



Universidad Tecnológica de la Mixteca

Labor et Sapientia Libertas

Extracción, identificación y cuantificación de ácidos grasos presentes en las larvas y pupas del insecto comestible denominado “ticoco”.

Tesis

Para obtener el título de:

Ingeniero en Alimentos

Presenta:

Abimael López Hernández

Directora:

M. C. Alma Yadira Salazar Govea

Huajuapán de León, Oaxaca, México, Noviembre de 2014

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Ciencias Químico-Biológicas, Laboratorio de Hidrología y en el Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

La parte de identificación taxonómica se realizó en el departamento de Zoología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La obtención de los espectros de CG-EM se realizó en el Laboratorio de Central de Analítica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN.

Dedico esta tesis a Dios por brindarme la oportunidad de vivir, por darme el conocimiento, la sabiduría ya que estoy cumpliendo parte de mis metas.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo mamá por darme una carrera para mi futuro y por apoyarme siempre, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre has estado apoyándome y brindándome todo tu cariño, por todo esto les agradezco de todo corazón el que estén conmigo a mi lado.

A mis hermanos, Carmen, José Antonio, Rufina, Alicia, Javier y Rosa gracias por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

Sobrinos, sobrinas y sobrinitos (Romina, Lupe y Jesús), quisiera nombrarlos a cada uno de ustedes pero son muchos, pero eso no quiere decir que no me acuerde de cada uno, a todos los quiero mucho y más que sobrinos son como mis amigos.

A todos mis amigos especialmente a Stefy, Evelyn y Marisol que las conocí ya hace varios años, muchas gracias por estar conmigo en todo ese tiempo donde he vivido momentos felices y tristes, gracias por ser mis amigos y recuerden que siempre los llevaré en mi corazón.

Y a mis profesores por confiar en mí, Alma Y. por tenerme la paciencia necesaria. Agradezco el haber tenido unos profesores tan buenas personas como lo son ustedes.

Y no me puedo ir sin antes decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el futuro. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y no los olvidaré.



*Sorprendernos por algo es el primer paso
de la mente hacia el descubrimiento*

Luis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas. Inicialmente agradezco a la familia López Hernández por haber ayudado en la recolección de los insectos.

Agradezco a la M.C. Alma Y. Salazar Govea, por creer en mi tema de tesis, por haberme orientado y apoyado en el trabajo de laboratorio, así como en las múltiples revisiones de este proyecto.

Agradezco al Dr. José Manuel Pino Moreno, por haber colaborado en este trabajo y por las facilidades en la identificación taxonómica de los insectos de estudio.

Agradezco a la Dra. Elvira Ríos Leal y a su auxiliar de investigación por los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa para los extractos de ticoco.

Agradezco al Dr. Vania Robles González por su apoyo con reactivos y préstamo de equipo para la realización de esta tesis.

Muchas gracias a la Dra. Edith González Mondragón y la Dra. Patricia Santiago Gómez por haber colaborado, aportando sus puntos de vista y conocimientos en esta tesis.

A todos los maestros que me guiaron en mi formación profesional y por su apoyo en los momentos difíciles en el laboratorio.

Finalmente a mis padres por haberme brindado el apoyo necesario durante toda mi estancia en la Universidad Tecnológica de la Mixteca.

RESUMEN

En la región Mixteca del estado de Oaxaca se localiza un insecto conocido como ticoco, el cual es utilizado como alimento por los lugareños, y hasta el momento no se ha reportado su contenido de ácidos grasos (AGs). Debido a lo anterior, en el presente trabajo se planteó como objetivo general llevar a cabo la identificación y cuantificación de los AGs del ticoco. Para ello se realizó la recolección de los insectos en los bosques de Santiago Yolomécatl, Teposcolula, Oaxaca. Se determinó la taxonomía del insecto en su estado adulto. Las grasas se obtuvieron por la técnica de extracción asistida con ultrasonido (EAU) empleando metanol-cloroformo (2:1) v/v, y la identificación de los componentes lípidos se realizó por cromatografía en capa fina (CCF). Los extractos grasos se *trans*-esterificaron con H₂SO₄ 0.9 M en metanol obteniendo de este modo los ésteres metílicos que fueron detectados y cuantificados mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (CG-EM). Previamente, se realizó una cinética para determinar el tiempo de reacción para obtener la mayor concentración de los AGs *trans*-esterificados, dando como resultado 180 min. Para la cuantificación de los AGs se realizaron curvas de calibración con AGs metilados puros. Los insectos identificados pertenecen a la familia Cerambycidae del orden coleóptera predominando *Mallodonopsis mexicanus* (Thomson, 1860). El contenido de grasa en peso húmedo fue 27 % y 23 % para la larva y pupa, respectivamente. En los extractos se identificaron principalmente tres grupos de lípidos que correspondieron a triglicéridos (TGs), AGs y colesterol, observándose una mayor concentración de TGs. Se cuantificaron los AGs mayoritarios en larvas y pupas de ticoco (g de AGs/100g de extracto lipídico) resultando en: ácido oléico (40.98±0.39, 42.00±0.86), palmítico (39.99±0.62, 42.91±0.67), esteárico (7.88±0.88, 5.88±0.29), linoléico (5.78±1.603, 3.35±0.10), mirístico (3.0±0.03, 2.89±0.15) y palmitoléico (2.36±0.24, 2.97±0.05). En el caso de los dos estados de desarrollo del ticoco se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácido linoléico, esteárico y palmítico ($P \leq 0.05$), siendo significativamente mayor para las larvas en los casos de linoléico y esteárico y significativamente menor para el palmítico, respecto a las pupas. Con los resultados obtenidos se puede concluir que los dos estados del ticoco (larva y pupa) pueden considerarse como fuentes de AGs y AGEs, con alto valor nutritivo por su composición balanceada de SFAs y PUFAs.

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	VII
LISTADO DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. HIPÓTESIS	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 OBJETIVO GENERAL	5
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
5. ESTADO DEL ARTE	6
5.1 LOS INSECTOS COMO PARTE DE LA ALIMENTACIÓN HUMANA	6
5.2 EL VALOR NUTRITIVO DE LOS COLEÓPTEROS	6
5.3 AGS EN INSECTOS DEL ORDEN COLEÓPTERA	7
5.4 TICOCO	8
6. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS	9
6.1 ÁCIDOS GRASOS	10
6.1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS AGS	11
6.1.2 IMPORTANCIA NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DE LOS AGS	12
6.1.3 FUENTES NATURALES DE AGS	13
6.1.4 AGS EN INSECTOS	13
6.2 ANÁLISIS QUÍMICO DE AGS EN ALIMENTOS	14
6.2.1 MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN DE GRASAS Y AGS	14
6.2.2 EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDO (EAU)	14
6.2.3 PREPARACIÓN DE ÉSTERES DERIVADOS DE AGS	14
6.2.4 <i>TRANS</i> -ESTERIFICACIÓN CATALIZADA POR H ₂ SO ₄ EN MEOH	15
6.2.5 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF) DE LÍPIDOS	16
6.3 TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA ASIGNAR ESTRUCTURA QUÍMICA DE AGS	17
6.3.1 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)	18
6.3.2 ESPECTROMETRÍA DE MASA (EM)	18
6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
6.4.1 DISTRIBUCIÓN F DE FISHER	21
6.4.2 DISTRIBUCIÓN T DE STUDENT	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	22
7.2 RECOLECCIÓN DEL INSECTO DE TICOCO	24
7.3 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA	24

7.4 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GRASAS	24
7.5 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA	26
7.6 OBTENCIÓN DE LOS EMAGS	27
7.7 IDENTIFICACIÓN DE LOS EMAGS	27
7.8 EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AGs	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
8.1 LOCALIZACIÓN Y OBTENCIÓN DEL INSECTO COMESTIBLE	29
8.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LAS LARVAS Y PUPAS DE TICOCO	29
8.3 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LARVAS Y PUPAS DE TICOCO	30
8.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO GRASO.....	32
8.5 <i>TRANS</i> -ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO LIPÍDICO.....	34
8.6 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)	34
8.7 EFECTO DEL TIEMPO DE REACCIÓN DE <i>TRANS</i> -ESTERIFICACIÓN.....	37
8.8 PERFIL DE AGs EN LARVAS Y PUPAS DE TICOCO	40
8.9 COMPARATIVO DEL ACEITE DE TICOCO CON ACEITES VEGETALES	45
9. CONCLUSIONES.....	47
10. PERSPECTIVAS.....	48
11. REFERENCIAS	49

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTADOS DEL TICOCO: A) LARVA, B) PUPA, C) IMAGO	9
FIGURA 2. FORMACIÓN DE UN TG A PARTIR DE UN GLICEROL Y TRES AGS (BADUI, 2006)	10
FIGURA 3. MECANISMO DE <i>TRANS</i> -ESTERIFICACIÓN DE UN TG CATALIZADO EN MEDIO ÁCIDO (CHRISTIE, 1989).....	15
FIGURA 4. CCF DE LÍPIDOS.....	17
FIGURA 5. ESPECTRO DE MASA DEL ÉSTER METÍLICO DEL ÁCIDO OLÉICO (AUTORES) Y SU FRAGMENTACIÓN TÍPICA (MCLAFFERTTY, TURECEK, 1993).....	20
FIGURA 6. ETAPAS DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL DE ESTA DE TESIS	23
FIGURA 7. CONSERVACIÓN DEL INSECTO TICOCO EN DIFERENTES ETAPAS, (A) LARVA, (B) PUPA, (C) PUPA, (D) PUPA, (E) LARVAS Y (D) IMAGO.....	30
FIGURA 8. DEROBRACHUS SP, WIKIMEDIA.ORG (2013)	31
FIGURA 9. MALLODONOPSIS MEXICANUS THOMSON, A-B) VISTA DORSAL A) MACHO; B) HEMBRA. C-D) CABEZA Y PRONOTO C) MACHO. D) HEMBRA, (SANTOS-SILVA, THOMAS, WAPPES, 2011).....	32
FIGURA 10. SEPARACIÓN DE LÍPIDOS DEL EXTRACTO GRASO DEL TICOCO POR CCF EN GEL DE SÍLICE. FASE MÓVIL: 84.155% HEXANO, 14.855% ÉTER DIETÍLICO Y 0.99 % DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL.....	35
FIGURA 11. SEPARACIÓN DE LÍPIDOS POR CCF EN GEL DE SÍLICE, FASE MÓVIL; 84.15% HEXANO, 14.85% ÉTER ETÍLICO Y 0.99 % DE ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL, A) TG (TRIPALMITINA), B) EXTRACTO DE TICOCO A LOS 60 MIN DE LA REACCIÓN DE <i>TRANS</i> -ESTERIFICACIÓN, C) Y D) EMAG DE LOS AGS PUROS, Y E) COLESTEROL LIBRE Y COLESTEROL ESTERIFICADO.	36
FIGURA 12. CINÉTICA DE REACCIÓN DE <i>TRANS</i> - ESTERIFICACIÓN DEL ACEITE DE TICOCO:	38
FIGURA 13. RENDIMIENTO DEL PRODUCTO DE REACCIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO DE <i>TRANS</i> -ESTERIFICACIÓN DEL EXTRACTO GRASO DE PUPA DE TICOCO.....	40
FIGURA 14. CROMATOGRAMAS DEL EXTRACTO ESTERIFICADO DE TICOCO, A) LARVA Y B) PUPA.	43

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL DE ALGUNOS COLEÓPTEROS (G/100 G BASE SECA).....	7
TABLA 2. PROPORCIÓN DE AGS PRESENTES EN COLEÓPTEROS TERRESTRES Y ACUÁTICOS.....	8
TABLA 3. LOS COLEÓPTEROS CONSUMIDOS EN LA MIXTECA OAXAQUEÑA*	9
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS AGS*	11
TABLA 5. DIMENSIONES PROMEDIO DE LARVAS Y PUPAS DE TICOCO	30
TABLA 6. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL INSECTO COMESTIBLE TICOCO.....	31
TABLA 7. CONTENIDO DE LÍPIDOS TOTALES, G/100 G	33
TABLA 8. RF DE SEÑALES DEL EXTRACTO GRASO DE TICOCO Y ESTÁNDARES	37
TABLA 9. COMPOSICIÓN DE AGS EN LARVAS Y PUPAS DE TICOCOG/100 G	43
TABLA 10. COMPOSICIÓN DE AGS (G/100G) DE EXTRACTOS LIPÍDICOS DE COLEÓPTEROS COMESTIBLES	44
TABLA 11. COMPARACIÓN DE AGS IDENTIFICADOS EN EL TICOCO CON OTROS ACEITES DE CONSUMO TRADICIONAL	46

ABREVIATURAS

AGE	Ácido graso esencial
AGs	Ácidos grasos
ALA	ácido alfa-linolénico
ARA	Ácido Araquidónico
BHT	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-butil-4-metilfenol
CCF	cromatografía de capa fina
CG	Cromatografía de gases
DHA	Ácido Decahexaenoico
DG	di glicérido
EAU	Extracción asistida con ultrasonido
EM	Espectrometría de masa
EMAG	Éster metílico de ácido graso
EPA	ácido eicoesapentaenoico
eV	Electrovolts
HCl	Ácido clorhídrico
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MG	mono glicérido
MUFA	Ácido graso mono insaturado
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
<i>R_f</i>	factor de retención
SFA	Ácido graso saturado
TG	Triglicérido

