



**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER.**

**Impacto en la calidad microbiológica y fisicoquímica de  
harina de larva de *Tenebrio molitor* sometida a diferentes  
métodos de higienización.**

*Impact on the microbiological and physicochemical quality of  
*Tenebrio molitor* larvae flour subjected to different sanitization  
methods.*

**Autor:** D<sup>a</sup> Aitana Lirola Cano

**Tutoras:**

Macarena del Mar Jurado Rodríguez

Rebeca Pilar Ramos Bueno

**Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria**

Facultad de Ciencias Experimentales. UNIVERSIDAD DE ALMERÍA.

Curso Académico: 2021/2022

Almería, julio de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Después de muchos meses trabajando en este proyecto, llega a su fin, al igual que lo hace el Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria. Hace un año me encontraba trabajando en el invernadero con mi padre (cosa que me encanta), planteándole la idea de realizar el máster. Él, como hace con todas mis ideas, me apoyó. Es por ello, que quiero agradecerle en primer lugar todo su cariño, esfuerzo, paciencia y comprensión a él.

Este máster me ha abierto las puertas hacia un nuevo futuro, hacia un nuevo trabajo de lo que me apasiona, pero sobre todo ha hecho posible conocer a todas las personas con quién he tenido la oportunidad de compartir muchos momentos, tanto a nivel profesional, como a nivel personal. Gracias a todos mis compañeros con los que he compartido mis prácticas en el centro tecnológico Tecnova, ya que sin ellos no se hubiese hecho tan llevadero el enorme trabajo que ha supuesto la realización de este trabajo de fin de máster. Gracias por todas las risas que me habéis sacado, y por ayudarme en todo lo que os ha sido posible.

También agradecer a mi tutora de prácticas, Rebeca Ramos y a María José. Gracias por brindarme todos los instrumentos posibles para la realización de este proyecto, por ayudarme con cualquier imprevisto que surgía y por aconsejarme y guiarme en este camino.

Agradecer a mis amigas, por escuchar mis quejas, por saber aconsejarme, por no dejar que tire la toalla y por hacer que me despeje cada vez que lo necesito. En especial a Evelyn, que tanto desde la distancia, como una vez aquí conmigo me ha apoyado y ayudado en todo lo que le ha sido posible.

Gracias también a toda mi familia, mi tía, mi abuela y mi madre, en especial. Por ser mi vía de escape, y por confiar en mí de una manera incondicional.

También, quisiera agradecer de una manera especial, a mi tutora académica, Macarena Del Mar Jurado Rodríguez. Por estar pendiente del teléfono siempre que me ha surgido alguna duda, por sacar tiempo cada vez que lo he necesitado, y por involucrarse tanto en este proyecto y por calmarme cuando los nervios y las dudas venían a mí. Aprovecho la mención a Macarena, para agradecer a todo el departamento de microbiología de la Universidad de Almería, que también me han prestado “su reino” y me han ayudado mucho y tratado como si fuese una más. Así mismo, agradecer a todos los profesores a los que he tenido la suerte de cruzarme en esta etapa tan bonita y que recordaré siempre.



## Índice

<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1.</b> .....	<b>INTRODUCCIÓN</b>
.....	7
1.1.    Uso de insectos en la industria agroalimentaria	7
1.1.1.    Reglamento Europeo	7
1.1.2.    Características de producción	8
1.2.    Cría de <i>Tenebrio molitor</i> : Aplicaciones	11
1.2.1.    Descripción de la especie y su ciclo de vida	11
1.2.2.    Potencialidades de la harina de insecto	13
1.3.    Seguridad alimentaria en la harina de insectos	14
1.3.1.    Principales riesgos microbiológicos en la cría de insectos	14
1.3.2.    Técnicas de higienización	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b> .....	23
3.1.    Materiales de partida y equipos	23
3.2.    Medios de cultivo	24
3.3.    Diseño de los ensayos de cría de insectos: Fases experimentales	25
3.4.    Análisis microbiológico de las muestras	28
3.5.    Análisis Físico-Químico	33
3.5.1.    Análisis de lípidos	33
3.5.2.    Análisis de proteínas	34
3.6.    Análisis estadístico	35
<b>4.</b> .....	<b>RESULTADOS</b>
.....	35
4.1.    Producción de larva de <i>T. molitor</i> a pequeña escala:	35
4.1.1.    Evaluación de las larvas en función de la cantidad de sustrato empleada (1º ensayo)	35
4.1.    Evaluación de las larvas en función de la incidencia de luz (2º ensayo)	38
4.1.3.    Caracterización microbiológica de las larvas y de los residuos generados	39
4.3.    Producción de larva de <i>T. molitor</i> a mediana escala en función del tipo de alimentación empleada	41
4.3.1.    Análisis microbiológico en función de los distintos sustratos empleados	41

4.3.2. Análisis microbiológico en función de los distintos tratamientos de higienización empleados	46
4.4. Caracterización nutricional de la harina elaborada a partir de larvas seleccionadas de <i>T. molitor</i> : Contenido en lípidos y proteínas	52
<b>5. .... CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>6. .... BIBLIOGRAFIA</b>	<b>55</b>

## RESUMEN

*Tenebrio molitor* (*T. molitor*) es una especie reconocida para alimentación humana, ya que permite conseguir alimentos con alto potencial nutricional, ricos en proteínas y lípidos principalmente. Sin embargo, al igual que cualquier otro producto de alimentación humana, es de vital importancia conocer y evaluar las posibles contaminaciones químicas, físicas y/o biológicas. Este último tipo de contaminación supone una de las principales vías de entrada de microorganismos al ser humano y, entre ellos, destacan los potenciales patógenos relacionados con enfermedades importantes. En general, en la industria alimentaria se utilizan diferentes tecnologías para eliminar estos microorganismos, entre las que destacan los procedimientos químicos y/o térmicos por su bajo coste y facilidad de implementación.

En este contexto, se planteó la necesidad de optimizar tanto los procesos de cría como las técnicas de higienización más adecuadas para este tipo de producto alimenticio, con objeto de aportar al consumidor un producto sostenible, rico en nutrientes y libre de microorganismos peligrosos. Para llevar a cabo este objetivo, se evaluaron diferentes tipos de alimentación y condiciones de cría e higienización (radiación UV y escaldado) de las larvas de *T. molitor*, así como las harinas elaboradas a partir de las larvas seleccionadas empleando indicadores físico-químicos, basados en el peso y número de muertes contabilizado en cada bloque experimental, así como en el contenido lipídico y proteico, para evaluar la evolución de los insectos y la calidad de los productos finales; y microbiológicos, basados en recuentos de grupo de interés alimentario como microbiota aerobia mesófila, incluyendo grupos bacterianos y fúngicos, enterobacterias, destacando la presencia de *Escherichia coli*, y representantes patógenos de interés alimentario como *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, para evaluar la seguridad alimentaria y las condiciones de saneamiento durante el procesado.

Tras los ensayos realizados, se determinó la idoneidad de utilizar la menor cantidad de alimento base en la dieta de los insectos (0,15 g de salvado de trigo/larva/día) y condiciones de oscuridad durante el desarrollo de las larvas, además, la incorporación de subproductos procedentes de la industria agroalimentaria como aditivos en la dieta de *T. molitor* mejoró la calidad nutricional y microbiológica de los sustratos empleados en la cría de insectos. Respecto a las técnicas de higienización, el escaldado se presenta como una técnica adecuada para implementar en la producción de productos alimenticios basados en el gusano de la harina. En definitiva, la cría de *T. molitor* se postula como un sistema de producción de interés para el futuro próximo que puede implementarse de un modo sostenible tanto desde el punto de vista ambiental como económico.

**Palabras Clave:** *Tenebrio molitor*, técnicas de higienización, contaminación microbiológica

## ABSTRACT

*Tenebrio molitor* (*T. molitor*) is a recognized species for human food, since it allows to obtain food with high nutritional potential, mainly rich in proteins and lipids. However, like any other human food product, it is of vital importance to know and evaluate possible chemical, physical and/or biological contamination. The latter type of contamination is one of the main routes of entry of microorganisms to humans and, among them, the potential pathogens related to major diseases stand out. In general, different technologies are used in the food industry to eliminate these microorganisms, among which chemical and/or thermal procedures stand out due to their low cost and ease of implementation.

In this context, the need to optimize both the rearing processes and the most appropriate sanitization technique for this type of food product was raised, in order to provide the consumer with a sustainable product, rich in nutrients and free of dangerous microorganisms. To carry out this objective, different types of feed and rearing and sanitizing conditions (UV radiation and scalding) of *T. molitor* larvae, as well as the meals made from the selected larvae, using physical-chemical indicators, based on the weight and number of deaths counted in each experimental block, as well as the lipid and protein content, to evaluate the evolution of the insects and the quality of the final products; and microbiological, based on counts of groups of food interest such as mesophilic aerobic microbiota, including bacterial and fungal groups, enterobacteria, highlighting the presence of *Escherichia coli*, and representatives of pathogens of food interest such as *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*, to evaluate food safety and sanitation conditions during processing.

After the tests carried out, it was determined the suitability of using the lowest amount of base food in the diet of insects (0.15 g of wheat bran/larvae/day) and dark conditions during larval development, in addition, the incorporation of by-products from the agri-food industry as additives in the diet of *T. molitor* improved the nutritional and microbiological quality of the substrates used in insect rearing. Regarding sanitization techniques, scalding is presented as a suitable technique to implement in the production of mealworm-based food products. In short, the rearing of *T. molitor* is postulated as a production system of interest for the near future that can be implemented in an environmentally and economically sustainable way.

**Key Words:** *Tenebrio molitor*, hygienization techniques, microbiological contamination

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el ser humano ha practicado la alimentación a base de insectos (entomofagia), siendo más extendida en zonas de Asia, África y América Latina, donde la ingesta de insectos complementa la dieta de aproximadamente 2.000 millones de personas. A nivel mundial se consumen más de 1.900 especies de insectos comestibles y, según estudios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), entre los insectos más consumidos destacan: escarabajos (31%), orugas (18%), hormigas, abejas y avispas (14%), saltamontes, langostas y grillos (13%), cochinillas y chinches (10%), termitas (3%), libélulas (3%), moscas (2%) y otros (5%) (FAO, 2013). Sin embargo, a pesar de esta tendencia al alza, la seguridad alimentaria es hoy en día un desafío global que tiene como objetivo satisfacer a la población con alimentos saludables y seguros. En este contexto, el consumo de insectos resulta ser una alternativa para cumplir con la demanda creciente de alimentos en un futuro (Patel et al., 2019). Además, la cría de insectos es una opción de inversión de baja tecnología y bajo capital que ofrece entradas económicas y oportunidades en los diferentes sectores agroalimentarios (González et al., 2018).

### 1.1. Uso de insectos en la industria agroalimentaria

#### 1.1.1. Reglamento Europeo

La relación de los insectos que actualmente pueden introducirse en el mercado europeo por estar acogidos a las medidas transitorias establecidas en el Reglamento (UE) 2015/2283 relativo a los Nuevos Alimentos (Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470), es la siguiente:

- *Acheta domesticus* (Orthoptera)
- *Tenebrio molitor* (Coleoptera)
- *Locusta migratoria* (Orthoptera)
- *Gryllobates sigillatus* (Orthoptera)
- *Schistocerca gregaria* (Orthoptera)
- *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera)
- *Apis mellifera* (Hymenoptera)
- *Hermetia illucens* (Diptera)

A pesar de la diversidad de insectos disponibles comercialmente, sólo una fracción de ellos son "fáciles de usar" para su cría como alimento o pienso. Debido a ciertas características del ciclo vital de los insectos, como la dependencia de la temperatura y del fotoperiodo, o a señales del entorno y/o huésped para terminar los ciclos, los insectos más fáciles de criar son los relativamente pequeños, ya que permiten obtener más de una generación al año (multivoltinos), se alimentan de plantas y no presentan requisitos



ambientales inusuales. En general, las especies que infectan cultivos comunes, plantas paisajísticas o productos almacenados son especialmente adecuadas para la cría artificial como, por ejemplo, los escarabajos (Coleópteros), las moscas (Dípteros) y los saltamontes (Orthoptera) (Sanguinetti, 2021).

A continuación, se resume en la Tabla 1 cómo ha variado la legislación en la Unión Europea con respecto al uso de insectos comestibles:

**Tabla 1.** Evolución de la normativa sobre insectos comestibles en la UE (Grau et al., 2017).

---

<b>2001</b>	La legislación de la UE prohíbe el uso de insectos muertos o procesados en los piensos, pero la alimentación con insectos vivos está permitida (CE 999/2001).
<b>2002</b>	No existen reglamentos específicos sobre los insectos comestibles para el consumo humano, por lo que la producción de insectos comestibles debe seguir los requisitos de la legislación alimentaria general (CE 1/8/2002).
<b>2003</b>	La legislación prohíbe el uso de antibióticos como promotores del crecimiento (CE 1831/2003).
<b>2004- 2007</b>	La producción de insectos comestibles debe cumplir los requisitos generales de higiene y producción (CE 852-854/2004).
<b>2013</b>	El uso de harina de insectos en las dietas de acuicultura se permite en la UE a partir de enero de 2018 (CE 56/2013).
<b>2014</b>	Algunos países de la UE toleran la comercialización de insectos enteros para el consumo humano. La agencia Federal Belga para la Seguridad de la Cadena Alimentaria (FASFC) aconseja a los productores en abril de 2014 (SIIC 9160) que se remitan a los criterios de higiene para productos comparables (CE 1441/2007).
<b>2015</b>	Los insectos y sus partes se consideran nuevos alimentos en la UE a partir del 1 de enero de 2018 (CE 2015/2283). Introduciendo así un proceso de autorización más eficiente para los productos de insectos.

---

Relativo al producto final generado tras la cría de insectos, en Europa el empleo de harina elaborada a base de estos organismos está actualmente autorizado en alimentos de uso acuícola. Además, se concibe su permiso para la nutrición de aves y cerdos (Byrne, 2021), así como la introducción de las larvas en la cadena alimentaria a un mayor nivel. Sin embargo, la información sobre el impacto de los patógenos alimentarios presentes en las larvas durante el procesamiento de cría es aún insuficiente.

### **1.1.2. Características de producción**

La cría de insectos presenta diversas ventajas, entre las que destaca la baja demanda de agua que supone la producción de estos organismos. Esto es así debido a que los insectos suelen extraer el agua de los alimentos suministrados (Miglietta et al., 2015), lo cual es ventajoso frente a otras actividades productivas como, por ejemplo, la ganadería, que es uno de los sistemas que más agua dulce consume a nivel mundial (Turner et al., 2004). Además, cabe mencionar que la cría de insectos comestibles es una estrategia alternativa

para la producción de alimentos y piensos ricos en proteínas con una baja huella ecológica (Grau et al., 2017). Esto último es debido a que la producción industrial de proteínas derivadas de insectos es más rentable y eficiente energéticamente que la ganadería o la acuicultura. En este sentido, cabe destacar que el gusano de la harina, *T. molitor*, es una de las especies más importantes desde el punto de vista económico para la conversión a gran escala de biomasa vegetal en proteínas. Precisamente a este respecto, uno de los aspectos de interés durante la cría de insectos, en general, es su alta capacidad para la transformación de la materia orgánica en biomasa de elevado valor nutricional, como proteínas o calorías. Es decir, presentan una alta tasa de conversión alimenticia (Van Huis, 2013; Alves et al., 2016; Alexander et al., 2017). Esto es debido, en gran parte, a su naturaleza, ya que son poiquilotermos, es decir, presentan un metabolismo y desarrollo sincrónico con la temperatura que hay en el ambiente, lo que les hace no gastar energía (Van Huis, 2013; Alves et al., 2016). Esta relación de conversión alimenticia (FCR, por sus siglas en inglés “Food Conversion Ratio”) en larvas frescas se calcula de la siguiente manera:

$$FCR = \frac{\text{peso del alimento ingerido}}{\text{incremento peso vivo de las larvas}}$$

En la siguiente imagen (Figura 1) se muestran algunos ejemplos de FCR de distintos animales. Estos datos corroboran que *T. molitor* (gusano de la harina) es una especie interesante como bioconvertora, que podría incluirse en sistemas de economía circular y llegar a ser una alternativa a la ganadería convencional.



**Figura 1.** Relación de conversión alimenticia (FCR) de distintos organismos, expresada en gramos (g) (Gahukar, 2016).

Otra característica favorable de la cría de insectos es la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero habitualmente asociadas a la producción animal, especialmente a los sistemas intensivos (Ooninx et al., 2010). Además, a nivel industrial, o con el fin de proyectar una granja de insectos, es interesante destacar que, debido al tamaño de estos organismos, existe la posibilidad de concentrar un elevado número de individuos en un espacio reducido, ya sea en zonas urbanas, peri-urbanas o rurales (Ooninx y de Boer, 2012). En general, la mayoría de los insectos pueden cultivarse fácilmente en pequeños contenedores de plástico ventilados y controlados, a temperatura ambiente, hasta 30 °C, y humedad relativa hasta el 70%. Además, se caracterizan por no

requerir luz solar durante algunas etapas de su ciclo biológico. A esto se le puede añadir que la rentabilidad del cultivo de insectos comestibles también se ve favorecida por los cortos ciclos de vida de estos animales, pudiendo generar varios ciclos de producción al año (Gahukar, 2011).

Por otro lado, la versatilidad de su dieta permite que una gran cantidad de insectos comestibles puedan ser alimentados con residuos orgánicos (Oonicx et al., 2012), reduciendo así los costes de su producción. La introducción en la dieta destinada a los insectos de productos de desecho de la agricultura está en consonancia con el concepto de bioeconomía o economía circular (Tabla 2), lo cual quiere decir que existe la posibilidad de aprovechar los subproductos generados en otros procesos agroalimentarios con el fin de obtener productos de alto valor añadido.

**Tabla 2.** Principios clave de la economía circular y comparación con la entomofagia. (Nava et al., 2020).

Principios clave de la economía circular	Entomofagia
Mínimos insumos naturales y recursos	Disminución del agua y gases de efecto invernadero que el ganado convencional
Compartir energía y recursos renovables y reciclables	Los insectos se alimentan de los desechos de comida humana, residuos y estiércol o incluso vegetales, de esta manera convierten todos los desechos en una biomasa de proteínas de alta calidad
Disminución de emisiones	En la cría de insectos los agricultores recuperan los nutrientes de los desechos y pueden devolverlos a la cadena alimentaria, sin dejar rastro de contaminación durante el proceso.
Reducción de material, mermas de recursos y desperdicio	No necesitan grandes espacios de terreno como pastizales para rebaños de ganado
Conservar la aptitud de los componentes y la calidad de los materiales económicos	Se proponen la estrategia de promover la economía circular mediante el reciclaje de desechos orgánicos de alimentos.

La implantación de sistemas productivos basados en economía circular es la vía para sostener la biodiversidad de la tierra y optimizar los recursos, así como para conseguir disminuir los residuos y la contaminación generados por la actividad humana. En este sentido, algunos autores incluso atribuyen a determinados insectos, como *T. molitor*, la capacidad de alimentarse a partir de residuos más complejos, de origen xenobiótico, como el poliestireno, ayudando así a disminuir los problemas de gestión y contaminación de residuos plásticos (Rodríguez-Carreón et al., 2021). En definitiva, el aprovechamiento de residuos para la cría de insectos es una línea de investigación de gran interés para las empresas agroalimentarias, ya que posibilita la revalorización de los subproductos generados en dichas industrias (Tabla 3).

A continuación, en la Tabla 3 se resumen las principales condiciones para la cría de insectos.

**Tabla 3.** Principales aspectos a tener en cuenta para la cría de insectos (Melgar-Lalanne et al., 2019; Araújo et al., 2019).

ESPECIE	CONDICIONES AMBIENTALES	CRIADEROS	ALIMENTACIÓN	SUSTRATO INICIAL
<i>Acheta domesticus</i>	T <sup>a</sup> = 20-35 °C Humedad= 50-80%	Jaulas: cartón/plástico/ madera 1200x800x800 mm 75 L capacidad = grillos adultos	Omnívora Granular	Vermiculita
<i>Hermetia ilucens</i>	T <sup>a</sup> = 25-30 °C Humedad= 70-80%	Cajas de plástico 600x400x240m m	Líquido y/o en forma de pasta. Contenido de agua 80-90%	Salvado de trigo
<i>Tenebrio molitor</i>	T <sup>a</sup> = 25-27 °C Humedad= 60-75%	Cajas de plástico 600x400x120 mm	Mezcla de ingredientes basado en frutas y hortalizas	Harina de trigo u otros cereales
<i>Zophobas morio</i>	T <sup>a</sup> = 24-28 °C Humedad= 60-75%	Cajas de plástico y/o vidrio 600x400x120m m	Seca u húmeda. 80% harina de maíz 20% granulado de trigo	Aserrín mezclado con polvo de madera

## 1.2. Cría de *Tenebrio molitor*: Aplicaciones

Tal como se ha descrito anteriormente, los insectos comestibles podrían ser una alternativa viable por considerarse una fuente de proteínas, omegas y minerales y, con especial relevancia, el gusano de la harina: *T. molitor*. Por ello, es importante que el proceso de cría y cosecha de *T. molitor* sea diseñado desde una perspectiva de máximo aprovechamiento de todos los recursos involucrados, reduciendo la producción de residuos, minimizando las emisiones de gases de efecto invernadero y valorizando todos los subproductos derivados del proceso.

