia fetida* (HLRC-L).*



*Nota.* Los valores representan la media  $\pm$  desviación estándar. El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al grupo control.

Esta tendencia sugiere que la inclusión del hidrolizado proteico disminuyó la cantidad de azúcares liberados durante la digestión, lo cual podría estar relacionado con una posible inhibición de la actividad enzimática digestiva, en especial de la  $\alpha$ -amilasa y/o  $\alpha$ -glucosidasa, como ha sido reportado en otros estudios con péptidos bioactivos derivados de proteínas animales o vegetales (Arise et al., 2019). La reducción progresiva del contenido de azúcares reductores con el aumento del porcentaje de hidrolizado respalda la hipótesis de que estos péptidos pueden interferir con la hidrólisis del almidón al unirse a las enzimas digestivas o al sustrato, dificultando su acción catalítica.

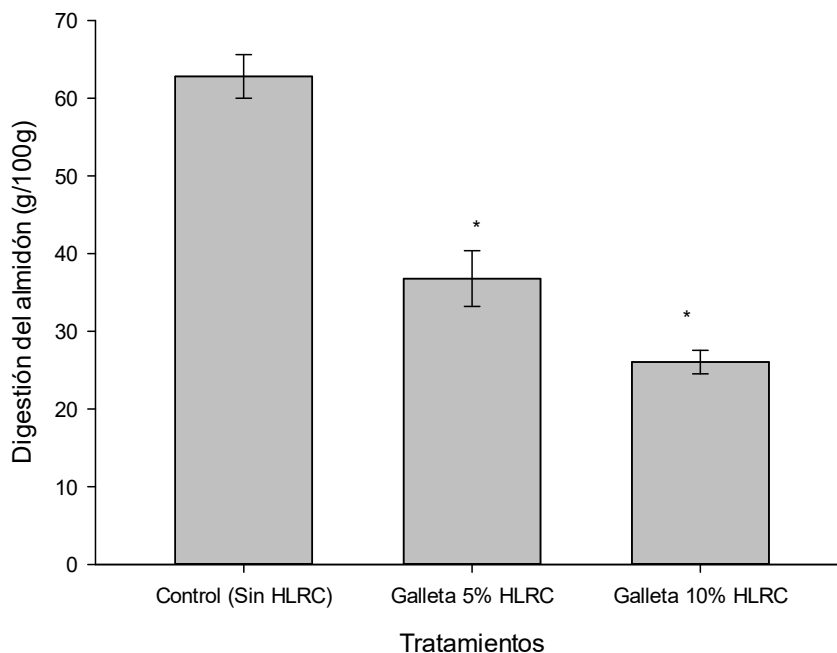
### **Digestibilidad *in vitro* del almidón en galletas funcionales enriquecidas con HLRC-L**

En línea con los resultados previamente descritos, el porcentaje de almidón digerido disminuyó con el incremento de la concentración del hidrolizado proteico (Figura 16). Las galletas control alcanzaron un valor promedio de  $62,81 \pm 2,81\%$ , mientras que las muestras con 5 % y 10 % de hidrolizado presentaron valores promedio de  $36,78 \pm 3,59\%$  y  $26,04 \pm 1,51\%$ , respectivamente.

Estos resultados refuerzan el efecto inhibitorio del HLRC sobre la digestibilidad del almidón en condiciones simuladas de digestión gastrointestinal. Diversas investigaciones han demostrado que los péptidos bioactivos pueden reducir la respuesta glucémica postprandial al limitar la degradación enzimática del almidón, actuando por mecanismos de inhibición competitiva, mixta o no competitiva sobre enzimas clave como la  $\alpha$ -amilasa pancreática (Ngho & Gan, 2016; Payeras, 2023). Además, los hidrolizados también pueden influir en la estructura de la matriz alimentaria, aumentando la resistencia del almidón a la digestión, lo cual podría ser un efecto adicional observado en esta formulación.

**Figura 16.**

Porcentaje de almidón digerido en galletas enriquecidas con hidrolizado proteico de *Eisenia fetida* (HLRC-L).



*Nota.* Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar (DE). El asterisco (\*) indica diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ).

En el presente estudio, la adición de hidrolizados proteicos de *E. fetida* a galletas a base de harina de trigo mostró una reducción significativa en la liberación de azúcares reductores y en el porcentaje de almidón digerido durante la digestión *in vitro*, en comparación con el control sin HLRC. Estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados por Lu y col. (2023), quienes evaluaron el efecto de hidrolizados de proteína de trigo (WPH) sobre la digestión del almidón de arroz. En dicho estudio, la adición de WPH redujo la fracción de almidón de digestión rápida (RDS) y aumentó la fracción resistente (RS), además de disminuir la constante cinética de digestión ( $k$ ) y el valor de digestión final ( $C_{\infty}$ ), lo cual evidenció una menor velocidad e intensidad de hidrólisis enzimática. En ambos casos, se sugiere que los péptidos presentes en los hidrolizados interactúan físicamente con la matriz del almidón, ya sea mediante

enlaces de hidrógeno, formación de complejos tipo V o a un entrelazamiento estérico, dificultando el acceso de las enzimas digestivas a los sitios de hidrólisis. Aunque en este trabajo no se cuantificaron las fracciones RDS, SDS o RS, la disminución progresiva del almidón digerido en las muestras con 5 % y 10 % de hidrolizado es indicativa de un efecto similar al descrito por los anteriores investigadores, lo cual respalda la hipótesis de que los péptidos generados durante la hidrólisis enzimática de proteínas pueden influir en la biodisponibilidad del almidón en matrices alimentarias.

