



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

Trabajo fin de máster
**INFLUENCIA DEL USO DE FRUTOS DE
DESTRÍO COMO ALIMENTO EN EL PERFIL
LIPÍDICO DE LARVAS DE INSECTOS**

Carolina Ramponi Weill

Tutores: Rebeca Pilar Ramos Bueno, Centro Tecnológico Tecnova, Almería
Francisca Suárez Estrella, Universidad de Almería

Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria

Facultad de Ciencias Experimentales

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Curso Académico: 2019/2020

Almería, noviembre 2020

CONTENIDO

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Ácidos grasos y su importancia	6
2.2 Fuentes de ácidos grasos	7
2.3 Las larvas como fuente de ácidos grasos	8
2.3.1 <i>Tenebrio molitor</i>	9
2.3.2 <i>Zophoba morio</i>	10
2.3.3 <i>Hermetia illucens</i>	10
2.4 Estudios previos	11
2.5 Hipótesis de trabajo	12
3. OBJETIVO	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Larvas seleccionadas y condiciones de crecimiento	14
4.2 Preparación de las muestras	16
4.2.1 Métodos de deshidratación	16
4.2.2 Procedimiento de molienda de larvas	18
4.3 Optimización de un procedimiento de extracción del contenido lipídico	18
4.3.1 Extracción utilizando disolventes	18
4.3.2 Prensado	19
4.4 Caracterización del perfil lipídico mediante cromatografía de gases (GC)	20
4.4.1 Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos	20
4.4.2 Detección y cuantificación del perfil lipídico por GC	20
4.5 Caracterización del perfil de triacilgliceroles mediante cromatografía de líquidos ...	20
4.6 Análisis estadístico	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22

5.1	Evaluación de la metodología de secado	22
5.2	Optimización de una metodología de extracción de contenido lipídico	22
5.3	Caracterización del perfil lipídico mediante cromatografía de gases (GC)	24
5.4	Caracterización del perfil de triacilgliceroles mediante cromatografía de líquidos ...	30
6.	CONCLUSIONES	33
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	34

Abreviaturas

μ	micro
Ácido graso poliinsaturado omega 3	PUFA n-3
Ácido graso poliinsaturado omega 6	PUFA n-6
Ácido graso monoinsaturado	MUFA
Ácido docosahexaenoico	DHA
g	Gramo
mL	Mililitro
nm	nanometro
SD	Desviación estándar

1. RESUMEN

Los ácidos grasos se han convertido en los últimos años en objeto de estudio debido a su importancia tanto alimenticia como industrial. Estudios previos han demostrado que las larvas de insectos comestibles, además de ser una fuente proteica, son una fuente interesante de ácidos grasos. Se ha demostrado además que el perfil lipídico de dichas larvas varía según su etapa de vida, su hábitat, el sexo y la alimentación. Alimentar larvas con frutos de destrío podría mejorar su perfil lipídico además de tener un impacto positivo a nivel medioambiental. Con lo cual, el objetivo de este trabajo se centró en estudiar la influencia del uso de frutos de destrío como alimento en el perfil lipídico de larvas de *Tenebrio molitor*, *Zophoba morio* y *Hermetia illucens*. En primer lugar, cabe destacar que las larvas de *Zophoba morio* fueron las que obtuvieron un mayor contenido en grasa, lo que se correlacionó con la bibliografía. En segundo lugar, las larvas de *Tenebrio molitor* alimentadas con sandía deshidratada presentaron un pequeño porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA n-3), lo que podría ser un inicio para mejorar el perfil lipídico de estas larvas para la obtención de este grupo de ácidos grasos. Las larvas de *Hermetia illucens* alimentadas con papaya y tomate deshidratado presentaron un pequeño porcentaje de ácido α -linoleico, un ácido graso de gran interés ya que es el precursor de DHA (C22:6n3), un ácido graso que juega un rol importante en la prevención de muchas patologías. Por otra parte, las larvas de *Hermetia illucens* son mejores candidatas para la producción de biodiésel gracias a su alto contenido en ácidos grasos saturados. Por último, se evaluó el perfil de triacilgliceroles de las larvas de *Zophoba morio* obteniendo una fracción con alto contenido en ácido oleico (C18:1n9), un ácido graso de interés en la industria alimenticia. Estos resultados permitieron concluir que la alimentación con frutos de destrío mejoró el perfil lipídico de larvas de *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens*. Estos resultados podrían ser un inicio para futuras investigaciones.

Abstract

Fatty acids have become an object of study in the past years due to their nutritional and industrial importance. Previous studies have proven that edible insect larvae, besides being a great protein source, are an interesting source of fatty acids. It has also been proven that the fatty acids profile of larvae varies according to their life stage, their habitat, sex and diet. Feeding larvae with agricultural wastes like bad fruits could improve the fatty acids profiles and would have a positive environmental impact. So, this work was focused on studying the influence of using those agricultural wastes as food in *Tenebrio molitor*, *Zophoba morio* and *Hermetia illucens* larvae. In the first place, the larvae of *Zophoba morio* were those with the highest fat content, which was correlated with the literature. Secondly, *Tenebrio molitor* larvae fed with dehydrated watermelon showed a small percentage of fatty acids n3 (PUFA n-3), which could be a starting point to improve the fatty acids profile of this larvae to obtain this group of fatty acids. *Hermetia illucens* larvae fed with dehydrated tomato and papaya showed a small percentage of α -linoleic acid (C22:6n3), the precursor of DHA, a fatty acid that plays an important role preventing many pathologies. On the other hand, it was found that *Hermetia illucens* larvae were the best candidates to biodiesel production, due to their high content in saturated fatty acids. Finally, the triacylglycerols profile of *Zophoba morio* was evaluated obtaining a fraction with a high content of oleic acid (C18:1n9), a fatty acid of interest in the food industry. These results allow to conclude that feeding *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* larvae with agricultural wastes improve the fatty acids profile and could be a starting point for further studies.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Ácidos grasos y su importancia

El consumo de aceites a nivel mundial ha aumentado notablemente en los últimos veinte años y en la actualidad su utilización está ampliamente diversificada en todo el planeta (Landívar Valverde, 2012). Por otra parte, ha aumentado considerablemente la importancia de los alimentos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, debido a sus efectos positivos en el organismo en cuanto al funcionamiento del sistema nervioso central (Hernández, 2014). La importancia de este grupo de ácidos grasos también se debe a que los pertenecientes a la familia omega 6 y omega 3 no pueden ser sintetizados por el ser humano, con lo cual son considerados esenciales y deben estar presentes en la dieta (Onofre et al., 2010). Se debe tener en cuenta, además, que en ciertas partes del mundo la relación n-6/n-3 se encuentra entre 15.0/1 y 16.7/1, siendo su valor óptimo entre 1.0/1.0 y 4.0/1.0. Con lo cual, la obtención de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA n-3) es especialmente relevante para la nutrición humana (Guil-Guerrero et al., 2018).

Las deficiencias en ácidos grasos poliinsaturados omega 6 (PUFA n-6) pueden conducir a un crecimiento deficiente, lesiones cutáneas e insuficiencia reproductiva. Mientras que, las deficiencias en ácidos grasos omega 3 podrían provocar reducción de la agudeza visual, un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, así como la disminución del ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n3) en el cerebro y en la retina, lo que derivaría en una disminución de la modulación de varias vías de señalización a nivel del cerebro (Guil-Guerrero et al., 2018).

El ácido docosahexaenoico (22:6n3) es un ácido graso omega 3 de cadena larga derivado del ácido α -linolénico. El ácido docosahexaenoico junto con el ácido araquidónico es el ácido graso poliinsaturado que se encuentra en mayor concentración en el tejido nervioso. Sin embargo, hasta el momento, su mecanismo de acción no está totalmente dilucidado, pero es probable que actúe a nivel de las membranas celulares, regulando diversas funciones metabólicas, y también a nivel de la expresión de genes relacionados con la función cerebral (Landívar Valverde, 2012; Sanhueza et al., 2004).

Otros ácidos grasos de interés en la alimentación son los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), como los ácidos grasos omega 9. Si bien no son considerados esenciales (Valenzuela et al., 2009) resultan también de enorme interés en alimentación. En concreto, se ha demostrado que el ácido oleico (C18:1n9) disminuye la producción de mediadores quimiotácticos de inflamación, disminuyendo así la intensidad de algunos procesos inflamatorios (Mesa et al, 2006).

Además, los ácidos grasos pueden convertirse en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) mediante la utilización de un catalizador alcalino. Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) pueden ser utilizados para la producción de biodiesel, que es una alternativa al diésel. Sin embargo, este catalizador funciona únicamente con triacilglicéridos, por lo que los ácidos grasos libres no pueden ser convertidos (Canakci et al., 2001).

Por lo tanto, los ácidos grasos tienen un gran valor a nivel industrial y alimentario estando en continuo estudio la mejora de la obtención de estos de la manera más económica y eficiente.

2.2 Fuentes de ácidos grasos

Actualmente, las fuentes más importantes de omega 3 son los peces y mariscos de agua fría, mientras que las de ácidos grasos omega 6 son los aceites de soja, girasol y nuez, entre otros (Hernández, 2014).

Prácticamente todo el omega 3 que se introduce en productos de consumo humano proviene del aceite de pescado. Sin embargo, el inconveniente derivado del característico olor de este producto obliga a su refinado, lo que conlleva el encarecimiento del producto final (Landívar Valverde, 2012). Los PUFA n-6 están presentes en todos los aceites, mayonesas y otros productos elaborados que se consumen diariamente (Landívar Valverde, 2012). Como se ha mencionado anteriormente, se busca aumentar la ingesta de omega 3 en la dieta humana para mejorar la relación n-3/n-6 (Morales et al., 2010). Por otra parte, los MUFA, como el ácido oleico, se obtienen principalmente de plantas, y se consumen en productos como el aceite de oliva.