### 1.2.1. Descripción de la especie y su ciclo de vida

*T. molitor* es un insecto del orden Coleoptera, de la familia Tenebrionidae y que presenta un desarrollo holometábolo (Mondragón, 2015). En el estado adulto se caracteriza por tener una tonalidad castaño oscuro, de aproximadamente 18 mm de largo y 4 mm de ancho. Se trata de uno de los insectos más importantes que ataca los granos almacenados

(Reyes y Melendez, 2013). En las Figuras 2 y 3 se resumen el ciclo de vida y la metamorfosis de esta especie.

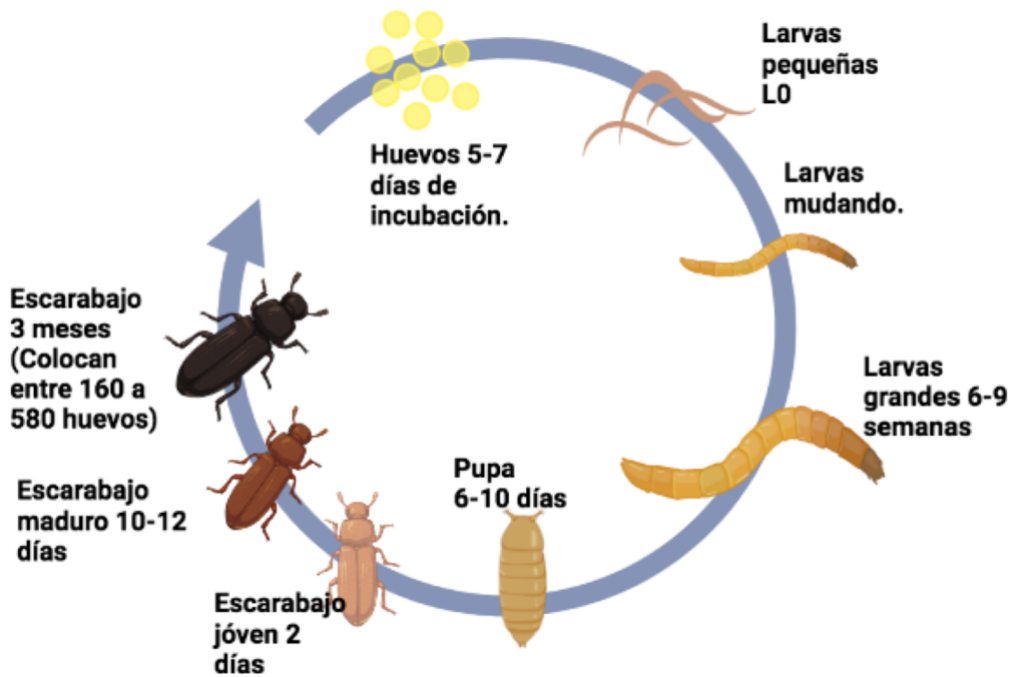


Figura 2. Ciclo de vida de *T. molitor* (Fuente: elaboración propia).

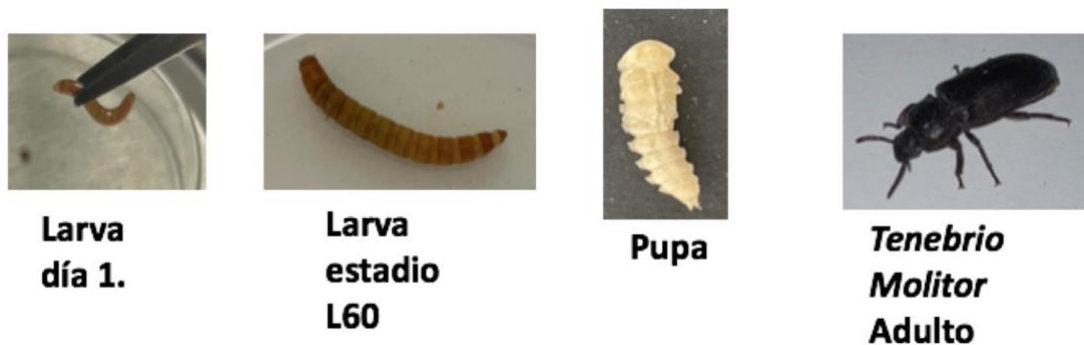


Figura 3. Fases de la metamorfosis de *T. molitor*: larva, pupa y adulto. (Fuente: elaboración propia).

Aunque los tiempos de las diferentes fases pueden cambiar de acuerdo a las condiciones de temperatura y humedad, de forma general, la etapa de huevo comprende 10 días de incubación, mientras que la fase larval constituye un total de 2 a 3 meses, creciendo hasta la madurez y cambiando o mudando de piel entre 9 y 18 veces. Las larvas que eclosionan se alimentan del sustrato y se mueven de manera libre (Meléndez-Guerrero, 2001). Finalmente, pasan al estado de pupa, el cual transcurre en 20 días y posteriormente la pupa se transforma en escarabajo joven, con una tonalidad marfil que pasados 2-3 días cambia a color negro-marrón. En esta fase pasa en total un periodo de vida de 2 a 3 meses (Meléndez-Guerrero, 2001).

### 1.2.2. Potencialidades de la harina de insecto

El incremento constante de la población unido a las tendencias alimentarias actuales está obligando al sector agroalimentario a incrementar la producción de alimentos y piensos. Sin embargo, esta acción conlleva una serie de consecuencias negativas como la escasez de tierra para el cultivo, el gasto de recursos hídricos, la intensificación de actividades como la pesca y la ganadería, la pérdida de recursos naturales y de biodiversidad, así como de nutrientes y energías no renovables (Huis, 2013). Para solventar estos problemas se requiere la mejora de la eficiencia y rentabilidad de los sistemas de producción de alimentos, asegurando un efecto mínimo sobre el medio ambiente (Berg et al., 2017). Por lo tanto, es necesario mejorar la utilización de recursos limitados, como la tierra y el agua, e investigar extensamente los sistemas de producción sostenibles para contrarrestar los efectos adversos del cambio climático, y así proporcionar y sostener la disponibilidad de alimentos a nivel global (Dar y Gowda, 2013).

En este sentido, la EPA (*European Public Affairs*) pronostica que, la incorporación de los insectos en alimentación animal, sólo en Europa, podría reducir en más de un 80% la dependencia de fuentes de proteína, tales como la soja y la harina de pescado. Los insectos son una fuente potencial para la producción convencional de proteínas, ya sea para consumo humano directo o indirectamente a través de nuevos alimentos elaborados a partir de proteínas de insectos, así como una fuente de proteína en la mezcla de materias primas para piensos (Huis, 2013; Halloran et al., 2014). Además del alto contenido en proteínas (30-80%), los alimentos a base de insectos aportan un elevado porcentaje de grasas (14-50%) y algunos minerales (Aniebo et al., 2010). Otras de las características nutricionales de los insectos a destacar es la calidad óptima de sus aminoácidos, así como la cantidad de estos que son esenciales. Los principales aminoácidos que contienen son los ácidos glutámico y aspártico, fenilalanina y alanina (Avendaño et al., 2020). Otros valores de interés en estos alimentos son su contenido en humedad (58,02%), fibra cruda (4,28), calcio (57,37 ppm) y fósforo (0,27%) (Reyes y Meléndez, 2013).

A continuación (Tabla 4), se exponen las características de *T. molitor*, en estado larvario, en comparación con la composición de algunas de las harinas más utilizadas en la industria de la alimentación de animales (harina de soja y de pescado).

**Tabla 4.** Composición porcentual de *T. molitor* comparado con otras fuentes proteicas habituales en alimentación animal (FEDNA, 2010; Makkar et al, 2014).

Harinas	Cenizas	Fibra	Proteína Bruta	Lisina total	Metionina total	Lípidos
<i>T. molitor</i> (larva)	3,1	6,5	52,8	2,86	0,79	36,1
Soja	7,0	5,4	53,4	3,27	0,76	2,2
Pescado	16,3	1,1	71,8	5,31	1,94	10,1

La proteína de los insectos tiene una gran solubilidad en un amplio rango de pH y una alta capacidad de retención de agua lo que favorece la formación de emulsiones y espumas estables, facilitando su uso en la industria alimentaria como materia prima para elaborar alimentos (Bußler et al., 2015). En diferentes estudios se ha visto que la introducción de *T. molitor* en las dietas de animales a través de las harinas, como por ejemplo en granjas de pollos, puede ser utilizada sin efecto negativo. No se han observado rechazos debido a la textura o palatabilidad. Tampoco se han observado efectos adversos en el rendimiento del pollo de engorde (Ramos-Elorduy et al., 2002). Cabe destacar, además, que las harinas de insectos contienen más hierro y zinc que las procedentes de productos cárnicos (Zielinska et al., 2015; Payne et al., 2016), lo que hace que el interés por estos productos aumente considerablemente, siendo una buena herramienta para combatir potenciales deficiencias de éstos. Adicionalmente, *T. molitor* abarca compuestos bioactivos como compuestos fenólicos, péptidos y ácidos grasos con función cosmética y farmacéutica evidente. Estos compuestos podrían ser usados como antioxidantes y blanqueadores (Kim et al., 2018).

A continuación, se muestra el perfil lipídico de *T. molitor* (Tabla 5) y su composición mineral (Tabla 6).

**Tabla 5.** Contenido de los principales ácidos grasos de *T. molitor* (% sobre materia seca) (Makkar et al., 2014; Zielinska et al., 2015).

	<b>C14:0</b>	<b>C16:0</b>	<b>C16:1</b>	<b>C18:0</b>	<b>C18:1</b>	<b>C18:2</b>	<b>C18:3</b>
<i>T. molitor</i>	4,0	21,1	4,0	2,7	37,7	27,4	1,3

**Tabla 6.** Contenido de los principales minerales de *T. molitor* (g/kg de materia seca) (Makkar et al., 2014).

	<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Mg</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
<i>T. molitor</i>	2,7	7,8	2,3	0,009	0,057	0,016	0,116

En cuanto a la alimentación humana, la harina de insectos presenta distintas ventajas, como la forma en la que el hierro está presente en los insectos, especialmente en lo que se refiere a la facilidad para digerir este elemento en comparación con el hierro presente en plantas (Dobermann et al., 2017). Algunos estudios avalan también que este alimento puede mejorar la salud gastrointestinal de los consumidores, aumentando la función inmunitaria, reduciendo el riesgo de infección bacteriana e incluso disminuyendo la inflamación crónica (Nowakowski et al., 2022).

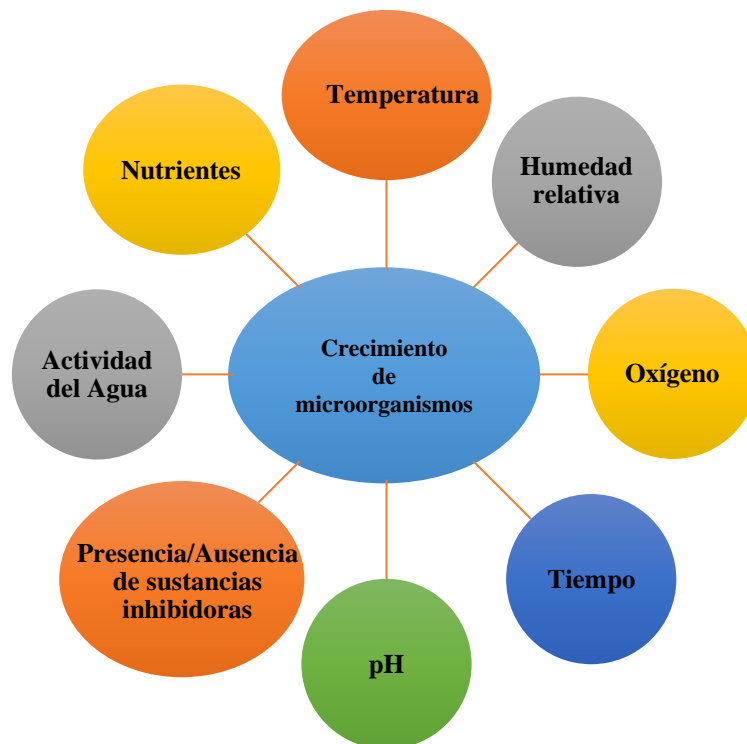
### 1.3. Seguridad alimentaria en la harina de insectos

#### 1.3.1. Principales riesgos microbiológicos en la cría de insectos

Uno de los principales riesgos a considerar de cara a la cría y el consumo de insectos es el de la contaminación microbiana. El perfil microbiológico de las larvas de *T. molitor* se

ha investigado utilizando diferentes métodos dependientes e independientes de cultivo, de hecho, algunos estudios han revelado la presencia de un elevado número de bacterias no sólo en larvas frescas, sino también en aquellas ya liofilizadas (hasta 8 log UFC/g), lo cual es lógico teniendo en cuenta que estos insectos comen y defecan en el mismo entorno (Caparrós-Megido et al., 2014). Por ello, es crucial realizar una correcta limpieza e higiene del entorno donde se encuentran las larvas.

En la Figura 4 se resumen los distintos parámetros que favorecen la proliferación de los microorganismos.



**Figura 4.** Factores que determinan el crecimiento de los microorganismos (García-Hurtado, 2012).

En el control de la proliferación microbiana de los alimentos influyen tanto parámetros intrínsecos, es decir, los que se pueden encontrar en el propio sustrato y se asocian a lo que utilizan los microorganismos como nutrientes, como extrínsecos, que son los factores ambientales que afectan el crecimiento de dichos microorganismos. Si el alimento en cuestión es rico en nutrientes, esto lo hará ideal para la proliferación microbiana. El pH también influye en el crecimiento de microorganismos. De hecho, la mayoría de las bacterias se desarrollan a valores de pH entre 4,5-9, situándose el óptimo de un número importante de bacterias entre 6,5 y 7,5, mientras que los hongos mohos y levaduras pueden crecer en un rango de pH más amplio, entre 2-11, con un amplio número de microbiota fúngica capaz de crecer a valores de pH de entre 4-6 (Adams y Moss, 2008). Por esta razón, algunos métodos de conservación se establecen en base a la disminución de los valores de pH (por ejemplo, favoreciendo las fermentaciones o mediante la adición de ácidos orgánicos). También influye el oxígeno, ya que de la presencia o ausencia de



este elemento dependerá el crecimiento de microorganismos aerobios o anaerobios, respectivamente. Para gestionar este parámetro, principalmente se debe controlar la atmósfera que rodea al alimento. En base al control de este factor surgen los métodos de conservación de envasado al vacío. Así mismo, influye el grado de disponibilidad de agua que tenga el alimento, lo cual condiciona el crecimiento de los microorganismos (Castro-Ríos, 2011). Finalmente, la temperatura es uno de los parámetros más importantes, ya que permite controlar la proliferación de los microorganismos, en general, según su óptimo de crecimiento, siendo especialmente importante desde el punto de vista de la supresión de especies patógenas (Hérrnandez-Montoya, 2019).

Desde un punto de vista legislativo, los grupos microbianos de mayor interés respecto a la seguridad alimentaria son los siguientes (Reglamento (CE) n° 2073/2005):

#### ❖ *Enterobacterias*

La familia *Enterobacteriaceae* resulta ser el grupo de mayor extensión y diversidad de bacilos gramnegativos con trascendencia clínica, ya que producen diversas enfermedades al ser humano. Son microorganismos ubicuos que se hallan en suelo, agua y vegetación y también forman parte de la microbiota intestinal de muchos animales, incluidas las personas. Son microorganismos anaerobios facultativos. Fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa positivos y oxidasa negativos (Guerrero et al., 2014). Dentro de este grupo se encuentran dos bacterias importantes: *Escherichia coli* y *Salmonella*.

##### ▪ *Escherichia coli*

*E. coli* se encuentra entre los patógenos transferidos por alimentos más relevantes y reportados con mayor frecuencia. En seres humanos, puede ocasionar diarrea severa, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Müller et al., 2021). La mayoría son fermentadores de lactosa y tienen la capacidad de generar indol a partir de triptófano. Existen bastantes infecciones relacionadas con estas bacterias, fundamentalmente extraintestinales y entéricas (Puerta-García y Materos-Rodríguez, 2010).

##### ▪ *Salmonella*

Las especies de *Salmonella* spp. son los miembros más complejos de la familia Enterobacteriaceae, con aproximadamente 2.400 serotipos descritos hasta la fecha. Actualmente, el género contiene dos especies de interés en cuestiones de seguridad alimentaria: *S. enterica* y *S. bongori* (Vásquez et al., 2007). Las bacterias de este género no son formadoras de esporas, son móviles, anaerobias facultativas, no fermentadoras de lactosa (la gran mayoría) y oxidasa negativas. Este género, en general, contiene múltiples patógenos para humanos y para animales, se adquieren por vía oral, causando enteritis, infección sistémica y fiebre entérica, y se asocian con la ingesta de alimentos mal preparados o manipulados inadecuadamente (Rodríguez y Prado, 2006; Rincón et al., 2011).

### ❖ *Listeria monocytogenes*

Se trata de un microorganismo con gran capacidad de resistencia y ubicuidad, lo que le permite integrarse con simplicidad a la cadena alimenticia (Torres et al., 2004). Se ha asociado esta bacteria con infecciones invasivas. Se estima que el hábitat primario de *L. monocytogenes* es el suelo y los vegetales en descomposición (McCarthy, 1990). Este microorganismo muestra supervivencia a distintas técnicas de procesado y conservación de alimentos, ya que es halotolerante, psicrofílico y resiste valores de pH relativamente bajos (Lou, 1999).

### ❖ Hongos y levaduras

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas entre los que encontramos mohos, levaduras y organismos productores de setas. Se clasifican en el reino fungi, son heterótrofos y crecen a valores de pH inferiores a las bacterias. Algunos hongos causan gran cantidad de enfermedades, por ejemplo, los mohos productores de sustancias tóxicas conocidas como micotoxinas (Robledo-Marengo et al., 2012) o determinadas levaduras patógenas de personas y otros animales.

### ❖ Formadores de esporas

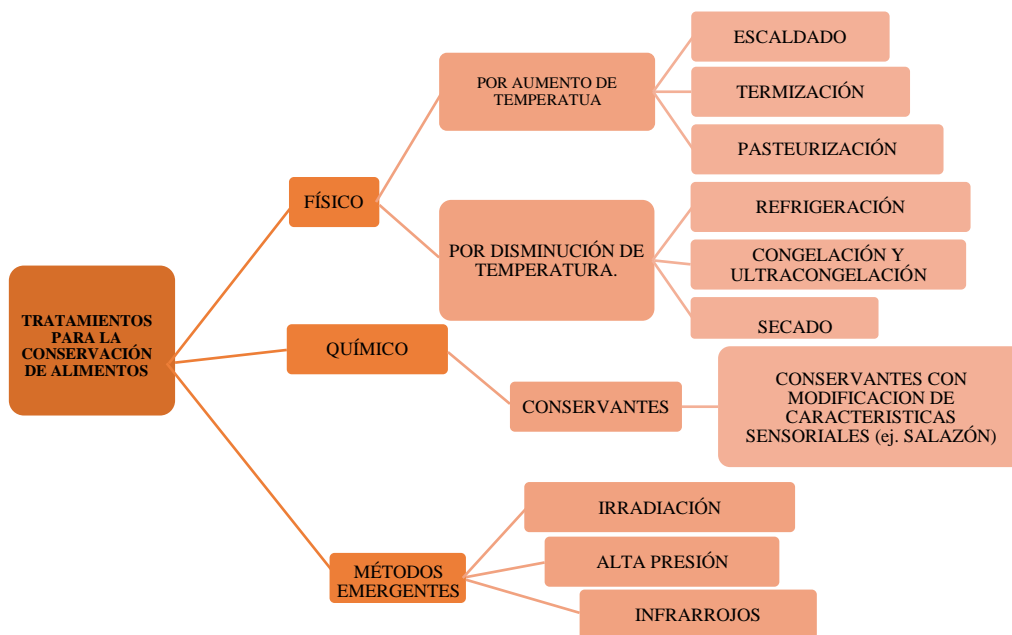
Entre las bacterias que sobreviven a altas temperaturas se encuentran aquellas cuyo ciclo de vida incluye la producción de endosporas, por ejemplo, los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. Las esporas son estructuras que resisten temperaturas superiores a 100 °C y durante periodos de tiempo de hasta 20 minutos, sin ser destruidas (Huesca-Espitia et al., 2014). Algunas especies producen toxinas que pueden o no resistir el tratamiento térmico, este es el caso de la bacteria *C. botulinum* que produce toxinas que vuelven tóxicos a los alimentos, generando la enfermedad denominada botulismo (Westhoff et al., 2013). Por su parte, *B. subtilis* es una especie de bacteria mesófila y termotolerante. Su importancia en la microbiología de los alimentos radica en que altera alimentos vegetales enlatados, pan, lácteos y pastas, mientras que las especies pertenecientes al género *Clostridium*, son anaerobias o microaerofílicas, pudiendo, además, actuar en rangos mesófilos o termófilos de temperatura (Adams y Moss, 2000; Frazier y Westhoff, 2003).