Diversos estudios han demostrado que las proteínas alimentarias, y en particular sus hidrolizados, pueden modular significativamente la digestión del almidón. Esto ocurre a través de múltiples mecanismos: desde interacciones no covalentes con las cadenas del almidón (como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas) hasta la formación de estructuras ordenadas que limitan la acción enzimática (Lu et al., 2023). En nuestro estudio, la incorporación del hidrolizado proteico de *E. fetida* en las formulaciones de galletas redujo de manera significativa la liberación de azúcares reductores y el porcentaje de almidón digerido durante la digestión *in vitro*, lo cual sugiere un efecto inhibitorio sobre la acción de las enzimas digestivas. Este fenómeno podría explicarse tanto por la formación de complejos almidón-proteína que dificultan el acceso de la  $\alpha$ -amilasa, como por una posible interacción directa de péptidos bioactivos con la enzima, disminuyendo su actividad catalítica, tal como se ha reportado con proteínas hidrolizadas de arroz, cebada y papa (Lu et al., 2023; Xie et al., 2020). En conjunto, los resultados respaldan la hipótesis de que el hidrolizado proteico de *E. fetida* presenta capacidad para modular la digestibilidad del almidón, lo que sugiere su potencial aplicación como ingrediente funcional en matrices alimentarias. Esta propiedad podría aprovecharse en el

desarrollo de productos con menor índice glucémico, contribuyendo al diseño de alimentos con características nutricionales mejoradas

## Conclusiones

El protocolo de obtención de *Eisenia fetida* permitió disponer de un material biológico limpio y estandarizado, garantizando la calidad experimental en todas las etapas del estudio. El análisis composicional evidenció un contenido proteico superior al descrito previamente en la literatura, posiblemente asociado a las condiciones particulares de cría y alimentación, lo que resalta la necesidad de controlar estos factores en futuras investigaciones.

La hidrólisis enzimática secuencial con Flavourzyme y Alcalasa generó un hidrolizado proteico con un grado de hidrólisis moderado (~10 %), aunque con un perfil de fragmentación amplio y representativo de la acción combinada de ambas enzimas. Este comportamiento confirma la complementariedad en sus especificidades: Flavourzyme actúa sobre enlaces peptídicos externos y Alcalasa sobre internos, generando péptidos de diverso peso molecular y composición.

El análisis del perfil de distribución de masa molecular mostró un predominio de fracciones de 2–6 kDa, asociadas a péptidos de tamaño intermedio. Esta distribución influyó directamente en la bioactividad observada, ya que los ensayos *in vitro* demostraron una inhibición efectiva y dosis dependiente sobre la  $\alpha$ -amilasa, mientras que la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa fue limitada dentro del rango evaluado. El análisis cinético sugirió un mecanismo de inhibición no competitivo con posible componente mixto, indicando una interacción específica pero no exclusiva con el sitio activo de la enzima.

Los ensayos de aplicación en galletas evidenciaron que el enriquecimiento con el hidrolizado proteico redujo significativamente el porcentaje de almidón digerido y la liberación de azúcares reductores durante la digestión simulada. Este resultado respalda el potencial del

hidrolizado proteico de lombriz roja californiana (HLRC) como modulador de la digestibilidad del almidón y su posible contribución al desarrollo de alimentos con menor índice glucémico.

En conjunto, los datos obtenidos confirman que los hidrolizados proteicos de *E. fetida* no solo representan una fuente proteica alternativa de alto valor biológico, sino también una estrategia innovadora para formular alimentos funcionales orientados al control dietario de la glucemia posprandial. A futuro, será necesario complementar estos hallazgos mediante la caracterización estructural de los péptidos activos (por HPLC, LC-MS/MS o secuenciación de péptidos), así como evaluar su estabilidad y biodisponibilidad en condiciones digestivas reales.

## Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos y considerando las oportunidades de mejora y profundización en el estudio del hidrolizado proteico de *Eisenia fetida* (HLRC), se proponen las siguientes recomendaciones para investigaciones futuras y aplicaciones tecnológicas:

### 1. Aplicaciones tecnológicas

Ampliar los ensayos de incorporación del HLRC a otras matrices alimentarias de consumo habitual, tales como bebidas lácteas fermentadas, productos de panificación o barras nutricionales, con el fin de evaluar el impacto del procesamiento y de la composición de la matriz en la conservación de su bioactividad funcional (Pasupuleti & Demain, 2010).