Para la producción de biodiesel, los ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga derivan de lípidos renovables como los derivados de aceites vegetales y grasa animal (Zheng et al., 2012). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) utilizados para la producción de biodiesel suelen obtenerse de aceite de soja. Sin embargo, el alto valor del aceite de soja como producto alimenticio hace que la producción rentable de dicho combustible sea muy difícil (Canakci et al., 2001).

Para tratar de solventar esta problemática, se ha planteado la utilización de larvas de insectos para la obtención de grasas. Originalmente, las larvas se utilizaban para la obtención de proteínas debido a su alto contenido, sin embargo, se ha demostrado que también representan una fuente alternativa de lípidos, especialmente de ácidos grasos poliinsaturados (Santurino et al., 2016). Esta nueva fuente de ácidos grasos se considera una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente, tanto para la alimentación animal como para la dieta de millones de personas en todo el mundo (FAO, 2013).

2.3 Las larvas como fuente de ácidos grasos

Los insectos suelen ser estudiados más por los problemas que causan en la sociedad o en la agricultura, que por los posibles beneficios derivados de su composición nutricional (Valdez Pantoja et al., 2010). Sin embargo, las larvas de insectos comestibles constituyen una fuente importante de proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas, fibras, micronutrientes como cobre, hierro, magnesio, fósforo, manganeso, selenio y zinc, así como de otras sustancias bioactivas (FAO, 2013). No obstante, se debe tener en cuenta que la composición química de los insectos depende de muchos factores y puede variar significativamente incluso en la misma etapa de vida de una misma especie. Algunos de estos factores son la fase de desarrollo, el sexo, el hábitat, la dieta y la estación del año. Por ejemplo, el contenido lipídico es mayor en el estado larvario que en el estado de pupa, siendo el de menor contenido lipídico el adulto (Mícek et al., 2014, Chen et al., 2009; Finke, 2004). Esto se debe a que los insectos establecen reservas metabólicas, especialmente durante los estados de larva y pupa, ya que luego pasan por períodos del ciclo de vida sin alimentación, como es el caso de la metamorfosis. En los espacios entre los órganos, los insectos poseen una estructura llamada “fat body”, un sistema de almacenamiento de nutrientes utilizado durante la metamorfosis (Manzano-Agugliaro et al., 2012).

Actualmente, los insectos comestibles constituyen una fuente natural y económica de alimentación para los humanos. Son consumidos principalmente en zonas con deficiencia en aminoácidos esenciales como por ejemplo países de Latinoamérica, Asia y África. Además de su utilización como alimento, su alto contenido en grasas abre interesantes posibilidades industriales, como es la obtención de biodiesel, para la cual, los FAMES de algunas especies de insectos, se han encontrado adecuados. Por tanto, la producción de insectos puede resultar un negocio potencial, teniendo en cuenta que poseen un alto nivel nutritivo y su crianza supone un bajo impacto ambiental (Ramos-Bueno et al., 2016).

Según el principal grupo de ácidos grasos presente en los insectos, se consideran tres posibles aplicaciones en la industria alimentaria:

- La presencia de MUFA, especialmente ácido oleico (18:1n9) les otorga propiedades texturales con lo cual suelen ser utilizados como agentes emulsionantes y aditivos alimenticios. *Zophoba morio* es una especie con alto contenido en ácido oleico.
- La presencia de PUFA n-3 y PUFA n-6 son interesantes para la industria alimentaria, al tratarse de ácidos grasos esenciales.
- La presencia de ácidos grasos saturados para la industria alimentaria. Este es el caso de *Hermetia illucens* y *Zophoba morio*, cuyos ácidos grasos pueden

ser utilizado en aplicaciones similares al aceite de coco o leche en polvo para bebés, entre otras (Ramos-Bueno et al., 2016).

Por otra parte, para la producción de biodiésel es muy interesante el alto contenido en ácidos grasos saturados (Manzano-Agugliaro et al., 2012).

Se ha demostrado que el perfil lipídico de los insectos, especialmente durante su estado larvario, puede ser manipulado mediante la dieta (Guil-Guerrero et al., 2018). Por otra parte, también se debe tener en cuenta que el método de extracción utilizado resultará en la extracción de distintas clases de lípidos (Christie, 1993).

En este trabajo, estudiaremos el perfil lipídico de las larvas de *Tenebrio molitor*, *Zophoba morio* y *Hermetia illucens* con distintos tipos de alimentación. El perfil lipídico influye en los posibles usos de las larvas, ya sea para obtener biodiesel o como alimentación. A continuación, detallamos las características principales de cada una de las larvas seleccionadas.

2.3.1 *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor es una especie de escarabajo que presenta una amplia distribución geográfica. Dicho escarabajo es uno de los más grandes (15 mm largo) e infecta productos alimenticios almacenados. Se alimenta de productos provenientes de plantas y causa daños a su masa total y valor nutritivo (Siemianowska et al., 2013).

Sus larvas se utilizan habitualmente como materia prima proteica en la acuicultura. Cada hembra adulta pone alrededor de 300 huevos, que podrían incubar en larvas en 10 a 12 días (Zheng et al., 2013). El estado larvario es el más largo, siendo de 3 a 4 meses. El estado de pupa suele durar entre 12-20 días (Ong et al., 2018). En la figura 2-1 se muestra el ciclo de vida de dicha especie.

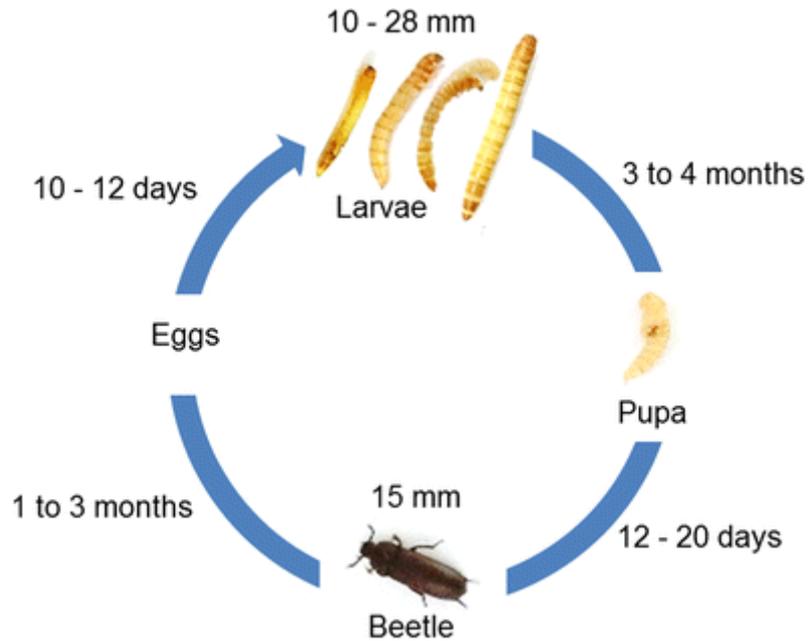


Figura 2-1 Esquema del ciclo de vida de *Tenebrio molitor*. Fuente: Ong et al., 2018.

2.3.2 *Zophoba morio*

Zophoba morio es una especie de escarabajo usado comúnmente como alimento para reptiles domesticados y en polvos proteicos industriales. El ciclo de vida de *Zophoba morio* dura casi 6 meses e incluye cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Su contenido en grasa es de aproximadamente 1/3 de su peso seco, valor que es relativamente mayor que otras especies de insectos (Leung et al., 2012).

La hembra de *Zophoba morio* pone alrededor de 400 huevos, 20 a 60 huevos por evento reproductivo. Estos huevos pueden incubar a larvas en un período de 8 a 12 días. El estado larvario suele ser el más largo, durando aproximadamente 3 meses. El estado de pupa suele durar entre 2 a 3 semanas. El ciclo de vida de esta especie varía según la temperatura (Schulte, 1996).

2.3.3 *Hermetia illucens*

Hermetia illucens es una especie de mosca que contiene un alto valor nutricional (Sheppard et al., 1998). Es un componente muy completo en dietas que favorecen el crecimiento de las aves de corral y cerdos, entre otros (Segura Cazorla, 2015).

Las hembras ponen alrededor de 600 huevos. La incubación de los huevos es de 3 a 4 días hasta alcanzar el estado larvario. En condiciones ideales, la larva puede madurar en 10 días. Los adultos no se alimentan, con lo cual, dependen de las reservas acumuladas

durante la fase larvaria (Segura Cazorla, 2015). En la figura 2-2 se muestra un esquema del ciclo de vida de *Hermetia illucens*.