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha aumentado considerablemente la importancia de los alimentos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) debido a sus efectos positivos en el organismo humano, como mejoras en el funcionamiento del sistema nervioso central. Las fuentes importantes de PUFAs ω -3 son los peces y mariscos de agua fría, mientras que las de ácidos grasos esenciales (AGE) son los aceites de soya, girasol y nuez, entre otros (Hu *et al.*, 2002; Kris-Etherton, Harris, Appel, 2002; Terry, Rohan, Wolk, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado una correlación entre el consumo de estos alimentos y la reducción en el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas (WHO, 2003). La mayor atención en el uso de los insectos como fuente de alimento se centra en el contenido de proteína, sin embargo, algunas investigaciones en cuanto a composición química han demostrado que los insectos son una fuente importante de lípidos (Ramos-Elorduy *et al.*, 1997; Ramos-Elorduy *et al.*, 2006; Ramos-Elorduy, Pino, Martínez, 2012; FAO/Wur, 2013, Yi *et al.*, 2013; Tzompa-Sosa, Yi, van Valenberg, van Boekel, Lakemond, 2014). Además, se ha reportado que la fracción lipídica de los insectos del orden coleóptera contienen PUFAs y AGEs (Yang, Siriamornpun, Li D., 2006). Los AGEs son muy importantes para las funciones del ser humano pero estos no pueden ser sintetizados por el organismo sino que deben ser aportados en la dieta. A la fecha se ha reportado el contenido y tipo de AGs de varios coleópteros (Fontaneto, Tommaseo-Ponzetta, Galli, Risé, Paoletti, 2011; Tzompa-Sosa *et al.*, 2014) y de la larva del escarabajo *Rhychophorus phoenicis* (Fabricius, 1801), (Elemo B., Elemo G., Makinde, Erukainure, 2011). En la larva de *R. phoenicis* (Fabricius, 1801), los autores reportaron las siguientes concentraciones: 35.30 % de ácido palmítico, 60.47 % de ácido esteárico, para grasas saturadas (SFA), mientras que para los PUFAs se tuvo la siguiente composición: ácido oléico 0.72 % y ácido linoléico 3.51 %. Por otra parte, Fontaneto *et al.*, (2011) reportaron que los insectos comestibles, incluyendo a los coleópteros, varían en su composición lipídica, con un 32 ± 11.9 % de SFA, 22.5 ± 19.3 % de AGs monoinsaturados (MUFAs) y un total de PUFAs del 44 ± 19.0 %.

Las larvas y pupas del ticoco, objetos del presente estudio, son consumidos en la región de la Mixteca del estado de Oaxaca, se recolectan y se consumen exclusivamente en los hogares de la región. Existen algunos reportes acerca de la composición nutrimental de varias larvas de coleópteros conocidas como ticoco (Ramos-Elorduy *et al.*, 1997). No obstante, a la fecha se desconoce el contenido y composición de AGs de las larvas de ticoco reportadas; también se desconoce el contenido y composición de AGs de las pupas de dicho insecto. Es importante señalar que las pupas de estos coleópteros también son consumidas por los habitantes de algunas poblaciones de la región mixteca del estado de Oaxaca.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo en una primera etapa se llevó a cabo la identificación taxonómica del insecto denominado "ticoco", consumido en la localidad de Santiago Yolomécatl, Teposcolula, Oaxaca. En una segunda etapa, se realizó la extracción de los AGs con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, v/v) por Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU), el extracto graso se *trans*-esterificó por catálisis ácida. Para caracterizar los AGs presentes se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los datos obtenidos de éste análisis mostraron que el ticoco contiene una importante cantidad de grasa en ambos estados. Se identificaron AGs libres, TG y colesterol por CCF según estándares empleados. Los EMAGs obtenidos del extracto graso se obtuvieron a las tres horas de reacción dando como resultado la mayor concentración de estos en el ticoco. Finalmente se identificaron seis AGs mayoritarios en el extracto graso del ticoco por medio de CG-EM.

2. JUSTIFICACIÓN

En relación a la salud, en los últimos años ha aumentado considerablemente el interés de los consumidores por conocer la relación que existe entre la composición química de los alimentos. Al respecto, existen cada vez más pruebas científicas que apoyan la hipótesis de que algunos componentes de los alimentos influyen de manera clara en el estado de salud, e incluso pueden mejorar el bienestar y reducir el riesgo de desarrollar enfermedades (Baum *et al.*, 2012). A la fecha, se ha hecho énfasis en las recomendaciones respecto a la fracción lipídica de los alimentos, teniendo mayor importancia los PUFAs y AGEs por su actividad metabólica en el ser humano debido a que son nutrientes indispensables para su crecimiento y desarrollo fisiológico, además de prevenir enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cánceres (Hoffmire, Block, Thevenet-Morrison, van Wijngaarden, 2012).

Por otra parte, en el procesado de alimentos se emplean AGEs con el propósito de enriquecer productos alimenticios aumentando de este modo su valor biológico, sensorial y funcional (López-Huertas, 2010). Debido a lo anterior, existe una búsqueda y evaluación de AGs ω -3 y ω -6 para ser empleados en la industria de los alimentos así como para evaluar el beneficio potencial para el consumidor por la ingesta de los mismos. Los PUFAs y AGEs se encuentran en animales marinos y semillas, sin embargo, estudios recientes han reportado que los coleópteros también los contienen (Arango-Gutiérrez, 2005; Raksakantong, Meeso, Kubola, Siriamornpun, 2010; Fontaneto *et al.*, 2011; Elemen *et al.*, 2011; Tzompa-Sosa *et al.*, 2014).

En el estado de Oaxaca, Ramos-Elorduy *et al.*, (1997), determinaron la composición nutrimental de varias larvas de coleópteros de la región de la Mixteca. Los autores reportaron que el contenido de grasas es relativamente alto en estado larvario. A la fecha no hay reportes en la literatura que muestre la composición de AGs de las larvas y pupas del ticoco que se consumen en Santiago Yolomécatl, Teposcolula, Oaxaca. Esta tesis se realizó con la finalidad de conocer la composición de AGs del ticoco, y de este modo promover su consumo como fuente de AGEs.

3. HIPÓTESIS

Las fracciones lipídicas obtenidas a partir de larvas y pupas del insecto ticoco están compuestas por AGs poliinsaturados (PUFAs), dentro de los cuales se encuentran ácidos grasos esenciales (AGEs).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la composición de AGs presentes en los extractos grasos de larvas y pupas del insecto comestible denominado “ticoco”, mediante el uso de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa CG-EM.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Colectar el insecto ticoco en los estados de desarrollo correspondiente a larva, pupa e imago en los bosques de Santiago Yolomécatl, Teposcolula Oaxaca, en los meses de Marzo y Abril de 2013.

4.2.2. Identificar taxonómicamente al insecto comestible denominado ticoco, por medio de las claves analíticas correspondientes y/o por comparación de los géneros y especies de coleópteros depositados en la colección nacional de insectos del Instituto de Biología de la UNAM.

4.2.3. Cuantificar el contenido de grasas totales presentes en larvas y pupas de ticoco por gravimetría mediante la EAU empleada por Wei *et al.*, (2008) y Tzompa-Sosa *et al.*, (2014).

4.2.3. Identificar los lípidos del extracto graso por CCF en base al factor de retención (R_f) de los estándares de TG, AGs y colesterol (Tzompa-Sosa *et al* 2014).

4.2.3. Obtener los EMAGs a partir de los AGs libres y TG por medio de la *trans*-esterificación catalizada en H_2SO_4 0.9M en MeOH establecida por la *Instrumental Committe of the American Oil Chemist's Society* (AOCS), 1966.

4.2.4. Establecer el tiempo óptimo de la reacción de *trans*-esterificación para obtener la mayor concentración de EMAGs en base a la temperatura de 80°C establecida por la AOCS, 1966.

4.2.5. Identificar y cuantificar los AGs mediante CG-EM empleando sus EMAGs correspondientes.

5. ESTADO DEL ARTE

En este capítulo se habla sobre la relevancia nutrimental del consumo de insectos por su alto contenido de PUFAs. Además, se mencionan estudios previos que demuestran que los coleópteros contienen PUFAs principalmente ω -9, ω -6 y ω -3. Se presenta un panorama sobre la importancia del ticoco, que como se explicó anteriormente es un insecto poco conocido que se consume en la región de la Mixteca del estado de Oaxaca.

5.1 Los insectos como parte de la alimentación humana

Desde tiempos remotos y hasta nuestros días, los insectos han sido consumidos por diversas sociedades alrededor del mundo, jugando un papel importante en términos de alimentación y nutrición (Singh, Nabom, Chakravorty, 2007; Birgit, Oliver, 2013; FAO, 2013). La mayoría de los insectos comestibles poseen altas cualidades nutricionales, y en algunos países constituyen una parte importante de la dieta humana (Verkerk, Tramper, van Trijp, Martens, 2007; Srivastava, Babu, Pandey, 2009; Chakravorty, Ghosh, Meyer-Rochow, 2011; Birgit *et al*, 2013). Los insectos proporcionan vitaminas, minerales, AGs, grasas, fibra, proteínas y sustancias activas para el tratamiento de enfermedades (Tang, Shi, Zhao, Hao, Le, 2008; Srivastava *et al.*, 2009; Chavunduka, 2010; Lokeshwari, Shantibala, 2010; Raksakantong *et al.*, 2010; Ratcliffe, Mello, Garcia, Butt, Azambuja, 2011; Ajai, Bankole, Jacob, Audu, 2013; Herzner *et al.*, 2013). Debido a la abundancia de insectos y su aporte nutrimental, actualmente se consumen y comercializan a precios elevados (Siriamornpun, Thammapat, 2008; Viesca, Romero, 2009; Osasona, Olaofe, 2010; Birgit *et al*, 2013).

5.2 El valor nutritivo de los coleópteros

Ramos-Elorduy *et al.*, (1997) reportan poco menos de un centenar de especies de insectos pertenecientes a 28 familias y 8 órdenes, sin embargo, el orden más consumido es el de los coleópteros con 443 especies (Ramos-Elorduy, Muñoz, Pino, 1998). De toda esta

diversidad de especies, Ramos-Elorduy *et al.*, (1997) realizaron un análisis comparativo de la composición nutrimental de coleópteros del estado de Oaxaca, concluyendo en que tienen un alto contenido de proteínas y grasas. Además, estudios posteriores mostraron que el aporte nutrimental de los coleópteros es alto en proteínas y grasas, tal como se muestra para la larva de *R. phoenicis* (Fabricius, 1801) (Elemo *et al.*, 2011), Tabla 1. También los coleópteros son ricos en sales minerales (Ca, Mg, Na, P y K) y en vitaminas, principalmente del grupo B (Ramos-Elorduy *et al.*, 1998; Ramos-Elorduy, Pino, 2001; Ramos-Elorduy *et al.*, 2006).

Tabla 1. Composición nutrimental de algunos coleópteros (g/100 g base seca)

Nombre (Escarabajos)	Proteínas	Grasas	Minerales	Carbohidratos totales		kcal/100g
				Estructurales	Otros	
<i>Oileus rimator</i> , (Truqui, 1857)	21 ± 1.3	47 ± 2.4	2 ± 0.7	13 ± 2.8	18 ± 0.5	574
<i>Passalus punctiger</i> , (Lepeletier, 1825)	26 ± 0.3	44 ± 3.8	3 ± 0.3	15 ± 2.1	12 ± 0.6	552
<i>Aplagiognathus spinosus</i> , (Newman, 1940)	26 ± 1.2	36 ± 2.8	3 ± 0.5	15 ± 1.9	19 ± 1.0	508
<i>Callipogon barbatus</i> , (Fabricius, 1775)	41 ± 0.5	34 ± 0.8	2 ± 0.1	23 ± 2.0	1 ± 0.0	474
<i>Homolepta sp</i>	54 ± 0.0	18 ± 0.1	7 ± 0.6	12 ± 1.9	10 ± 0.8	410
<i>Scyphophorus acupunctatus</i> , (Gyllenhaal, 1838)	36 ± 1.8	52 ± 1.9	1 ± 0.6	6 ± 0.6	6 ± 0.4	555
<i>Arophalus rusticus*</i> , (Linnaeus, 1758)	20.60	56.10	1.70	5.10	17.00	652
<i>Arophalus sp*</i>	20.98	56.86	1.49	5.94	14.73	654
<i>Rhychophorus phoenicis**</i> , (Fabricius, 1801)	66.3 ± 0.074	37.12 ± 0.38	5.20 ± 0.04	-----		478
Larva de ticoco***	20.17 ± 1.77	51.56 ± 1.95	1.01 ± 0.0	27.26 ± 1.54		---
Pupa de ticoco***	21.64 ± 1.4	49.36 ± 3.02	1.01 ± 0.0	27.98 ± 1.27		---

Los datos que se presentan en esta tabla corresponden a larvas de insectos comestibles, a excepción del último renglón. Ramos-Elorduy *et al.*, 1997, *Ramos-Elorduy *et al.*, (2006), **Elemo *et al.*, (2011), ***López-Hernández, Salazar-Govea, Santiago-Gómez, González-Mondragón, (2012).