Analizar la compatibilidad sensorial, tecnológica y de estabilidad del HLRC en formulaciones reales de alimentos funcionales, incluyendo análisis de textura, sabor, color y aceptación del consumidor (López-Varela et al., 2002).

### 2. Proyección biológica

Implementar modelos de digestión *in vitro* dinámicos, como el sistema TIM-1 o SHIME®, que simulan de manera más realista las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal humano, con el objetivo de evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos del HLRC (Minekus et al., 2014).

Desarrollar ensayos *in vivo* en modelos animales o estudios piloto en humanos que permitan validar la eficacia del HLRC en la modulación de la respuesta glucémica posprandial, así como su potencial uso como ingrediente nutracéutico en el manejo del síndrome metabólico (Kitts & Weiler, 2003).

### 3. Nuevas líneas de investigación

Profundizar en la caracterización estructural e identificación específica de los péptidos bioactivos presentes en el HLRC, particularmente aquellos asociados a la inhibición enzimática ( $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa), mediante técnicas como espectrometría de masas (LC-MS/MS) y análisis bioinformático de secuencias (Udenigwe & Aluko, 2012).

Investigar la capacidad del HLRC para interactuar con iones metálicos biológicamente relevantes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), lo cual podría expandir su espectro funcional como agente antioxidante y su posible rol en la homeostasis mineral en aplicaciones alimentarias o farmacológicas (Zhu et al., (2022).

### Referencias Bibliográficas

- Admassu, H., Gasmalla, M. A., Yang, R., & Zhao, W. (2018). Identification of bioactive peptides with  $\alpha$ -amylase inhibitory potential from enzymatic protein hydrolysates of red seaweed (*Porphyra* spp). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19), 4872-4882.
- Agba, T. D., Yahaya-Akor, N. O., Kaur, A., Ledbetter, M., Templeman, J., Wilkin, J. D., ... & Oyeyinka, S. A. (2024). Flour functionality, nutritional composition, and in vitro protein digestibility of wheat cookies enriched with decolourised *Moringa oleifera* leaf powder. *Foods*, 13(11), 1654.
- Aldarraji, M. (2013). Antioxidant activity and total phenolic content of earthworm paste of *Lumbricus rubellus* (red worm) and *Eudrilus eugenia* (African night crawler). *Journal of Entomology and Nematology*, 5(3), 33–37. <https://doi.org/10.5897/JEN2013.0075>
- Alqahtani, A. S., Holman, A. G., Alshomi, H. H., Alabdaly, A. S., & Sheweita, S. A. (2019). Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Enzyme Inhibition: A Strategy for Controlling Postprandial Hyperglycemia. *Journal of Diabetes Research*, 2019, Article ID 5941957. <https://doi.org/10.1155/2019/5941957>
- Andhiarto, Y., Setiawan, A. A., Ningsih, K. N., Suciati, S., & Sukardiman, S. (2025). *In silico* and *in vitro* alpha glucosidase inhibition of myricitrin isolated from *Syzygium cumini* var. album leaves. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry Research*, 7(9), 1987-1998.
- Augustine, D., Rao, R. S., Anbu, J., & Chidambara Murthy, K. N. (2019). *In vitro* cytotoxic and apoptotic induction effect of earthworm coelomic fluid of *Eudrilus eugeniae*, *Eisenia foetida*, and *Perionyx excavatus* on human oral squamous cell carcinoma-9 cell line. *Toxicology Reports*, 6, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.04.005>
- Arif, M. N., Sheikh, A. S., Shah, I., Javed, T., Fatima, J., Khurram, Y., ... & Khan, R. A. (2025). New Thiazolidine-4-Carboxylic Acid Derivatives Act as Promising  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors; Synthesis, *In Vitro* Pharmacological Evaluation and *In Silico* Molecular Docking Study. *Journal of Pharma and Biomedics*, 3(1), 11-21.
- Arise, R. O., Idi, J. J., Mic-Braimoh, I. M., Korode, E., Ahmed, R. N., & Osemwegie, O. (2019). *In vitro* Angiotensin-1-converting enzyme,  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory and antioxidant activities of *Luffa cylindrical* (L.) M. Roem seed protein hydrolysate. *Heliyon*, 5(5).
- Azmi, N., Hashim, P., Hashim, D. M., Halimoon, N., & Majid, N. M. N. (2014). Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S348–S352. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1166>