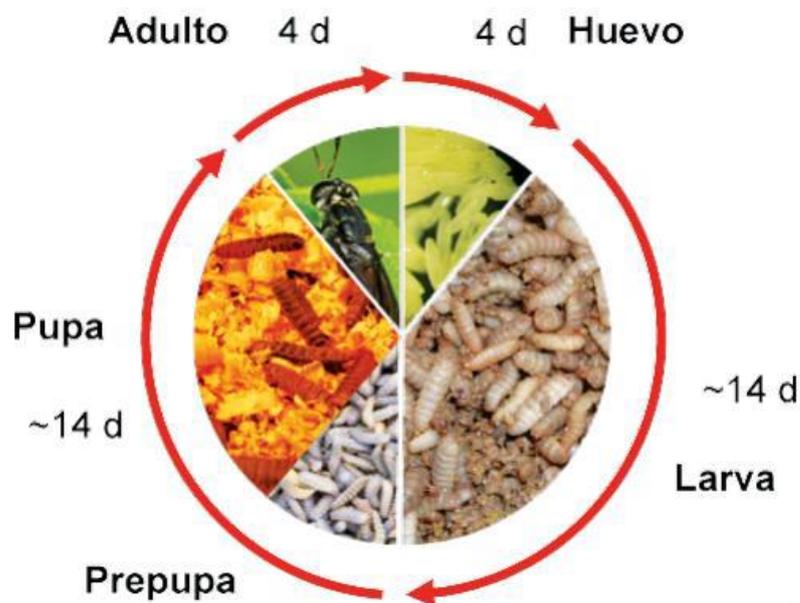


Figura 2-2 Esquema del ciclo de vida de *Hermetia illucens* Fuente: investiga. Tec., enero de 2009

2.4 Estudios previos

La mayor atención en el uso de insectos como fuente de alimento se centra en el contenido proteico, sin embargo, algunas investigaciones en cuanto a la composición química han demostrado que los insectos son una fuente importante de lípidos, especialmente de ácidos grasos esenciales (PUFA n-3 y PUFA n-6) (Chen et al., 2009; Ramos-Elorduy, 2008; Yang et al., 2006). Estudios previos han demostrado que el contenido en ácidos grasos poliinsaturados esenciales en larvas es superior al observado en grasa animal (Chen et al., 2009). El contenido en grasa de las larvas oscila entre un 10 y 40% de su peso seco, y en todos los casos está constituido por más ácidos grasos insaturados que en otras especies animales (Ramos-Elorduy, 1998).

Un estudio ha mostrado que el contenido en grasa en peso seco de *Tenebrio molitor* en su estado larvario se encuentra alrededor del 30%, mientras que el de *Zophoba morio* se encuentra alrededor de 40%, y el de *Hermetia illucens* entorno a un 20%. Sin embargo, estos datos son muy variables, como mencionamos anteriormente, ya que el perfil lipídico de las larvas depende de muchos factores (Manzano-Agugliaro et al., 2012).

La mosca *Hermetia illucens* tiene un alto valor nutricional. Estudios previos han demostrado el alto porcentaje de grasa de las prepupas (35%) (Segura Cazorla, 2015;

Newton et al., 1997). Estudios similares también han mostrado que a partir de harina de las prepupas de *Hermetia illucens*, es posible reemplazar al menos en un 25% la harina de pescado en una dieta, sin reducir la tasa de conversión (Segura Cazorla, 2015; St-Hilaire et al., 2007). Por otra parte, las prepupas de *Hermetia illucens* alimentadas con desechos de pescado mezclado con estiércol de vaca, mejoran el contenido de ácidos grasos omega 3 desde unos niveles insignificantes hasta alcanzar un 3% (Segura Cazorla, 2015; St-Hilaire et al., 2007).

Un estudio realizado por Souza en 2011 ha mostrado como varía el ciclo de vida de *Tenebrio molitor* según el tipo de alimentación. Muestra que el peso aumenta considerablemente si las larvas son alimentadas con avena en lugar de trigo, además de aumentar su porcentaje de lípidos, sin embargo, se obtuvo mayor contenido proteico para las larvas alimentadas con harina de trigo. Con lo cual, este estudio ha vuelto a confirmar que tanto la etapa de vida del insecto como su alimentación influyen considerablemente en su valor nutritivo.

Por otra parte, durante los últimos años, los insectos también han atraído la atención de investigadores por su enorme potencial como fuente de energía. Se ha estudiado la capacidad de especies como *Tenebrio molitor* para reciclar residuos orgánicos generando un incremento en la acumulación de grasa. Así, se ha visto que *Hermetia Illucens* puede colonizar una amplia gama de materiales orgánicos, y utilizarlos para sintetizar proteínas y grasas, que a su vez pueden ser utilizadas como materia prima para la producción de biodiesel. Especies como *Zophoba morio* también han sido estudiadas para su utilización en la producción de biodiesel, obteniéndose resultados muy satisfactorios y prometedores (Leung et al., 2012).

2.5 Hipótesis de trabajo

En función de lo indicado con anterioridad, la hipótesis de partida se basó en el hecho de que, mediante distintas estrategias de alimentación de larvas de *Tenebrio molitor*, *Zophoba morio* y *Hermetia Illucens*, a base de distintos frutos de destrío deshidratados, se podría modificar el perfil lipídico de las larvas, permitiendo obtener ácidos grasos de mayor interés alimentario y/o industrial.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Evaluar la influencia del uso de frutos de destrío como alimento en el perfil lipídico de larvas de *Tenebrio molitor*, *Zophoba morio* y *Hermetia illucens*.

3.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos abarcan la realización de estudios comparativos entre las larvas alimentadas con salvado de trigo y las larvas alimentadas con frutos de destrío (sandía, papaya y tomate deshidratado), con el fin de determinar:

- i) El contenido en grasa mediante la evaluación de distintos métodos de extracción.
- ii) La variación del perfil lipídico
- iii) La variación del perfil de triacilgliceroles

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Larvas seleccionadas y condiciones de crecimiento

Se seleccionaron larvas de tres insectos *Tenebrio molitor* (gusano de la harina), *Hermetia illucens* (mosca soldado negra) y *Zophoba morio* (gusano rey) por su alto contenido en grasa (Figura 4-1). Las larvas fueron alimentadas con salvado de trigo (control) y con residuos de frutos de sandía, tomate y papaya. Los residuos de frutos fueron previamente deshidratados.



Figura 4-1- Imagen representativa de las larvas de insectos utilizados.

En la siguiente tabla se hace referencia a los códigos que se utilizaron para nombrar las distintas especies de larvas, así como los tratamientos aplicados en función del tipo de dieta.

Tabla 4-1 – Códigos de las especies de larvas y tratamientos aplicados.

Especie	Tipo de alimentación	Código asignado
<i>Zophoba morio</i>	Salvado de trigo	ZC
	Sandía deshidratada	ZS
	Tomate deshidratado	ZT
	Papaya deshidratada	ZP
<i>Tenebrio molitor</i>	Salvado de trigo	TC
	Sandía deshidratada	TS
	Tomate deshidratado	TT
	Papaya deshidratada	TP
<i>Hermetia illucens</i>	Salvado de trigo	HC
	Sandía deshidratada	HS
	Tomate deshidratado	HT
	Papaya deshidratada	HP

Las larvas se adquirieron a una empresa especializada en cría de insectos y, durante los siguientes tres días de su recepción, se mantuvieron en condiciones similares de temperatura y dieta. Las larvas de *Hermetia illucens* se compraron en estado larvario L2-L3 y las larvas de *Zophoba morio* y *Tenebrio molitor* tenían entre 2-3 semanas de crecimiento. Se alimentaron 2 veces por semana y para hidratarlas se les suministro un poco de agua en gel. La cantidad de alimento fue modificándose conforme el crecimiento de las larvas era mayor.

Los ensayos con *Tenebrio molitor* se llevaron a cabo en bandejas de plástico de 75 g. El número de larvas aproximado por bandeja fue de 200-300 larvas, previamente sometidas a una limpieza de restos de excrementos y alimentos utilizando un tamiz de 100 μm . Las larvas se mantuvieron en las mismas bandejas, 4 réplicas para el control y para cada uno de los alimentos suministrados. Los 16 grupos de larvas se limpiaron semanalmente y se alimentaron con salvado de trigo y alimento deshidratado (aprox. 15 g) dos veces por semana. La limpieza consistió en la retirada de los restos de alimento y de los excrementos mediante tamizado, con un tamaño de poro adecuados al tamaño de las larvas (100 -500 μm).

La cantidad de alimento que se les añadió dependió de las necesidades de las larvas, aumentando la cantidad de alimento progresivamente a medida que las larvas crecían e intentando mantener una proporción constante para el salvado y el alimento fresco.

De igual manera se trabajó con las larvas de *Zophoba morio* y con *Hermetia illucens*. En la figura 4-2 se muestran imágenes de los ensayos realizados con las tres especies de larvas.

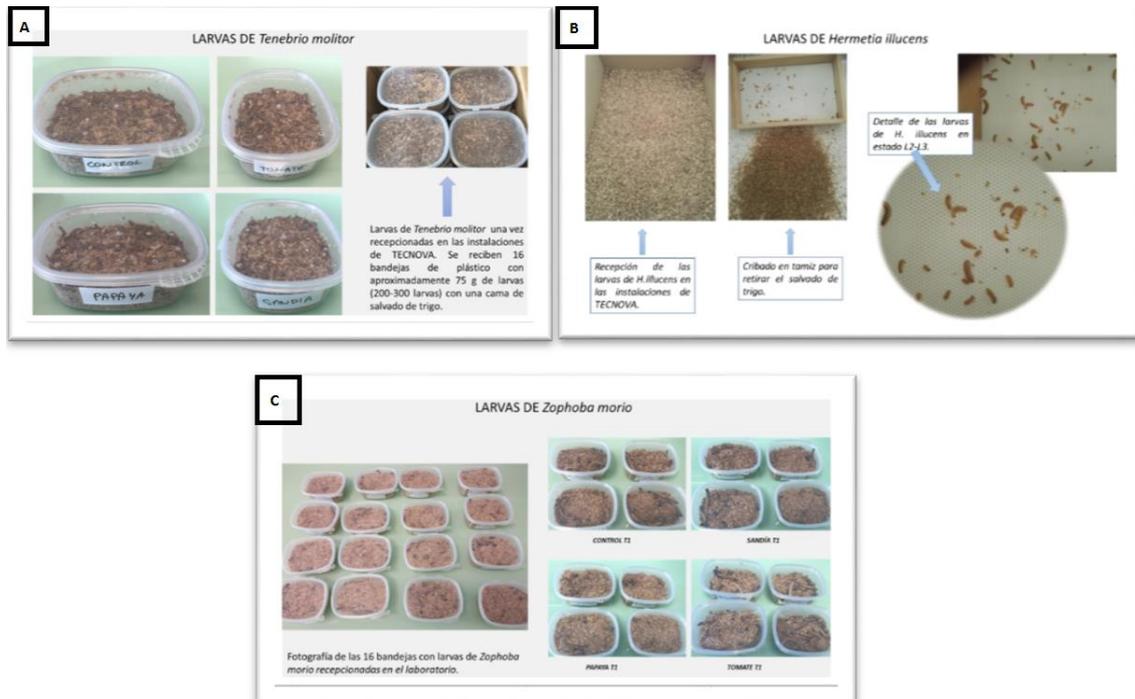


Figura 4-2- Imagen de los ensayos realizados en el laboratorio con *Tenebrio molitor* (A); *Hermetia illucens* (B) y *Zophoba morio* (C).