5.3 AGs en insectos del orden coleóptera

Recientemente se ha reportado la composición de AGs de insectos del orden coleóptera tanto acuáticos como terrestres, Tabla 2. En base a los datos reportados por Fontaneto *et*

al., (2011), se sabe que el porcentaje de AGs varía entre especies del mismo género por factores tanto intrínsecos como extrínsecos (madurez, clima, temperaturas, estaciones de año, etc.). También se ha observado que la variación de AGs en insectos está asociada con su alimentación y con la planta hospedero de donde los insectos se alimentan (Bukkens, 1997). Por otra parte, Elemo *et al.*, (2011), cuantificaron un total de 60.47 ± 0.34 g de ácido esteárico/100 g de larva de *R. phoenicis* (Fabricius, 1801), y en menores cantidades el ácido oléico y linoléico (0.72 ± 0.08 % y 3.51 ± 0.19 %, respectivamente).

Tabla 2. Proporción de AGs presentes en coleópteros terrestres y acuáticos.*

AG	Acuáticos	Terrestres
SFAs	34.3 ± 4.3	27.1 ± 17.3
MUFAs	35.2 ± 1.2	25.5 ± 23.9
PUFAs	30.6 ± 5.5	46.8 ± 27.7
Ácido α -linolénico (ALA)	4.7 ± 2.3	2.5 ± 1.5
Ácido Araquidónico (ARA)	5.6 ± 2.2	46.8 ± 27.7

*Fontaneto *et al.*, 2011.

5.4 Ticoco

Entre los coleópteros, las larvas de la especie *Scyphophorus acupunctatus* (Gyllenhaal, 1838), conocidas como botijas son consumidas en el estado de Oaxaca (Ramos-Elorduy, Pino, 1989). En la población de Santiago Yolomécatl, Teposcolula, Oaxaca y pueblos vecinos se consume un coleóptero terrestre conocido como ticoco, incluyendo larvas y pupas así como el abdomen del imago. Son preparados fritos, cocidos, empanizados, asados, e incluso, se comen crudos. Las principales características de las larvas de ticoco son los pliegues de su cuerpo grasoso de color marfil mientras que las pupas adquieren la forma que se muestra en la Figura 1, en donde se observa la metamorfosis para llegar al estado de imago (adulto). Los escarabajos depositan sus huevos en las grietas de los elites viejos (*Alnus jurullensis* (Kunth 1817)), en donde las larvas se alimentan y las pupas se desarrollan.

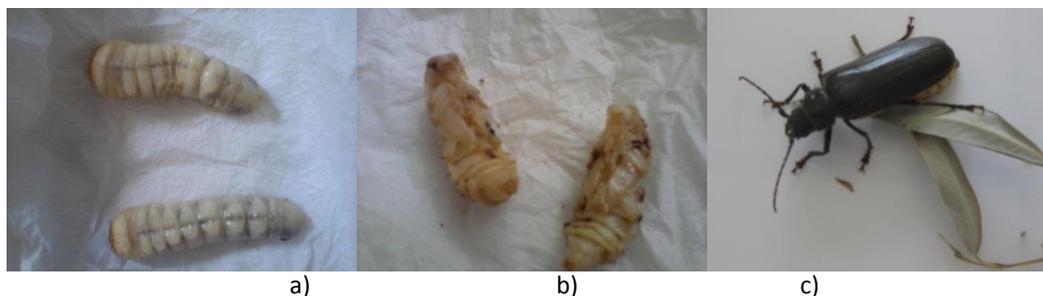


Figura 1. Estados del ticoco: a) larva, b) pupa, c) imago

Existe una gran diversidad de especies de coleópteros reportados como ticoco los cuales son consumidos en la Mixteca Oaxaqueña, Tabla 3. Ramos-Elorduy *et al.* (1997) registraron a las larvas de ticoco como especies comestibles, aunque como se mencionó anteriormente, existen poblaciones en las que también se consumen las pupas de estos insectos.

Tabla 3. Los coleópteros consumidos en la mixteca oaxaqueña*

Genero	Especie	Lugar y región	Nombre común	Estado de consumo
<i>Stenodontes</i>	<i>cer. maxillosus</i> (Drury, 1773)	Nduayaco, Apoala	ticoco del encino podrido	Larva
<i>Callipagon</i>	<i>barbatum</i> , (Fabricius, 1781)	Tlaxiaco	Cuautolin	Larva
<i>Derobrachus</i>	<i>procerus</i> , (Thomson, 1860)	Tlaxiaco	ticoco del encino	Larva
<i>Aplagiognathus</i>	<i>spinosus</i> , (Newman, 1940)	Tlaxiaco	ticoco del encino podrido	Larva

*Ramos-Elorduy *et al.*, 1997.

6. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

En el presente capítulo se señala la importancia nutricional y biológica de los AGs contenidos en alimentos, así mismo se menciona la relevancia de los AGs, PUFAs y AGEs. Se presenta un panorama sobre la importancia del análisis químico en alimentos, que involucra los métodos de extracción, cuantificación y caracterización de AGs.

6.1 Ácidos grasos

Los AGs se definen como ácidos mono-carboxílicos de cadena alifática con número par (por regla general) de átomos de carbono los más comunes (Badui, 2006; Wade, 1993). Estos AGs conforman parte de las grasas y aceites en forma de TG, los que a su vez, son ésteres de AGs con glicerol. El glicerol, un polialcohol, está esterificado con uno, dos, o tres AGs, resultando en monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG), o TG, respectivamente. En la Figura 2, se presenta la formación de un TG a partir de una molécula de glicerol y tres de AGs.

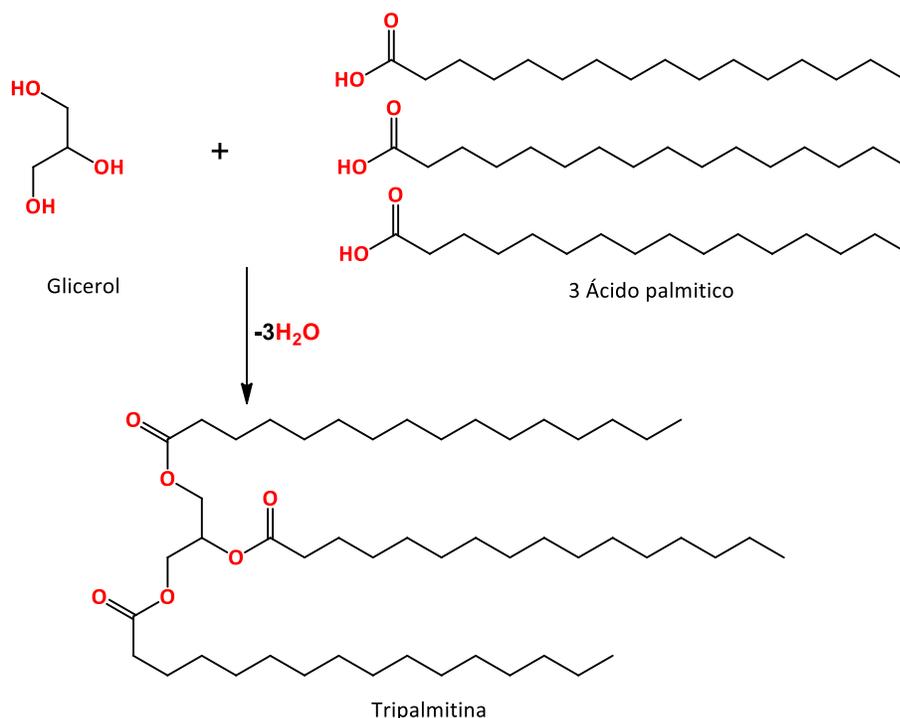


Figura 2. Formación de un TG a partir de un glicerol y tres AGs (Badui, 2006)

6.1.1 Características estructurales de los AGs

Existen dos clases generales de AGs en la naturaleza: los saturados (SFA) y los insaturados, los cuales se distinguen por algunas características estructurales, Tabla 4, (Lehninger, 1980; Hamilton, Hamilton S., 1992). Además, los PUFAs contienen dobles enlaces con configuración *Z*-(*cis*), que usualmente son más abundantes en la naturaleza en comparación a su isómero *E*-(*trans*). En contraste, la configuración *E*-(*trans*) está asociada con problemas de salud y debe evitarse el consumo excesivo de este tipo de AGs (Micha, Mozaffarian, 2008; Kandhro *et al.*, 2008; Grimm *et al.*, 2012).

Tabla 4. Características estructurales de los AGs*

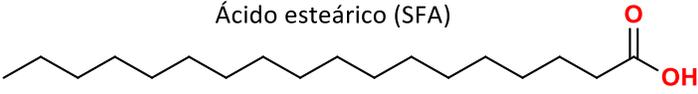
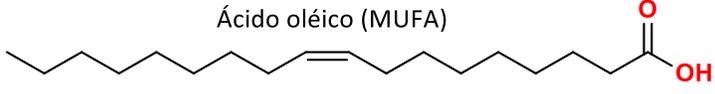
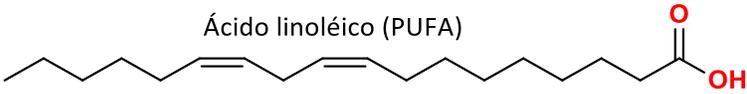
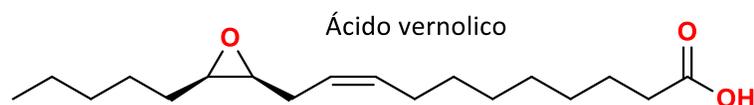
Características Fisicoquímicas	Nomenclatura
<p style="text-align: center;">Ácido esteárico (SFA)</p>  <p>Sólidos o semi-sólidos; no presentan dobles enlaces y suele nombrar el hidrocarburo con la terminación "oico"</p>	<p>Láurico (Dodecanoico, C12:0) Palmítico (Hexadecanoico, C16:0) Esteárico (Octadecanoico, C18:0)</p>
<p style="text-align: center;">Ácido oléico (MUFA)</p>  <p>Líquidos; presentan un doble enlace, y suele colocarse el símbolo ω para ubicar dicha instauración (contada a partir del último carbono de la cadena carbonada).</p>	<p>Miristoléico (9-tetradecenoico, C14:1-ω 5) Palmitoléico (9-Hexadecanoico, C16:1- ω 9) Oléico (9-Octadecanoico, C18:1- ω 9)</p>
<p style="text-align: center;">Ácido linoléico (PUFA)</p>  <p>Líquidos; presentan dos o más enlaces dobles, por ejemplo, en la nomenclatura del ácido α-linolénico, ALA (C18:3 ω-3), el número 18 se refiere a la cantidad de átomos de carbono, el número tres se refiere al número de enlaces dobles.</p>	<p>Linoléico (C18:2,ω -6) ALA (C18:3, ω-3) ARA (C20:4, ω-6) Eicosapentanoico "EPA" (C20:5, ω-3) Decahexanoico "DHA" (C22:6, ω-3)</p>

Tabla 4. (continuación) Características estructurales de los AGs



AGs menos comunes

Sólidos y líquidos; presentan un número impar de átomos de carbono, enlaces acetilénicos, grupos epoxi-, hidroxil-, anillos ciclopropano y ciclopentano. Crepenínico
Vernólico

*La configuración del enlace doble en cada caso es z-(cis). Badui, 2006; Gustone, 1992; Choong, Lin, Chen, 1999; Murray, 2001; Barceló-Coblijn, Murphy, 2009.

6.1.2 Importancia nutricional y funcional de los AGs

Los AGs tienen gran importancia en la nutrición, ya que son la principal fuente de almacenamiento de energía (9 kcal/g) cuando se encuentran en forma esterificada (Badui, 2006). Los AGs, en especial los AGEs, son necesarios para un crecimiento y desarrollo normal de los seres humanos, por lo que deben ser incluidos en la dieta del individuo debido a que el organismo no los puede sintetizar y su carencia da lugar a ciertas manifestaciones clínicas como las enfermedades cardiovasculares (Elvevoll, James, 2000; Galli, Risé, 2009; Hoffmire *et al.*, 2012). Los AGEs son importantes biológicamente debido a que dentro del organismo forman parte de la membrana celular, regulan la presión arterial y son indispensables en la reparación celular (Hu *et al.*, 2002; Kris-Etherton *et al.*, 2002; Barceló-Coblijn, Murphy, 2009). También, los PUFAs son precursores de la síntesis de algunas hormonas como las prostaglandinas que cumplen una función importante para la salud (Simopoulos, 2002; Baum *et al.*, 2012). Adicionalmente se ha reportado que el ácido oléico, el EPA y el DHA previenen varios tipos de cánceres (Terry, Rohan, Wolk, 2003; Larsson, Kumlin, Ingelman-Sundberg, Wolk, 2004; Win, 2005).