#### **1.3.2. Técnicas de higienización**

La protección que se quiere brindar al consumidor por la gran dimensión y diversificación de la industria alimentaria es una de las principales prioridades de este sector. El consumidor presenta una serie de derechos, como son el consumo de productos inocuos, seguros y de calidad. Para conseguir dichos requisitos es importante tomar una serie de medidas higiénicas en todas las fases de la cadena de elaboración de un alimento, el cual puede ser susceptible de mostrar cambios no deseables.

La contaminación alimentaria puede ser de carácter físico, químico o biológico. Sin embargo, de todos los tipos de contaminación, la biológica es la que mayor significancia tiene, ya que es la principal causante de problemas de salud en relación con el consumo de alimentos (García-Hurtado, 2012). Convencionalmente, los insectos comestibles se

cocinan en agua salada, se secan en grandes superficies o se asan ligeramente antes del consumo (Viesca y Romero, 2009). No obstante, la industria actual de procesamiento de insectos ha comenzado a ofrecer productos secos utilizando otras técnicas como la liofilización (Grabowski y Klein, 2017). Aun así, las autoridades sanitarias europeas aconsejan calentarlos mediante un proceso de escaldado antes del consumo, ya que se ha observado que los insectos están a menudo contaminados con potenciales patógenos tanto en su superficie exterior como en su tracto intestinal y las técnicas convencionales que se aplican parecen no ser totalmente efectivas contra los microorganismos que continúan contaminando en gran número el producto procesado (Klunder et al., 2014). En definitiva, es necesario buscar otras alternativas más eficaces para la eliminación de los microorganismos no deseados. (Figura 5)



**Figura 5.** Tratamientos para la conservación de alimentos (Castro Ríos et al., 2011).

A continuación, se describen con más detalle algunas de las técnicas de higienización y conservación que mejor se adaptan a los productos procedentes de la industria agroalimentaria:

- **Radiación ultravioleta (UV)**

Esta radiación destruye o desestabiliza el ADN de los microorganismos, inactivándolos y, en consecuencia, impidiendo su patogenicidad. La radiación UV es capaz de inactivar microorganismos a través del daño fotoquímico (Muñoz et al., 2016), una vez que es absorbida promueve la formación de enlaces entre nucleótidos adyacentes, creando dímeros (Cruz, 2020). La formación suficiente de dímeros dentro de un microbio impide que replique su ADN y ARN, inhibiendo su capacidad para proliferar en el agua o los alimentos (Cruz, 2020). Un parámetro a tener en cuenta cuando se usa radiación ultravioleta es la dosis que se va a aplicar. Esto es debido a que la relación que existe entre la dosis aplicada y el tiempo de exposición de la muestra a dicha radiación determina

la cantidad de radiación que los microorganismos recibirán (Gouvêa et al., 2014). La dosificación mínima universalmente aceptada para que una lámpara ultravioleta sea de uso germicida es de  $16.000 \mu\text{W s/cm}^3$ . Se ha demostrado que, con las radiaciones UV, son eliminados hasta el 99,99% de bacterias y virus. Por otro lado, la banda UVC, donde la longitud de onda se encuentra comprendida entre 200 a 320 nm, es la más apropiada para la eliminación de microorganismos (Gouvêa et al., 2014). Una ventaja de esta tecnología es que no opera con productos químicos ni reacciona con otros constituyentes del agua y, por lo tanto, no genera subproductos ni origina sabores u olores, además, es compatible con otros procesos de desinfección que proporcionan un efecto residual más permanente (Saucedo, 2017).

A continuación, se presentan algunas ventajas y desventajas de la radiación ultravioleta (Tabla 7).

**Tabla 7.** Ventajas y desventajas más destacadas del tratamiento con radiación ultravioleta (El Salous, 2021).

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Desactiva la mayoría de los virus, esporas, quistes y requiere un periodo de tiempo más corto en comparación con otros desinfectantes.	Algunos microorganismos no son eliminados mediante la luz UV, por su mecanismo de fotorreactivación.
Es la única alternativa de desinfección rentable que no crea/libera subproductos cancerígenos al medio ambiente.	Alternativa no tan económica a la desinfección con cloro.
No existe ningún efecto residual que pueda afectar al ser humano o cualquier otro organismo acuático.	Los sólidos suspendidos totales y turbidez presentes en el agua residual producen una disminución de eficacia en la desinfección UV.

- **Congelación**

Muchos microorganismos a temperaturas inferiores a  $0^\circ\text{C}$  no mueren, pero sí detienen su actividad, entrando en un estado de latencia. Es lo que se pretende aprovechar mediante la congelación. La congelación es una técnica de gran eficacia para la conservación. Se realiza aplicando temperaturas inferiores a los  $-20^\circ\text{C}$  en el alimento. De esta manera, se impide la multiplicación de microorganismos y la producción de reacciones químicas que alteren el alimento (García-Hurtado, 2012). En concreto, se lleva a cabo la congelación rápida, que permite congelar el alimento en un rango de tiempo de 2 horas como máximo. Esto conlleva que los productos se puedan conservar manteniendo gran parte de sus cualidades. Esto es así, ya que la estructura celular no resulta afectada de manera significativa, puesto que la medida de los cristales de hielo que se forman en la célula es de un tamaño pequeño. Esto no tiene importancia en seguridad alimentaria, pero sí en las cualidades organolépticas del alimento (García et al., 2017). El proceso de congelación, prorroga el deterioro de los alimentos, prolongando su seguridad, evitando que los

microorganismos se desarrollen o aminorando la actividad enzimática que favorece dicho deterioro (Castro-Ríos, 2011).

- **Escaldado**

Otro método de higienización de interés es el escaldado. Este proceso consiste en una cocción rápida para reblandecer los tejidos, conservar el color o mejorar la textura del producto. Es importante saber que el escaldado debe precederse de una fase de enfriamiento rápido, para de esta manera evitar la cocción excesiva del producto (Ramírez-Mendez et al., 2010). El tratamiento de escaldado, el cual se realiza con aplicaciones de agua caliente, inmersión en agua caliente, vapor o aplicando aire calientes forzado, es utilizado para la obtención de alimentos mínimamente procesados. Reduciendo así la incidencia de patógenos (Maxin et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que un escaldado previo al envasado para conservación de la harina de insecto, inhibe significativamente el pardeamiento y mejora la textura de la harina, así como disminuye o elimina el olor que desprende. Esto proporciona, además, la ventaja de obtener un producto más atractivo para el consumidor, evitando el rechazo que podrían causar sus características organolépticas intrínsecas (Mendoza-Lainez, 2017). No obstante, el escaldado tiene algunas desventajas a tener en cuenta, como la pérdida de nutrientes durante el proceso y la contaminación que podría haber por el agua residual de dicho escaldado. Para ello, existen otras tecnologías alternativas derivadas de ésta como el escaldado por impacto con vapor sobrecalentado (Xiao et al., 2014).

- **Liofilización**

El proceso de liofilizado es el más utilizado en la industria alimentaria para evitar dañar las proteínas, pero al ser un proceso con un costo elevado, el secado al horno o al sol es más usado en países en vías de desarrollo (Grabowski y Klein, 2017). Con la liofilización se logra reducir la acción microbiana y la degradación oxidativa, resultando en una alternativa muy usada también en labores de investigación (Avedaño et al., 2020). La liofilización es un proceso de secado que se basa en sublimar el hielo de un producto congelado. El agua del producto pasa, por tanto, directamente de estado sólido a vapor sin pasar por el estado líquido, para lo cual se debe trabajar por debajo del punto triple del agua, 0,01 °C y 4,5 mmHg.

En la Tabla 8 se resumen las principales ventajas e inconvenientes de la liofilización en la industria agroalimentaria:

**Tabla 8.** Ventajas e inconvenientes del proceso de liofilización (Avedaño et al., 2020).

<b>VENTAJAS</b>	<b>INCONVENIENTES</b>
Mantiene mejor la estructura y el aspecto original del alimento	Es necesaria una gran inversión del equipamiento, alrededor de tres veces el de otros métodos
La baja temperatura de trabajo impide la alteración de productos termolábiles.	Alto coste energético y elevado tiempo de proceso (entre 4 y 10h/ciclo secado)
Al sublimarse el hielo quedan poros que permiten una reconstrucción rápida.	
Inhibe el deterioro del color y sabor por reacciones químicas y las pérdidas de propiedades fisiológicas.	
La humedad residual es baja.	
El tiempo de conservación es largo.	
La retención de los aromas es muy alta.	

- **Calor seco**

La deshidratación y el secado es uno de los procesos más antiguos de conservación utilizados por el ser humano (Castro-Ríos, 2011). El proceso de deshidratado paraliza la degradación natural de los alimentos, ya que elimina el agua que los microorganismos requieren para su actividad, empleando temperaturas entre 40 y 100 °C. El secado artificial con estufa se basa en la exposición de material húmedo a una corriente de aire constante, forjada mecánicamente, a unas condiciones de temperatura, humedad y velocidad definidas. La ventaja aparente de esta técnica es la posibilidad de un control efectivo y relativamente sencillo de la temperatura. Un inconveniente es el tiempo que tarda en realizarse, ya que otras técnicas de secado como el túnel de secado o secado en microondas requieren menor tiempo. En lo que se refiere al análisis bromatológico de la muestra, algunos autores concluyen que las técnicas de secado no afectan de manera significativa a la proteína cruda (Suárez-Hernández et al., 2016).

- **Tratamientos altas presiones**

La alta presión hidrostática (HPP o “High Pressure Pumps”) es una de las técnicas de mantenimiento no térmica más, ya que posibilita la inactivación de microorganismos patógenos que pueden deteriorar los alimentos (Torres et al., 2004). Se ha evidenciado que el uso de HPP permite obtener cinco reducciones decimales en patógenos significativos para la conservación de alimentos, incluyendo *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus* (Téllez-Luis et al., 2001).

- **Tratamiento con sosa**

Este tratamiento químico consiste en el uso de varias soluciones como el hipoclorito de sodio, el clorito de sodio acidificado, el dióxido de cloro, el peróxido de hidrógeno, los ácidos orgánicos y/o el ozono como desinfectantes en la industria alimentaria (Kim et al., 2009).

## **2. OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta las actuales demandas por parte de los consumidores de alimentos saludables y procedentes de sistemas de producción sostenibles, así como las necesidades de los cada vez más exigentes mercados agroalimentarios respecto a la seguridad, durabilidad y calidad de los productos requeridos en el contexto de las normativas aprobadas, se planteó como objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster la “evaluación de diferentes técnicas de higienización para reducir la carga microbiana de harina obtenida a partir de la cría de larvas de *Tenebrio molitor*”. Para alcanzar este objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar las condiciones de cría óptimas empleando diferentes condiciones y sustratos nutricionales para la producción de *T. molitor*.
2. Aplicar diferentes técnicas y tratamientos de higienización para eliminar los microorganismos patógenos más representativos de la industria alimentaria en las larvas seleccionadas.
3. Desarrollar un producto final (harina) que mantenga un potencial nutricional adecuado y que permanezca libre de una carga microbiana indeseable.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Materiales de partida y equipos

En el presente trabajo se desarrolló una metodología que incluyó el uso de los materiales y equipos que se mencionan a continuación:

- Cajas de plástico tamaño 16x12 cm.
- Cajas de plástico tamaño 40x60 cm.
- Habitación para almacenar las cajas.
- Humidificador (3L Large Capacity Air Humidifier (Real-time monitoring of spray humidity)).
- Lámpara de calor y de luz.
- Balanza Mettler Toledo ML y balanza de precisión MT ML204.
- Registrador de datos de humedad, temperatura y punto de rocío (Lascar EL-USB-2+ con alarma, interfaz USB)

En las siguientes tablas se recogen una lista de diferentes equipos utilizados (Tabla 9), otra lista de equipos y técnicas específicamente destinadas a tareas de higienización de los productos analizados (Tabla 10) y la relación de materiales (Tabla 11) empleados durante el desarrollo del presente trabajo.

**Tabla 9.** Equipos utilizados en diferentes etapas del trabajo y su finalidad en el estudio.

Finalidad	Equipo	Modelo	Marca
Deshidratación	Liofilizador	Lyoquest-85 plus	Telstar
Escaldar	Olla	-	-
Higienizar	Ultravioleta	-	-
Homogeneizador	Mezclador Peristáltico	EasyMix	Lab Blender
Acondicionamiento microorganismo	Estufa de cultivo (30 °C ±1 °C)	Estufa desecación 53L	Memmert UNB400
Evitar contaminación	Cabina de Bioseguridad de flujo laminar	BIOII A.	Telstar
Esterilizar	Autoclave	Trade	Raypa
Esterilizar	Camping Gas	-	-
Pesar	Balanza de precisión	MT ML204	-
Calentar la muestra	Termoblok	-	-
Crear condiciones de anaerobiosis	Cámara de anaerobiosis	BD GasPak™ EZ	GasPak™



**Tabla 10.** Equipos empleados para técnicas de higienización.

Técnica de Higienización	Utensilio	Condiciones
<b>Congelación</b>	Congelador	-19 °C - Tiempo mínimo: 24 horas
<b>Escaldado</b>	Olla	- 100 °C - 1 minuto
<b>Ultravioleta-Visible</b>	Equipo semiindustrial equipado con lámparas Ultravioleta-Visible	Tratamiento 1 (T1) a 260 nm: ● Dosis: 1,2 KJ/m <sup>2</sup> ● Tiempo: 4 min Tratamiento 2 (T2) a 260 nm. ● Dosis: 3,1 KJ/m <sup>2</sup> ● Tiempo: 2 min
<b>Conservación y secado</b>	Liofilizador	- -80 °C - 0,03 mBar

**Tabla 11.** Materiales de laboratorio utilizados.

Pipetas	Tubos de ensayo 160 x 16 mm
Duquesas	Pipetas estériles de 1 ± 0,01 mL
Botes ISO	Pipetas estériles de 10 ± 0,1 mL
Asa de siembra	Pipeta graduada de 100 a 1000 µL
Bolitas de vidrio	Puntas estériles
Alcohol	Matraz Erlenmeyes de 500 mL
Bolsas de plástico estériles 400 mL	Gradilla de bolsas
Placas Petri de 90 mm de diámetro	Tubos eppendorf

### 3.2. Medios de cultivo

Para que los microorganismos crezcan adecuadamente en las placas de Petri y poder detectarlo en condiciones de laboratorio, es vital aportarles un medio con los nutrientes y las condiciones fisicoquímicas que necesitan para su correcto desarrollo. En general, los medios de cultivo contienen agua y nutrientes esenciales, que resultan necesarios para el metabolismo de los microorganismos. El resto de los componentes varía en función de los diferentes grupos microbianos que se pretendan estudiar.

A continuación, se enumeran los diferentes medios de cultivo comerciales empleados durante el desarrollo del presente trabajo, los cuales fueron preparados según las instrucciones de cada fabricante.

1. Agua de Peptona Tamponada (APT) (VWR Chemicals).
2. Patata Dextrosa Agar (PDA) (VWR Chemicals).

3. Agar Selectivo para *Listeria* (ASL) (VWR Chemicals), según Ottaviani y Agosti (2008).
4. Agar Rojo Violeta con Glucosa (VRBG) (Labken).
5. Agar para recuento en placa (PCA) (Biokar diagnostic).
6. Agar para coliformes (Chromogenis isoE).
7. Agar bacteriológico (VWR Chemicals).
8. Oxytetracycline hydrochloride. Antibiótico para PDA (sigma-aldrich).
9. Agar Xylose Lysine Deoxycgolate (XLD) (VWR Chemicals).
10. Medios de enriquecimiento para *Salmonella* (VWR Chemicals)

### **3.3. Diseño de los ensayos de cría de insectos: Fases experimentales**

De acuerdo con su alto contenido en proteínas y lípidos, así como con la versatilidad y facilidad para la cría, se seleccionó la especie *T. molitor* como el insecto de interés para el desarrollo del presente TFM.

Durante el proceso de cría se llevaron a cabo diferentes ensayos preliminares que permitieron optimizar las condiciones del procedimiento de acuerdo con diferentes parámetros de temperatura, humedad y tipo de alimentación. Adicionalmente, en el último ensayo se incluyó como factor diferenciador la aplicación de distintas dietas basadas en subproductos procedentes de la industria agroalimentaria, en concreto se emplearon tomate de destrío, lo cual, además de potenciar la valorización de biomasa residual en los procesos de cría de insectos acercándose a los sistemas de producción basados en bioeconomía y sostenibilidad, permite conseguir una reducción en el coste total del proceso.

En la Figura 6 se muestra una imagen con la disposición de los materiales empleados para la cría de larvas de *T. molitor*.



**Figura 6.** Materiales de partida para el ensayo inicial de la cría de *T. molitor*.

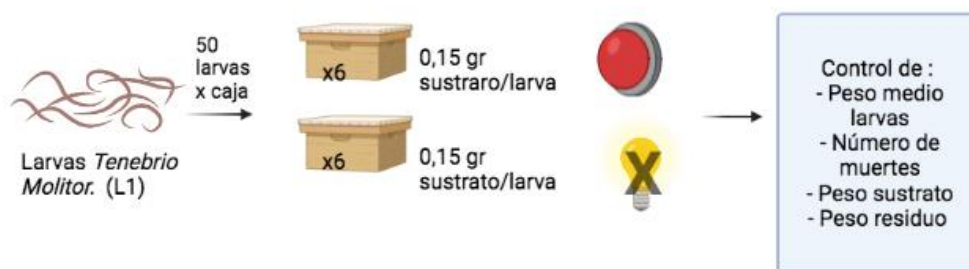
Los diferentes bloques experimentales llevados a cabo fueron los siguientes:

1º ensayo: El objetivo fue determinar la cantidad mínima de alimento necesaria para un correcto crecimiento de las larvas. En este sentido, se analizaron las siguientes cantidades de salvado de trigo por larva: 0,15 g, 0,20 g y 0,25 g. Cada uno de estos tres tratamientos se llevó a cabo en 6 cajas con 50 larvas por recipiente. Posteriormente, se realizó el recuento del número de individuos muertos, el peso medio de 20 larvas, el peso del sustrato consumido y el peso del residuo obtenido (Figura 7).



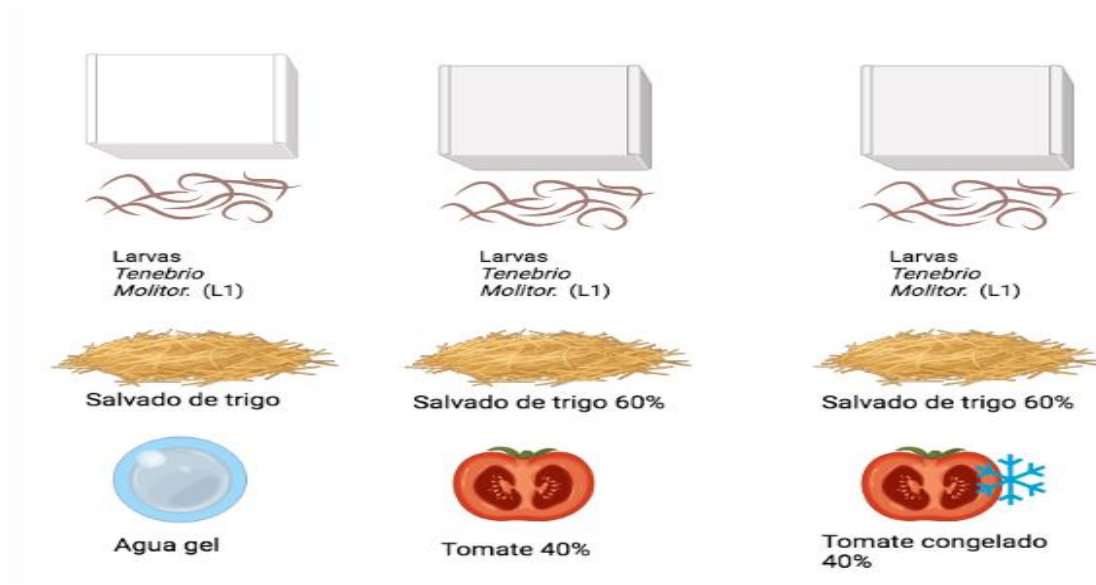
**Figura 7.** Esquema del ensayo a pequeña escala para el control y selección de la alimentación sobre la cría de *T. molitor*.

2º ensayo: Se realizó un ensayo en paralelo al anteriormente descrito empleando diferentes condiciones ambientales. Para ello, se utilizaron 6 cajas con 50 larvas cada una y se dispusieron a una temperatura media de 20,4 °C, 74% de humedad y en condiciones de oscuridad. Mientras que otras 6 cajas de 50 larvas se colocaron en una zona en la que se alternaron 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, a una temperatura media de 20,7 °C y humedad media del 64%. Las 12 cajas contenían 0,15 g de sustrato (salvado de trigo) por larva. Este ensayo tuvo una duración de 33 días. En ambos ensayos las condiciones de humedad se mantuvieron aportando agua en gel, así como mediante el uso de un humidificador (Figura 8).



**Figura 8.** Evaluación de la cría de *T. molitor* con diferentes condiciones de luz y el mismo sustrato.

3º ensayo: El tercer ensayo se realizó utilizando 3 tratamientos a una escala mayor que los anteriores y empleando diferentes sustratos para la alimentación de los insectos con 300 g de larvas en cada caja. Con una temperatura media de 20,4 °C y 74% de humedad. El primer tratamiento tuvo como alimento únicamente salvado de trigo; el segundo tratamiento, salvado de trigo y tomate congelado en una proporción 60-40 (trigo/tomate congelado); y el tercer tratamiento, salvado de trigo y tomate fresco en una proporción 60-40 (trigo/tomate fresco). El tomate utilizado para el ensayo provenía de frutos de destrío, y el hecho de utilizarlo congelado y sin congelar se basa en que la congelación permite una mejor digestibilidad además de reducir la carga microbiana proveniente de dichos frutos (Figura 9).