Las larvas se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 25-28°C y una humedad relativa de 60% con fotoperiodo controlado (16 horas de luz y 8 de oscuridad). La cría de las larvas se prolongó durante seis semanas y media y se prosiguió con su mantenimiento de limpieza y suministro de alimento. Durante las últimas 24 horas, las larvas se mantuvieron sin alimento para vaciar su contenido intestinal. A continuación, se limpiaron los excrementos, se registró su peso total, se introdujeron en bolsas de congelación y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior procesado.

4.2 Preparación de las muestras

4.2.1 Métodos de deshidratación

Se evaluaron distintos métodos de deshidratación para determinar si existen variaciones en el perfil lipídico de las larvas estudiadas. Los métodos evaluados fueron: secado por estufa (Estufa Memmert VFS); deshidratación por convección (Irconfort Infrared Emitters IRCD18) y por infrarrojo (Klarstein Food Dehydrator) (figura 4-3, 4-4 y 4-5)



Figura 4-3 – Método de deshidratación por estufa. Equipo utilizado (A) Muestras de *Zophoba morio* (B) Muestras de *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens* (C).



Figura 4-4 – Método de deshidratación por convección. (A) Equipo utilizado (B) Muestras de *Zophoba morio* (C) Muestras de *Tenebrio molitor* (D) Muestras de *Hermetia illucens*



Figura 4-5 – Método de deshidratación por infrarrojo. (A) Equipo utilizado (B) Muestras de *Zophoba morio* (C) Muestras de *Tenebrio molitor* (D) Muestras de *Hermetia illucens*.

4.2.2 Procedimiento de molienda de larvas

Una vez deshidratadas, las larvas fueron molidas con un molinillo (Molinillo Titanmill 300 Duoclean (Cecotec)) hasta obtener un polvo fino, denominado harina de insecto. En la figura 4-6 se muestra ver el proceso de molienda con las larvas de *Zophoba morio*.



Figura 4-6 – Molienda de las larvas de *Zophoba morio*

4.3 Optimización de un procedimiento de extracción del contenido lipídico

Se evaluaron distintas metodologías para la extracción del contenido lipídico:

- extracción utilizando n-hexano
- extracción utilizando acetato de etilo
- prensado de las larvas en frío.

La técnica seleccionada finalmente, fue aquella para la cual se obtuvo un mayor contenido en grasa. Para conocer el valor del contenido en grasa, se pesó inicialmente el matraz vacío y posteriormente se volvió a pesar tras el secado de la muestra por evaporación.

4.3.1 Extracción utilizando disolventes

El procedimiento utilizado se basó en el descrito por Taborda et al. (2018). En un tubo falcon^{TN} de 50mL se pesaron 2 g de harina de insecto, se agregaron 14mL de disolvente (n-hexano o acetato de etilo) y se llevó al ultrasonido (Ultrasons-H JP Selecta) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto se filtró con papel de filtro y se adicionaron de nuevo 14mL de disolvente para la realización de una segunda extracción siguiendo el mismo procedimiento. Se unieron ambos extractos y se llevó a

sequedad mediante evaporación a presión reducida a 40°C utilizando el rotavapor (Evaporador rotativo RE100-Pro) (figura 4-7).



Figura 4-7– Metodología de secado mediante destilación. (A) Matraz con el extracto a secar (B) Rotavapor con el matraz (C) Matraz con el extracto seco.

4.3.2 Prensado

Para evaluar esta técnica de extracción se utilizaron muestras de larvas de forma previa al proceso de deshidratación y molienda mencionado en el punto 4.2. Se pesaron aproximadamente 10 g de larvas frescas y se procedió al prensado. Se transfirió el material prensado a un tubo falcon^{TN} de 15mL y se pesó para conocer la masa obtenida. Se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos. Se tomó el aceite, se pasó a un tubo Eppendorf® y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 10 minutos. Se guardó el aceite obtenido en un vial y se registró la cantidad obtenida. En la figura 4-8 se muestra la metodología de prensado.

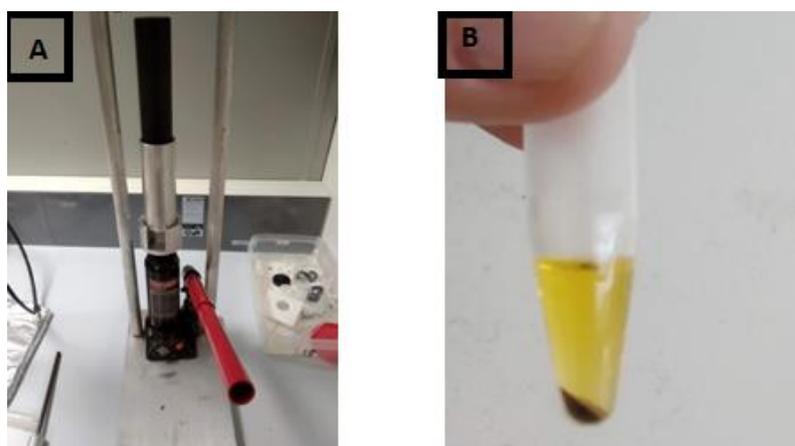


Figura 4-8 – Metodología de prensado. Prensa utilizada (A), aceite obtenido (B).

4.4 Caracterización del perfil lipídico mediante cromatografía de gases (GC)

4.4.1 Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos

Este procedimiento se basa en el descrito por Ramos-Bueno et al, 2016. Se pesaron 50-60 mg de harina de insecto en un tubo pirex[®]. Se agregó 1mL de hexano y 1mL de la mezcla metilante. Se llevó a 100°C durante 30 minutos en un termobloque. Una vez enfriado el extracto, se agregó 1mL de H₂O, se centrifugó durante 2 minutos a 1000 rpm y finalmente se pasó la fase orgánica a viales para su análisis final. Este procedimiento se realizó por triplicado.

4.4.2 Detección y cuantificación del perfil lipídico por GC

El estudio del perfil lipídico se realizó mediante el análisis de la fracción conteniendo los FAMES de interés. Los distintos ácidos grasos se mostraron como picos con distintos tiempos de retención.

La cuantificación se realizó a partir del cromatograma, del cual se obtuvo el porcentaje de área de cada pico, correspondiente a un ácido graso. El área de los picos se corresponde con la concentración del ácido graso en la muestra.

4.5 Caracterización del perfil de triacilglicerolos mediante cromatografía de líquidos

Para la consecución de esta tarea, se utilizaron 5 mg de aceite a partir del aceite obtenido mediante la extracción con acetato de etilo en 1mL de n-hexano (5mg/mL). Se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC Thermo Spectrasystem UV8000) con una columna en fase reversa C18 donde se empleó como fase móvil una mezcla de Acetonitrilo:Isopropanol (80:20) y un caudal de flujo de 1 mL/min. La temperatura de la columna fue de 30°C y la longitud de onda del espectrofotómetro fue fijada en 210 nm. La duración del cromatograma se estableció en 30 minutos.

Los diferentes triglicéridos se recogieron por separado en función de su tiempo de retención, se dejó evaporar el n-hexano. Se metilaron y se analizaron posteriormente mediante cromatografía de gases (Thermo Trace GC Ultra), donde se obtuvo la composición de los triglicéridos del aceite y, por tanto, su contenido en ácidos grasos.

4.6 Análisis estadístico

Los resultados del perfil lipídico obtenidos mediante cromatografía de gases se analizaron estadísticamente para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tipos de alimentación evaluados.

Para cada análisis, se calculó la desviación estándar (SD) entre las réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un nivel de significancia de 0,05. Cuando se encontraron diferencias significativas entre las muestras se realizó un test de comparaciones múltiples utilizando el índice de Tukey. Estos análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 8.4.3 (686) (GraphPad Software, San Diego, California USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de la metodología de secado

Para la realización de este trabajo, se evaluaron tres metodologías de secado: estufa, convección e infrarrojo. En la tabla 5-1 se muestra la variación del perfil lipídico analizado por cromatografía de gases de *Tenebrio molitor* alimentado con salvado de trigo (TC) secado con las tres metodologías evaluadas.

Tabla 5-1 – Variación del perfil lipídico de TC con las distintas metodologías de secado.