6.1.3 Fuentes naturales de AGs

Uno de los principales nutrimentos presentes en los alimentos son las grasas, las cuales están ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo abundantes en productos de origen animal, vegetal y marino. Las grasas de origen animal son ricas en SFA, especialmente aquellas provenientes de mamíferos como el cerdo, la oveja, el pollo y la vaca. Las grasas provenientes de otros grupos de animales, como peces, contienen PUFAs ω -3, DHA y EPA (Silveira-Rodríguez, Monereos-Megías, Molina-Baena, 2003; Hoffmire *et al.*, 2012). Los aceites vegetales provenientes de semillas como el maíz, girasol, soya y oliva, tienen un alto contenido de AGEs y PUFAs (ácido oléico, ω -9; ácido linoléico, ω -6; y ácido linolénico, ω -3), por ello es importante y conveniente que formen parte de la dieta. Pero no sólo los alimentos antes mencionados son ricos en AGs, también los insectos son un recurso importante de estos metabolitos esenciales (Fontaneto *et al.*, 2011).

6.1.4 AGs en insectos

Los lípidos forman parte de la estructura de los insectos y suelen almacenarse en un órgano conocido como cuerpo graso que es análogo al tejido adiposo del hígado en los vertebrados. Se ha observado que por lo general más del 90% de los lípidos del cuerpo graso de los insectos son TG (Canavoso, Jouni, Karnas, Pennington, Wells, 2001). Como en cualquier otro organismo, los lípidos son fuente de energía y componentes estructurales de las membranas en los insectos (Raksakantong *et al.*, 2010); además, para muchos de ellos, la energía durante los períodos en los que no se alimentan (como en la etapa de huevo y pupa) proviene de los AGs de los TG (Cakmak, Bashan, Bolu, 2007). Sin embargo, también realizan funciones específicas para ellos, como por ejemplo, son precursores de la biosíntesis de feromonas así como de componentes de sus secreciones de defensa (Ray *et al.*, 2011; Rodstein *et al.*, 2011).

6.2 Análisis químico de AGs en alimentos

6.2.1 Métodos generales de extracción de grasas y AGs

La extracción es un proceso por el cual se separa una sustancia o grupos de sustancias basándose en la diferencia de solubilidad de las mismas, en un determinado disolvente. La extracción se puede realizar a partir de muestras sólidas o líquidas. En el primer caso hay dos fases una sólida y una líquida, mientras que en el segundo se deben presentar dos fases líquidas inmiscibles. En los métodos de extracción para la separación de grasas, la mayoría se basa en la extracción con diversos disolventes tales como hexano, cloroformo, éter de petróleo o etílico, entre otros. Para lograr la extracción de metabolitos de interés con un mínimo de degradación de las grasas se describe a continuación el siguiente método.

6.2.2 Extracción asistida con ultrasonido (EAU)

La EAU facilita y acelera los procesos de extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas (Azuala, Vargas, 2007). Este proceso de extracción es más rápido y más completo en comparación con los métodos tradicionales como la maceración y Soxhlet (Metherel, Taha, Izadi, Stark, 2009). Con la EAU se tiene un mayor rendimiento, y se ha demostrado que la extracción es más eficiente en períodos cortos de tiempo (30 min) a temperatura ambiente (Trusheva, Trunkova, Bankova, 2007). Estudios recientes indican que el tratamiento con ultrasonidos mejora de forma significativa la extracción de aceites naturales en semillas e insectos, sin modificar las estructuras de los TG y AGs (Zhang, Wang, Jiao, Chen, Mao, 2008; Wei *et al.*, 2008; Metherel *et al.*, 2009; Tzompa-Sosa *et al.*, 2014).

6.2.3 Preparación de ésteres derivados de AGs

En muchos casos la determinación de analitos de interés se desarrollada sobre moléculas intactas; sin embargo para sustancias no volátiles, termo inestables y reactivas como los

AGs, se requiere de su derivación previa a la cromatografía (Christie, 1989). Los derivados más comunes de los AGs son los EMAGs, los cuales se pueden obtener vía condiciones básicas (NaOCH_3 , KOH y NaOH) o ácidas (HCl , H_2SO_4 y BF_3) sobre los lípidos aislados de la matriz alimenticia (Hamilton, Hamilton S., 1992). Teóricamente, la preparación de los EMAGs ocupa varias reacciones químicas reversibles en un sistema complejo, cada uno con su propia capacidad catalítica y limitaciones de aplicación.

6.2.4 *Trans*-esterificación catalizada por H_2SO_4 en MeOH

Los AGs de los TG pueden ser *trans*-esterificados por un alcohol en presencia de un catalizador ácido conveniente, tal como se ilustra en la Figura 3. En el medio de reacción, primero ocurre la protonación del TG (a) después, por la adición de un alcohol, se origina el intermediario (b), el cual se puede disociar a través de un estado de transición (c), produciendo al nuevo éster (d).

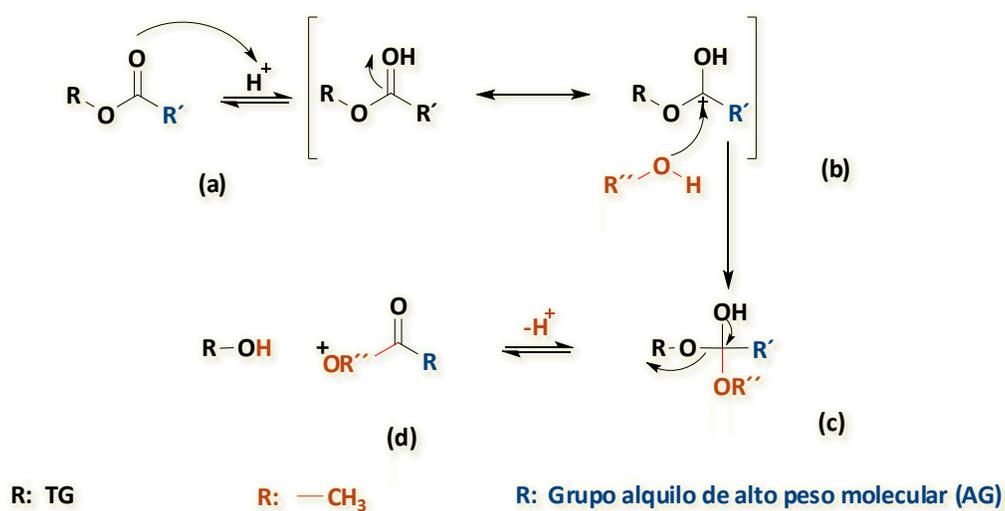


Figura 3. Mecanismo de *trans*-esterificación de un TG catalizado en medio ácido (Christie, 1989).

Las condiciones preferidas para la reacción de *trans*-esterificación son: exceso de alcohol (MeOH) y ausencia de agua. Las condiciones libres de agua se alcanzan por adición de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) o 2,2-dimetoxipropano al medio de reacción (Christie, 1989). Un catalizador ácido, considerado por los científicos como el mejor para la reacción de *trans*-esterificación, es el HCl en MeOH al 5% (Christie, 1989). Sin embargo, Hitchcock y Hammond (1980), afirmaron que el H₂SO₄ al 2% en MeOH es un buen reactivo para metilar AGs, éste fue aprobado en 1966 por la AOCS. Para evitar la degradación de los AGs en las reacciones de conversión a ésteres se deben tomar algunas consideraciones tales como que el H₂SO₄ es un agente oxidante fuerte y debe emplearse en concentraciones menores al 10%, evitar tiempos largos de reflujo (hasta seis horas) y evitar altas temperaturas (menores a 170 °C) (Hansen, Smith, 1966).

6.2.5 Cromatografía en capa fina (CCF) de lípidos

El análisis por CCF es un método analítico empleado para analizar muestras de lípidos, mediante esta técnica de análisis se puede determinar la concentración de EMAGs, TG, DG, MG y AGs. Además, la CCF se usa para procesos de aislamiento o concentración, debido a que por simple adsorción en sílice se pueden separar exitosamente EMAGs de TG y AGs, que difieren en su polaridad y longitud de cadena, Figura 4. Los compuestos de cadena larga son ligeramente menos polares que sus análogos de cadena media, y los PUFAs son ligeramente más polares que sus homólogos saturados. Los AGs o ésteres con grupos funcionales polares adicionales (hidroxi, epoxi, etc.) los cuales se separan con facilidad dependiendo del número de dichos grupos, de tal manera que la CCF provee un fácil camino para la identificación y separación de tales compuestos previo a la inyección en equipos de cromatografía.

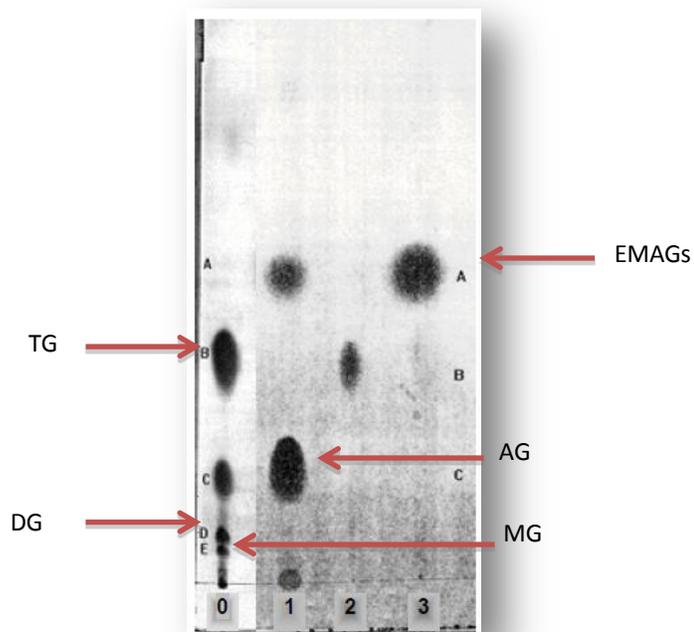


Figura 4. CCF de lípidos. Muestra 0: análisis de aceite usado antes de la reacción, se identifican B, C, D y E. Muestra 1: análisis de una mezcla de A y C. Muestra 2: análisis del aceite de girasol, antes de la reacción. Se identifica B, no se observan D ni E. Muestra 3. Análisis de la fase de A puro en este análisis únicamente se identifican los EMAG (Aliseda, 2002).

6.3 Técnicas instrumentales para asignar estructura química de AGs

Para la caracterización de compuestos aislados de muestras biológicas, se utilizan un grupo de técnicas instrumentales que permiten la obtención de espectros correspondientes a los niveles energéticos de átomos y moléculas. La espectrometría de masa (EM) y/o la cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) en combinación con otras espectroscopias como la resonancia magnética nuclear (RMN) e infrarrojo (IR), forman la base del análisis químico cualitativo y cuantitativo para la identificación y caracterización de estructuras moleculares de una muestra o mezcla. El análisis de los datos provenientes de estas espectroscopias permite asignar la estructura química al compuesto en estudio.

6.3.1 Cromatografía de gases (CG)

La CG ha jugado un papel importante en el análisis de todas las clases de lípidos encontrados en fuentes naturales, tanto de origen vegetal como animal (Evershed, 1992), con excepción de algunos compuestos isoprenoides de alto peso molecular (carotenoides). La primera separación de AGs fue realizada por James y Martin (1952), hasta nuestros días, la CG ha revolucionado el estudio de los lípidos porque ha hecho posible la determinación completa de AGs, en tiempos de análisis muy cortos (Christie, 1989). Los AGs son generalmente convertidos a sus correspondientes EMAGs (Christie, 1989) antes del análisis cromatográfico para aumentar su volatilidad, mejorar la forma de los picos y lograr, por ende, una resolución más alta de los respectivos derivados de AGs (Liu, 1994). El análisis de los EMAGs puede realizarse en columnas capilares apolares (polidimetilsiloxano), columnas altamente polares o en columnas polares (poli etilenglicol) (Supelco, 1997); siendo estas últimas las más utilizadas. Los correspondientes EMAGs eluyen en orden creciente de su longitud y grado de insaturación en columnas polares. El detector de ionización en llama, es el sistema de detección más utilizado para registrar EMAGs. En la CG la fase móvil es un gas inerte (helio, nitrógeno o hidrógeno), mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido. La separación de una mezcla por medio de CG consiste básicamente en inyectar una muestra en el equipo, volatilizarla, cargarla en la columna cromatográfica y hacerla eluir a través de la fase estacionaria por medio del flujo de un gas inerte (Skoog, Crouch, Holler, 2008).

6.3.2 Espectrometría de masa (EM)

La EM es capaz de detectar concentraciones bajas de analitos provenientes de alimentos de origen vegetal y animal. La EM suministra información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los compuestos que eluyen de una columna o que se insertan directamente a la cámara de ionización. La EM es una técnica empleada para estudiar las masas de átomos, moléculas o fragmentos de moléculas (iones fragmento), estos fragmentos dan información relevante respecto de la estructura del analito. Para obtener un espectro de masa las moléculas gaseosas o las especies desorbidas de fases

condensadas se ionizan, los iones se aceleran en un campo eléctrico y a continuación se separan según su relación masa/carga (m/z). El proceso de esta espectrometría comprende básicamente cuatro etapas (Corral, 2006):

1. Ionización de la muestra.
2. Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
3. Dispersión de los iones según su masa/carga (m/z).
4. Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Las moléculas entran a una cámara donde se ionizan por impacto electrónico comúnmente, los electrones emitidos por un filamento caliente son acelerados a través de un potencial, generalmente de 70 electrovolts (eV). Prácticamente todas las moléculas estables tienen un número par de electrones, pero cuando se pierde un electrón, el catión que resulta con un electrón desapareado se designa como M^+ (ión molecular), el cual indica la masa molecular de un compuesto desconocido. Después de la ionización, el ión M^+ , normalmente tiene suficiente energía interna residual (aprox. 1 eV) para romperse en fragmentos. En algunas ocasiones ciertos compuestos no generan el ión molecular utilizando la ionización electrónica, porque el ión molecular se rompe con gran eficacia. No obstante, los fragmentos proporcionan claves valiosas de la estructura de un compuesto desconocido, como se muestra en la Figura 5. En el espectro de masas del éster metílico del ácido oléico, se destaca el ion molecular M^+ (m/z 296) así como los iones correspondientes a las pérdidas del radical CH_3O^- y del reordenamiento (McLafferty, Turecek, 1993), ($M-74$), en m/z 265 y 222, respectivamente. El ión pico base, m/z 55, corresponde a la formación del ion $(C_4H_7)^+$. Para hallar la masa molecular se puede obtener un espectro por ionización química, que normalmente da un pico intenso del ion MH^+ (Harris, 2007).