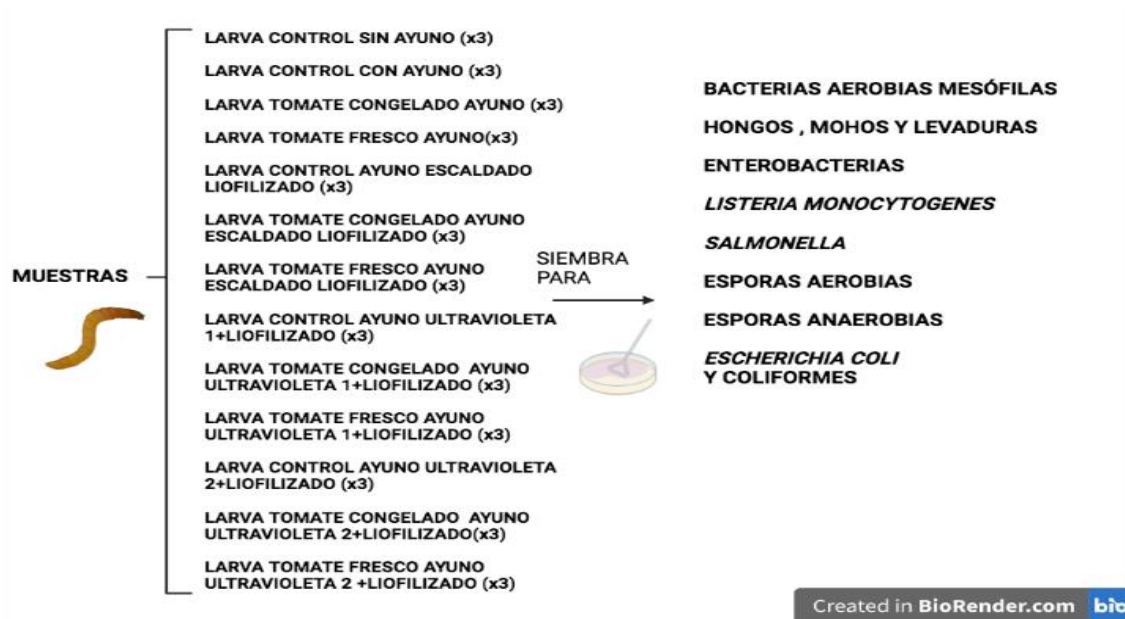


**Figura 9.** Esquema del ensayo a mediana escala para el control y selección de la alimentación, empleando tres alternativas, sobre la cría de *T. molitor* para el estudio microbiológico.

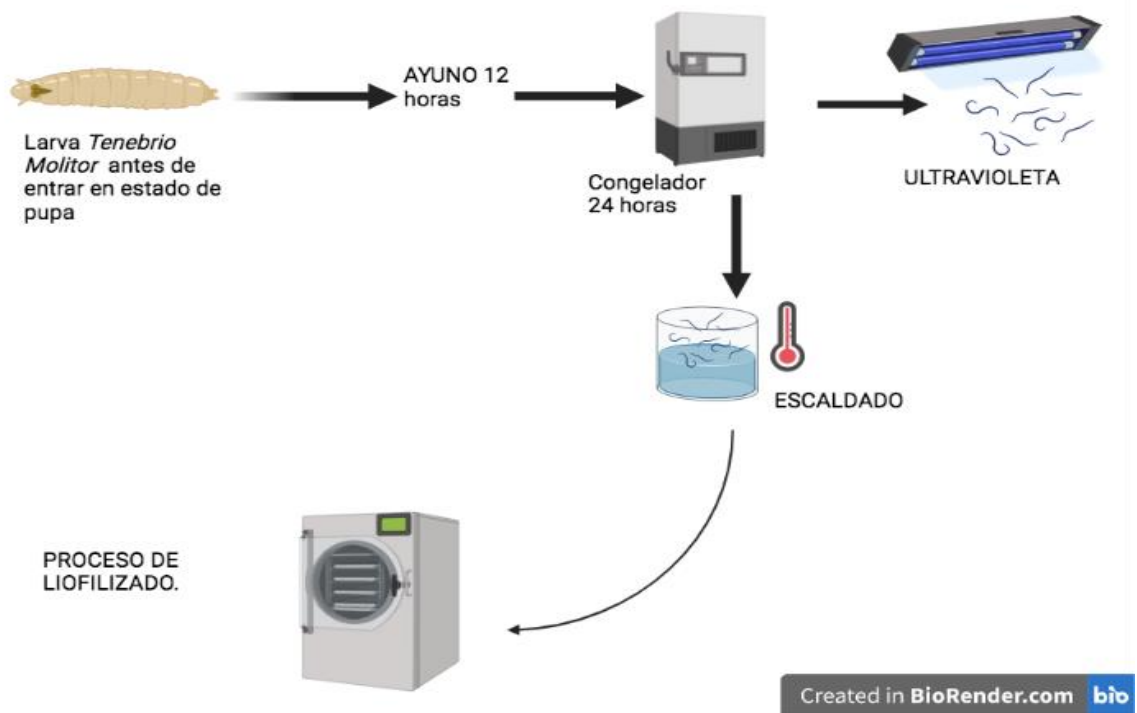
### 3.4. Análisis microbiológico de las muestras

Se realizaron pruebas microbiológicas a los sustratos empleados para la alimentación de las larvas de *T. molitor* correspondientes al tercer bloque experimental (ver Apartado 3.3.- 3° ensayo). Una vez finalizada la cría, se llevaron a cabo de nuevo analíticas microbiológicas para evaluar la carga microbiana de los residuos remanentes tras el proceso de cría, en cada caso.

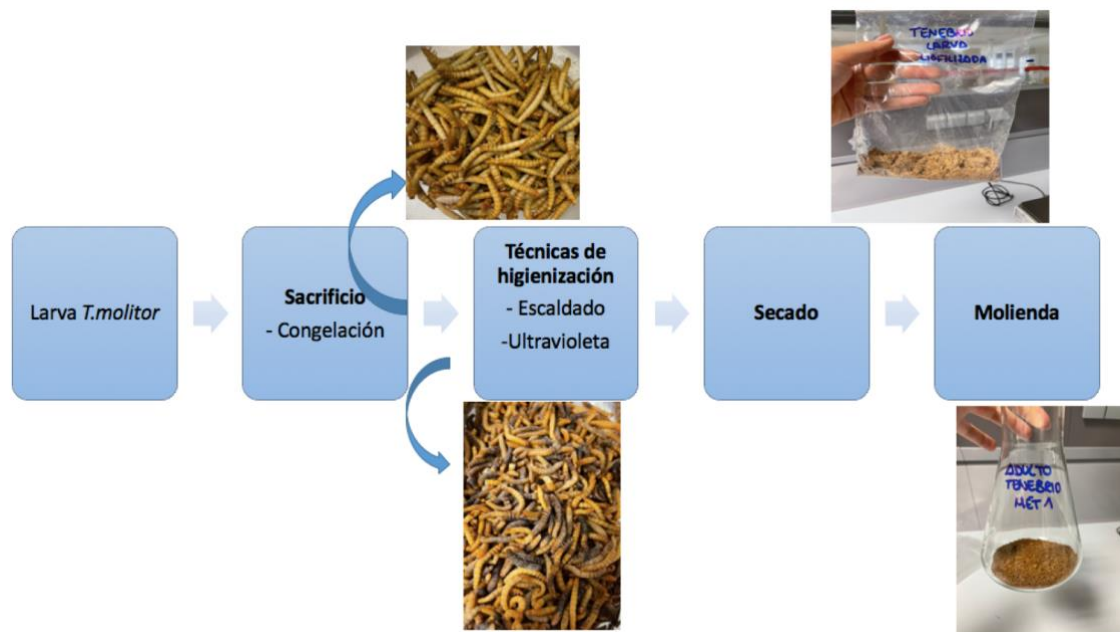
Para analizar la microbiota correspondiente a las larvas (Figura 10), se llevó a cabo el sacrificio de estas en un estado previo al de pupa. El método utilizado fue la congelación. Además, se incluyó el factor ayuno para la realización de las pruebas. De manera que, se realizaron los estudios, por un lado, sometiendo a un periodo de 12 horas de ayuno a un grupo de larvas antes del sacrificio, para permitir el vaciado de su contenido intestinal, y, por otro lado, utilizando otro grupo de larvas sin periodo de ayuno previo al momento del sacrificio. Así mismo, se analizó la microbiota correspondiente a las larvas procesadas en forma de harina, para ello, previamente se descongelaron las larvas y se sometieron un grupo a un tratamiento de escaldado y otro a un tratamiento de radiación UV, con objeto de reducir la carga microbiana durante el almacenamiento. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas y trituradas para elaborar el prototipo de harina de *T. molitor*, a partir del cual se realizaron los análisis microbiológicos pertinentes al producto final (Figuras 11 y 12). Se estudiaron dos tratamientos de UV: 1) Tiempo 4 minutos, dosis: 1,2 KJ/m<sup>2</sup>, 2) Tiempo 2 minutos, dosis: 3,1 KJ/m<sup>2</sup>.



**Figura 10.** Esquema general indicando los grupos microbianos analizados a partir de las muestras estudiadas.



**Figura 11.** Esquema del procesado de las larvas de *Tenebrio molitor* para la elaboración de harinas.



**Figura 12.** Esquema del proceso para la obtención de harina de *T. molitor*.

Los análisis microbiológicos se realizaron de acuerdo con la legislación vigente en materia de calidad y seguridad alimentaria (Reglamento (CE) nº 2073/2005), con el fin de garantizar que la carga microbiana del producto no significase un riesgo para el consumidor. Atendiendo a dicho reglamento, la misión de estas analíticas fue satisfacer lo acordado en dicha normativa con respecto a los Criterios de Seguridad Alimentaria. Es así, ya que los criterios mencionados resultan aplicables a los productos comercializados durante toda su vida útil y determinan que sean aceptables en condiciones previsibles de distribución, almacenamiento y uso.

Según lo mencionado, se analizaron distintos grupos microbianos empleando la técnica de recuento en placa. Para ello, partiendo de una muestra de  $10 \pm 0,1$  g tomada en condiciones de esterilidad (empleando cabina de flujo vertical y mechero bunsen) y homogeneizada en un mezclador peristáltico (Lab Blender) con 100 mL de medio APT, se realizaron diluciones decimales seriadas tomando cada vez  $1 \pm 0,01$  mL de la suspensión inicial y adicionando a un tubo con  $9 \pm 0,01$  mL de solución salina estéril al 0,9%. A partir de las diluciones requeridas para el recuento de cada grupo microbianos, se llevaron a cabo siembras en placa, denominadas siembra en superficie, empleando bolitas de vidrio estériles que permitieron repartir el volumen inoculado en cada caso (0,1 mL). Tras el tiempo de incubación correspondiente, se realizó la lectura de recuentos microbianos utilizando la fórmula de Unidades Formadoras de Colonias por unidad de volumen o peso (UFC/mL) o (UFC/g):

$$\frac{UFC}{g \text{ ó } mL} = \frac{N^{\circ} \text{ colonias}}{\text{Volumen inoculado} \cdot \text{Dilución}}$$

Para asegurar una lectura de recuentos significativos se tomaron placas con un número de morfotipos coloniales comprendido entre 30 y 300, en el caso de bacterias, y entre 15 y 30, en el caso de hongos.

Los grupos microbianos analizados en las diferentes fases experimentales:

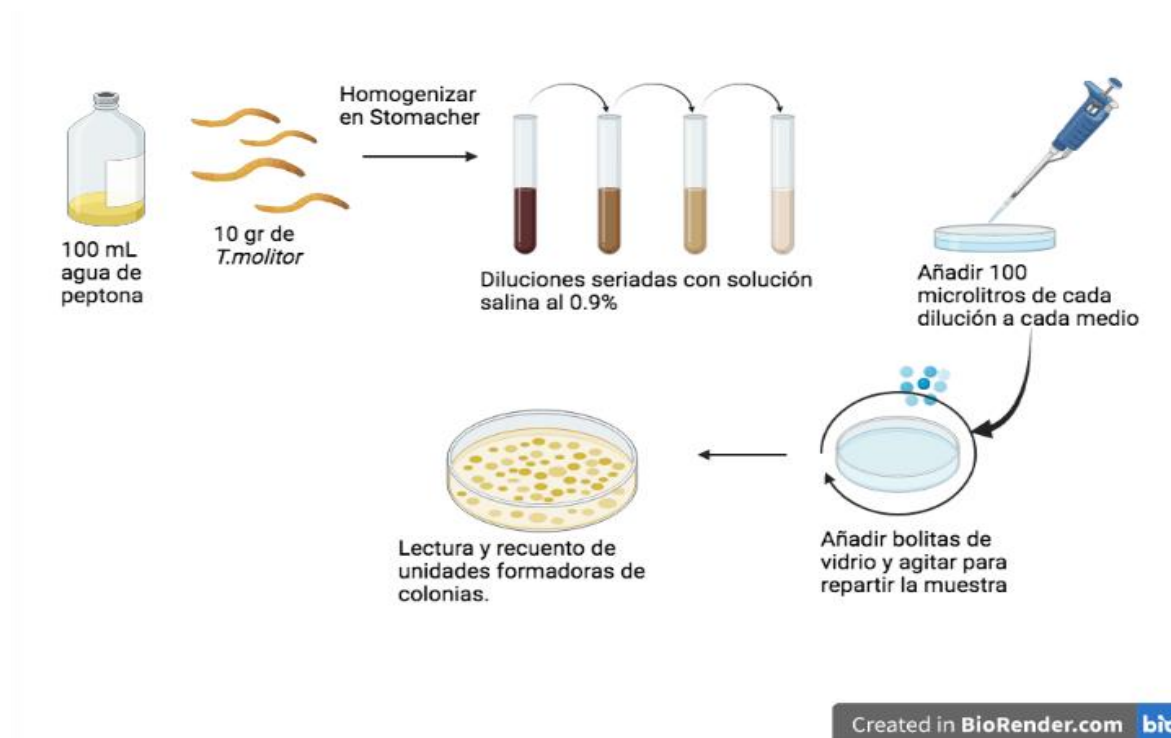
### 1) Microbiota aerobia mesófila:

Para el recuento de bacterias aerobias mesófilas se realizaron siembras en placas con medio PCA que se incubaron a  $30 \pm 1$  °C durante  $72 \pm 3$  h (Figura 13).

Para el recuento de hongos y levaduras mesófilos se realizaron siembras en placas con medio PDA adicionado con antibiótico que se incubaron a  $30 \pm 1$  °C durante  $72 \pm 3$  h para el recuento de levaduras y  $120 \pm 3$  h para hongos mohos (Figura 13).

### 2) Enterobacterias totales:

Para el recuento de enterobacterias totales se realizaron siembras en placas con medio VRBG que se incubaron en condiciones de microaerofilia a  $30 \pm 1$  °C durante  $72 \pm 3$  h (Figura 13).

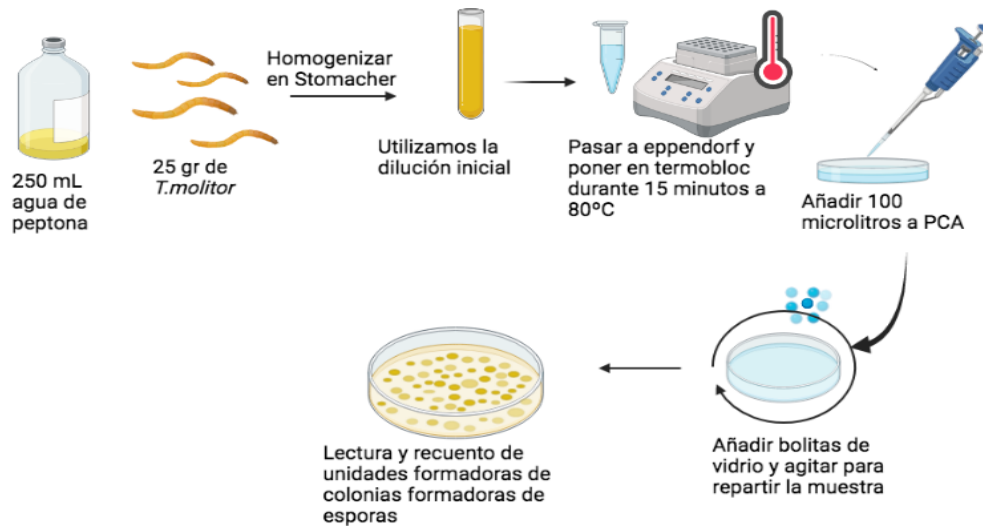


**Figura 13.** Esquema de preparación de muestras y realización de siembras para el recuento de microbiota aerobia mesófila, bacteriana y fúngica, y enterobacterias totales.



### 3) Formadores de esporas:

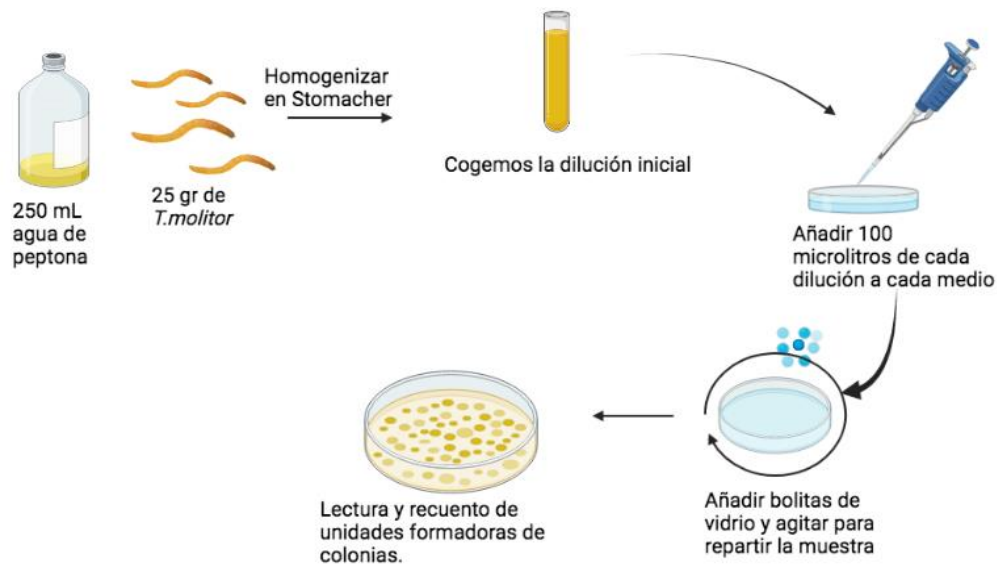
Para el recuento de microorganismos formadores de esporas se realizaron siembras en placas con medio PCA que se incubaron a  $30 \pm 1$  °C durante  $72 \pm 3$  h, pero partiendo de una muestra de  $1 \text{ mL} \pm 0,1$  de la suspensión inicial sometida a un tratamiento térmico de 15 minutos a una temperatura de 80 °C , empleando un termoblock (Termolita), para eliminar la forma vegetativa de las bacterias y forzar la formación de endosporas por parte de aquellas especies capaces de producir estas formas de resistencia (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema de preparación de muestras y realización de siembras para el recuento de bacterias formadoras de esporas.

### 4) *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes*:

Para el recuento de patógenos específicos asociados a enfermedades de origen alimentario, como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, se realizaron siembras, partiendo de la suspensión inicial, en placas con medios selectivos para cada caso (Agar XLD y ASL respectivamente) que se incubaron a  $37 \pm 1$  °C durante  $48 \pm 2$  h (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema de preparación de muestras y realización de siembras para el recuento de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

### 3.5. Análisis Físico-Químico

Además de las analíticas microbiológicas, se estudió el perfil nutricional de las harinas elaboradas a partir de las larvas de insecto, en concreto, el contenido en grasas y proteínas.

#### 3.5.1. Análisis de lípidos

##### Caracterización del perfil lipídico mediante cromatografía de gases (GC):

La obtención del perfil de ácidos grasos de la harina producida tuvo lugar mediante los siguientes pasos:

#### 1. Obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

Para la realización de la metilación directa se partió de 50-60 mg de harina de insecto y se agregó 1 mL de hexano y 1 mL de la mezcla metilante (Metanol:Cloruro de acetilo, 20:1). Posteriormente, se colocó en un termoblock a 100 °C durante 30 minutos. Se dejó enfriar y se agregó 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Se centrifugó durante 2 minutos a 1000 rpm y se tomó la fase orgánica. El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra.

#### 2. Detección y cuantificación del perfil lipídico por GC-FID

El estudio del perfil lipídico se realizó mediante el análisis de la fracción conteniendo los FAME 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 (Figura 16).



**Figura 16.** Equipo GC-FID (Thermo Trace GC Ultra).

Para la caracterización del perfil lipídico de cada aceite extraído con acetato de etilo se calculó el porcentaje de área de cada pico obtenido en el cromatograma, lo que permitió evaluar en qué proporción se encontraba cada ácido graso en la muestra.