Ácido graso	INFRARROJO	ESTUFA	CONVECCIÓN
C12	0,14±0,04*	0,14±0,05*	0**
C14	2,25±0,07*	1,84±0,08*	2,12±0,20*
C16	17,62±0,06*	16,48±0,08*	17,22±0,69*
C16.1n9	1,46±0,11*	1,29±0,01*	1,32±0,15*
C18.1n9	2,90±0,81*	2,33±0,13*	3,05±0,11*
C18.1n7	32,41±0,65*	33,92±0,61*	32,14±1,96*
C18.2n6	41,23±1,58*	42,19±0,25*	42,16±0,78*
C18.3n3	1,83±0,01*	1,79±0,01*	1,75±0,08*

* indican que no se encontraron diferencias significativas entre las muestras analizadas.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el perfil lipídico obtenido a partir de metodología de secado, por lo que los ensayos posteriores se llevaron a cabo en estufa de secado tradicional.

5.2 Optimización de una metodología de extracción de contenido lipídico

Para seleccionar el mejor procedimiento de extracción de contenido lipídico se evaluó el contenido en grasa a partir de cada una de las metodologías evaluadas, las cuales fueron extracción con n-hexano, con acetato de etilo y prensado. En la tabla 5-2 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5-2. Porcentaje de grasa obtenido realizando la extracción con n-hexano, acetato de etilo y mediante prensado. Se muestra el resultado promedio junto con su desviación estándar.

Muestra	% Grasa con n-hexano	% Grasa con acetato de etilo	% Grasa mediante prensado
TC	11,23±0,45	16,10±0,66	1,94±1,28
TS	16,16±2,86	19,66±0,41	15,92±0,57
TT	14,28±2,18	19,75±0,82	6,63±2,32
TP	16,93±3,88	22,77±0,45	3,57±0,61
HC	6,31±0,33	10,36±1,84	-
HS	6,89±0,57	11,29±1,04	-
HT	9,97±0,85	14,03±0,23	-
HP	7,33±0,20	15,06±0,04	-
ZC	13,56±0,67	23,41±1,86	-
ZS	13,05±1,07	25,17±0,21	-
ZT	15,00±0,35	20,97±0,30	-
ZP	14,86±0,60	21,56±1,40	-

TC- *Tenebrio control*, TS- *Tenebrio* alimentado con sandía deshidratada, TT- *Tenebrio* alimentado con tomate deshidratado, TP- *Tenebrio* alimentado con papaya deshidratada, HC- *Hermetia control*, HS- *Hermetia* alimentada con sandía deshidratada, HT- *Hermetia* alimentada con tomate deshidratado, HP- *Hermetia* alimentado con papaya deshidratada, ZC- *Zophoba control*, ZS- *Zophoba* alimentado con sandía deshidratada, ZT- *Zophoba* alimentado con tomate deshidratado, ZP- *Zophoba* alimentado con papaya deshidratada.

Los resultados del contenido en grasa tras la extracción con n-hexano mostraron, en general, una elevada reproducibilidad entre réplicas. En este caso, a partir de las muestras de *Tenebrio molitor* se obtuvo un mayor contenido en grasa. En concreto, las muestras de TS. Por otra parte, las muestras de *Hermetia illucens* fueron las que mostraron menor contenido en grasa, siendo las HT las que tuvieron un mayor rendimiento en esta especie. En el caso de *Zophoba morio*, las ZT también fueron las que presentaron un mejor rendimiento.

Al igual que en el caso anterior, los resultados obtenidos a partir de la extracción con acetato de etilo mostraron una elevada reproducibilidad entre réplicas. Sin embargo, en este caso, las muestras de *Zophoba morio* fueron las que obtuvieron un mayor contenido en grasa. En concreto, las muestras ZS. Al igual que en la extracción con n-hexano, la extracción de *Hermetia illucens* con acetato de etilo dio lugar a un menor contenido en grasa, siendo la muestra HP la que obtuvo un mayor rendimiento. Por último, en el caso de *Tenebrio molitor*, la muestra que mostró un mayor rendimiento tras la extracción con acetato de etilo fue aquella alimentada con papaya deshidratada (TP).

En el caso de la extracción realizada mediante prensado se evaluó únicamente *Tenebrio molitor*, ya que en el resto de las muestras se observó que los resultados obtenidos no mostraban una elevada reproducibilidad. Por otra parte, el contenido en

grasa obtenido para TC, TT y TP fue considerablemente menor que el obtenido mediante las otras dos metodologías de extracción.

Los resultados obtenidos mediante la extracción con acetato de etilo coincidieron con los encontrados en bibliografía (Manzano-Agugliaro et al., 2012), siendo las larvas de *Zophoba morio* las que mostraron un mayor contenido en grasa. Sin embargo, los resultados reportados en bibliografía son mucho mayores a los obtenidos en este estudio, ya que se ha descrito en *Zophoba morio* hasta un 38-40% de grasa, en *Tenebrio molitor* hasta un 30-35% y en *Hermetia Illucens* hasta un 16-18% (Manzano-Agugliaro et al., 2012). Por otra parte, se ha observado que el contenido en grasa se ve influenciado por la metodología de extracción (Tzompa-Sosa et al., 2014; Pérez-Palacios et al., 2008), así como por la alimentación de las larvas (Santurino et al., 2016; Segura Cazorla, 2014). Se debe tener en cuenta además que las larvas utilizadas se encontraban en distintas etapas de crecimiento de su estado larvario, y, como se mencionó anteriormente, esto también pudo influir en el contenido de grasa obtenido, así como en el rendimiento en la extracción del contenido lipídico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este apartado del preliminar del trabajo, se continuó el estudio con las muestras extraídas con acetato de etilo, ya que el rendimiento de la extracción fue mayor en todos los casos. Además, se trata de un disolvente verde que puede ser reutilizado una vez realizado el proceso de extracción.

5.3 Caracterización del perfil lipídico mediante cromatografía de gases (GC)

Para la caracterización del perfil lipídico se calculó el porcentaje de área de cada pico obtenido en el cromatograma, lo que nos permitió evaluar en qué proporción se encontraba cada ácido graso en la muestra. En la tabla 5-3 se muestran los resultados obtenidos para las distintas muestras de *Tenebrio molitor*.

Tabla 5-3. Perfil lipídico obtenido para las muestras de *Tenebrio molitor*.

Ácido graso	TC	TS	TT	TP
C12	0,14±0,05	0,16±0,01	0,13±0,02	0,23±0,06
C14	1,84±0,08	2,12±0,07	1,95±0,05	2,56±0,01
C16	16,48±0,08	17,02±0,45	16,89±0,30	18,56±0,51
C16:1n9	1,29±0,01	1,85±0,03	1,63±0,04	0,54±0,23
C16:2n4	0	0,18±0,01	0	0
C16:3n4	0	0,08±0,01	0	0
C18:1n9	2,33±0,13	0	1,48±0,01	0
C18:1n7	33,92±0,60	49,20±0,61	38,89±0,65	44,07±1,14
C18:2n6	42,19±0,25	27,79±0,13	37,11±0,23	30,63±1,22
C18:3n3	1,79±0,01	1,19±0,03	1,73±0,02	1,42±0,08
C18:4n3	0	0,22±0,01	0	0

TC- *Tenebrio control*, TS- *Tenebrio alimentado con sandía deshidratada*, TT- *Tenebrio alimentado con tomate deshidratado*, TP- *Tenebrio alimentado con papaya deshidratada*

En la figura 5-1 se muestra un gráfico comparativo del perfil lipídico obtenido para cada muestra de *Tenebrio molitor* con cada tipo de alimentación. En el caso de los ácidos grasos saturados, TP presentó diferencias significativas con el resto de las muestras. En el caso de los MUFA, todas las muestras presentaron diferencias significativas con el control (TC). Además, la muestra de TS fue la que presentó una mayor cantidad de MUFA (~51%), presentando diferencias significativas con TT y TP. En el caso de los PUFA n-3, se observaron diferencias significativas entre dos grupos: TC y TT con TS y TP, siendo TC y TT las que obtuvieron una cantidad mayor. Finalmente, respecto a los PUFA n-6, se observaron diferencias significativas entre todas las muestras, siendo el control la que presentó una mayor cantidad (~42%).

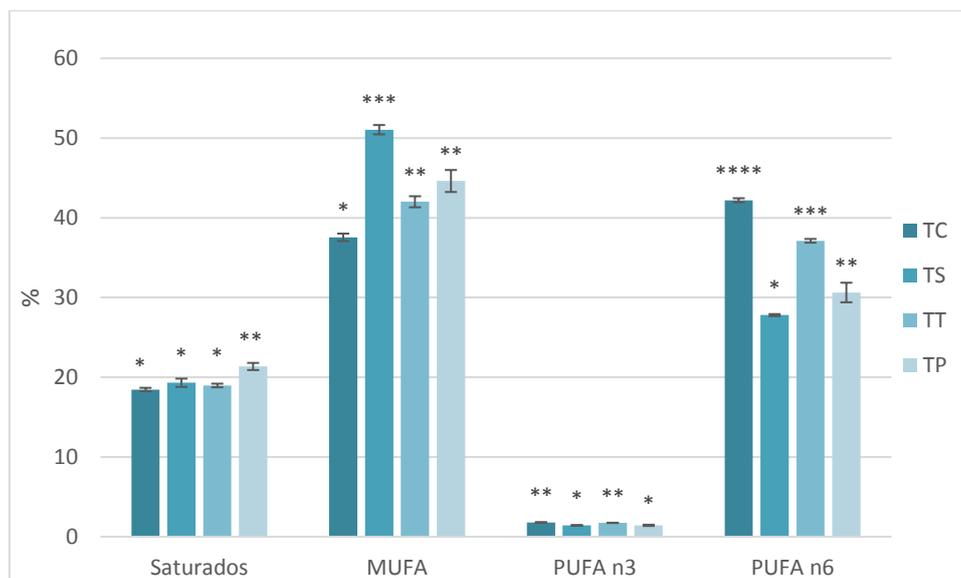


Figura 5-1. Gráfico representativo de los distintos grupos de ácidos grasos presentes en las distintas muestras de *Tenebrio molitor*. Cada barra azul representa la suma de porcentajes de área de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados n-3 (PUFA n-3) y poliinsaturados n-6 (PUFA n-6). Cada barra negra representa la desviación estándar asociada. La cantidad de asteriscos (*) sobre las barras representan las diferencias significativas dentro de cada grupo en base al índice de Tukey ($p < 0.05$)