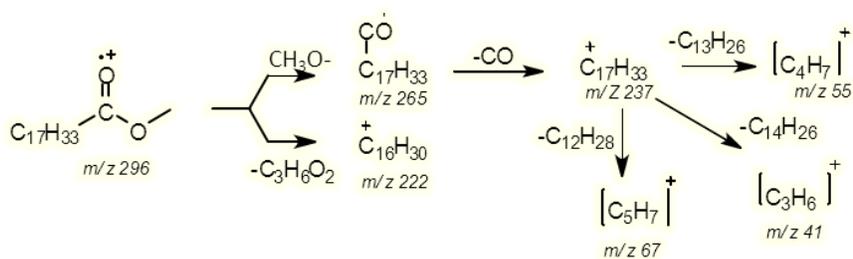
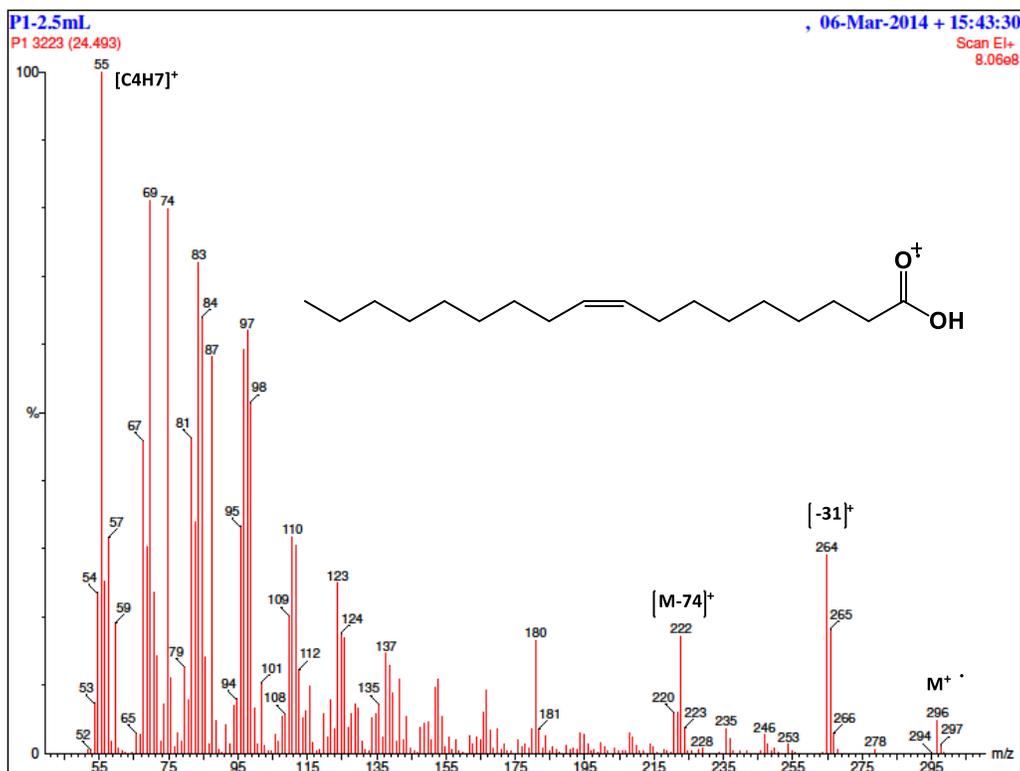


Figura 5. Espectro de masa del éster metílico del ácido oléico (Autores) y su fragmentación típica (McLafferty, Turecek, 1993).

6.4 Análisis estadístico

A través de un análisis estadístico, se conoce la función de probabilidad de los datos, y a partir de ella, se sabe su comportamiento, los parámetros estocásticos y se determinan las probabilidades de interés. En la práctica, la mayoría de los sucesos estadísticos tienen, a

nivel de función de probabilidad, un comportamiento análogo que hace que sean susceptibles de encajar dentro de alguno de los modelos más usuales de distribución de probabilidad, algunos de estos modelos se explican a continuación.

6.4.1 Distribución F de Fisher

En estadística, una variable F se define como el cociente entre dos variables ji-cuadrados divididas por sus correspondientes grados de libertad. Esta distribución se emplea para probar si dos muestras provienen de poblaciones que poseen varianzas iguales. Esta prueba es útil para determinar si una población normal tiene una mayor variación que la otra y también se aplica cuando se trata de comparar simultáneamente varias medias poblacionales (Moreno-Gil, 1995).

6.4.2 Distribución t de Student

En estadística, una prueba *t* de Student es aquella en la que el estadístico utilizado tiene una distribución *t* de Student si la hipótesis nula es cierta. Se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real. Es utilizado en análisis discriminante, mediante el cual se comprueba si las medias de dos poblaciones distribuidas en forma normal son iguales (Fadem, Barbara, 2008).

7. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se describen los materiales, equipos y etapas del desarrollo experimental del proyecto de tesis, Figura 6. Asimismo se menciona la relevancia de los métodos del análisis químico en alimentos para la obtención de los AGs.

7.1 Materiales, equipos y reactivos

Balanza granataria Ohaus de 2610 g, balanza analítica Sartorius BL210S, congelador General Electric modelo FUM 17DRBRWIT, refrigerador Acros-Whirlpool modelo ARM07NP, calibrador vernier digital electrónico General (± 0.1 mm), sonicador-degasificador Branson 8510, parrillas de calentamiento Barnstead Thermolyne CIMAREC e IKA C-MAG HS4, vórtex Barnstead International Type 16700 Mixer e IKA vortex 3, rotavapor Heidolph Laborota 4000 efficient, bomba de vacío vacuum brand MZ2C, lámpara de UV modelo UVG-54 mineralight UV-254 nm San Gabriel CA91778, digester Hach modelo DRB 200, bomba de vacío de diafragma 50/60 Hz 2.6/1.3 A vacuum brand GMBH-CO Kg, desecador de vidrio con válvula de vacío CSN SIMAX, Cromatógrafo de Gases-MS Perkin Elmer Clarus 580 MS Clarus SQ 8S, columna: Elite – 5 MS 30 m x 0.32 mm DI 0.25 μm .

Material de vidrio en general, estándares de AGs: esteárico (S-4751), palmítico (P-0500), mirístico (M-3128), palmitoléico (P-5585), oléico (O-1008), linoléico (L-1376), linolénico (L-2376), tripalmitina (T-5888), palmitato de colesterol 98% HPLC (C-6072), 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-butil-4-metilfenol (BHT), hexano y placas de sílice gel con indicador (Sigma-Aldrich). Hexano grado HPLC Burdick Jackson, ácido acético glacial, cloroformo, éter etílico, MeOH, etanol anhidro, acetona, H_2SO_4 , formaldehído (todos de la marca J.T. Baker). Cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, Na_2SO_4 , gel de sílice granular con indicador (todos de la marca Meyer). Así mismo todos los disolventes utilizados antes de ser empleados recibieron un tratamiento de desgasificación con el fin de eliminar trazas de peróxidos y oxígeno.

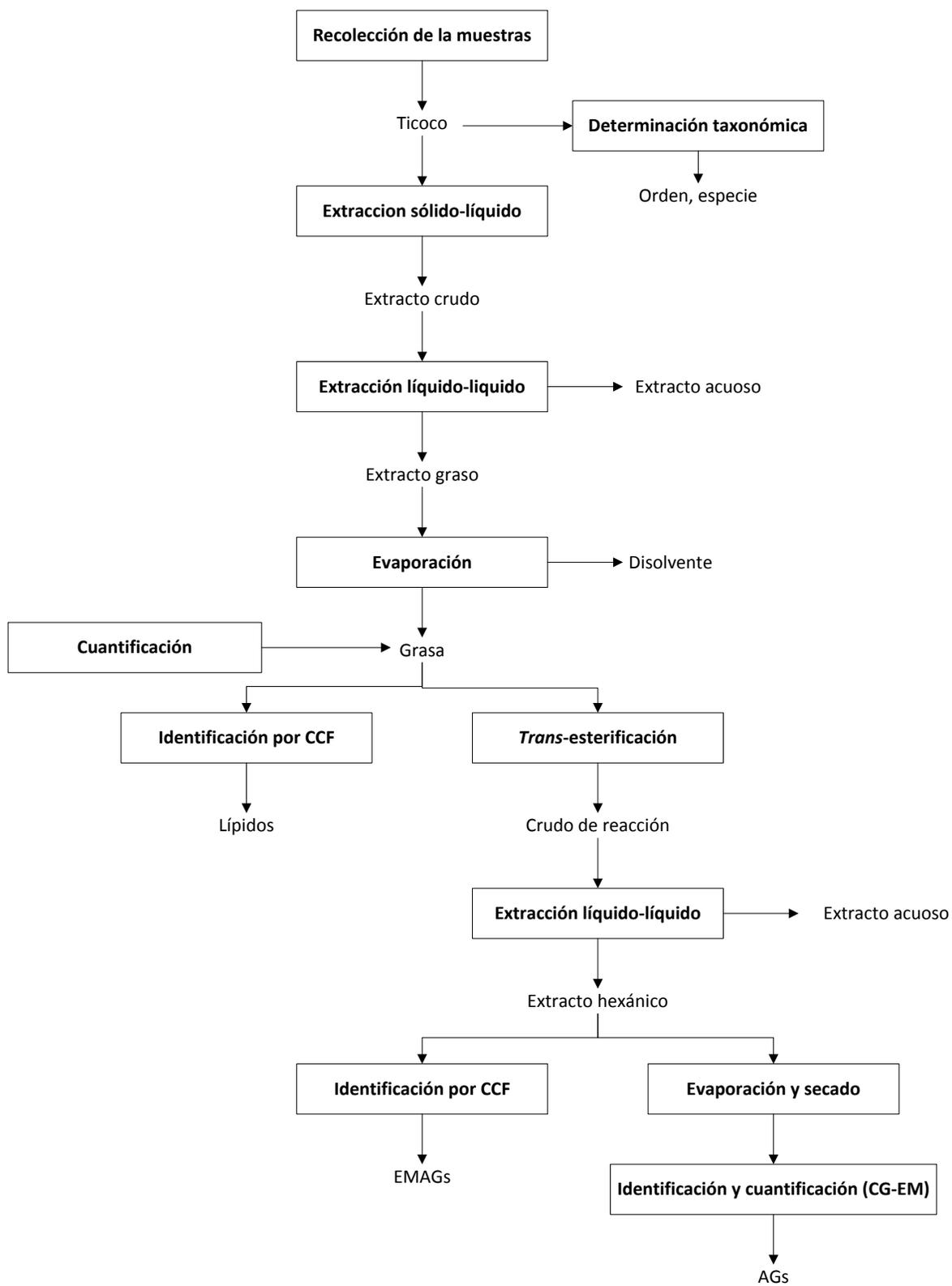


Figura 6. Etapas del desarrollo experimental de esta de tesis.

7.2 Recolección del insecto de ticoco

La recolección del ticoco se efectuó en el bosque de Santiago Yolomécatl, Teposcolula, estado de Oaxaca, que se localiza en la parte noreste del estado, en la coordenada 97° 34' longitud oeste, 17° 28' latitud norte y a una altura de 2,120 metros sobre el nivel del mar. A una distancia aproximada a la capital del estado de 147 kilómetros.

Recolección y conservación: Los insectos se extrajeron de troncos podridos de árboles de elite (*Alnus jurullensis* (Kunth 1817)), los insectos fueron removidos con ayuda de una vara curva y la madera fue removida con un hacha. Las pupas se limpiaron (remoción de partículas de madera) pesaron, midieron, y se colocaron en frascos ámbar que se almacenaron a -20°C. Por otra parte, las larvas recolectadas se mantuvieron sin alimentación por 2 días, con el propósito de que los insectos defecaran la materia orgánica contenida en su intestino. Pasado este tiempo se pesaron, midieron y fueron almacenadas del mismo modo que las pupas.

7.3 Determinación Taxonómica

Preparación de disoluciones: solución Kahle; se midieron y mezclaron los siguientes reactivos: 59 mL de agua destilada, 2 mL de ácido acético glacial, 28 mL de etanol anhidro y 11 mL de formaldehído al 37 %. La solución así descrita sirvió para la conservación del insecto previa a la identificación taxonómica (Márquez, 2005).