### **3.5.2. Análisis de proteínas**

#### **Proteína bruta:**

Para determinar el contenido en proteína bruta se utilizó el método Kjeldahl, el cual consta de 3 fases:

#### **1. Digestión:**

Se produjo la descomposición del nitrógeno que contenían las muestras orgánicas utilizando una solución de ácido concentrado. Esto se obtuvo haciendo hervir la muestra en una concentración de ácido sulfúrico. Para llevarlo a cabo se pesó 1 g de muestra, se añadieron 12 mL de ácido sulfúrico y una pastilla de catalizador de mineralización Kjeldahl (Lab instruments s.a.s) de 5,1 g, así como 3 bolitas de vidrio de 6 mm para ayudar a la homogeneización durante el proceso de digestión. Se trabajó en un tubo de vidrio de 4,8 cm de diámetro y 29,8 cm de alto, especialmente preparado para el equipo digestor Kjeldahl.

#### **2. Destilación:**

En esta etapa se logra la liberación del amoníaco, el cual es retenido en una solución de ácido bórico al 4%. La destilación se llevó a cabo con una solución de NaOH al 32%.

#### **3. Titulación:**

En esta última etapa se llevó a cabo una valoración de la cantidad de amonio presente en la muestra a partir de una solución de HCl 0,1N. Para cuantificar el contenido en proteína

total se partió del contenido en Nitrógeno total cuantificado por Kjeldhal y se aplicó un factor proteínico (5,6) para la transformación de los datos.

### **3.6. Análisis estadístico**

Todos los resultados obtenidos fueron procesados en Microsoft Office Excel 365 para Windows, así como la obtención de las gráficas correspondientes al análisis. Por otra parte, con el programa Statgraphics Centurion XIX se hizo un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA Simple) para comparar los grupos de homogeneidad y diferencias significativas entre las medias de los distintos grupos microbianos analizados mediante el Test de Mínima Diferencia de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ), así como un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial, gracias al que se determinó la influencia significativa de los distintos factores de variabilidad, así como la interacción entre ellos, sobre las distintas variables analizadas. Además, algunas representaciones gráficas se elaboraron con el programa BioRender.

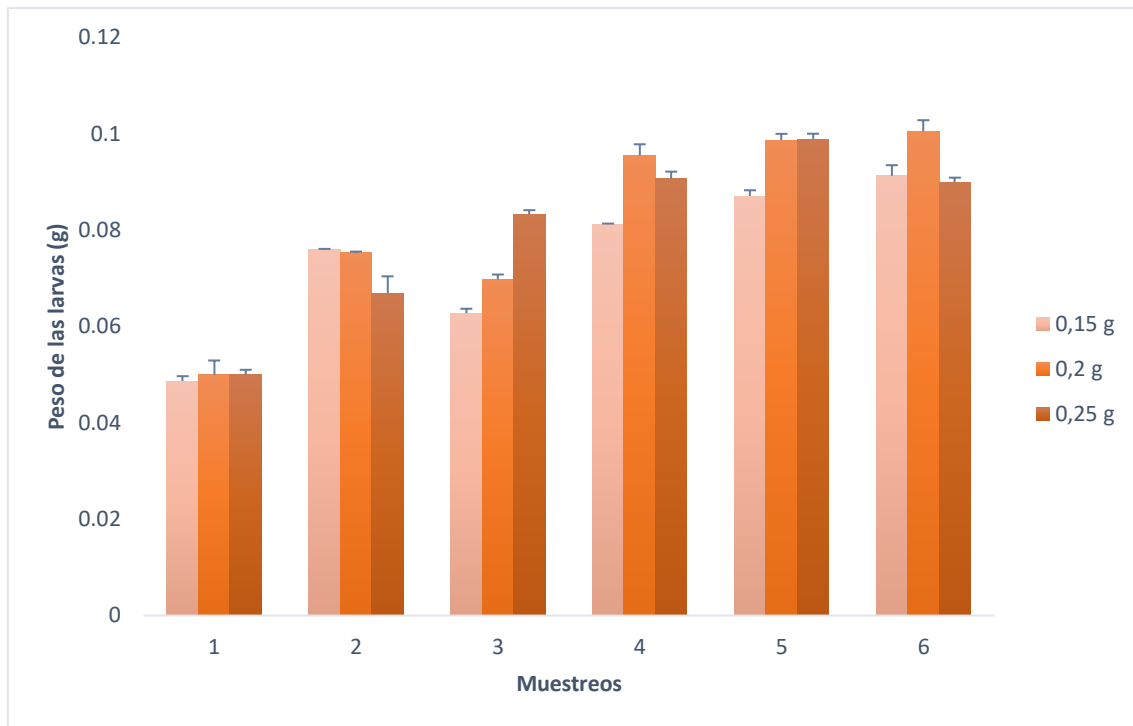
## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Producción de larva de *T. molitor* a pequeña escala:**

#### **4.1.1. Evaluación de las larvas en función de la cantidad de sustrato empleada (1º ensayo)**

Durante la primera etapa del trabajo, se estudió el comportamiento de *T. molitor* empleando como factor diferenciador durante el periodo de cría la cantidad de sustrato utilizado (salvado de trigo), es decir, se aplicaron tres tratamientos distintos de alimentación a las larvas: a un grupo se le sometió a una alimentación basada en una relación de 0,15 g de salvado de trigo por larva; a otro grupo, una relación de 0,20 g por larva; y, por último, al grupo restante se le ofreció la mayor cantidad ensayada, 0,25 g de alimento por larva.

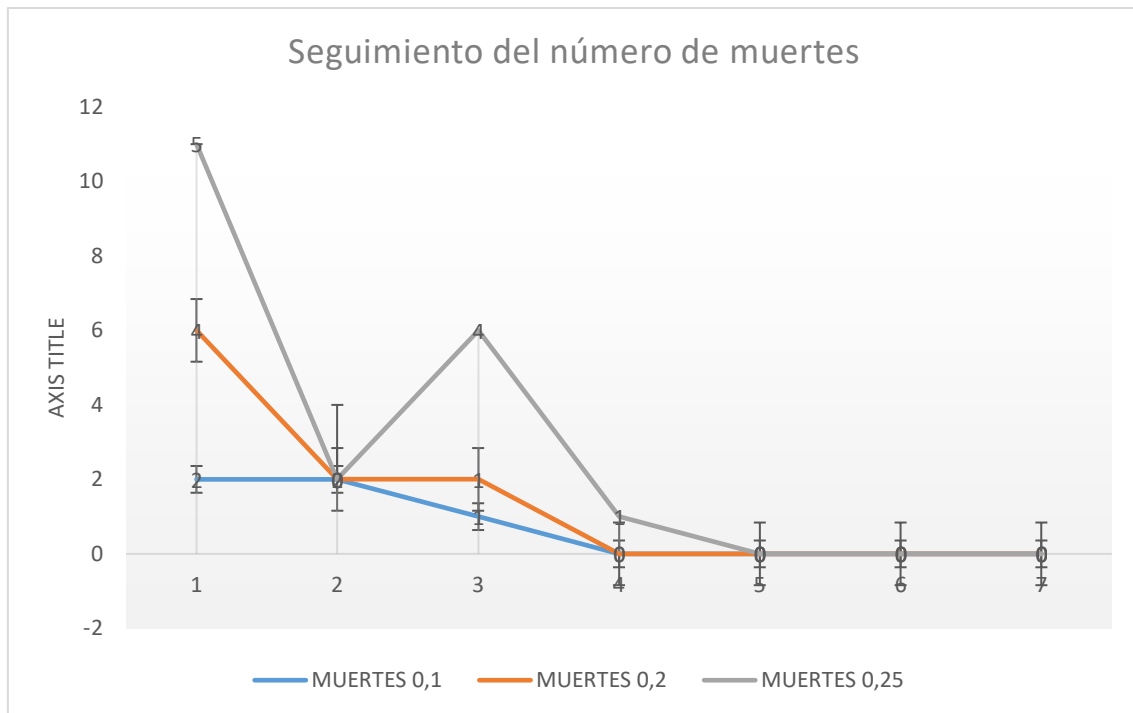
En la Figura 17 aparece reflejada la ganancia de peso de las larvas, en un periodo de crecimiento de un mes, siendo los números del 1 al 6 los distintos días muestreados en los que se procedió al pesaje y recuento de estas. Es decir, se llevó a cabo un muestreo cada 5 días.



**Figura 17.** Aumento de peso de larvas de *T. molitor* en relación con la cantidad de alimento suministrado (0,15 g; 0,20 g; 0,25 g) en los seis muestreos realizados.

En la Figura 17 se puede observar que no hubo diferencias significativas respecto al aumento de peso de las larvas entre los diferentes tratamientos aplicados dentro de cada muestreo, lo cual podría reflejar que la cantidad mínima utilizada (0,15 g) es suficiente para el engorde de los insectos y el resto del sustrato quedaría incluso desperdiciado, lo cual sería un coste económico extra innecesario.

En el ensayo también se analizó el número de muertes (Figura 18), en función de cada tratamiento en los distintos días muestreados.



**Figura 18.** Seguimiento del número de muertes de larvas de *T. molitor* en relación con la cantidad de alimento suministrado (0,15 g; 0,20 g; 0,25 g) en los distintos días muestreados.

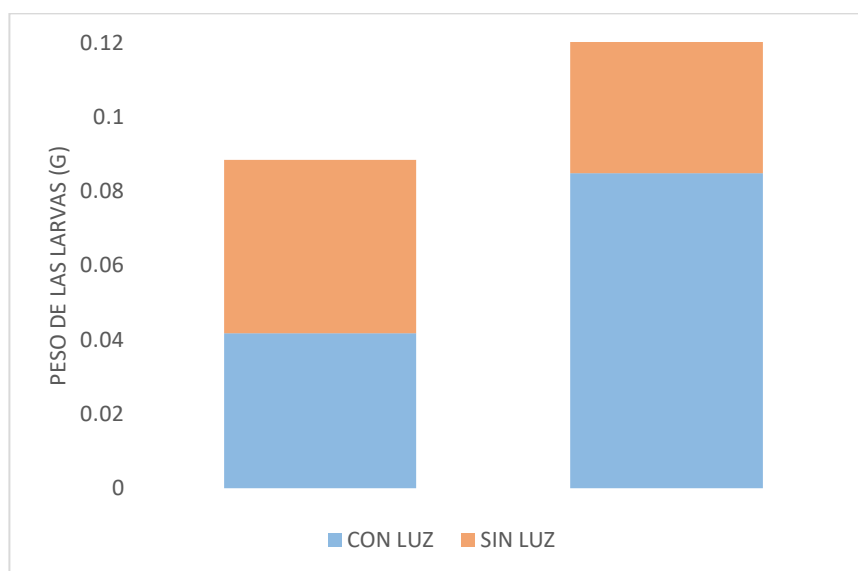
Como se observa en la Figura 18, ocurrió un mayor número de decesos durante los primeros días muestreados, con diferencias claras entre tratamientos, siendo el mejor en este sentido el de la menor cantidad de sustrato aplicada (0,15 g) y el que más muertes causó al inicio, el tratamiento con la mayor cantidad de salvado de trigo (0,25 g). El número de muertes fue descendiendo conforme las larvas se fueron adaptando a las nuevas condiciones ambientales. Una vez estabilizado este factor, no se vio una diferencia en el número de muertes relacionado con la cantidad de salvado de trigo proporcionado a las larvas desde el muestreo número 4 y hasta el final del experimento.

Con este ensayo se pudo comprobar que en las bandejas con 7,5 g de sustrato, es decir, aquellas con 0,15 g de salvado de trigo por larva, los insectos consumieron el total del alimento dispensado una semana antes que en el resto de las bandejas, visualizándose, además, las primeras pupas con mayor celeridad respecto al resto de condiciones estudiadas.

El salvado de trigo (*Triticum aestivum L.*), utilizado en este ensayo, se ha descrito como una opción adecuada de materia prima para ser empleada como alimento principal en la cría de insectos (Li et al., 2016). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió emplear como sustrato de referencia en el siguiente experimento nuevamente el salvado de trigo y en la menor cantidad aplicada, 0,15 g por larva, ya que ofreció los mejores resultados, puesto que no presentó diferencias significativas respecto al resto de cantidades ensayadas, por tanto, implicando su uso un menor coste económico por ser la menor cantidad de sustrato aplicada.

#### 4.1. Evaluación de las larvas en función de la incidencia de luz (2º ensayo)

En el segundo bloque experimental, se empleó el mismo tipo y cantidad de sustrato, pero diferentes condiciones de luz, se pudo comprobar como la ganancia de peso fue similar entre las larvas con luz roja (denominado en la gráfica como “Con Luz”) y las larvas sometidas a un periodo de oscuridad durante la cría (denominado en la gráfica como “Sin Luz”) (Figura 19).



**Figura 19.** Ganancia de peso de las larvas con un proceso de desarrollo exclusivamente en oscuridad (SIN LUZ) y con un fotoperiodo de 8 horas de luz roja y 16 horas de oscuridad (CON LUZ) el primer día (izquierda) y el último (derecha) del ensayo.

La Figura 19 refleja cómo el tipo de tratamiento lumínico utilizado durante el periodo de cría de los insectos no presentó diferencias significativas respecto al peso medio alcanzado por los individuos analizados en los dos muestreos llevados a cabo, al inicio y al final del proceso. Así mismo, en los ensayos se vieron diferentes sucesos de interés, citados a continuación:

- En las bandejas sin luz crecieron larvas (L0). Se puede considerar como hipótesis el hecho de que posiblemente en el tamiz utilizado para separar las larvas del residuo hubiera huevos de larvas.
- En las bandejas sin luz se contabilizaron el último día un total de 304 larvas de las 300 iniciales. Mientras que en las bandejas Con Luz se contabilizaron el último día un total de 51 larvas vivas de 300 larvas que se pusieron inicialmente. Corroborando este suceso lo afirmado por (Gahukar, 2011). respecto a la fotosensibilidad de las larvas.
- Las larvas criadas con luz fenecen en el proceso de muda de piel (Figura 20).

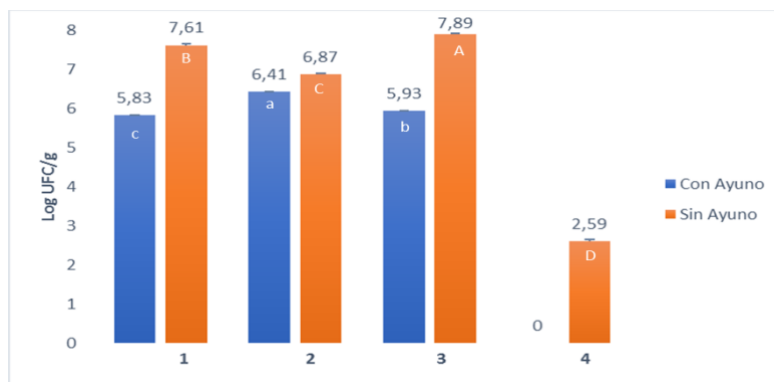


**Figura 20.** Larva procedente del tratamiento con luz roja constante (Con Luz) mudando la piel.

En este sentido, a pesar de que los individuos testados respecto a la ganancia de peso no presentaron diferencias, la supervivencia se vio fuertemente afectada en función del tipo de tratamiento aplicado, siendo, por tanto, la ausencia de luz durante el desarrollo de las larvas la mejor opción para la cría de *T. molitor*.

#### **4.1.3. Caracterización microbiológica de las larvas y de los residuos generados**

Durante los ensayos de cría de larvas a pequeña escala se llevó a cabo una caracterización microbiológica tanto de las propias larvas tras ser sacrificadas mediante congelación para la elaboración de la harina como de los residuos generados, en general, a partir de éstas. Respecto al primer caso mencionado, las larvas se analizaron bajo dos condiciones distintas: un grupo fue sometido a ayuno previo al sacrificio de 12 horas y otro no (Figura 26).

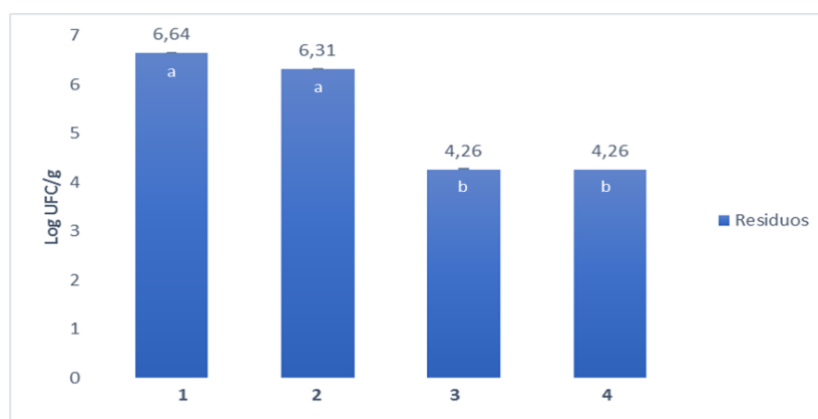


**Figura 26.** Recuento de los distintos grupos microbianos analizados (1: Enterobacterias Totales; 2: Bacterias Aerobias Mesófilas; 3: Hongos y Levaduras; 4: Esporas aerobias) a partir de las larvas seleccionadas y sometidas a pretratamiento de ayuno antes del sacrificio (Con Ayuno) y sin pretratamiento (Sin Ayuno), expresado en Log de UFC/g. \*No se detectaron en ningún caso esporas capaces de germinar en condiciones de anaerobiosis.



Como se observa en la Figura 26, el pretratamiento de ayuno previo al momento del sacrificio, permitió reducir la carga microbiana presente en las larvas, en todos los grupos estudiados. Esto ha sido corroborado por otros estudios como el de Mancini et al. (2019), quienes afirman que el ayuno resulta efectivo para la reducción de bacterias, incluidas especies peligrosas para la salud humana como *Listeria monocytogenes*.

Por otro lado, se analizaron los grupos microbianos presentes en los residuos remanentes del periodo de producción de las larvas (Figura 27).



**Figura 27.** Recuento de los distintos grupos microbianos analizados (1: Enterobacterias Totales; 2: Bacterias Aerobias Mesófilas; 3: Hongos y Levaduras; 4: Esporas aerobias) a partir de los residuos generados tras el proceso de cría de las larvas, expresado en Log de UFC/g. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). \*No se detectaron en ningún caso esporas capaces de germinar en condiciones de anaerobiosis.

Como se observa en la gráfica anterior (Figura 27), los grupos microbianos con mayor presencia en los residuos de los terrarios utilizados para la cría de las larvas corresponden al grupo de las Enterobacterias, seguido de las Bacterias Aerobias Mesófilas. Teniendo en cuenta que el excremento de larva es seco y sin olor, esto ayudaría a inhibir el crecimiento y proliferación de determinados grupos microbianos, en comparación con lo observado en muestras procedentes de excrementos de otro tipo de animales (Li et al., 2016).

La contaminación microbiana se ha considerado como uno de los principales problemas que afectan a la cría de insectos (Sikorowski y Lawrence, 1994). Además, los microbios presentes en el alimento suministrado a los insectos, así como los propios microorganismos presentes en el ambiente, pueden llegar a afectar a las comunidades microbianas simbióticas de insectos (Engel y Mora, 2013), que tienen una estrecha relación positiva con el crecimiento de los insectos y juegan papeles importantes como movilizar el nitrógeno almacenado, aportar aminoácidos esenciales, en definitiva, proporcionar nutrientes para la viabilidad y fertilidad del huésped y mejorar el sistema inmunológico de éste (Pernice et al., 2014).

En el estudio de los grupos microbianos de interés asociados a los ensayos anteriormente descritos, no se encontró la presencia de morfotipos sospechosos de corresponder al género *Salmonella*, pero sí de la especie *Listeria monocytogenes*. No se realizaron recuentos, sino que se llevó a cabo una analítica de presencia o ausencia de estos patógenos determinantes de la industria alimentaria sobre 25 g de muestra.

**Tabla 11.** Presencia (+) y ausencia(-) de *Listeria Monocytogenes* y *Salmonella* en los diferentes sustratos analizados.