Las larvas de *Tenebrio molitor* tienen un perfil lipídico rico en ácidos grasos PUFA n-6 y MUFA. Observando la figura 5-1, las larvas alimentadas a base de frutos de destrío obtuvieron un porcentaje mayor de MUFA que las larvas control. Este resultado puede ser interesante para la industria alimentaria, donde los ácidos grasos monoinsaturados pueden ser utilizados como agentes emulsificantes y aditivos alimenticios (Ramos-Bueno et al., 2016). Por otra parte, en el caso de los PUFA n-6 el resultado es el contrario: las larvas alimentadas con frutos de destrío obtuvieron porcentajes significativamente menores a las larvas control. Con lo cual, si lo que se busca obtener son PUFA n-6, la mejor opción sigue siendo la alimentación con salvado de trigo.

Cabe mencionar que si bien el contenido de PUFA n-3 es muy reducido en estas larvas (~1,5%), las larvas alimentadas con sandía deshidratada son las únicas que contienen el ácido estereadónico (C18:4n3) en un porcentaje bajo (0,22%). Esto puede ser interesante ya que puede ser un inicio para mejorar el perfil lipídico de estas larvas para la obtención de ácidos grasos PUFA n-3, los cuales son especialmente relevantes en la nutrición humana (Guil-Guerrero et al., 2018).

Por otra parte, las larvas TP fueron las que obtuvieron un porcentaje mayor de ácidos grasos saturados. Si bien las larvas de *Tenebrio molitor* no son las que poseen un perfil lipídico con abundantes ácidos grasos saturados, este resultado puede ser

interesante para evaluar su posible uso en la producción de biodiésel (Manzano-Agugliaro et al., 2012).

En la tabla 5-4 se muestra el perfil lipídico obtenido para *Zophoba morio* con cada tipo de alimentación.

Tabla 5-4 Perfil lipídico obtenido para las muestras de *Zophoba morio*.

Ácido graso	ZC	ZS	ZT	ZP
C6	0	0	0,04±0,01	0
C8	0,68±0,02	0,80±0,10	0,70±0,05	0,70±0,05
C10	0,10±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01
C12	0,09±0,02	0	0,13±0,01	0,12±0,02
C14	1,22±0,03	1,29±0,13	1,20±0,04	1,22±0,01
C16	29,49±0,89	31,51±0,75	29,52±0,41	29,87±0,29
C16:1n9	1,92±0,46	2,12±0,04	2,09±0,13	2,18±0,01
C16:2n4	1,09±0,01	1,10±0,09	1,03±0,01	1,03±0,01
C16:3n4	0	0,41±0,04	0,44±0,03	0,42±0,02
C18:1n9	9,13±5,83	5,56±0,18	6,14±1,24	5,16±0,34
C18:1n7	31,76±4,25	33,86±1,16	34,57±0,72	35,11±0,03
C18:2n6	23,39±0,16	22,66±0,20	23,49±0,06	23,60±0,08
C18:4n3	0,55±0,06	0,54±0,01	0,53±0,03	0,54±0,01

ZC- *Zophoba control*, ZS- *Zophoba* alimentado con sandía deshidratada, ZT- *Zophoba* alimentado con tomate deshidratado, ZP- *Zophoba* alimentado con papaya deshidratada.

En la figura 5-2 se muestra un gráfico comparativo del perfil lipídico obtenido para cada muestra de *Zophoba morio* con cada tipo de alimentación. En este caso, no se observaron diferencias significativas entre las muestras en cuanto a la proporción de ácidos grasos saturados, MUFA y PUFA n-3. Sin embargo, en el caso de PUFA n-6, ZS presentó diferencias significativas con el resto de las muestras, siendo la que mostró una menor proporción de dichos ácidos grasos.

Las larvas de *Zophoba morio* tienen un alto contenido en MUFA y ácidos grasos saturados. Sin embargo, se puede decir que el tipo de alimentación no influyó en el perfil lipídico de las larvas ya que no se observaron diferencias significativas entre las larvas control y las larvas alimentadas con frutos de destrío. La única excepción es el caso de ZS, que obtuvo un contenido menor de PUFA n-6 que el resto de las larvas, con lo cual, este tipo de alimentación se podría descartar en caso de buscar una mejora en el contenido de ácidos grasos PUFA n-6.

Las larvas de *Zophoba morio* podrían ser utilizadas tanto en la producción de biodiesel gracias a su alto contenido en ácidos grasos saturados (Leung et al., 2012; Manzano-Agugliaro et al., 2012), como para la industria como aditivos alimentarios y emulsificantes (Ramos-Bueno et al., 2016).

Si bien la alimentación de las larvas de *Zophoba morio* con frutos de destrío no mejora el perfil lipídico en comparación con las alimentadas con salvado de trigo, se podría utilizar este tipo de alimentación, beneficiándonos así de su bajo impacto medioambiental (Santurino et al., 2018; Ramos-Bueno et al., 2016).

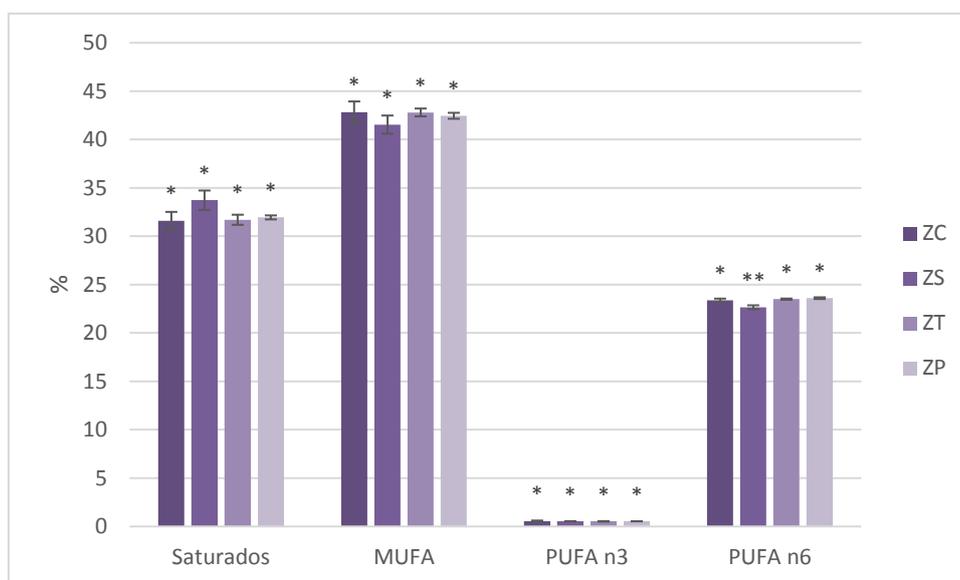


Figura 5-2. Gráfico representativo de los distintos grupos de ácidos grasos presentes en las distintas muestras de *Zophoba morio*. Cada barra violeta representa la suma de porcentajes de área de los ácidos grasos saturados, MUFA, PUFA n-3 y PUFA n-6). Cada barra negra representa la desviación estándar asociada. La cantidad de asteriscos (*) sobre las barras representan las diferencias significativas dentro de cada grupo en base al índice de Tukey ($p < 0.05$)

Finalmente, en la tabla 5-5 se muestra el perfil lipídico obtenido para las muestras de *Hermetia illucens*, y en la figura 5-3 el gráfico representativo.

Tabla 5-5. Perfil lipídico de las muestras de *Hermetia illucens*

Ácido graso	HC	HS	HT	HP
C6	0	0	0.06±0.01	0.07±0.01
C10	0.92±0.04	0.99±0.01	0.95±0.05	0.91±0.03
C12	39.14±1.65	42.03±0.05	42.85±2.30	40.56±0.52
C14	9.77±0.19	9.64±0.05	10.49±0.39	10.00±0.05
C16	16.47±0.32	15.31±0.04	15.36±0.20	16.00±0.14
C16:1n9	2.48±0.02	2.68±0.02	2.72±0.04	2.63±0.01
C18:1n9	3.12±0.02	2.73±0.01	3.05±0.32	3.08±0.02
C18:1n7	15.04±0.35	13.91±0.06	14.30±1.59	14.43±0.30
C18:2n6	13.04±1.20	12.25±0.04	10.22±0.59	12.01±0.15
C18:3n3	0	0.42±0.01	0	0.32±0.03