Análisis taxonómico: la taxonomía de las larvas, pupas y escarabajos fueron determinadas en el Laboratorio de Entomología del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por el Dr. Santiago Zaragoza Caballero.

7.4 Extracción y cuantificación de grasas

La extracción de las grasas de las larvas y pupas de ticoco se llevó a cabo empleando la técnica de EAU, y considerando las recomendaciones de Folch, Lees y Sloane, (1957),

Raksakantong *et al.*, (2010) y Elemo *et al.*, (2011), de la forma que se describe a continuación.

Preparación de disoluciones: solución de NaCl al 0.9 %; se pesaron 9 g de NaCl y se disolvieron en 1 L de agua destilada estéril y degasificada. BHT al 1%; se pesaron 10 mg de BHT y se disolvió en 1 L de MeOH degasificado. CHCl₃:MeOH (2:1, v/v); se midieron 80 mL de CHCl₃ que se mezclaron con 20 mL de MeOH, ambos degasificados.

Extracción: En un frasco ámbar de 100 mL de capacidad se pesaron aproximadamente 8 a 10 g de larvas, previamente homogenizadas, que se sometieron con disolvente a EAU, por un período de 20 min (por triplicado) a 27 °C. Se utilizaron 40 mL de una mezcla CHCl₃:MeOH (2:1, v/v), al MeOH previamente se le adicionó BHT al 1% como agente antioxidante para evitar la degradación de los AGs. Los extractos colectados se lavaron con 15 mL de una solución salina de NaCl al 0.9 % en un embudo de separación, separándose la fase clorofórmica que contenía la grasa. Se realizaron dos extracciones consecutivas con 20 mL de CHCl₃, seco y degasificado para extraer la mayor cantidad de grasa.

Cuantificación: El extracto clorofórmico resultante se concentró en un evaporador rotatorio a vacío, hasta obtener el material lipídico libre de disolventes, el cual se colocó en un vial ámbar. El contenido de grasa en base húmeda se obtuvo por diferencia de peso, y se expresó en g de grasa en 100 g de muestra, Fórmula 1. Por otra parte, el contenido de lípidos en base seca se calculó de acuerdo a la Fórmula 2, en base a los datos de humedad reportados por López-Hernández *et al.*, (2012).

$$\% \text{ de grasa base húmeda} = \frac{\text{masa del extracto lipídico}}{\text{masa inicial húmeda}} * 100$$

Fórmula 1

$$\% \text{ grasa en base seca} = \left(\frac{\% \text{ de grasa en base húmeda}}{100 - \% \text{ de agua}} \right) * 100$$

Fórmula 2

7.5 Cromatografía de capa fina

Preparación de disoluciones: Fase móvil; éter de petróleo: éter etílico: ácido acético, 100 mL de la mezcla se prepararon con 85 % hexano, 15 % éter etílico y 1 mL de ácido acético glacial (Tzompa-Sosa *et al*, 2014). Fase estacionaria; gel de sílice. Estándares de lípidos: tripalmitina HPLC, ácido linolénico, linoléico, oléico, esteárico, palmítico y palmitato de colesterol HPLC. Revelador químico; H₂SO₄ al 50 % en agua.

Cromatografía: se depositaron las muestras y los estándares a dos cm del borde inferior de la placa empleando capilares, lentamente y sin tocar con las manos el gel de sílice, se esperó que el disolvente se evaporara antes de continuar sembrando. Se colocó la placa en la cámara cromatográfica saturada con el disolvente y se dejó correr hasta que el frente avanzó a una distancia previamente fijada. Una vez terminada la cromatografía, se retiró la placa de la cámara, se marcó el frente de la fase móvil y se secó la placa al aire. Los cromatofolios fueron revelados con luz ultravioleta a 254 nm y para observar todas las señales se empleó como revelador H₂SO₄ al 50 %, sometidos a calentamiento en una parrilla eléctrica a una temperatura aproximada de 100°C. Se determinaron los R_f (Fórmula 3) comparando con los estándares, también se comparó con el extracto antes y después de la reacción de *trans*-esterificación.

$$R_f = \frac{\text{Distancia de migración: desde el origen hasta el centro de la señal}}{\text{Distancia de revelado: desde el origen hasta el frente de disolvente}}$$

Fórmula 3

7.6 Obtención de los EMAGs

El análisis de AGs se llevó a cabo mediante la obtención de sus ésteres metílicos, basándose en el método de la AOCS 1966, el cual fue empleado por Elemen *et al.*, (2011) de la siguiente manera:

Preparación de disoluciones: BHT al 5%; se pesaron 5 mg de BHT y se disolvieron en 1L de MeOH anhidro degasificado. H₂SO₄ 0.9 M en MeOH; se midieron 0.48 mL de H₂SO₄ concentrado al 98.8 %, se disolvió y aforó en 10 mL de MeOH anhidro al 5% de BHT, esta mezcla catalizadora se preparó al momento de ser utilizada para la *trans*-esterificación. NaCl al 0.9%; se pesaron 9 g de NaCl y se disolvieron en agua destilada estéril.

Trans-esterificación: Aproximadamente 40 mg del material lipídico de las larvas o pupas, se colocaron en un tubo Hach 16x150 mm; seguido 100 mg de Na₂SO₄ anhidro y 100 µL de hexano anhidro, inmediatamente se adicionó 1 mL de la solución catalizadora de H₂SO₄. La mezcla se agitó vigorosamente evitando la formación de burbujas, y se calentó a 80 °C en un digestor Hach durante el tiempo establecido por la AOCS, (1966). Después del tiempo de reacción, el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente, inmediatamente al tubo se le adicionaron 500 µL de hexano seco seguido de 1.5 mL de NaCl al 0.9%, se agitó y se dejó en reposo hasta que se observó la separación de las fases. Se realizaron las extracciones de los EMAGs con 500 µL de hexano, y los extractos hexánicos se lavaron con bicarbonato de sodio diluido para neutralizar residuos del H₂SO₄. Los extractos que contenían los EMAGs se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se recolectaron los filtrados en viales ámbar. Posteriormente el disolvente se evaporó a vacío en desecador con gel de sílice y los viales que contendían los EMAGs fueron almacenados y cubiertos con parafilm en congelación.

7.7 Identificación de los EMAGs

Los EMAGs de la fracción lipídica de la larva y pupa de ticoco, fueron caracterizados analizando los datos espectrométricos de CG-EM. Todos los datos espectrométricos se obtuvieron en el Laboratorio de Central Analítica del Departamento de Biotecnología y

Bioingeniería, del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV-IPN. Los experimentos fueron realizados por la QFB. Elvira Ríos Leal.

Condiciones Cromatográficas: Temperatura del horno 120 °C por 4 min con una aceleración de 4 °C/min hasta 250 °C, temperatura de la columna: 150 °C por 4 min con una aceleración de 5 °C/min hasta 300 °C a 10 min, volumen de inyección: 1µL, fase móvil helio: 1 mL/min, columna de 30.0 m x 320 µm.

Condiciones EM: EM Sistema Cuadrupolo SQ 8S controlado con el software TurboMass, los análisis fueron monitoreados en modo SIM, energía de Ionización: 70 eV, temperatura de transferencia 280 °C, temperatura de la fuente de ionización: 220 °C solvent delay: 3 min scan 0-500 DA.

Determinación. Los EMAGs se disolvieron en 2.5 mL de hexano HPLC, y se inyectó 1 µl al equipo de CG-EM en una aceleración 1/10 mL. La identificación se realizó comparando los tiempos de retención de estándares de AGs puros metilados, generando sus correspondientes espectros de masa, estos espectros fueron comparados con los espectros de la biblioteca del equipo.

Cuantificación: Los EMAGs de los extractos hexánicos se disolvieron en hexano HPLC, y para su cuantificación se prepararon previamente curvas de calibración de AGs metilados puros (mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico y linoléico), Apéndice I.

7.8 Efecto del tiempo de reacción sobre la concentración de AGs

Se realizó una cinética de reacción para determinar el tiempo óptimo para cuantificar la mayor concentración de AGs a partir de sus correspondientes EMAGs. Esta cinética fue monitoreada por CCF y CG-EM a los tiempos de 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 y 360 min de la forma descrita en la sección 7.6. La cinética se realizó por duplicado sobre los extractos grasos de la pupa de ticoco. Una vez determinado el tiempo óptimo se reprodujo la reacción por triplicado para su cuantificación por GC-EM.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Localización y obtención del insecto comestible

Las larvas, pupas e imagos fueron recolectados en los bosques de Santiago Yolomécatl, Teposcolula, Oaxaca. Los puntos de muestreo correspondieron únicamente a dos lugares cuya ubicación fue de aproximadamente 500 metros uno con respecto al otro, en cada lugar sólo se seleccionó una planta para la recolección de los insectos. Una característica importante de los puntos de colecta fue que las plantas hospederas se encontraban cercanas a yacimientos de agua. Dichas plantas fueron árboles denominados *Alnus jurullensis* Kunth 1817 (Elite), según estudios de identificación realizados por el M. C. Rafael Barba, del Herbario Nacional del Instituto de Biología, de la UNAM.

La recolección se realizó cuidadosamente evitando dañar al insecto por corte y manipulación, estas recolecciones fueron durante la mañana con el propósito de evitar que los insectos se expusieran al sol. En el habitat natural de los insectos, se encontraron larvas y pupas. Se observó también la metamorfosis de una larva a pupa cuando ésta se encontraba dentro del nido del árbol. Después de la recolección, los insectos fueron colocados en una caja con aserrín con la finalidad de evitar el daño físico (fricción, mordeduras etc.) y ambiental (calor, humedad, luz) durante el transporte al Laboratorio de Química de la UTM.

8.2 Características físicas de las larvas y pupas de ticoco

En la Tabla 5 se muestran los datos correspondientes al peso y a las dimensiones (largo y grosor), para las larvas y pupas de ticoco. El peso promedio de 22 pupas fue de 6.95 ± 1.65 g de pupa entera, con una longitud y anchura media de 5.39 ± 0.43 cm y 2.38 ± 0.21 cm, respectivamente. En el caso de la pupas, su tamaño y peso fueron mayores que para las larvas, cabe mencionar que las dimensiones de estos insectos variaron debido a los parámetros intrínsecos y extrínsecos del lugar donde fueron colectados (su biología, clima,

tipo de vegetación, suelo etc.), según Bukkens (1997) los cuales han sido observados en otros insectos comestibles

Tabla 5. Dimensiones promedio de larvas y pupas de ticoco

Característica	Larva	Pupa
Peso (g)	4.25±1.54	6.95±1.65
Longitud (cm)	5.87±0.29	5.39±0.43
Grosor (cm)	2.35±0.41	2.38±0.21

8.3 Determinación taxonómica de larvas y pupas de ticoco

Para identificar de manera adecuada al insecto se realizó la preparación y conservación por separado, de la larva, pupa y escarabajo del ticoco en una solución Kahle, Figura 7.

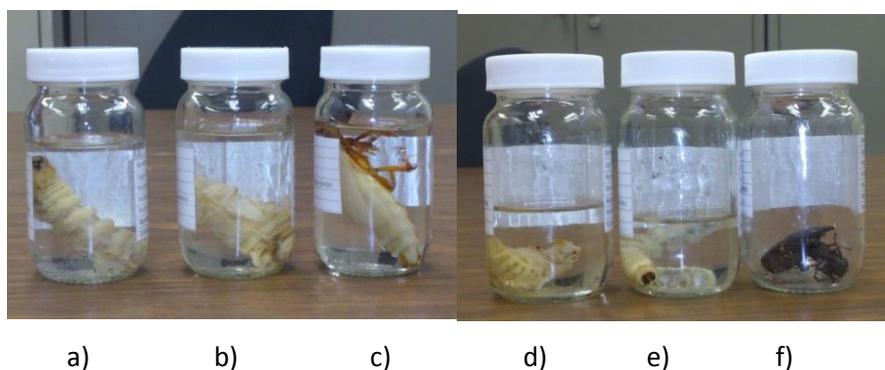


Figura 7. Conservación del insecto ticoco en diferentes etapas, a) larva, b) pupa, c) pupa, d) pupa, e) larvas y f) imago.

Las muestras fueron enviadas al Departamento de Zoología del Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, IB-UNAM, donde el Dr. Santiago Zaragoza Caballero, Investigador especialista en coleópteros, identificó a los insectos, Tabla 6.

Tabla 6. Identificación taxonómica del insecto comestible ticoco.

Estado	Nombre Científico
Larva (Figura 7 a)	Larva de la Familia Buprestidae
Pupa (Figura 7 b)	Pupa de la Familia Cerambycidae
Imago incompleto (pupa) (Figura 7 c)	<i>Derobrachus</i> sp. (Cerambycidae)
Pupa (Figura 7 d)	Pupa de la Familia Cerambycidae
Larvas (Figura 7 e)	larvas de la Familia Buprestidae
Imago (Figura 7 f)	<i>Malldonopsis mexicanus</i> (Thomson, 1860) (Cerambycidae)

Los insectos (a, (b), (c) y (f) fueron extraídos del punto de muestreo 1 y los insectos (d) y (e) extraídos del punto de muestreo 2.