- Baba, W. N., Mudgil, P., Kamal, H., Kilari, B. P., Gan, C. Y., & Maqsood, S. (2021). Identification and characterization of novel  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from camel whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1364-1377.
- Babatunde, O. T., Bewaji, C. O., & Igunnu, A. (2025). Protein hydrolysates from *Cucumeropsis mannii* seed inhibit Alpha-amylase *In-vitro*: potential for managing postprandial hyperglycemia. *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 14(1), 57-66.
- Bahadori, Z., Esmailzadeh, L., Karimi-Torshizi, M. A., Seidavi, A., Olivares, J., Rojas, S., Salem, A. Z. M., Khusro, A., & López, S. (2017). The effect of earthworm (*Eisenia foetida*) meal with vermi-humus on growth performance, hematology, immunity, intestinal microbiota, carcass characteristics, and meat quality of broiler chickens. *Livestock Science*, 202, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.05.010>
- Balamurugan, M., Parthasarathi, K., Ranganathan, L. S., & Cooper, E. L. (2008). Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(2), 141–147. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0720194>
- Balderas-León, I., Baigts-Allende, D., & Cardador-Martínez, A. (2021). Antioxidant, angiotensin-converting enzyme, and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of protein hydrolysates of *Leucaena leucocephala* seeds. *CyTA-Journal of Food*, 19(1), 349-359.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Briceño-Islas, G., Mojica, L., & Urías-Silvas, J. E. (2024). Functional chia (*Salvia hispanica* L.) co-product protein hydrolysate: An analysis of biochemical, antidiabetic, antioxidant potential and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 460, 140406.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... & Dupont, D. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Brown, H. A., Morris, A. L., Pudlo, N. A., Hopkins, A. E., Martens, E. C., Golob, J. L., & Koropatkin, N. M. (2024). Acarbose impairs gut *Bacteroides* growth by targeting intracellular glucosidases. *mBio*, 15(12), e0150624.
- Bruhn, Heike, Julia Winkelmann, Christian Andersen, Jörg Andrä, & Matthias Leippe. (2006). “Dissection of the Mechanisms of Cytolytic and Antibacterial Activity of Lysenin, a Defence Protein of the Annelid *Eisenia foetida*.” *Developmental and Comparative Immunology* 30(7):597–606.
- Bui, P. T., Pham, K. T., & Vo, T. D. L. (2023). Earthworm (*Perionyx excavatus*) Protein Hydrolysate: Hypoglycemic Activity and Its Stability for the Hydrolysate and Its Peptide Fractions. *Processes*, 11(8), 2490. <https://doi.org/10.3390/pr11082490>

- Chandimali, N., Bak, S.-G., Hyun Park, E., Lim, H.-J., Won, Y.-S., Kim, B., & Lee, S.-J. (2024). Bioactive peptides derived from duck products and by-products as functional food ingredients. *Journal of Functional Foods*, 113, 105953. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105953>
- Chathuranga, Uvini & Pasquel Handi, Uddala & Jayawardena, Bimali. (2024). *Development and characterization of a cinnamon-based cereal using low-pressure cold extrusion for hyperglycemia management* [Ponencia]. 17th International Research Conference of General Sir John Kotelawala Defence University, Ratmalana, Sri Lanka.
- Chen, Y., Li, X., Li, J., Ren, J., Luo, S., & Fu, X. (2020). Antioxidant activity and mechanism of peptides from rice bran: Free radical scavenging and metal chelation. *Food Chemistry*, 319, 126537. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126537>
- Chi, C., Shi, M., Zhao, Y., Chen, B., He, Y., & Wang, M. (2022). Dietary compounds slow starch enzymatic digestion: A review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1004966.
- Coelho, M. C., Ribeiro, T. B., Oliveira, C., Batista, P., Castro, P., Monforte, A. R., ... & Pintado, M. (2021). *In vitro* gastrointestinal digestion impact on the bioaccessibility and antioxidant capacity of bioactive compounds from tomato flours obtained after conventional and ohmic heating extraction. *Foods*, 10(3), 554.
- Connolly, A., Piggott, C. O., & FitzGerald, R. J. (2014). *In vitro*  $\alpha$ -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, 56, 100-107.
- Corredor, Y. A. V., & Pérez, L. I. P. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 59-72.
- Coşkun, N., Sarıtaş, S., Jaouhari, Y., Bordiga, M., & Karav, S. (2024). The Impact of Freeze Drying on Bioactivity and Physical Properties of Food Products. *Applied Sciences*, 14(20), 9183. <https://doi.org/10.3390/app14209183>
- Copeland, R. A. (2013). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Dabbour, M., Sami, R., Mintah, B. K., He, R., Wahia, H., Khojah, E., Petkoska, A. T., & Fikry, M. (2022). Effect of Drying Techniques on the Physical, Functional, and Rheological Attributes of Isolated Sunflower Protein and Its Hydrolysate. *Processes*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.3390/pr10010013>
- Dávila León, R., González-Vázquez, M., Lima-Villegas, K. E., Mora-Escobedo, R., & Calderón-Domínguez, G. (2024). *In vitro* gastrointestinal digestion methods of carbohydrate-rich foods. *Food Science & Nutrition*, 12(2), 722-733.
- Dickinson, E., & Leser, M. E. (Eds.). (2007). Food colloids: *self-assembly and material science*. Royal Society of chemistry. RSC Publishing, Suiza.