	<i>L.</i> <i>MONOCYTOGENES</i>	<i>SALMONELLA</i>
SALVADO DE TRIGO	+	-
SALVADO DE TRIGO + TOMATE CONGELADO	+	-
SALVADO DE TRIGO + TOMATE FRESCO	+	-
RESIDUO	+	-
LARVA CONTROL	+	-
LARVA CONTROL CON AYUNO	+	-
LARVA ST+TC AYUNO	+	-
LARVA ST+TF AYUNO	+	-
LARVA CONTROL AYUNO ESCALDADO	-	-
LIOFILIZADO		
LARVA ST+TC AYUNO ESCALDADO	-	-
LIOFILIZADO		
LARVA ST+TF AYUNO ESCALDADO	-	-
LIOFILIZADO		
LARVA CONTROL AYUNO UV1	+	-
LARVA ST+TC AYUNO UV1	+	-
LARVA ST+TF AYUNO UV1	+	-
LARVA CONTROL AYUNO UV2	+	-
LARVA ST+TC AYUNO UV2	+	-
LARVA ST+TF AYUNO UV2	+	-

### 4.3. Producción de larva de *T. molitor* a mediana escala en función del tipo de alimentación empleada

#### 4.3.1. Análisis microbiológico en función de los distintos sustratos empleados

Los insectos comestibles pueden ser una respuesta eficaz a la creciente demanda de proteínas animales con un impacto ambiental menor al relacionado con la ganadería convencional (Oonincx y de Boer, 2012; Van Huis et al., 2013) y, sin embargo, con un aporte nutricional comparable a los de los animales criados de forma tradicional (Rumpold y Schlüter, 2013). No obstante, se necesita más investigación para ofrecer al mercado un producto libre de peligro (Belluco et al., 2013). En este sentido, los insectos se están posicionando como una alternativa viable para la obtención de nutrientes con fines alimenticios y, en concreto, para la producción de piensos destinados al consumo animal. Para optimizar la producción, debido a la creciente demanda de proteínas, se plantea la incorporación de nutrientes diferentes a los convencionales en la dieta habitual

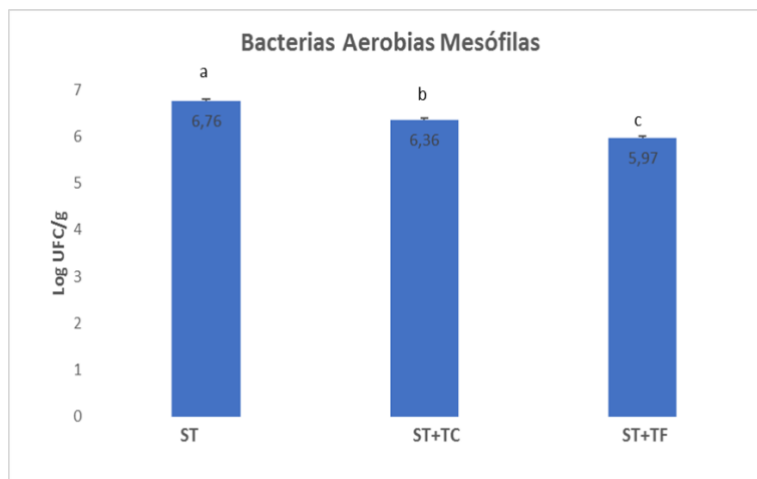
de los insectos. Una opción es añadir a la dieta del gusano de la harina residuos generados en la industria agroalimentaria, lo que permitiría reducir los materiales de desecho, convirtiéndolos en potenciales recursos, aumentando así las ganancias en varios sectores (Mancini et al., 2019). No obstante, los sustratos de cría deben seleccionarse rigurosamente para maximizar los resultados en relación con los objetivos prefijados.

De este modo, la incorporación de subproductos de otras industrias agroalimentarias, como los tomates de desecho, a una alimentación que funciona como base principal para la producción de insectos, como es el salvado de trigo, se plantea como una opción necesaria a estudiar durante la cría de insectos para conseguir sistemas más sostenibles de producción tanto desde el punto de vista ambiental como económico.

Sin embargo, la ingesta de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en forma fresca puede estar afectada por la presencia de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y diversos representantes del grupo de las enterobacterias, con una clara incidencia por parte de las siguientes especies: *Enterobacter cloacae*, *Citrobacterium freundii* y *Escherichia coli* (Luna-Guevara et al., 2012). Estos microorganismos tienen la capacidad de alojarse tanto en la parte externa como interna del fruto (Guo et al., 2001), disminuyendo así la eficacia de los procesos de higienización previos al consumo (Luna et al., 2006). Teniendo esto en cuenta, se debe asegurar un tratamiento de higienización adecuado que permita la eliminación de patógenos microbianos y que no ponga en peligro al consumidor final.

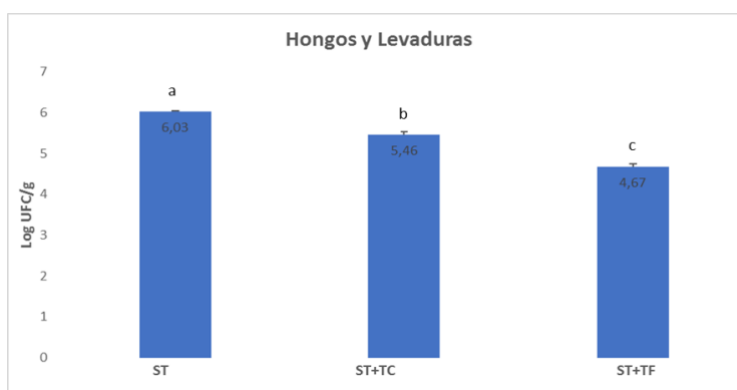
De este modo, en el tercer bloque experimental llevado a cabo en este trabajo, se realizó un análisis de la calidad microbiológica de las larvas desarrolladas en base a diferentes sustratos nutritivos aplicados: Salvado de Trigo (ST), Salvado de Trigo más Tomate Congelado (ST+TC) y Salvado de Trigo más Tomate Fresco (ST+TF). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se decidió aplicar el pretratamiento de ayuno antes de llevar a cabo la congelación para el sacrificio de las larvas.

En las Figuras 21 y 22, se muestran los resultados correspondientes a la microbiota general observada según los diferentes tratamientos, por un lado, los recuentos de Bacterias Aerobias Mesófilas (Figura 21) y, por otro, los recuentos correspondientes a Hongos y levaduras (Figura 22).



**Figura 21.** Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas para cada tratamiento aplicado (ST: salvado de trigo; ST+TC: salvado de trigo más tomate congelado; ST+TF:salvado de trigo más tomate fresco), expresado en Log de UFC/g. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Como se observa en la Figura 21, la carga bacteriana total disminuyó cuando se incorporó tomate a la dieta de los insectos, tanto fresco como congelado, detectándose los menores recuentos en la dieta a base de tomate fresco, lo cual a priori resulta curioso, ya que los tratamientos de congelación ayudan por sí mismos a disminuir la viabilidad microbiana y, de hecho, se emplean como métodos de conservación de alimentos. Una explicación plausible sería el hecho de que entre la microbiota asociada al tomate fresco se incluyen representantes del género *Bacillus* asociados con una fuerte actividad antimicrobiana, lo que les permite competir frente a otros microorganismos que pretendan emplear dicho sustrato como nicho ecológico y, por ende, disminuyendo la carga total microbiana detectada.



**Figura 22.** Recuento de Hongos y Levaduras para cada tratamiento aplicado (ST: salvado de trigo; ST+TC: salvado de trigo más tomate congelado; ST+TF:salvado de trigo más tomate fresco), expresado en Log de UFC/g. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

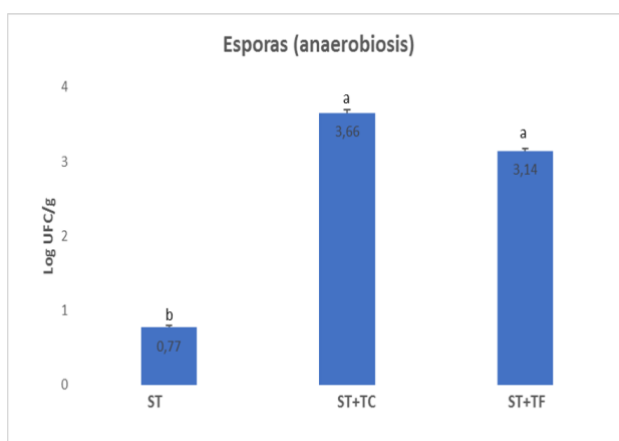
Precisamente, siguiendo con el argumento anterior, en este ensayo se detectó una menor carga fúngica total, incluyendo hongos mohos y levaduras, en los alimentos a base de tomate además de salvado de trigo (Figura 22). De hecho, Valencia-Arteaga (2018) indicó

la presencia de cepas de *Bacillus subtilis* en frutos de tomate con acción antagónica frente al hongo *Fusarium oxysporum*, debido probablemente a la producción de metabolitos secundarios de *Bacillus subtilis* con acción antifúngica como la Iturina A y la fengicina.

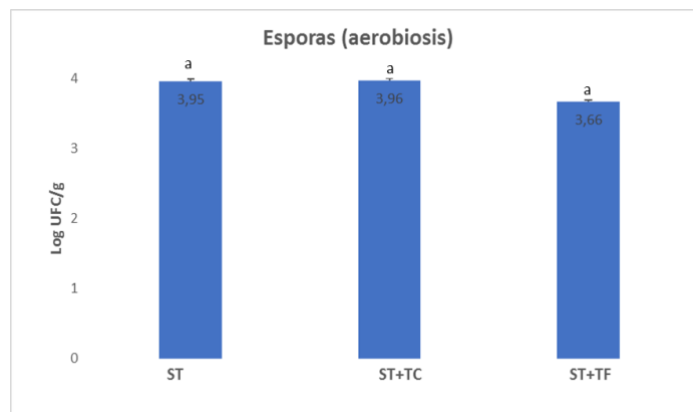
Otros estudios reflejan que distintas partes del propio fruto del tomate poseen compuestos con actividad antimicrobiana (Lara et al., 2020). Subproductos de la producción del tomate, como las hojas, contienen varios metabolitos secundarios bioactivos como, por ejemplo, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, terpenos y esteroides. Estos metabolitos se asocian con actividad antimicrobiana (Taveira et al., 2012). De hecho, de acuerdo con lo descrito por Fuertes-Ruitón (1998), los flavonoides y alcaloides son moléculas que presentan inhibición frente a bacterias grampositivas y gramnegativas. Esto es debido a la presencia en la estructura de los flavonoides de hidróxilos fenólicos, que penetran la membrana celular bacteriana y desnaturalizan las proteínas protoplasmáticas. Además, también se describe que la acción antibacteriana de los alcaloides puede deberse a la presencia de nitrógeno en su estructura, en forma de amina o amida (Zeng et al., 2019). Los terpenos, por su parte, confieren una mayor actividad antimicrobiana *in vitro* por la perturbación de la doble capa fosfolipídica que producen en la membrana plasmática, lo que conlleva a una alteración de la permeabilidad celular (Mewalal et al., 2017).

Otros estudios apoyan la actividad específicamente antifúngica del tomate, en concreto frente a las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii*, así como frente a otras especies consideradas levaduras alterantes de los alimentos (Patelin et al., 2019).

En las siguientes gráficas, Figuras 23 y 24, se muestran los recuentos de bacterias formadoras de endosporas, en condiciones anaerobias y aerobias, respectivamente.



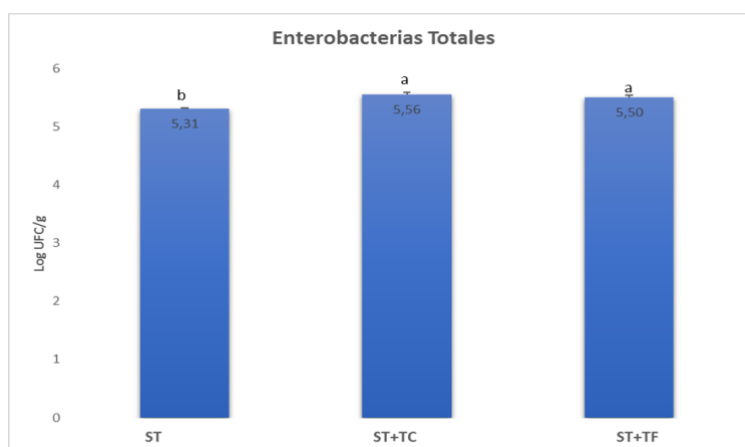
**Figura 23.** Recuento de esporas con capacidad de germinar en condiciones anaerobias de incubación para cada tratamiento aplicado (ST: salvado de trigo; ST+TC: salvado de trigo más tomate congelado; ST+TF: salvado de trigo más tomate fresco), expresado en Log de UFC/g. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 24.** Recuento de esporas con capacidad de germinar en condiciones aerobias de incubación para cada tratamiento aplicado (ST: salvado de trigo; ST+TC: salvado de trigo más tomate congelado; ST+TF:salvado de trigo más tomate fresco), expresado en Log de UFC/g. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los menores recuentos observados en condiciones anaerobias corresponden al tratamiento a base exclusivamente de ST (Figura 23), mientras que en condiciones aerobias no se observaron diferencias significativas de recuentos entre los distintos tratamientos. La potencial presencia de especies de *Bacillus* en tomate, antes citada, podría suponer un aumento en el número de esporas en sustratos a base de tomate, ya que estas especies bacterianas tiene capacidad para crecer en condiciones tanto de presencia de oxígeno como en microaerofilia y corresponden a un género eminentemente productor de esporas.

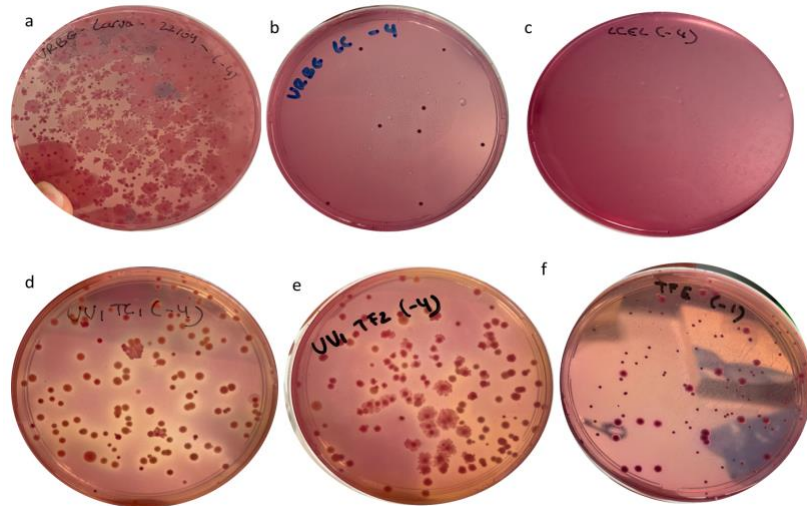
Finalmente, en el análisis de los sustratos alimenticios empleados en este ensayo, se observó la presencia de Enterobacterias totales en el medio selectivo VRBG (Figura 25).



**Figura 25.** Recuento de Enterobacterias Totales para cada tratamiento aplicado (ST: salvado de trigo; ST+TC: salvado de trigo más tomate congelado; ST+TF:salvado de trigo más tomate fresco), expresado en Log de UFC/g. Distintas letras indican la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 25 se observa como en los tratamientos suplementados con tomate aumentaron los recuentos de enterobacterias, respecto al tratamiento exclusivamente a

base de ST. Esto podría explicarse, como se mencionó anteriormente, debido a la presencia habitual de enterobacterias en plantas de tomate, probablemente proveniente de las aguas de riego o incluso de la proliferación de este tipo de bacterias en el ambiente natural (Guo et al., 2001; Luna et al., 2006; Luna-Guevara et al., 2012).



**Figura 26.** Colonias de enterobacterias en medio VRBG. a) Larva sin tratamiento (-4). B) larva con ayuno congelada (-4). C) Larva ayuno congelada escaldada liofilizada (-4). D) Larva alimentada con tomate congelado escaldado UV1 (-4). e) Larva tomate fresco ultravioleta 1 (-4). f) Larva tomate fresco escaldada liofilizada (-1).

Como ocurrió con el ensayo anterior a pequeña escala, en este caso, tras el estudio de los grupos microbianos de interés asociados a las larvas que crecieron en base a los distintos sustratos analizados, tampoco se encontró la presencia de morfotipos sospechosos de corresponder al género *Salmonella*, pero sí de la especie *Listeria monocytogenes*.

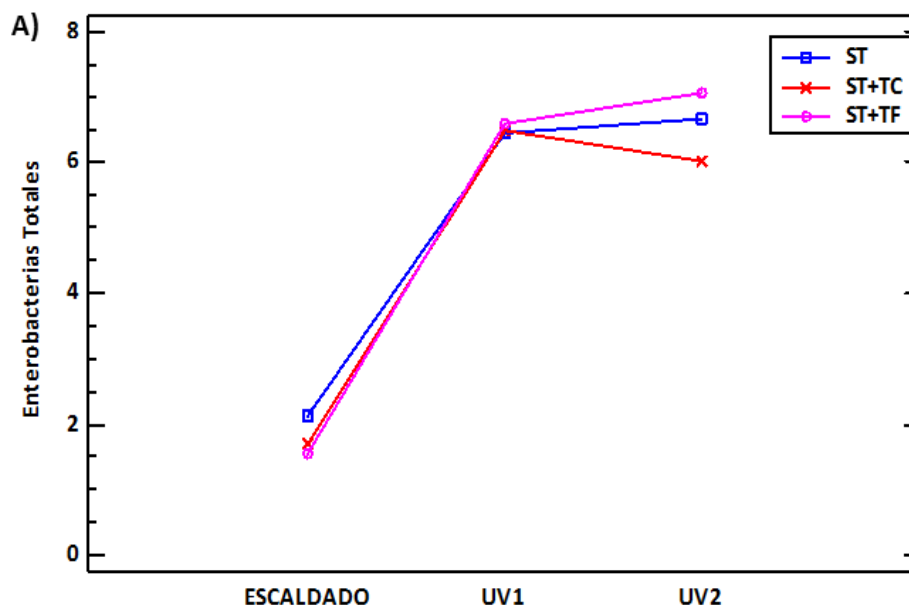
#### **4.3.2. Análisis microbiológico en función de los distintos tratamientos de higienización empleados**

Las diferentes metodologías para conservar los alimentos tienen como objetivo aumentar su vida útil durante el periodo de almacenamiento. Esto se realiza mediante la aplicación de técnicas que evadan las alteraciones microbiológicas del producto y mantengan su calidad. Así mismo, es importante el cuidado de la higiene durante el proceso de producción, con la intención de disminuir la carga microbiana e impedir su desarrollo posterior. Para este fin, muchos productos se tratan mediante técnicas que utilizan la temperatura, con el inconveniente de la merma en las características sensoriales y nutricionales de determinados alimentos. Es por esto último que se están estudiando actualmente el uso de las denominadas “tecnologías suaves” que se caracterizan por ser poco agresivas y no alterar, en la medida de lo posible, las características organolépticas deseables por el productor y consumidor del alimento en cuestión.

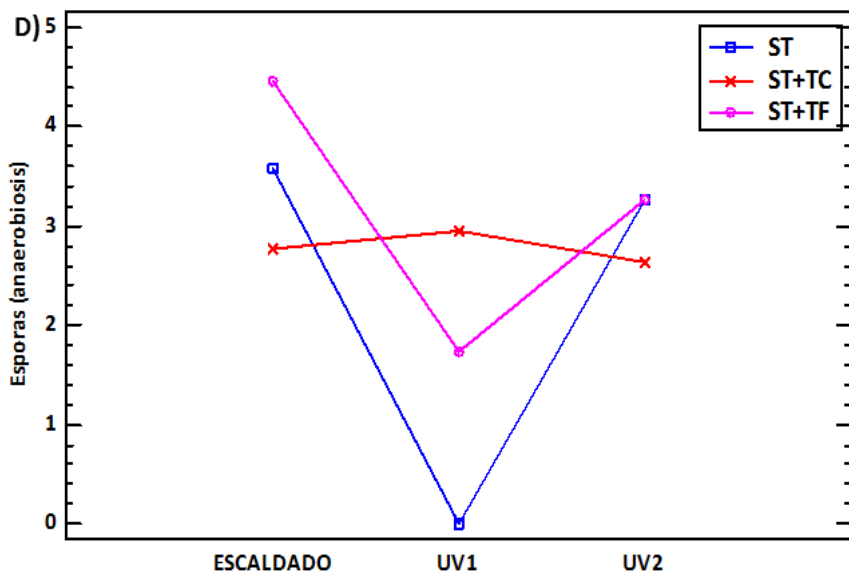
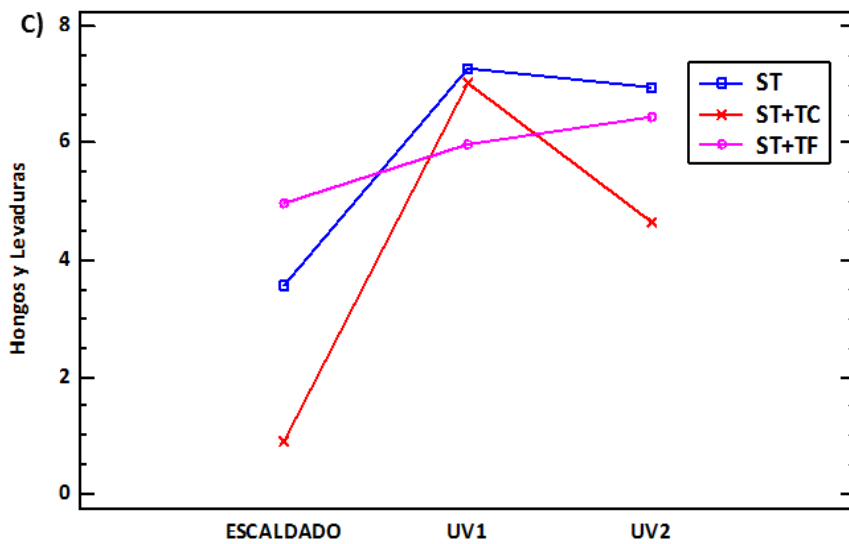
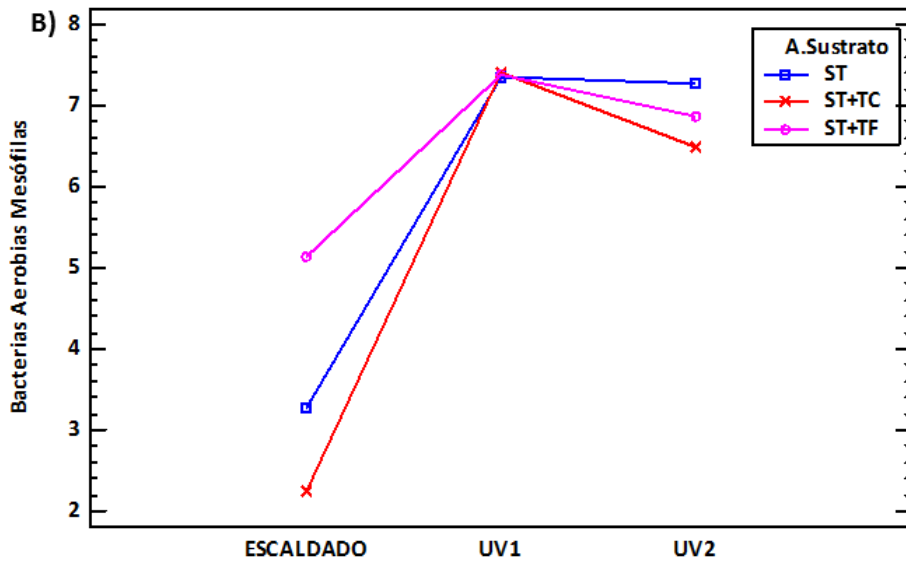
Una de las opciones planteadas es el tratamiento con luz UV. Esta técnica de higienización se ha empleado con éxito sobre la superficie de distintos tipos de carne, antes de su refrigeración, para reducir la carga microbiana en dos o tres unidades logarítmicas (dependiendo de la dosis aplicada). En este caso, como inconveniente, se podrían generar sustancias iniciadoras de la oxidación del alimento, por lo que existiría el riesgo de que las características organolépticas del producto se vieran modificadas. (Guerrero-Beltrán et al., 2004). Otra de las opciones a tener en cuenta en los procesos de higienización de alimentos es el escaldado, ya que ha demostrado ser eficaz para garantizar la inocuidad del producto, además de para conservar o aumentar los compuestos bioactivos. No obstante, los alimentos resultantes de la transformación pueden verse afectados tanto a nivel sensorial como nutricional, debido a una inadecuada aplicación de este tratamiento de higienización en lo que se refiere al tiempo aplicado.