Cabe mencionar que las larvas y pupas de los insectos no pudieron ser clasificadas hasta género y especie ya que para tal procedimiento se requiere su imago (adulto). De esta forma, se determinó que de las larvas recolectadas unas pertenecen a la Familia Buprestidae mientras que otras pertenecen a la familia Cerambycidae, ambas del orden coleóptera. Las pupas recolectadas en esta investigación concuerdan con las de la familia Cerambycidae reportadas por Ramos-Elorduy *et al.*, (1997), Tabla 1. Por otra parte, el imago incompleto Figura 7 c) corresponde a la taxonomía de *Derobrachus* sp, del cual se muestra el insecto adulto en la Figura 8. Es importante mencionar que las larvas de este insecto ya están registradas como comestibles, pero se desconoce el contenido y composición de AGs en ambos estados (larvas y pupas).



Figura 8. *Derobrachus* sp, Wikipedia.org, (2013).

En el caso del imago (Figura 7 f), se determinó que el insecto adulto corresponde a *Malladomopsis mexicanus* (Thompson, 1860), el cual aún no ha sido reportado como insecto comestible y se desconoce el tipo y contenido de AGs (Figura 9), no obstante, en la población de Santiago Yolomécatl ya se consumen sus larvas y pupas.

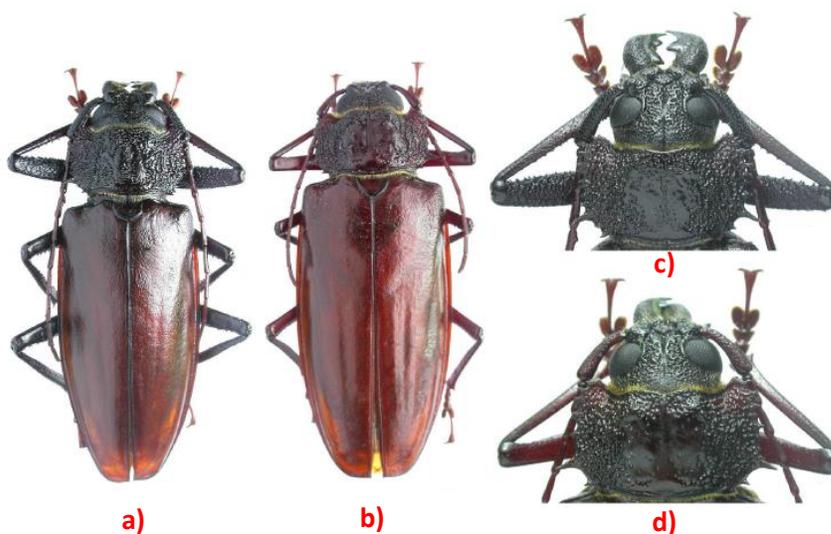


Figura 9. *Malladonopsis mexicanus* Thomson 1860, a-b) vista dorsal a) macho; b) hembra. c-d) Cabeza y pronoto c) macho, d) hembra (Santos-Silva, Thomas, Wappes, 2011)

8.4 Obtención del extracto graso

Los extractos crudos adquirieron una coloración amarilla muy tenue, y posterior a la separación de la fase orgánica mediante el lavado con NaCl 0.9 %, la fase inorgánica adquirió una coloración amarilla debido a la presencia de compuestos polares como azúcares, aminoácidos, fenoles, pigmentos y vitaminas (Bukkens, 1997; Finke, 2002). Una vez colectada la fase clorofórmica se sometió a evaporación del disolvente, y el extracto restante resultó ser líquido a temperatura ambiente con una coloración amarilla muy tenue y con olor característico.

El contenido total de lípidos en base húmeda y base seca se muestra en la Tabla 7. Para el caso de las larvas se obtuvo un contenido lipídico total de 22.15%, las diferencias observadas en los diferentes estados de desarrollo estudiados están relacionadas con los factores endógenos y/o exógenos (temperatura, nutrientes, la disponibilidad de alimentos, diferencias biológicas como tamaño, sexo y ciclo biológico, entre otros factores), los cuales pudieron influir en las diferencias del contenido lipídico en los estados de desarrollo del ticoco. Generalmente, el porcentaje de lípidos en los insectos varía entre el 10 y el 30%, sobre una base húmeda, en mayor cantidad se encuentran los ácidos oléico, linoléico y linolénico (DeFoliart, 1991); dicha variación depende de la especie y/o de los estados de desarrollo. Por ejemplo, para las orugas (Lepidoptera) el intervalo de lípidos totales va de 8.6 a 15.2 g/100 g base húmeda, en contraste, los saltamontes y especies relacionadas (Orthoptera) se encuentra de 3.8 hasta 5.3 g/100 g de insecto en base húmeda (Bukkens, 1997). En el caso del ticoco (coleóptero) en sus dos etapas de desarrollo contiene aproximadamente la misma cantidad de lípidos, pero en este trabajo se cuantificó una concentración mayor en la pupa (23.25 % en base húmeda). Aunque las larvas de ticoco almacenan la mayor cantidad de lípidos como reservas metabólicas (períodos de alta demanda energética) de la siguiente fase (pupa) hasta su metamorfosis completa (imago), en este caso las pupas recolectadas tuvieron poco tiempo para transformarse (de larva a pupa) y esto pudo influir en los resultados presentados aquí.

Tabla 7. Contenido de lípidos totales, g/100 g

Estado	Base húmeda	Base seca
Larva	22.15 ± 1.50	66.96 ± 1.22
Pupa	23.25 ± 1.85	71.63 ± 1.36

% de grasa, promedio de tres replicas.

Por otro lado, se ha reportado que la extracción de Folch aplicando ultrasónidos mejora de manera significativa la extracción de los lípidos en comparación con los métodos

convencionales como la extracción acuosa, Soxhlet, y la extracción asistida por microondas, estas dos últimas con aplicación de calor (Tzompa-Sosa *et al.*, 2014). Lo anterior se refleja al comparar los resultados de las Tablas 1 y 7, ya que para el caso de la pupa se obtuvo una diferencia del 22.27 % entre el método de Folch y el Soxhlet, y un 15.40 % para larvas, obteniéndose una mayor concentración de lípidos en base seca mediante el método de Folch, para ambos estados.

8.5 *Trans*-esterificación del extracto lipídico

Se midieron 100 μ L (aproximadamente 40 mg) del extracto graso seco los cuales se disolvieron en 100 μ L de hexano degasificado. La muestra se puso a reaccionar con 2 mL de una mezcla H_2SO_4 en MeOH (0.9 M) para obtener los EMAGs correspondientes. Posterior a la reacción, el producto se sometió a un proceso de secado a vacío, los rendimientos después de la *trans*-esterificación fueron del 80 %, a los 180 min. Cabe mencionar que el hexano añadido a la reacción fue para lograr una mayor solubilidad del extracto, debido a que se observó que éste no se disolvía completamente por la formación de un coágulo, el cual impedía que la reacción se llevara a cabo de manera eficiente.

8.6 Análisis de los extractos grasos por cromatografía en capa fina (CCF)

Los análisis de CCF mostraron una separación del extracto crudo (Figura 10) en tres componentes correspondientes a TG, AGs y colesterol. La identificación se llevó a cabo con los estándares de TG (tripalmitina) AGs (oléico, linoléico, linolénico, esteárico y palmítico) y colesterol (palmitato de colesterol) comparando los valores de sus R_f . En todos los casos, la señal al frente en cada cromatograma correspondió al BHT (observado bajo luz UV a 254 nm), antioxidante empleado para prevenir la degradación de los lípidos insaturados.

Por otra parte, la separación por CCF empleada en este trabajo concuerda con lo reportado para otros insectos (Tzompa-Sosa *et al.*, 2014), entre los cuales se encuentra un coleóptero que ya se comercializa y consume. En dicho cromatograma se muestra la separación de seis clases de lípidos: los no polares (éster de colesterol, TG, AGs libres, DG, MG) y los polares (fosfolípidos). Cabe mencionar que en los extractos del ticoco también pueden estar presentes los fosfolípidos y que por su polaridad no migraron, lo que concuerda con lo observado por Tzompa-Sosa *et al.*, (2014). La presencia de los AGs libres observados en los extractos de ticoco, Figura 10, puede atribuirse a la presencia de lipasas durante el descongelamiento de la muestra, debido a que a esas temperaturas las lipasas tiene actividad hidrolítica de los TG (Joseph, Ramteke, Thomas, 2008), o bien se puede atribuir a la biosíntesis de AGs en el metabolismo del insecto (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988; Morgan, 2010). Sin embargo, los AGs libres observados en el ticoco están en baja concentración comparados con los obtenidos por Tzompa-Sosa *et al.*, (2014), debido tal vez a la presencia de lipasas. La presencia del colesterol en el extracto del ticoco pudo deberse al método de extracción de Folch (Tzompa-Sosa *et al.*, 2014).

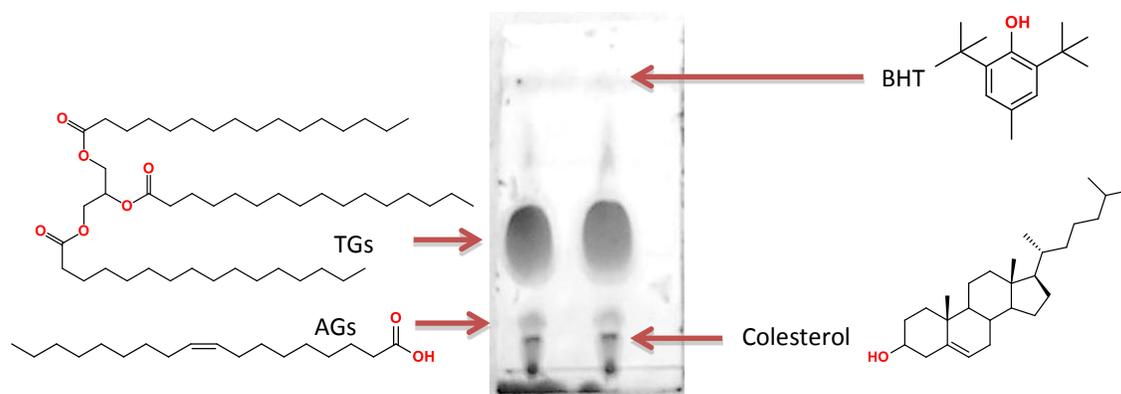


Figura 10. Separación de lípidos del extracto graso del ticoco por CCF en gel de sílice. Fase móvil: 84.155% hexano, 14.855% éter dietílico y 0.99 % de ácido acético glacial.

En la Figura 11 (b) se muestra el comportamiento de los componentes lípidicos después de la *trans*-esterificación. Se puede apreciar la separación de los EMAGs y la disminución en la concentración de TGs y AGs. Para corroborar la presencia de los EMAGs en el extracto, también se *trans*-esterificaron los AGs puros (oléico, linoléico, linolénico, palmítico y esteárico), y se obtuvo una señal con un R_f que coincide con aquellas obtenidas en el extracto reaccionado Figura 11 (c y d). Por otro lado, la señal correspondiente al colesterol apareció con el mismo R_f antes y después de la reacción de *trans*-esterificación, Figura 11 (b y e). La Tabla 8 muestra los valores de los R_f determinados para los componentes que se describieron con anterioridad.

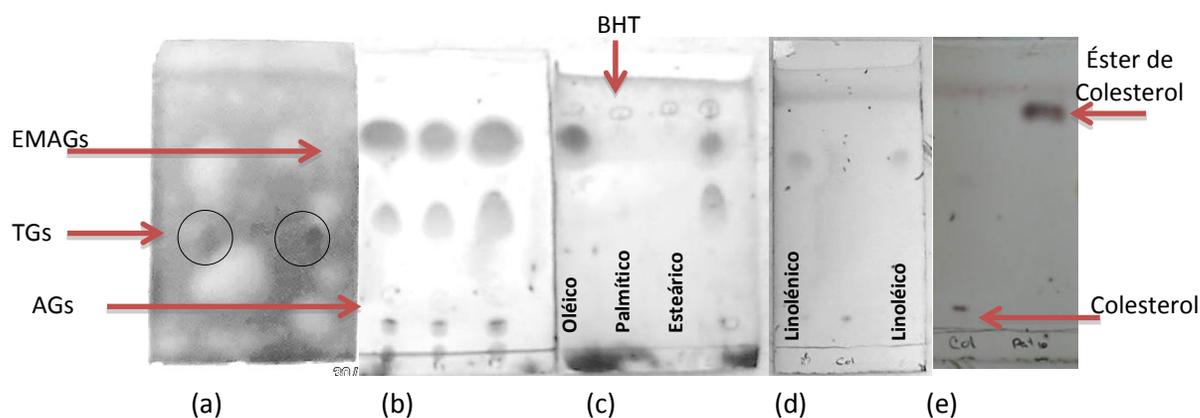


Figura 11. Separación de lípidos por CCF en gel de sílice, fase móvil; 84.15% hexano, 14.85% éter etílico y 0.99 % de ácido acético glacial, a) TG (tripalmitina), b) extracto de ticoco a los 60 min de la reacción de *trans*-esterificación, c) y d) EMAG de los AGs puros, y e) colesterol libre y colesterol esterificado.

Como resultado del monitoreo de las reacciones de *trans*-esterificación para la obtención de los EMAGs se puede decir que el extracto de ticoco contiene en su composición los estándares empleados en este estudio, en base a los valores R_f .