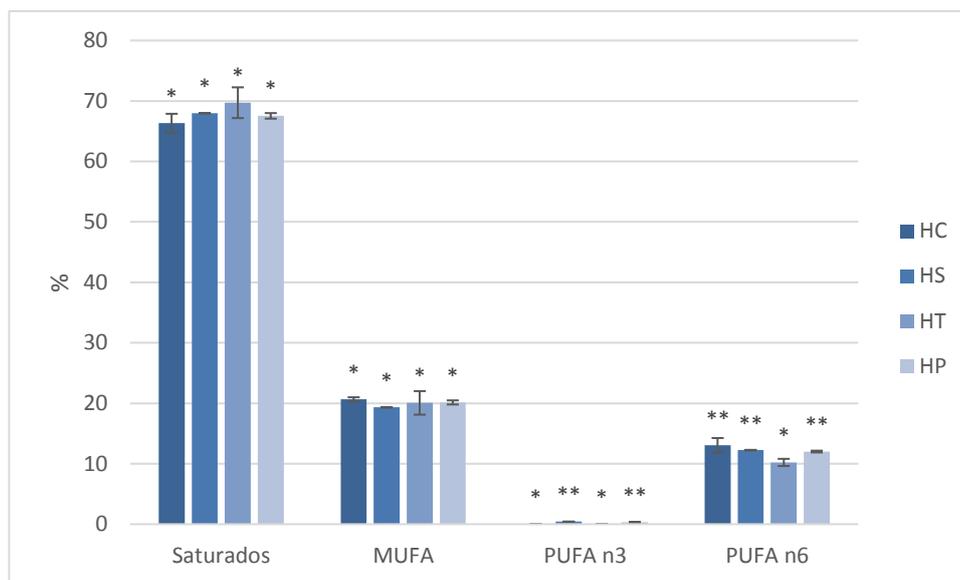


Figura 5-3. Gráfico representativo de los distintos grupos de ácidos grasos presentes en las distintas muestras de *Hermetia illucens*. Cada barra azul representa la suma de porcentajes de área de los ácidos grasos saturados, MUFA, PUFA n-3) y PUFA n-6. Cada barra negra representa la desviación estándar asociada. La cantidad de asteriscos (*) sobre las barras representan las diferencias significativas dentro de cada grupo en base al índice de Tukey ($p < 0.05$)

En el caso de *Hermetia illucens*, se observaron diferencias significativas únicamente en el caso de los perfiles de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA n-3 y PUFA n-6). En el caso de los PUFA n-3, se observaron dos grupos: HC y HT con HS y HP, siendo estos últimos los que presentaron una mayor proporción de PUFA n-3. Por otra parte, para los PUFA n-6, HT presentó diferencias significativas con el resto de las muestras, siendo la muestra con menor proporción de este grupo de ácidos grasos.

Las larvas de *Hermetia illucens* tienen un alto contenido en ácidos grasos saturados. A diferencia de *Tenebrio molitor* y *Zophoba morio*, este perfil podría ser interesante para la utilización de estas larvas en la industria cosmética o bien para la producción de biodiesel (Manzano-Agugliaro et al., 2012), y no tanto para la industria alimentaria. Las larvas de *Hermetia illucens* son las que presentan el mayor contenido en ácidos grasos saturados de las tres especies estudiadas en este trabajo.

Es interesante mencionar en este caso que el ácido α -linoleico (C18:3n3) que no se encontró en las larvas control, está presente en las larvas alimentadas con papaya y tomate deshidratado. Este ácido graso es de gran interés a nivel nutricional en mamíferos, ya que es el precursor de DHA (C22:6n3), que, como se mencionó anteriormente es precursor de compuestos antiinflamatorios y juega un rol importante en la prevención de muchas patologías (Venegas-Venegas et al., 2013). Con lo cual, estos resultados son prometedores en tanto en cuanto pueden suponer un punto de partida para la obtención de este ácido graso a partir de este grupo de larvas.

Para el resto de los grupos de ácidos grasos, al igual que en el caso de *Zophoba morio*, no se logró mejorar el perfil lipídico utilizando frutos de destrío como alimento. Sin embargo, desde una perspectiva sostenible y ambiental, se podría optar por la utilización de los frutos de destrío para la alimentación de este tipo de larvas.

5.4 Caracterización del perfil de triacilglicerol mediante cromatografía de líquidos

Para la caracterización del perfil de triacilglicerol (TAG) se realizó un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a partir de muestras de ZS extraídas con 5mg/mL de aceite en n-hexano. Se seleccionó únicamente las larvas ZS para la realización de este ensayo debido a que fueron las larvas que presentaron un mayor contenido lipídico. En la figura 5-4 se muestra el cromatograma obtenido.

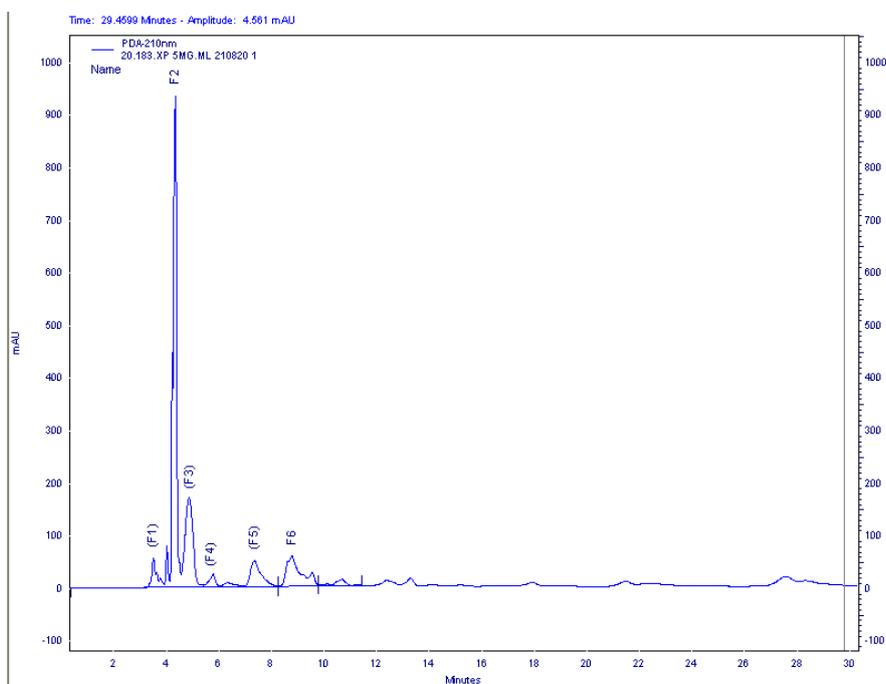


Figura 5-4 Cromatograma del perfil de triacilglicéridos de la muestra ZS.

Los diferentes triacilglicéridos se recogieron por separado en función de su tiempo de retención. Se recogieron 6 fracciones en los siguientes tiempos:

- F1: 3,16 minutos
- F2: 3,97 minutos
- F3: 4,56 minutos
- F4: 5,37 minutos
- F5: 7,00 minutos
- F6: 8,46 minutos

Cada fracción fue analizada mediante cromatografía de gases (GC). En la figura 5-5 se muestra a modo de ejemplo el cromatograma obtenido para la F3.

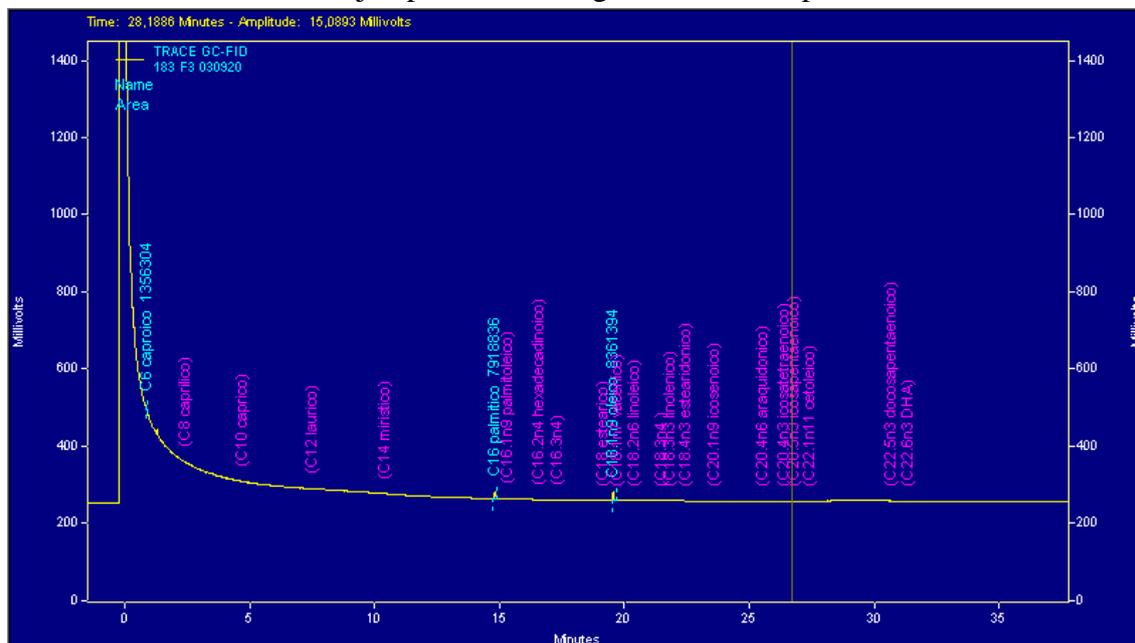


Figura 5-5. Cromatograma de la composición de ácidos grasos de la F3 obtenido mediante cromatografía de gases.

En la tabla 5-6 se muestra la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de triacilglicéridos de la muestra ZS.

Tabla 5-6. Composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de TAG de la muestra ZS.