- Dinesh, M. S., Sridhar, S., Chandana, P. G., Pai, V., Geetha, K. S., & Hegdge, R. N. (2013). Anticancer potentials of peptides of coelomic fluid of earthworm *Eudrilus eugeniae*. *Biosci Biotechnol Res Asia*, 10(2), 601-606.
- Dullius, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods—Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, 42, 58-74.
- Esfandi, R., Willmore, W. G., & Tsopmo, A. (2019). Peptidomic analysis of hydrolyzed oat bran proteins, and their *in vitro* antioxidant and metal chelating properties. *Food Chemistry*, 279, 49-57.
- Fadimu, G. J., Farahnaky, A., Gill, H., Olalere, O. A., Gan, C. Y., & Truong, T. (2022). *In-silico* analysis and antidiabetic effect of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from lupin protein hydrolysate: Enzyme-peptide interaction study using molecular docking approach. *Foods*, 11(21), 3375.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2001). Food energy – methods of analysis and conversion factors (FAO Food and Nutrition Paper 77). Rome: FAO. <https://www.fao.org/3/y5022e/y5022e00.htm>
- Feng, J., Ma, Y. L., Sun, P., Thakur, K., Wang, S., Zhang, J. G., & Wei, Z. J. (2021). Purification and characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from defatted camellia seed cake. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(1), 138-147.
- Flores Bocanegra, L. C. (2013). *Inhibidores de alfa-glucosidasa de Vauquelinia corymbosa* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. UNAM Repositorio Institucional. <https://ru.dgb.unam.mx/bitstreams/5c25b729-38fd-4aa4-90bf-96b7155ddd08/download>
- Fu, Y., Liu, J., Hansen, E. T., Bredie, W. L., & Lametsch, R. (2018). Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma. *Food Chemistry*, 257, 163-171.
- Fvasconcellos. (2007). Ribbon diagram of human salivary alpha-amylase (PDB entry 1SMD) [Imagen]. Wikimedia Commons (Dominio público). [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salivary\\_alpha-amylase\\_1SMD.png?uselang=es#Licencia](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salivary_alpha-amylase_1SMD.png?uselang=es#Licencia)
- Gaviria Gaviria, Y. S. (2024). Actividad biológica de hidrolizados proteicos de la lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*) y las fracciones obtenidas mediante un sistema de ultrafiltración tangencial. Universidad de Antioquia. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10495/44434>
- Gaviria Gaviria, Y. S., Guerra, C. M., & Zapata Montoya, J. E. (2024). *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* antihypertensive evaluation of enzymatic hydrolysates of Californian red worm (*Eisenia fetida*) proteins. *Heliyon*, 10, e25715

- Gaviria Gaviria, Y.S., Y Zapata, J.E. (2023). Efecto del fraccionamiento con membranas sobre la actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteína de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). *Información tecnológica*, 34(2), 147-158.  
<https://dx.doi.org/10.4067/s0718-07642023000200147>
- Gaviria, Y. S., & Zapata, J. E. (2024). Optimization of fractionation with membranes of antioxidant enzymatic hydrolysate of Californian red worm (*Eisenia fetida*) protein. *Heliyon*, 10(10).
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., Zapata, J. E., López-García, G., Cilla, A., & Alegría, A. (2019). *In vitro* antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates. *Food Research International*, 120, 52–61.
- Gómez-Sampedro, L. J., Noreña Mora, A. M., Gaviria Gaviria, Y. S., & Zapata Montoya, J. E. (2022). Hidrólisis enzimática de proteínas de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*) con diferentes proteasas. *Publicaciones E Investigación*, 16(4).  
<https://doi.org/10.22490/25394088.6502>
- Gottschalk, P. G., & Dunn, J. R. (2005). The five-parameter logistic: A characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Analytical Biochemistry*, 343(1), 54–65.
- Guo, H., Hao, Y., Yang, X., Ren, G., & Richel, A. (2023). Exploration on bioactive properties of quinoa protein hydrolysate and peptides: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(16), 2896-2909.
- Islam, M. S., Hongxin, W., Admassu, H., Mahdi, A. A., Chaoyang, M., & Wei, F. A. (2021). *In vitro* antioxidant, cytotoxic and antidiabetic activities of protein hydrolysates prepared from Chinese pond turtle (*Chinemys reevesii*). *Food Technology and Biotechnology*, 59(3), 360-375.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*, 121(1), 178-184.
- James, J. I., Aisami, A., Maijama, M. S., Adams, B. D., & Zira, S. G. (2020). *In vitro*  $\alpha$ -amylase inhibitory activity and antioxidant profile of carica papaya seed protein hydrolysate. *International Journal of Innovative Approaches in Science Research*, 4(1), 1-14.)
- Jiménez Suaste NI, Chel-Guerrero L, Betancur- Ancona D, Bustillos RZ (2023) Antioxidant and inhibitory activities of  $\alpha$ -Amylase,  $\alpha$ -Glucosidase and Angiotensin-I of protein hydrolysates from “Sac-Beh” quality protein maize (QPM). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 35(7): 674-682. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2023.3107>
- Karami, Z., & Akbari-Adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of food science and technology*, 56(2), 535-547.