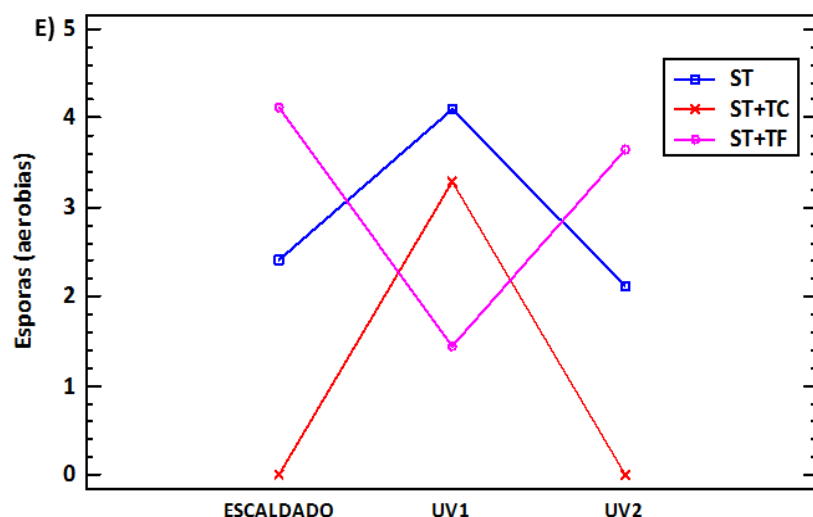
El escaldado es el tratamiento térmico utilizado previamente a procesos como el secado, liofilización o congelación. Suele comprender temperaturas entre 70-100°C y tiempos entre 1 y 10 minutos. Hay diversos tipos de escaldado, siendo el escaldado con agua caliente el más empleado a nivel comercial, ya que es sencillo de establecer y fácil de operar.

En este ensayo, empleando los diferentes sustratos antes analizados, y en las mismas condiciones de ayuno previo a la congelación, se llevó a cabo adicionalmente una caracterización microbiológica de las larvas para evaluar la eficacia de tres métodos de higienización distintos: radiación UV1 (1,2 KJ/m<sup>2</sup>), radiación UV2 (3,1 KJ/m<sup>2</sup>) y escaldado (Figura 26).









**Figura 26.** Gráficos de interacción de los resultados derivados de los recuentos de los distintos grupos microbianos estudiados, analizando la variable Log UFC/g respecto a la interacción Tratamiento (Escaldado; UV1; UV2) x Sustrato empleado (ST: salvado de trigo; ST+TC: salvado de trigo más tomate congelado; ST+TF: salvado de trigo más tomate fresco). A) Enterobacterias Totales; B) Bacterias Aerobias Mesófilas; C) Hongos y Levaduras; D) Esporas (anaerobiosis); E) Esporas (aerobiosis).

En los ensayos llevados a cabo en el presente trabajo, no se vio una notable reducción de la carga microbiana tras el empleo de las radiaciones UV (UV1 y UV2), en el caso de las Bacterias Aerobias Mesófilas y las Enterobacterias Totales, independientemente del tipo de sustrato nutricional empleado. Por otro lado, el escaldado resultó mucho más efectivo, en el caso de las Bacterias Aerobias Mesófilas, grupo que se llegó a reducir en hasta 5 unidades logarítmicas (Figura 26a, b), respecto al ensayo anterior (Figura 21). Los recuentos referentes a Hongos y Levaduras, siguieron una tendencia similar a lo anteriormente descrito, excepto en el caso de las larvas procedentes del sustrato ST+TC donde el tratamiento UV2 presentó mayor eficacia que para el resto de sustratos empleados, siendo el escaldado, en cualquier caso, la mejor opción.

Por su parte, el estudio sobre las bacterias capaces de esporular es más heterogéneo, incluso llegando a ofrecer mejores resultados el tratamiento UV1, en el caso de esporas capaces de germinar en condiciones anaerobias (Figura 26d), y el UV2, en el caso de esporas capaces de germinar en condiciones anaerobias (Figura 26e), excepto para las larvas alimentadas con tomate fresco, en cuya caso UV1 funcionó mejor como tratamiento higienizante. Aunque el escaldado dio buenos resultados para la eliminación de esporas en algunos de los casos, es lógico que, tratándose de estructuras de resistencia a diferentes factores físicos y químicos, incluido el calor y la radiación, existiera mayor variabilidad en los resultados concernientes a los organismos esporulados.

Como en los experimentos anteriores, en este caso también se estudió la presencia/ausencia de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Sólo para el tratamiento de escaldado, en todas las condiciones estudiadas, se consiguió eliminar *L. monocytogenes*,

lo cual refuerza aún más el potencial de este tratamiento de higienización en procesos de la industria alimentaria. Esto podría deberse a algún error dependiente de los factores críticos del tratamiento por UV sobre la inactivación microbiana. Además, la eficacia de la tecnología de ultravioleta está directamente relacionada con factores intrínsecos y extrínsecos del alimento, afectando a la acción microbiana y conservante de este método. Como propuesta de mejora, en este sentido, podría emplearse una dosis de destrucción microbiana diferente, ya que la utilizada resultó insuficiente. Otro factor a tener en cuenta es el tiempo de acción que, como en cualquier otra técnica de higienización, es trascendental para asegurar un buen funcionamiento de la técnica. En algunas frutas se ha comprobado que un tiempo de exposición de 10 minutos muestra resultados mayores que un tiempo de 5 minutos (González-Aguilar et al., 2007). El siguiente factor a mencionar es la distancia entre el producto y la lámpara de luz ultravioleta, ya que el equipo ha de encontrarse lo más próximo posible al producto durante el tiempo de tratamiento, debido a que la distancia es inversamente proporcional a la intensidad (Suárez, 2001). Igual de importante se considera la longitud de onda utilizada, ya que las longitudes de onda con una mayor acción bactericida son las próximas a 260 nm. La efectividad germicida de la luz UV puede variar entre especies de microorganismos. Otro factor a considerar es la composición del alimento, ya que la constitución del objeto irradiado, influye de manera significativa en la eficacia del tratamiento, además, cabe mencionar que un incremento en la cantidad de sólidos puede causar una disminución en la penetración de la radiación y que la presencia de grandes partículas suspendidas puede bloquear la incidencia de la luz sobre la población microbiana (Millán Villaruel et al., 2015). Esto último pudo ocurrir en el caso de las bandejas de larvas donde unos insectos se superponen sobre otros impidiendo la incidencia adecuada de la luz UV, llegando a desinfectar sólo aquellas situadas en la superficie. De este modo, una gran parte de los microorganismos pueden quedar protegidos por sólidos. No obstante, algunos autores han referido la capacidad de algunos microorganismos para revertir los efectos destructivos de la luz UV-C mediante mecanismos de fotoreactivación, lo que también podría ser una explicación para los resultados obtenidos en este ensayo (Domínguez y Perzanese, 2017).

El escaldado, por su parte, ha demostrado su eficiencia en la eliminación de microorganismos que causan contaminaciones. Principalmente, en mohos, levaduras y algunas bacterias. Esta destrucción microbiana ocurre según Frazier y Westhoff (1993) como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas por la acción del calor y, sobre todo, de la inactivación enzimática que requieren para el desarrollo de sus actividades metabólicas. De hecho, el escaldado afecta la actividad de determinadas enzimas microbianas como las peroxidasas y polifenoloxidasas (Tao et al., 2013). Con este proceso también se observa un cambio de tonalidad del producto, lo cual se puede utilizar como un indicador del cambio de calidad del producto durante el escaldado. Todas estas condiciones que producen cambios sensoriales y nutricionales en los productos, no son deseadas. No obstante, no es el caso de esta técnica sobre los productos analizados, larvas de *T. molitor*, sobre las que se observó la fijación del color natural de los insectos (Figura

27), dando una mejor apariencia para el consumidor. Así mismo, se asocia con una abstracción de sabores y olores indeseables de la materia prima analizada.



**Figura 27.** A la izquierda larvas con escaldado previo y liofilización. A la derecha larvas con tratamiento ultravioleta.

Como en el caso de la luz UV, para eliminar los microorganismos de un alimento, el calor aplicado ha de llegar a todos los puntos de este. El “centro geométrico” de la masa del alimento es el lugar en el cuál se encuentra la región que suele tomar más tiempo en calentarse, denominándose punto frío. Se trata de una región crítica en la cual hay gran posibilidad de que los microorganismos sobrevivan. Un tratamiento térmico que alcance este punto, garantizará que todos los demás puntos del alimento o recipiente alcanzaron la misma temperatura (Bryan, 1992).

El proceso seguido en este trabajo coincide con el modo de proceder propuesto por la Plataforma Internacional de Insectos para Alimentos y Piensos (IPIFF), donde se indica que los insectos deben procesarse mediante técnicas de sacrificio (calentamiento o congelación) y tras el sacrificio llevar a cabo un secado y triturado para facilitar la alimentación animal. La incorporación del escaldado, mejora los resultados de calidad y seguridad del producto a nivel alimenticio. Por lo que, los pasos aquí establecidos son cruciales tanto para garantizar la seguridad, como para mantener la composición de nutrientes. El proceso de mortandad engloba escaldar, congelar, enfriar y secar. Todo este procesado permite el almacenamiento a largo plazo y el transporte de las larvas de *T. molitor* con seguridad desde el punto de vista microbiano. Diversos investigadores han pretendido hallar el método óptimo para afianzar la seguridad y el valor nutricional. Vandeweyer et al. (2017) sugirió escaldar antes de enfriar o secar ya que el escaldado consigue matar las células vegetativas y previene el crecimiento microbiano durante el almacenamiento. Después del sacrificio, el secado es importante debido al alto contenido de humedad de las larvas (aproximadamente 68%). Este alto contenido de humedad puede causar degradación enzimática o no enzimática y deterioro microbiológico, ya que dichas condiciones favorecen la proliferación microbiana.

Tras los resultados analizados, se pudo confirmar que el gusano amarillo de la harina (*T. molitor*), puede consumir desechos orgánicos de plantas (tomate de destrío) y producir piensos ricos en proteínas basados en sistemas de bioeconomía. Además, el producto

obtenido tras el desarrollo del presente TFM, tiene potencial para ser utilizado como alimento para mascotas, así como para la industria ganadera (Ramos-Elorduy et al., 2002), además podría considerarse su uso en alimentación humana, tal como ha estimado la FAO y diversos investigadores expertos en la materia (FAO,2013; Huis, 2013; Siemianowska et al., 2013).

En este trabajo se ha observado cómo las crías de *T. molitor* tienen ventajas sobre la cría de otros muchos animales de ganado: destacan por sus buenas composiciones nutricionales, tal como afirman otros autores (Siemianowska et al., 2013); puede alcanzar una alta tasa de crecimiento y una tasa de bioconversión en condiciones de crianza de alta densidad; son fáciles de criar y, por lo tanto, se pueden producir a gran escala, lo que reduciría los costes de mano de obra, entre otras, estos hechos han sido observados en trabajos anteriores (Vantomme et al., 2012).

#### 4.4. Caracterización nutricional de la harina elaborada a partir de larvas seleccionadas de *T. molitor*: Contenido en lípidos y proteínas

A partir de las larvas seleccionadas por presentar los mejores resultados de crecimiento, en este caso, aquellas alimentadas a base salvado de trigo y tomate fresco, se elaboró un producto alimenticio (harina) cuyo destino final potencial sería la industria ganadera.

En las siguientes tablas se recogen los datos obtenidos de la caracterización proteica (Tabla 12) y lipídica (Tabla 13) de las harinas elaboradas a partir de las larvas seleccionadas en el ensayo anterior (apartado 4.3).

**Tabla 12.** Información proteica de las larvas seleccionadas

Larva	% Proteína total
Salvado trigo	46,6 ± 0,460 <sup>a</sup>
Tomate	47,7 ± 1,05 <sup>a</sup>

Valores presentados en masa seca con  $\pm$  desviación estándar, n=3.; diferentes letras indican diferencias significativas entre el tipo de alimentación aplicado dentro de una misma especie.

Para la caracterización del perfil lipídico de cada aceite extraído con acetato de etilo se calculó el porcentaje de área de cada pico obtenido en el cromatograma, lo que permitió evaluar en qué proporción se encontraba cada ácido graso en la muestra.

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos para las distintas muestras de *T. molitor*.

**Tabla 13.** Perfil lipídico obtenido para las muestras de *T. molitor*.

Ácido graso	Salvado de trigo	Tomate
C12	0,14 ± 0,050	0,13 ± 0,020
C14	16,4 ± 0,0800	1,95 ± 0,0500
C16	1,29 ± 0,0100	16,8 ± 0,300

<b>C16:1n9</b>	2,33 ± 0,130	1,63 ± 0,0400
<b>C18:1n9</b>	33,9 ± 0,600	1,48 ± 0,0100
<b>C18:1n7</b>	42,1 ± 0,250	38,8 ± 0,650
<b>C18:2n6</b>	1,79 ± 0,0100	37,1 ± 0,230
<b>C18:3n3</b>		1,73 ± 0,0200

El contenido en lípidos y proteínas de las harinas se vio afectado por la dieta suministrada a las larvas de *T. molitor*. Respecto al contenido proteico, las larvas alimentadas con salvado de trigo mostraron valores más bajos en comparación con las alimentadas a base de tomate. Las composiciones químicas de las larvas confirman datos ya publicados y, en particular, que la composición de éstas muestra plasticidad en relación con la dieta suministrada (Mancini et al., 2019). Estos resultados reflejan que, a pesar de tratarse de un material inicialmente considerado un residuo, los tomates de destrío se postulan como una fuente potencial de nutrientes de calidad que favorece el establecimiento de sistemas de producción de alimentos basados en economía circular.

## 5. CONCLUSIONES

En base a los resultados descritos en el presente trabajo, se extrajeron las siguientes conclusiones:

- 1) Una cantidad mínima de sustrato básico para alimentación de insectos de 0,15 g de salvado de trigo/larva, es suficiente para un adecuado crecimiento y supervivencia de las larvas de *T. molitor*, lo cual permite disminuir los costes de producción del sistema de cría de este tipo de insecto.
- 2) Las larvas de *T. molitor*, a pesar de alcanzar un peso adecuado tanto sometidas a un fotoperiodo correspondiente a 8 horas de luz y 16 de oscuridad, así como desarrollando todo su ciclo de vida productivo en oscuridad, es en este último caso donde el número de individuos supervivientes es mayor. Este hecho nos permite concluir que el éxito del ciclo de vida productivo de *T. molitor* es dependiente de la luz. Por otro lado, permite abrir futuras líneas de investigación en relación al tipo de luz más idóneo para la cría de insectos.
- 3) El empleo de residuos procedentes de la industria agroalimentaria empleados en este trabajo como suplemento a una dieta estándar de salvado de trigo, mejora el contenido nutricional del producto final, así como incide positivamente en la disminución de la carga microbiana de los organismos empleados como materia prima para la elaboración de alimentos.
- 4) Las técnicas de higienización empleadas en este trabajo son adecuadas para su aplicación en productos destinados a la industria alimentaria, siendo el escaldado la opción más económica y eficiente en este caso, incluso llegando a eliminar *L. monocytogenes* persistente en el resto de ensayos. Además, no sólo disminuye satisfactoriamente la carga microbiana del alimento, sino que

favorece la adquisición de unas condiciones organolépticas deseables desde el punto de vista del consumidor final.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M.R y MOSS, M.O (2000). "Food microbiology". *Royal society of chemistry. (Cambridge, London). pp. 1-386.*
- ADAMS, M.R. y MOSS, M.O. (2008) "Bacterial agents of foodborne illness" *Food Microbiology. RSC Publishing. (Cambridge, UK). Capítulo 7, pp. 182-269.*
- ALEXANDER, P.; BROWN, C.; ARNETH, A., DIAS, C. FINNINGAN J.; MORAN D. y ROUNSEVELL, M. D.A (2017). "Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use". *Global Food Security. Vol.15 pp. 22-32.*
- ALVES, A.V.; SANJINEZ-ARGADOÑA, E.J.; LINZMEJER, A.M.; CARDOSO, C.A.L., y MACEDO, M.L.R (2016). *Food Value of Mealworm Grown on Acrocomia aculeata Pulp Flour. PLOS ONE 11(3).*
- ANIEBO, A.O; OWEN, O.J. "Effects of age and method of drying on the proximate composition of housefly larvae (*Musca domestica* Linnaeus) meal (HFLM). *Pakistan journal of Nutrition. Vol.9(5) pp.485-487.*
- ARAÚJO, R.R.S.; DOS SANTOS BENFICA, T.A.R.; FERRAZ V.P. y SANTOS E.M. (2019). "Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil". *Journal of Food Composition and Analysis. Vol.76, pp.22-26.*
- AVENDAÑO, C.; SÁNCHEZ, M.; y VALENZUELA, C. (2020). "Insects: an alternative for animal and human feeding." *Revista chilena de nutrición, vol.47(6), pp.1029-1037.*
- BELLUCO, S.; LOSASSO, C.; MAGGIOLETTI, M., ALONZI, C.C.; PAOLETTI, M.G.; RICCI, A. (2013). "Insectos comestibles desde la perspectiva de la seguridad alimentaria y la nutrición: una revisión crítica". Vol. 12, pp.296-313.
- BERG, J.; WENDIN, K.; LANGTON, M.; JOSELL, A. y DAVIDSSON, F. (2017) "State Of The Art Report: insects as food and feed". *Annals of Experimental Biology. Vol.5(2) pp. 1-9.*
- BYRNE, J. (2021). Los insectos como alimento: desarrollos legislativos de la UE por delante.
- BLAS, C.D.; MATEOS, G.G. y GARCÍA, R.P. (2010). "Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos". *Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (Madrid, España).*
- BUBLER, S.; STEINS, V.; EHLBECK, J y SCHLÜTER, O. (2015). "Impacto del tratamiento térmico frente al procesamiento con plasma atmosférico en frío sobre las propiedades proteicas tecnofuncionales de *Pisum sativum* "Salamanca". *Journal of food engineering. Vol.167 pp.166-174*
- BRYAN, F. L. (1992). "Evaluaciones por análisis de peligros en puntos críticos de control: guía para identificar peligros y evaluar riesgos relacionados con la preparación y la conservación de alimentos" *Organización Mundial de la Salud.*
- CAPARROS, M.R.; SABLON, L.; GEUENS, M.; BROSTAU, Y.; ALABI, T.; BLECKER, C. y FRANCIS, F. (2014). "Edible insects acceptance by Belgian consumers: promising attitude for entomophagy development". *Journal of Sensory Studies. Vol.29(1), pp. 14-20.*