Ácido graso (%)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
C6	26,62	15,92	7,69	59,73	43,40	62,71
C16	-	-	44,90	14,92	26,77	21,27
C18	-	-	-	25,35	-	-
C18:1n9	31,46	74,7	47,41	-	-	-
C18:2n6	41,93	9,38	-	-	29,83	16,02

Las fracciones F1 y F2 revelaron la presencia de triacilglicéridos compuestos por ácido caproico (C6), ácido oleico (C18:1n9) y ácido linoleico (C18:2n6). La fracción F3 estuvo principalmente compuesta por ácido caproico (C6), ácido palmítico (C16) y ácido oleico (C18:1n9). Por su parte, la fracción F4 mostró en su composición el ácido caproico (C6), palmítico (C16) y esteárico (C18). Finalmente, las fracciones F5 y F6 estuvieron compuestas por ácido caproico (C6), palmítico (C16) y linoleico (C18:2n6) en distintas proporciones.

De acuerdo con los resultados obtenidos, relativos a la composición de ácidos grasos en cada fracción de triacilglicéridos se pudo determinar cuáles de las fracciones

suponían un mayor interés en función de su composición en los diferentes ácidos grasos. Por ejemplo, la fracción F4 sería la mejor candidata para la producción de biodiésel, debido a que contiene una mayor proporción de ácidos grasos saturados, aunque, las fracciones F3, F5 y F6 también podrían ser utilizadas con este fin. La fracción F1, por su parte, junto con las fracciones F5 y F6, aunque estas en menor medida, parecen ser las mejores candidatas para la obtención de PUFA n-6, que son considerados ácidos grasos esenciales.

Cabe destacar la presencia en la fracción F2 de un elevado porcentaje de ácido oleico (C18:1n9), un ácido graso de enorme interés, ya que se ha demostrado que disminuye la producción de mediadores quimiotácticos de inflamación (Mesa et al., 2006) y además puede ser utilizado en la industria alimentaria como agente emulsionante y aditivo.

6. CONCLUSIONES

A continuación, se indican las conclusiones obtenidas en este Trabajo Fin de Master:

- 1 - En este trabajo, se evaluó la influencia del uso de frutos de destrío como alimento en el perfil lipídico de larvas de *Tenebrio molitor*, *Zophoba morio* y *Hermetia illucens*. El trabajo realizado permitió poner a punto una metodología de extracción del contenido lipídico para su caracterización mediante cromatografía de gases.
- 2 - A modo de conclusión, el rendimiento de MUFA de las larvas de *Tenebrio molitor* mejoró con el cambio de alimentación, lo que podría ser interesante para su utilización en la industria alimenticia.
- 3 - Las larvas de *Zophoba morio* no presentaron diferencias en el perfil lipídico con el cambio de la alimentación. Sin embargo, dado su perfil rico en ácidos grasos saturados y MUFA, son larvas que podrían ser utilizadas para la producción de biodiesel, como para la industria alimenticia.
- 4 - Las larvas de *Hermetia illucens* presentaron un perfil lipídico muy rico en ácidos grasos saturados, siendo éstas las mejores candidatas para la producción de biodiésel.
- 5 - Cabe destacar la presencia de PUFA n-3 en larvas de *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens* alimentadas con frutos de destrío, lo que sienta las bases para futuros estudios enfocados en mejorar el perfil lipídico de PUFA n-3 de estas larvas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Canakci, M., Van Gerpen, J. (2001). Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the ASAE*, 44(6), 1429.
- Chen X., Feng Y., Chen Z. (2009). Common edible insects and their utilization in China. *J. Entomol. Res.*, 39, 299–303
- Christie, W. W. (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in lipid methodology*, 2(69), 11.
- FAO (2013). *Edible insects: future prospects for food and feed security*. Roma, Italia: FAO Forestry paper; p. 171.
- Finke M.D. (2004). *Encyclopedia of Entomology*, 1st ed., Kluwer Academic Press: Dordrecht, The Netherlands.
- Guil-Guerrero, J. L., Ramos-Bueno, R. P., González-Fernández, M. J., Fabrikov, D., Sánchez-Muros, M. J., Barroso, F. G. (2018). Insects as food: fatty acid profiles, lipid classes, and sn-2 fatty acid distribution of Lepidoptera larvae. *European journal of lipid science and technology*, 120(6), 1700391.
- Hernández, A. L. (2014). Extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos presentes en las larvas y pupas del insecto comestible denominado “ticoco”.
- Investiga. TEC. (2009). Año 2, No. 4, ISSN: 1659-3383
- Landívar Valverde, M. D. (2012). Evaluación del método de digestión alcalina para la extracción de grasa de larvas de *rhyngophorus palmarum* l.
- Leung, D., Yang, D., Li, Z., Zhao, Z., Chen, J., & Zhu, L. (2012). Biodiesel from *Zophobas morio* larva oil: process optimization and FAME characterization. *Industrial & engineering chemistry research*, 51(2), 1036-1040.
- Manzano-Agugliaro, F., Sanchez-Muros, M. J., Barroso, F. G., Martínez-Sánchez, A., Rojo, S., Pérez-Bañón, C. (2012). Insects for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 3744-3753.
- Mesa, M.D., Aguilera García, C.M., & Gil Hernández, A. (2006). Importancia de los lípidos en el tratamiento nutricional de las patologías de base inflamatoria. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 30-43.
- Mlcek, J., Rop, O., Borkovcova, M., & Bednarova, M. (2014). A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in Europe—a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(3), 147-157.
- Morales, A., González Castillo, O., Morán Silva, A., Ramírez Romero, M.A. Estudio de mercado para la elaboración de Omega 3 (DHA) a partir de microalgas.
- Newton, G. L., Booram, C. V., Barker, R. W., & Hale, O. M. (1977). Dried *Hermetia illucens* larvae meal as a supplement for swine. *Journal of Animal Science*, 44(3), 395-400.

- Ong, S. Y., Zainab-L, I., Pyary, S., Sudesh, K. (2018). A novel biological recovery approach for PHA employing selective digestion of bacterial biomass in animals. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(5), 2117-2127.
- Onofre, A., Marquez Beltran, C., Sepúlveda, L., Efraín, R., García Nogales, J., Noriega-Rodríguez, J. (2010). Esterificación Enzimática de los Ácidos Grasos Poliinsaturados Aislados del Aceite de Canola. *Investigación*, 5(2), 23-28.
- Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Martín, D., Muriel, E., Antequera, T. (2008). Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products. *Food chemistry*, 110(4), 1025-1029.
- Valdez Pantoja, C., Untiveros Bermúdez, G. (2010). Extracción y caracterización del aceite de las larvas del Tenebrio molitor. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 76(4), 407-414.
- Ramos-Bueno, R. P., González-Fernández, M. J., Sánchez-Muros-Lozano, M. J., García-Barroso, F., Guill-Guerrero, J. L. (2016). Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *European Food Research and Technology*, 242(9), 1471-1477.
- Ramos-Elorduy, J. (2008). Energy supplied by edible insects from Mexico and their nutritional and ecological importance. *Ecology of food and nutrition*, 47(3), 280-297.
- Ramos - Elorduy, J., Pino, J. M., & Correa, S. C. (1998). Insectos comestibles del Estado de México y determinación de su valor nutritivo. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología*, 69(1), 65-104.
- Sanhueza, J., Nieto, S., Valenzuela, A. (2004). Acido docosahexaenoico (DHA), desarrollo cerebral, memoria y aprendizaje: la importancia de la suplementación perinatal. *Revista chilena de nutrición*, 31(2), 84-92.
- Santurino, C., García-Serrano, A., Molina García, J., Sierra Fernández, P., Castro-Gómez, M. P. (2016). Los insectos como complemento nutricional de la dieta: fuente de lípidos potencialmente bioactivos. *ANS. Alimentación, nutrición y salud*, 23(2), 50-56.
- Schulte, R. (1996). El manejo de *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae) en climas tropicales húmedos. *Folia amazónica*, 8(2), 47-75.
- Segura Cazorla, M. (2015). Composición bromatológica *Hermetia illucens*.
- Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Newton, L. G. (1998). Use of soldier fly larvae to reduce manure, control house flies, and produce high quality feedstuff. In: J. P. Blake and P. H. Patterson (Ed.). *Proc. 1998 National Poultry Waste Management Symp.* Springdale, AK. p. 405.
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., Jedras, M. (2013). Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food.
- Souza, P. C. D. (2011). Ciclo de Vida das Larvas de *Tenebrio Molitor* (coleoptera), Sob Diferentes Dietas. XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA-CNPq/FAPEAM.
- St-Hilaire, S., Sheppard, C., Tomberlin, J. K., Irving, S., Newton, L., McGuire, M. A., Sealey, W. (2007). Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the world aquaculture society*, 38(1), 59-67.

Taborda, B., Telles, I. R., Pareja, L., Niell, S., Jesús, F., López, A. (2019). Comparación de diferentes métodos de extracción para la determinación del perfil lipídico en semillas de quinoa. *Innotec*, (17 ene-jun), 78-87.

Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., van Valenberg, H. J., van Boekel, M. A., Lakemond, C. M. (2014). Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, 62, 1087-1094.

Valenzuela, A., Sanhueza, J. (2009). Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Revista chilena de nutrición*, 36(3), 246-257.

Venegas-Venegas, E., Guil-Guerrero, J. L., Rincón-Cervera, M. Á., Ramos-Bueno, R. P. (2014). Tridocosahexaenoyl glycerol purification from docosahexaenoic acid single cell oil (DHASCO). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(3), 266-271.

Yang, L. F., Siriamornpun, S., Li, D. U. O. (2006). Polyunsaturated fatty acid content of edible insects in Thailand. *Journal of Food Lipids*, 13(3), 277-285.

Zheng, L., Hou, Y., Li, W., Yang, S., Li, Q., & Yu, Z. (2013). Exploring the potential of grease from yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*) as a novel biodiesel feedstock. *Applied energy*, 101, 618-621.