- Karsten, G. R., & Drake, H. L. (1997). Denitrifying Bacteria in the Earthworm Gastrointestinal Tract and *In Vivo* Emission of Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) by Earthworms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 1878–1882. <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.1878-1882.1997>
- Khakhariya, R., Basaiawmoit, B., Sakure, A. A., Maurya, R., Bishnoi, M., Kondepudi, K. K., ... & Hati, S. (2023). Production and characterization of ACE inhibitory and anti-diabetic peptides from Buffalo and camel Milk fermented with *Lactobacillus* and yeast: a comparative analysis with *in vitro*, *in silico*, and molecular interaction study. *Foods*, 12(10), 2006.
- Kinariwala, D., Panchal, G., Sakure, A., & Hati, S. (2020). Exploring the potentiality of *lactobacillus* cultures on the production of milk-derived bioactive peptides with antidiabetic activity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(3), 1613-1627.
- Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1309–1323. <https://doi.org/10.2174/1381612033454883>
- Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., & Prakash, O. (2011).  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 19–29. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79096>
- Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G. B., Gill, H., Huynh, T., & Dias, D. A. (2021). Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, 17(1), 3. doi: [10.1186/s13007-020-00702-5](https://doi.org/10.1186/s13007-020-00702-5)
- Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical biochemistry*, 47(1), 273-279.
- Li, X., Bai, Y., Jin, Z., & Svensson, B. (2022). Food-derived non-phenolic  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitors for controlling starch digestion rate and guiding diabetes-friendly recipes. *LWT – Food Science and Technology*, 146, 112455. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112455>
- Li, Z., Zhang, S., Meng, W., Zhang, J., & Zhang, D. (2023). Screening and activity analysis of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides derived from Coix seed Prolamins using bioinformatics and molecular docking. *Foods*, 12(21), 3970
- López-Martínez, Leticia X., Aguilar Cisneros, Luisa M., & Dublán-García, Octavio. (2014). Actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). *Nova scientia*, 6(12), 234-347.
- López-Varela, S., González-Gross, M., & Marcos, A. (2002). Functional foods and the immune system: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(S3), S29–S33. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601484>

- Lu, W., & Dong, C. (2022). Research progress of metal chelating peptides. *Food Health*, 4(4), 19.
- Lu, X., Ma, R., Zhan, J., Liu, C., & Tian, Y. (2023). Starch digestion retarded by wheat protein hydrolysates with different degrees of hydrolysis. *Food chemistry*, 408, 135153.
- Lunn, & Major, B.J. & Kettlewell, Peter & Scott, R.K. (2001). Mechanisms Leading to Excess Alpha -Amylase Activity in Wheat (*Triticum aestivum*, L) Grain in the U.K. *Journal of Cereal Science*. 33. 313-329. 10.1006/jcrs.2001.0369.
- Marson, G.V.; Castro, R.J.S.d.; Machado, M.T.d.C.; Zandonadi, F.d.S.; Barros, H.D.d.F.Q.; Júnior, M.R.M.; Sussulini, A.; Hubinger, M.D. (2020). Proteolytic enzymes positively modulated the physicochemical and antioxidant properties of spent yeast protein hydrolysates. *Process Biochem*. 91, 34–45.
- Meza, D. L. M., & Valdés, R. M. (2015). Inhibición *in vitro* de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en química*, 10(1), 33-40.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mojica, L., & De Mejía, E. G. (2016). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. *Food & function*, 7(2), 713-727.
- Moreton, M., Casertano, M., Pellegrini, N., Anese, M., Fogliano, V., & Capuano, E. (2024). Effect of high pressure homogenization on *in vitro* digestibility and colon fermentability of pea protein-rich bread designed for elderly consumers. *Food & Function*, 15(20), 10459-10471.
- Narkhede, A. N., Nirmal, P. S., Tupe, R., Kulkarni, O. P., Harsulkar, A. M., & Jagtap, S. D. (2012). In vitro antioxidant, antiglycation and alpha amylase inhibitory potential of *Eulophia ochreatea* L. *Journal of pharmacy research*, 5, 2532-2537.
- Ngoh, Y. Y., & Gan, C. Y. (2016). Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food chemistry*, 190, 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.120>
- Noreña, A. M. (2022). Identificación de la efectividad catalítica de diferentes proteasas y la combinación de estas, para la obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*). [Tesis de grado]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia.