- CASTRO-RIOS, K. (2011) Tecnología de alimentos. Recursos electrónicos. Bogotá. Ediciones de la U.
- CRUZ, C.J.F (2020) “Diseño e implementación de un sistema de monitoreo de la radiación ultravioleta en la ciudad de Arequipa” Trabajo de Fin de Grado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Arequipa, Perú.
- DAR, W.D y LAXMIPATHI GOWDA, C.L. (2013). “Disminución de la productividad agrícola y seguridad alimentaria mundial”. *Revista de Mejoramiento de Cultivos*. Vol.27(2) pp.242-254.
- DOBERMANN, D.; SWIFT, J. y FIELD, L. (2017). “Oportunidades y obstáculos de los insectos comestibles para alimentos y piensos”. *Boletín de Nutrición*. Vol. 42(4) pp. 293-308.
- DOMÍNGUEZ, A. y PERZANESE, M. (2017). “Luz ultravioleta”. *Alimentos argentinos*, pp. 71-76.
- EL SALOUS, I. A. (2021). “Análisis comparativo de la pasteurización de la leche entre el tratamiento térmico y luz ultravioleta para la elaboración del yogurt”. Trabajo de Fin de Doctorado. Universidad Agraria del Ecuador. Ecuador.
- ENGEL, P. y MORA, N.A. (2013). “La microbiota intestinal de los insectos: diversidad en estructura y función”. *FEMS Microbiol*. Vol. 37, pp. 699-735.
- FAO, 2013. Insectos comestibles: perspectivas futuras para la seguridad alimentaria y de piensos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. pp. 67–79.
- FRAZIER, WC; WESTHOFF, DC. (2003). Food Microbiology. 4th edition McGrawHill, India. Pp.700.
- FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. y VERGÉS, M. R. (1993). “Microbiología de los alimentos”. *Microbiología de los alimentos* pp. 681-681.
- GAHUKAR, R. (2011). “Entomophagy and human food security”. *International Journal of Tropical Insect Science*. Vol.31(3) pp.129-144.
- GAHUKAR, R. (2016). “Edible insects farming: efficiency and impact on family livelihood, food security, and environment compared with livestock and crops”. *Insects as sustainable food ingredients*. Vol.4 pp. 85-111.
- GARCÍA-HURTADO, M. (2012). *Higiene general en la industria alimentaria: operaciones auxiliares de mantenimiento y transporte interno de la industria alimentaria*. IC Editorial. Antequera, Málaga.
- GARCÍA, R.; TORRES, J.M.; PINTO, A.D.; GONZÁLEZ, J.A.; RENGEL J.E. y PÉREZ N.A. (2017). “Diseño de una estrategia de control difuso aplicada al proceso de ultracongelación de alimentos”. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*. Vol.25(1) pp. 70-84.
- GONZÁLEZ, D.; GRABOWSKI, N.; BARBA, J. y GALVÁN, D. (2018). “Evaluación de tratamiento térmico de insectos comestibles (*Acheta domesticus*, *Locusta migratoria* y *Gryllus assimilis*) utilizando un test comercial de fosfatasa alcalina”. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*. Vol.4
- GRABOWSKI, N.T y KLEIN, G.(2017). “Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*)

- submitted to four different heating treatments”. *Food Science and Technology International*. Vol.23(1), pp.17-23.
- GRAU, T.; VILCINSKAS, A. y JOOP, G. (2017). “Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed”. *Zeitschrift für Naturforschung C*. Vol. 72, no 9-10, pp. 337-349.
- GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; ZAVALA-GATICA, R. y TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E. (2007). “Mejorando la calidad poscosecha de mango 'Haden' mediante tratamiento UV-C.” *Biología y tecnología poscosecha*. Vol. 45 (1), pp. 108-116.
- GOUVEA, M.M.; LIMA, G.S.; SILVA, N.A.A.; PEREIRA, N.A.D. y MARQUES, F.F.D.C (2014). “Aplicación de radiación ultravioleta como forma de contribución para una química verde y construcción de un reactor fotoquímico alternativo y de bajo coste para pre tratamiento de amostras”. *Quimica Nova*. Vol.37, pp.337-343.
- GUERRERO-BELTRÁN, J.A y BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. (2004). “Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light”. *Food SCI technol int*. Vol.10, pp.137-148
- GUERRERO, P.P.; SÁNCHEZ, F. G.; SABORIDO, D. G. y LOZANO, I. G. (2014). “Infecciones por enterobacterias”. *Medicine. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. Vol.11(55), pp. 3276-3282.
- GUO, X.; CHEN, J.; BRACKETT, R.E. y BEUCHAT, L.R. (2001). “Survival of *Salmonellae* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening”. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 67, pp.4760-4764.
- HALLORAN, A.; MUENKE, C.; VANTOMME, P y VAN HUIS, A. (2014) “Los insectos en la cadena alimentaria humana: Situación mundial y oportunidades”. *Food Chain*. Vol.4(2) pp. 103-118
- HUESCA-ESPITIA, L.C.; SÁNCHEZ, SALAS, J.L.; y BANDALA, E.R. (2014). “Métodos para la inactivación de esporas en alimentos”. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. Vol.8 (1) pp. 48-67.
- HUIS, AV. (2013). Potencial de los insectos como alimento y pienso para garantizar la seguridad alimentaria.
- KIM, Y.; CHOI, Y.; KIM, S.; PARK, J.; CHUNG, M.; SONG, K.B. y PARK, J. (2009). “Desinfección de lechuga iceberg por reacción fotocatalítica de dióxido de titanio-UV”. *Journal of food protection*. Vol.72(9), pp.1916-1922.
- KIM, J.; KIM, K. y YU, B. (2018). “Optimization of Antioxidant and Skin-Whitening Compounds Extraction Condition from *Tenebrio molitor* Larvae (Mealworm)”. *Molecules*. Vol.23(9), pp.2340.
- KLUNDER, H.C.; WOLKERS, R.J.; KORPELA, J.M. y NOUT, M.J.R (2014) “Microbiological aspects of processing and storage of insects”. *Food Control*. Vol.26(2), pp-628-631.
- LARA, Y.D.M.; MORALES, P.A.; GARZÓN, J.S. y OLAYA, J.F.P. (2020). “Componentes bioactivos del tomate y su posible poder antimicrobiano: estudio in vitro”. *Revista Cubana de Medicina Natural y Tradicional*. Vol.3.

- LI, L.; XIE, B.; DONG, B.; WANG, M. y LIU, H. (2016). "Can closed artificial ecosystem have an impact on insect microbial community? A case study of yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) *Ecological Engineering*. Vol.86 pp. 183-189.
- LOU, Y. y YOUSEF, A.E. (1999). "Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors". *Listeria, listeriosis and food safety*. Vol.2, pp.131-224.
- LUIS, S.T.; RAMÍREZ, J.A.; LAMELA, C.P.; VÁZQUEZ, M., y GÁNDARA, J.S. (2001). "Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos". *Ciencia y tecnología alimentaria*. Vol. 3(2), pp.66-80
- LUNA, G.M.L; LUNA, G.J.J; SPENCER, M. (2006). "El ABC para la seguridad alimentaria en los hogares". *Educación y cultura*. Pp. 74-77.
- LUNA-GUEVARA, M.L., DELGADO-ALVARADO, B.A.; HERRERA-CABRERA, E.; TORRES, A. G.; AVELINO-FLORES, F.; NAVARRO, OCAÑA, A. y PARADA, GUERRERA, F. (2012). "Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (*Lycopersi-cum sculetum* Mill) y suelos de invernadero. *Scientia Agropecuaria*. Vol. 3(2) pp. 161-169.
- MAKKAR, H.P.S; TRAN, G.; HEUZ, V. y ANKERS, P. (2014). "State of-the-art on use of insects as animal feed". *Animal Feed Science and Technology*. Vol.197 pp.1-33.
- MANCINI, S.; PACI, G.; CIARDELLI V.; TURCHI, B.; PEDONESE, F. y FRATINI, F. (2019). "Listeria monocytogenes contamination of *Tenebrio molitor* larvae rearing substrate: Preliminary evaluations". *Food microbiology*. Vol. 83, pp. 104-108.
- MANCINI, S.; FRATINI, F.; TURCHI, B.; MATTIOLI, S.; DAL BOSCO, A.; TUCCINARDI, T.; NOZIC, S. et al (2019). "Former Foodstuff Products in *Tenebrio Molitor* Rearing: Effects on Growth, Chemical Composition, Microbiological Load, and Antioxidant Status". *Animals*. Vol.9 (8), pp. 484.
- MAXIN, P.; HUYSKENS, KEIL, S.; KLOPP, K. y EBERT, G. (2004). "Control of postharvest decay in organic grown apples by hot water treatment". *V International Postharvest Symposium*, vol.682, pp.2153-2158.
- McCARTHY, SA.; MOTES, ML y McPHEARSON, RM (1990). "Recuperación de *Listeria monocytogenes* estresada por calor de camarones contaminados experimental y naturalmente." *Revista de protección de alimentos* , vol.53 (1), pp.22-25.
- MELÉNDEZ, GUERRERO. (2001). "Ecología trófica de la comunidad de Anuros del parque Nacional Yasuni en la Amazonia Ecuatoriana".
- MELGAR-LALANNE, G.; HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, A.J. y SALINAS-CASTRO, A. (2019). "Edible insects processing: Traditional and innovative technologies". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 18(4), pp. 1166-1191.
- MENDEZA, LAINEZ, E. (2017). *Influencia de diferentes dietas en la composición nutricional del insecto comestible Tenebrio molitor y estudio de su pardeamiento*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Pública de Navarra. Navarra, España.
- MEWALAL, R.; RAI, D.; KAINER, D.; CHEN, F.; KÜLHEIM, C.; PETER, G. y TUSKAN, G.A. (2017). "Plant-derived terpenes: A feedstock for speciality biofuels." *Trends in biotechnology*, vol.35(3), pp.227-240.

- MIGLIETTA, P.P.; DE LEO, F.; RUBERTI, M. y MASSARI, S. (2015). "Mealworms for food: A water footprint perspective". *Water*. Vol. 7(11), pp.6190-6203.
- MILLÁN VILLARROEL, D.; ROMERO GONZÁLEZ, L.; BRITO, M. y RAMOS-VILLARROEL, A. Y. (2015). "Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas." *Saber*. Vol. 27(3), pp. 454-469.
- MONDRAGÓN, I. y CONTRERAS, P.Y. (2015). "Uso de los insectos *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* y *Palembus dermestoides* (Coleoptera Tenebrionidae) como recurso didáctico en la enseñanza de las Ciencias Naturales". *Revista de Investigación*. Vol.39(86) pp.255-270.
- MONTOYA, L.E.H.; BURITICA, M.F.A.; IGUARÁN, E.C. y RÍOS, K.C. (2019) "Evaluación de conservación y procesamiento en la calidad físicoquímica y microbiológica de empanadas de maíz". *Alimentos Hoy*. Vol.27(46), pp.3-14.
- MÜLLER, A.; SEINIGE, D.; GRABOWSKI, N.T.; AHLFELD, B.; YUE, M. y KEHRENBERG, C. (2021). "Characterization of *Escherichia coli* from Edible Insect Species: Detection of Shiga Toxin-Producing Isolate. *Foods*. Vol.10(11), pp.2552.
- MUÑOZ, F.A.; ROJAS, R.M.; ORTEGA, A.M.; CAÑETE, J.E.M. y DÍAZ, R.G. (2016). "Nulo efecto bactericida de la radiación ultravioleta emitida por diodos LED". *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*. Vol.1(6), pp. 210-215.
- NAVA, A.L. (2020). IOP Conf. Ser: Medio ambiente terrestre.
- NOWAKOWSKI, A.C.; MILLER, A.C.; MILLER, M.E.; XIAO, H. y WU, X. (2022) "Potential health benefits of edible insects". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol.62 (13), pp. 3499-3508.
- OONINCX, D.G. y DE BOER, I.J. (2012). "Impacto ambiental de la producción de gusanos de la harina como Fuente de proteínas para los humanos: una evaluación del ciclo de vida". *PLoS One*. Vol.7 (12).
- OONINCX, D.G.; VAN ITERBEECK, J.; HEETKAMP, M.J.; VAN DEN BRAND, H.; VAN LOON, J.J. y VAN HUIS, A. (2010) An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PloS one*, Vol.5 (12).
- OTTAVIANI y AGOSTI. (2008). Agar *Listeria Monocytogenes* Selective acc. Guía de uso.
- PATEL, S.; SULERIA, H.A.R. y RAUF, A. (2019). "Edible insects as innovative foods: Nutritional and functional assessments". *Trends in Food Science & Technology*. Vol.86, pp. 352-359.
- PATELIN, J.M.C.; MONTIEL, L. G.; JUÁREZ, E.V. y USCANGA, M.G.A (2019). *Construcción de conocimiento multidisciplinario a partir de la educación y el emprendimiento*. Universidad del Papaloapan. Oaxaca, Mexico.
- PAYNE, C.L.R; SCARBOROUGH, P.; RAYNER, M. y NONAKA, K. (2016). "A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values". *Trends in Food Science & Technology*. Vol.47 pp.69-77.
- PERNICE, M.; SIMPSON, S.J. y PONTON, F. (2014). "Hacia una comprensión integrada de la microbiota intestinal utilizando insectos como sistemas modelo". *Fisiología de insectos*. Vol. 69, pp. 12-18.

- PUERTA, G.A. y MATEROS, R.F. (2010) “Enterobacterias. Enfermedades Infecciosas (III). Infecciones por anaerobios y enterobacterias. *Medicine*. Vol.10, pp. 3403-3473.
- RAMÍREZ MÉNDEZ, R.; ACOSTA, K.; ARENAS DE MORENO, L.; YAMARTE, M.; y SANDOVAL, L. (2010). “Efecto del escaldado sobre la calidad microbiológica de pulpa de guanábana (*Annona muricata* L.)” *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. Vol. 43(1).
- RAMOS, E. J.; GONZÁLEZ, E.A.; HERNÁNDEZ, A.R. y PINO, J. M. (2002). “Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens”. *Journal of economic entomology*. Vol.95(1), pp.214-220.
- REGLAMENTO (CE) n° 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiiformes transmisibles.
- REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- REGLAMENTO (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de noviembre de 2015, relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo y se derogan el Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1852/2001 de la Comisión (Texto pertinente a efectos del EEE). Bruselas (Bélgica). *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- REGLAMENTO (UE) 2017/2470 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2017, relativo a los nuevos alimentos, por el que se modifica el Reglamento (UE)”. Bruselas (Bélgica). *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- REYES, L.A y MELÉNDEZ, G.K. (2013). “Contenido de proteína, gracia, calcio, fosforo en larvas de escarabajo molinero”
- RINCÓN, D.; RAMÍREZ, R. y VARGAS, J. (2011) “Transmisión de *Salmonella* entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública”. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*. Vol.43 (2), pp. 167-177.
- RÍOS, K. C. (2011). *Tecnología de alimentos*. Ediciones de la U. Bogotá, Colombia.
- ROBLEDO, M.M.L.; ROJAS, G.A.; MEDINA, D.I.; BARRÓN, V.B.; ROMERO, B.C., RODRÍGUEZ, C.C. y GIRON, P.M. (2012). “Micotoxinas en Nayarit, México: Estudio de casos”. *Revista Bio Ciencias*. Vol.2(1)
- RODRIGUEZ, C. y PRADO, C. (2006). *Microbiología: lo esencial y lo práctico*. Organización Panamericana de la salud (UE). Pp. 248
- RODRÍGUEZ-CARREÓN, A.; ORTIZ-RIVERA, Y.; HERNÁNDEZ, P.C.C. y FIGUEROA, C. (2021). “Biodegradación de espumas plásticas por larvas de insectos: ¿una estrategia sustentable?” *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. Vol.24
- RUITÓN, C.M.F; ALCARAZ, M.R y VIDALÓN, M.T. (1998). Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* CC Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*. VolI (2) pp. 71-80.
- RUMPOLD, B.A y SCHLÜTER, O.K. (2013). “Composición nutricional y aspectos de seguridad de los insectos comestibles.” *Molecular Nutrition Food Resoruces*. Vol.57, pp. 802-823

- SANGUINETTI, A.; PABELLÓN, I. I. y CAMPOS, H. (2021). "Presence of the orchid *Sacoila lanceolata* (Orchidoideae: Cranichideae: Spiranthinae) within the limits of the city of Buenos Aires." *Trabajo de Investigación. Universidad de Buenos Aires*. Buenos Aires, Argentina.
- SAUCEDO, J.J.D. (2017). "Radiaciones, estudio de las incidencias de la obtención, ultravioleta (UV) en el proceso de agua envasada para mesa". *Trabajo de Fin de Grado. Universidad Nacional de Cajamarca*. Cajamarca, Perú.
- SIEMIANOWSKA, E.; KOSEWSKA, A.; ALJEWICZ, M.; SKIBNIEWSKA, K.; POLAK-JUSZCZAK, L.; JAROCKI, A. y JEDRAS, M. (2013). "Larvas del gusano de la harina (*Tenebrio molitor* L.)". *Europea food Agricultural Sciences*. Vol 4. Pp.287-291.
- SIKOROWSKI, P.P y LAWRENCE, A.M (1994). "Contaminación microbiana y cría de insectos. *Entomólogo estadounidense*". Vol. 40 (4), pp. 240-253.
- SUÁREZ, H.L.; BARRERA, Z.R.; y FORERO-SANDOVAL, A.F. (2016). "Evaluación de alternativa de secado en el proceso de elaboración de harina de lombriz". *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Vol.17(1), pp.55-71.
- TAO, Y. M.; YAO, L. Y.; QIN, Q. Y. y SHEN, W. (2013). "Purification and characterization of polyphenol oxidase from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulbs". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 61(51), pp. 12662-12669.
- TAVEIRA, M.; FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; OLIVEIRA, L.; VALENTAO, P. y ANDRRADE, P.B. (2012). "Fast determination of bioactive compounds from *Lycopersicon esculentum* mil leaves. *Food Chemistry*. Vol.135, pp. 748-755
- TORRES, K.J.; SIERRA, S.C.; POUTOU, R.A.; VERA, H.; CARRASCAL, A.K. y MERCADO, M. (2004) "Incidencia y diagnóstico de *Listeria Monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos". *Artículo técnico. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. Vol.7(1), pp. 27-39.
- TURNER, R.K.; GEORGIU, S.; CLARK, R.; BROUWER, R.; y BURKE, J.J. (2004). *Economic valuation of water resources in agriculture: From the sectoral to a functional perspective of natural resource management*. FAO Waters Reports. Roma, Italia.
- VALENCIA-ARTEAGA, C.S. (2018). *Ensayo bajo condiciones de invernadero de un product de Bacillus Sp. en plantas de tomate (Solanum lycopersicum)*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.
- VAN HUIS, A. (2013) "Potential of insects as food and feed in assuring food security". *Annual review of entomology*. Vol.58, pp. 563-583.
- VAN HUIS, A.; VAN ITTERBEECK, J.; KLUNDER, H.; MERTENS, E.; HALLORAN, A.; MUIR, G. y VANTOMME, P. (2013) "Insectos comestibles: perspectivas futuras para la seguridad alimentaria y de los piensos". *Documento forestal de la FAO. No. 171. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*. (Roma, Italia).
- VANDEWEYER, D.; CRAUWELS, S.; LIEVENS, B. y VAN CAMPENHOUT, L. (2017) "Recuentos microbianos de larvas de gusanos de la harina (*Tenebrio molitor*) y grillos (*Acheta domesticus* y *Gryllodes sigillatus*) de diferentes empresas de crianza y diferentes lotes de producción.

- VANTOMME, P.; MERTENS, E.; HUI, A.V. y KLUNDER, H. (2012). Informe resumido de la reunión de consulta técnica del 23 al 25 de enero de 2012: evaluación del potencial de los insectos como alimento y pienso para garantizar la seguridad alimentaria. FAO, Roma, Italia
- VÁSQUEZ, G.; GÓMEZ, E. y GAMBOA, E. (2007). “Condiciones higiénico sanitarias de los servicios de alimentación en Instituciones infantiles del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de Bucaramanga, Colombia”. *Revista Cachorro. Alimento. Nutrición*. Vol.17, pp. 23-33.
- VIESCA, G.F.C y ROMERO, C.A.T. (2009). “La entomofagia en Mexico. Algunos aspectos culturales”. *El Periplo Sustentable. Turismo y Desarrollo. Universidad Autónoma del Estado de México*. Vol.16.
- WESTHOFF, B.; SELLER, K.; WILD, A.; JAEGER, M. y KRAUSPE, R. (2013). “Técnica de inyección de toxina botulínica guiada por ultrasonido para el músculo iliopsoas”. *Medicina del desarrollo y neurología infantil*. Vol.45 (12), pp.829-832.
- XIAO, H.W.; BAI, J.W.; SUN, D.W. y GAO, Z.J. (2014). “The application of superheated steam impingement blanching (SSIB) in agricultural products processing” A review. *Journal of Food Engineering*. Vol. 132, pp.39-47.
- ZENG, X.; XI, Y. y JIANG, W. (2019). “Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: a review”. *Critical reviews in food science and nutrition*. Vol.59(13), pp. 2125-2135.
- ZIELINSKA, E.; BARANIAK, B.; KARAS, M.; RYBCZYNSKA, K. y JAKUBCZYK, A. (2015). “Selected species of edible insects as a source of nutrient composition”. *Food Research International*. Vol.77 pp.460-466.

## WEBGRAFIA

<http://www.europeanpublicaffairs.eu/> (06/04/2022)

<https://terrartropoda.wordpress.com/2013/08/11/ficha-gusano-de-la-harina-tenebriomolitor/> (14/04/2022)

<https://www.areatecnologia.com/electricidad/efecto-fotoelectrico.html> (11/07/2022)