- Organización Panamericana de la Salud & Organización Mundial de la Salud. (2023). Prevención de la obesidad. OPS/OMS. <https://www.paho.org/es/temas/prevencion-obesidad>.
- Pan, R., Zhang, Z.-J., & He, R.-Q. (2010). Earthworm Protease. *Applied and Environmental Soil Science*, 2010, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2010/294258>
- Pasupuleti, V. K., Holmes, C., & Demain, A. L. (2010). Applications of protein hydrolysates in biotechnology. In *Protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 1-9). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Patil, P., Mandal, S., Tomar, S. K., & Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European journal of nutrition*, 54(6), 863-880.
- Patwekar, M., Patwekar, F., Mezni, A., Sanauallah, S., Fatema, S. R., Almas, U., ... & Mallick, J. (2022). Assessment of Antioxidative and Alpha-Amylase Potential of Polyherbal Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022(1), 7153526.
- Payeras Perelló, F. M. (2023). *Study of potential alternatives to human digestive enzymes and prediction of digestibility and bioaccessibility of starch containing meals* (Doctoral dissertation, Universitat de les Illes Balears). Universitat de les Illes Balears Repositori Institucional. <https://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/161278>
- Pędziwiatr, D., Lamadrid, M. C., & Wojdyło, A. (2024). Cookies Fortified with Polyphenols Extracts: Impact on Phenolic Content, Antioxidant Activity, Inhibition of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase Enzyme, Colour and Sensory Attractiveness. *Antioxidants*, 13(9), 1108
- Peng, X., Liu, H., Li, X., Wang, H., Zhang, K., Li, S., ... & Yu, W. (2023). Predicting the glycemic index of biscuits using static *in vitro* digestion protocols. *Foods*, 12(2), 404.
- Pérez-Gálvez, R., Berraquero-García, C., Ospina-Quiroga, J. L., Espejo-Carpio, F. J., Almécija, M. C., Guadix, A., ... & Guadix, E. M. (2024). Influence of *In Vitro* Digestion on Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) Inhibitory Activity of Plant-Protein Hydrolysates Obtained from Agro-Industrial By-Products. *Foods*, 13(17), 2691.
- Pizaña Cisneros, R. I. (2023). Evaluación de la digestibilidad proteica de residuos de café y el potencial de sus péptidos bioactivos para el manejo del síndrome metabólico (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Powers, j. R., & whitaker, j. R. (1978). Effect of several experimental parameters on combination of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) A-amylase inhibitor with porcine pancreatic A-amylase. *Journal of Food Biochemistry*, 1(3), 239-260.
- Ramírez, O. (2017). Actividad antioxidante de biopéptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de las proteínas de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). [Tesis de Maestría]. Universidad de Papaloapan, México. URL: [https://www.unpa.edu.mx/tesis\\_Tux/tesis\\_digitales/maestria\\_biotecnologia/MB17-Ofelia\\_Ram%C3%ADrez\\_Isidro.pdf](https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotecnologia/MB17-Ofelia_Ram%C3%ADrez_Isidro.pdf)

- Rao PS, Bajaj R, Mann B. (2020). Impact of sequential enzymatic hydrolysis on antioxidant activity and peptide profile of casein hydrolysate. *J Food Sci Technol*. 57(12):4562-4575. doi: 10.1007/s13197-020-04495-2.
- Rezvankhah, A., Yarmand, M. S., Ghanbarzadeh, B., & Mirzaee, H. (2021). Generation of bioactive peptides from lentil protein: Degree of hydrolysis, antioxidant activity, phenol content, ACE-inhibitory activity, molecular weight, sensory, and functional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 5021-5035.
- Rodbard, D. (1974). Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clinical chemistry*, 20(10), 1255-1270.
- Rodrigues, M., Carlesso, W. M., Kuhn, D., Altmayer, T., Martini, M. C., Tamiosso, C. D., Mallmann, C. A., De Souza, C. F. V., Ethur, E. M., & Hoehne, L. (2017). Enzymatic hydrolysis of the *Eisenia andrei* earthworm: Characterization and evaluation of its properties. *Biocatalysis and Biotransformation*, 35(2), 110–119. <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1278754>
- Rosak, C., & Mertes, G. (2012). Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 5, 357–367. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S28340>
- Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3(4), 229-254.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- Sartorius, T., Weidner, A., Dharsono, T., Boulier, A., Wilhelm, M., & Schön, C. (2019). Postprandial effects of a proprietary milk protein hydrolysate containing bioactive peptides in prediabetic subjects. *Nutrients*, 11(7), 1700.
- Sebaugh, J. L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10(2), 128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>
- Siahbalaei, R., Kavosi, G., & Noroozi, M. (2021). Protein nutritional quality, amino acid profile, anti-amylase and anti-glucosidase properties of microalgae: Inhibition and mechanisms of action through *in vitro* and *in silico* studies. *Lwt*, 150, 112023.
- Siow, H.-L., & Gan, C.-Y. (2016). Extraction, identification, and structure–activity relationship of antioxidative and  $\alpha$ -amylase inhibitory peptides from cumin seeds (*Cuminum cyminum*). *Journal of Functional Foods*, 22, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.011>

- Sugimoto, S., Kobayashi, Y., Kusano, S., & Kishimoto, Y. (2012). Inhibitory effects of polyphenols on human intestinal  $\alpha$ -glucosidase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(7), 1308–1311. <https://doi.org/10.1271/bbb.110996>
- Sun, L., Liu, J., He, Z., & Du, R. (2024). Plant-Derived as Alternatives to Animal-Derived Bioactive Peptides: A Review of the Preparation, Bioactivities, Structure-Activity Relationships, and Applications in Chronic Diseases. *Nutrients*, 16(19), 3277. <https://doi.org/10.3390/nu16193277>
- Sun, Z. (2015). Earthworm as a biopharmaceutical: from traditional to precise. *European Journal of BioMedical Research*, 1(2), 28. <https://doi.org/10.18088/ejbmr.1.2.2015.pp28-35>
- Sun, Z., & Jiang, H. (2017). Nutritive Evaluation of Earthworms as Human Food. In Future Foods. *InTech*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70271>
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International journal of biological macromolecules*, 165, 2143-2196.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., & Matsuoka, T. (2006). Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(2), 149-153.
- Takei, Y., Hyodo, S., Katafuchi, T., & Minamino, N. (2004). Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function. *Peptides*, 25(10), 1643–1656. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.06.026>
- Talibov, S. (2017). Starch digestion in broiler chickens: A literature study and an *in vitro* comparison with pigs (Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences). NMBU. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/2453717>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Treviño Moreno, S. G. (2024). *Evaluación de la actividad hipoglucemiante de Gochnatia hypoleuca, Brickellia eupatorioides y Citrus limettioides en ratas wistar tratadas con aloxano* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). Repositorio UANL. <http://eprints.uanl.mx/26936/1/1080312819.pdf>
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11–R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- USDA - U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2024). FoodData Central. <https://fdc.nal.usda.gov/>
- Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 1(1), 59-72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>

- Veas Alborno, R. E. (2015). *Evaluación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de diez genotipos de Ugni molinae Turcz. y determinación del tipo de inhibición* [Tesis de licenciatura, Universidad de Chile]. Repositorio Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/140238>
- Vielma, R., Ovalles, J., León-Leal, A., & Medina, L. (2003). Valor nutritivo de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) como fuente de aminoácidos y su estimación cuantitativa mediante cromatografía en fase reversa (HPLC) y derivatización precolumna con o-ftalaldehído (OPA). *Ars Pharmaceutica*, 44(1), 43–58.
- Wan, P., Cai, B., Chen, H., Chen, D., Zhao, X., Yuan, H., ... & Pan, J. (2023). Antidiabetic effects of protein hydrolysates from *Trachinotus ovatus* and identification and screening of peptides with  $\alpha$ -amylase and DPP-IV inhibitory activities. *Current Research in Food Science*, 6, 100446.
- Wang, C., Sun, Z., Liu, Y., Zhang, X., & Xu, G. (2007). A novel antimicrobial vermipeptide family from earthworm *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*, 43, S127–S134. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.048>
- Wang, J., Wu, T., Fang, L., Liu, C., Liu, X., Li, H., Shi, J., Li, M., & Min, W. (2020). Anti-diabetic effect by walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.)-derived peptide LPLLR through inhibiting  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase, and alleviating insulin resistance of hepatic HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 69, 103944. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103944>
- Waseem, T., Zargaham, M. K., Ahmed, M., Rajput, T. A., Amin, A., & Nadeem, H. (2025). Computational investigation to identify multi-targeted anti-hyperglycemic potential of substituted 2-Mercaptobenzimidazole derivatives and synthesis of new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 39(1), 9.
- Wei, G., Zhao, Q., Wang, D., Fan, Y., Shi, Y., & Huang, A. (2022). Novel ACE inhibitory, antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubing cheese through peptidomic and molecular docking. *Lwt*, 159, 113196.
- 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.
- Yanqin, L., Yan, S., Zhenjun, S., Shijie, L., Chong, W., Yan, L., & Yuhong, G. (2007). Coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* induces apoptosis of HeLa cells *in vitro*. *European Journal of Soil Biology*, 43, S143–S148. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.049>
- Yikrazuul. (2009). Acarbose structure [Imagen]. Wikimedia Commons. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acarbose\\_structure.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acarbose_structure.svg)

- Yikrazuul. (2010). beta-D-maltotriose [Imagen]. Wikimedia Commons.  
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maltotriose.svg>
- Yin, S. W., Tang, C. H., Cao, J. S., Hu, E. K., Wen, Q. B., & Yang, X. Q. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food chemistry*, 106(3), 1004-1013.
- Yu, C., Cha, Y., Wu, F., Xu, X., & Du, M. (2018). Effects of limited hydrolysis and high-pressure homogenization on functional properties of oyster protein isolates. *Molecules*, 23(4), 729.
- Zapata, J. E., & Gómez-Sampedro, L. J. (2024). Antioxidant and antiproliferative activity of enzymatic hydrolysates from red tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera. *Biotechnology Reports*, 42, e00832.
- Zapata, J. E., Moya, M., & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis enzimática de la proteína de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de enzima, temperatura, pH y velocidad de agitación. *Información tecnológica*, 30(6), 63-72.
- Zhang, M., Zhu, L., Wu, G., Liu, T., Qi, X., & Zhang, H. (2024). Food-derived dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides: Production, identification, structure-activity relationship, and their potential role in glycemic regulation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 64(8), 2053-2075.
- Zhao, J., Qi, S.-P., Wu, J., Li, L., & He, R.-Q. (2005). Earthworm Fibrinolytic Enzyme (pp. 825–847). [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(05\)80048](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(05)80048)
- Zhu, Y., Lao, F., Pan, X., & Wu, J. (2022). Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability. *Biomolecules*, 12(11), 1622.