Tabla 8. R_f de señales del extracto graso de ticoco y estándares

Señal	Compuestos	R_f
1	BHT	1.00
Estándar 0	Tripalmitina (TG)	0.44
Estándar 1	Ácido oléico	0.19
Estándar 2	Ácido esteárico	0.2
Estándar 3	Ácido palmítico	0.18
Estándar 4	Ácido linoléico	0.21
Estándar 5	Ácido linolénico	0.22
Estándar 6	Éster metílico del ácido oléico	0.74
Estándar 7	Éster metílico del ácido esteárico	0.73
Estándar 8	Ester metílico del ácido palmítico	0.73
Estándar 9	Éster metílico del ácido linoléico	0.74
Estándar 10	Éster metílico del ácido linolénico	0.75
Estándar 11	Éster de colesterol (palmitato de colesterol)	0.94
Estándar 12	Éster de colesterol reaccionado a los 60 min.	0.11
Extracto de ticoco reaccionado a los 60 min.	EMAGs	0.74
	TGs	0.46
	AGs	0.16
	Colesterol	0.11

8.7 Efecto del tiempo de reacción de *trans*-esterificación

La metodología implementada y validada por la AOCS (1966) para la obtención de EMAGs a partir de AGs en aceites vegetales establece que el tiempo de reacción necesario es de una hora. No obstante, en este proyecto de tesis se realizó una cinética de reacción para el proceso de *trans*-esterificación con la finalidad de detectar cambios en el contenido de los componentes presentes en el extracto de pupa (por ejemplo, la migración de los dobles enlaces de los PUFAs). En la Figura 12 se muestra el comportamiento a través del tiempo de reacción para la obtención de los EMAGs a partir del extracto graso de ticoco, estos resultados fueron monitoreados por CG-EM y CCF (Figura 12 f).

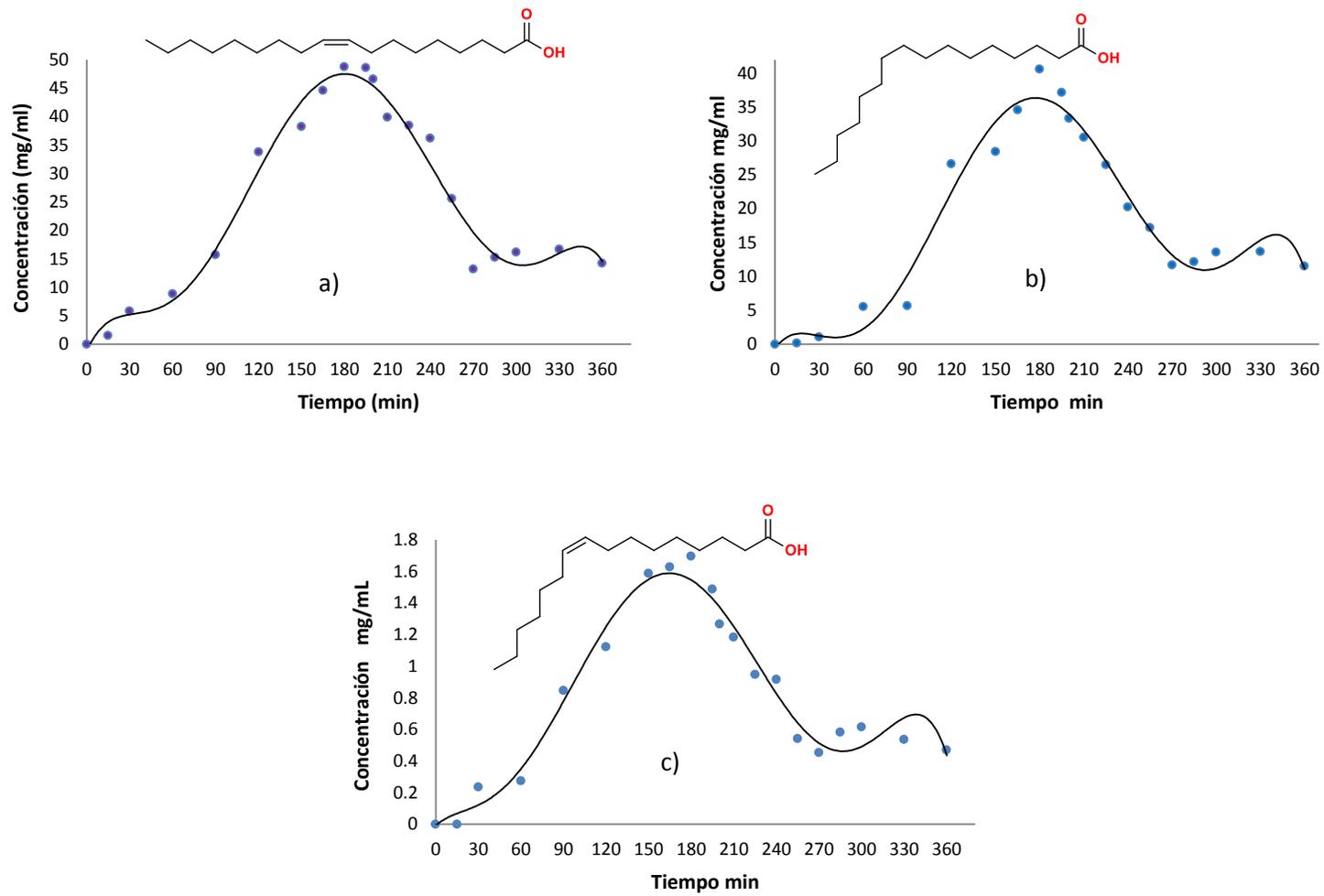


Figura 12. Cinética de reacción de *trans*-esterificación del aceite de ticoco: a) ácido oleico, b) palmítico, c) palmitoléico.

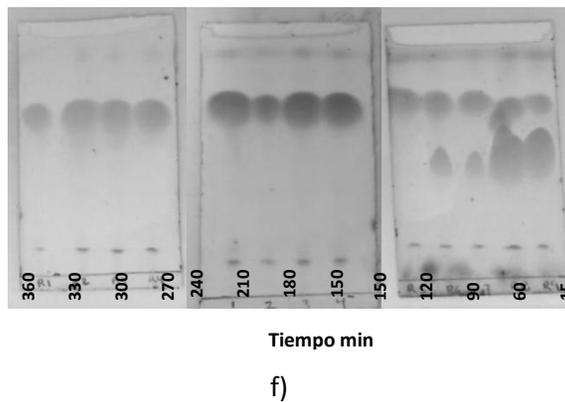
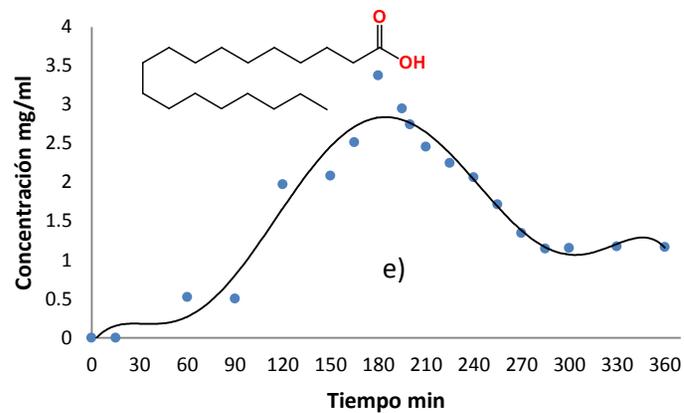
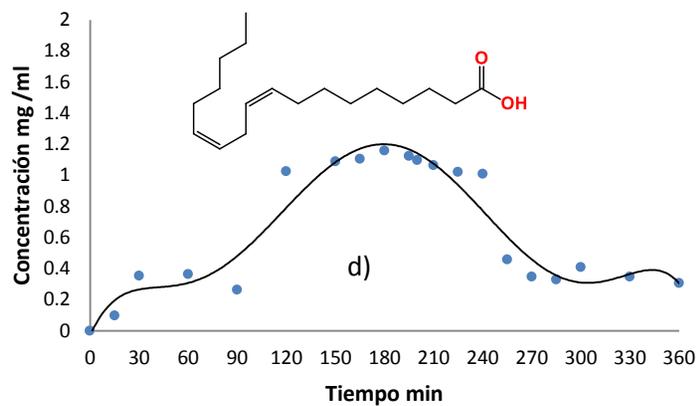


Figura 12 (continuación). Cinética de reacción de *trans*-esterificación del aceite de ticoco: d) ácido linoléico, e) esteárico y f) CCF del aceite *trans*-esterificado.

Como se puede apreciar en las Figuras 12 (a-e), la concentración de los EMAGs aumenta proporcionalmente al tiempo de reacción. La máxima concentración de estos componentes se obtuvo a los 180 min de reacción, después de este tiempo las concentraciones disminuyeron. Se ha observado que a mayor tiempo de reacción en los aceites se generan transformaciones químicas en las estructuras de sus componentes (Hansen, Smith, 1966). Lo anterior se puede explicar en base a las posibles rupturas de enlaces carbono-carbono de los dobles enlaces por el agente oxidante (H_2SO_4) generando subproductos coloreados posiblemente hidrocarburos u otros compuestos volátiles que simplemente no fueron detectados por CG-EM por estar en trazas. Por tal motivo, el tiempo de tres horas fue seleccionado para realizar los procesos de *trans*-esterificación de las muestras de grasa estudiadas en este proyecto de tesis. Además, a este tiempo de reacción se tuvo un rendimiento del 80%, Figura 13.

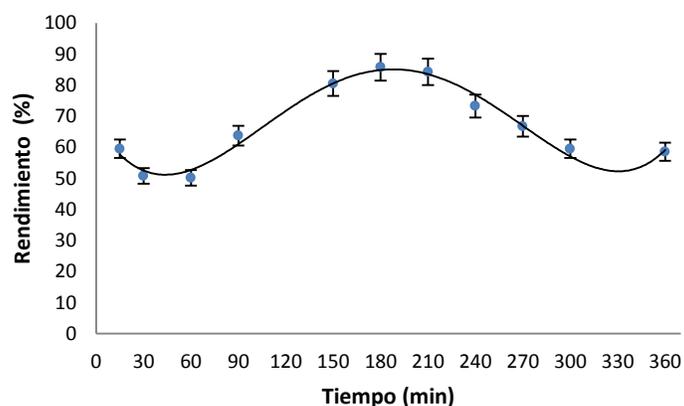


Figura 13. Rendimiento del producto de reacción a través del tiempo de *trans*-esterificación del extracto graso de pupa de ticoco.

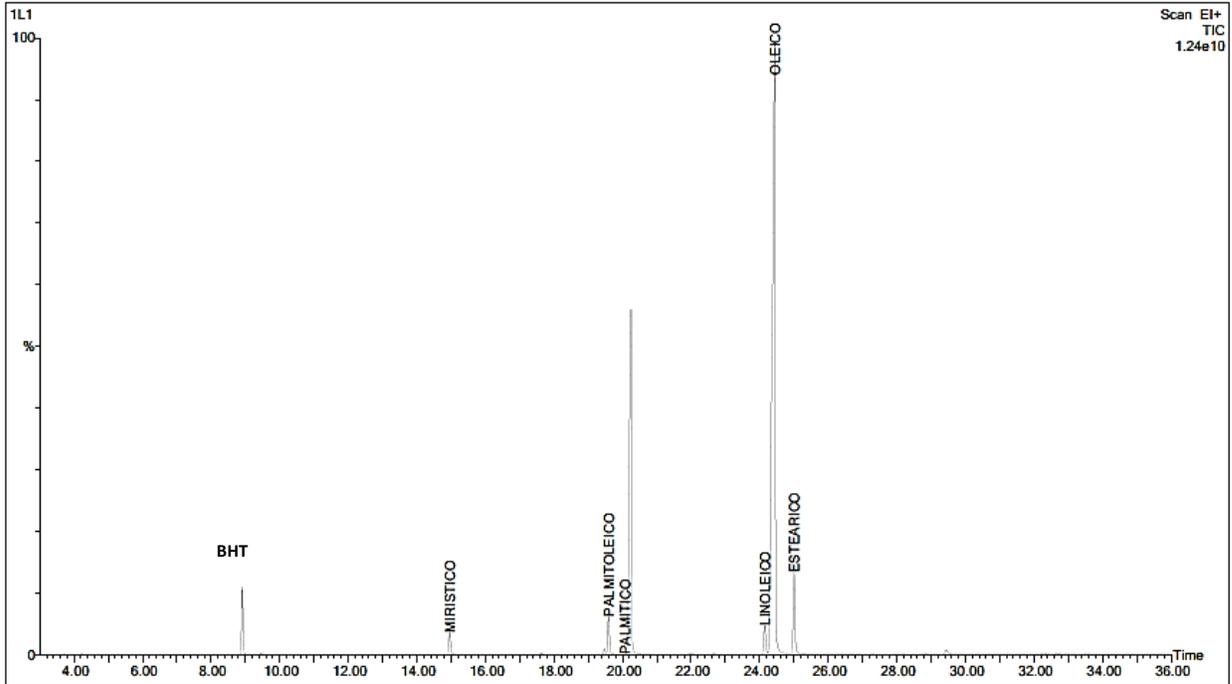
8.8 Perfil de AGs en larvas y pupas de ticoco

Los extractos de aceite de larva y de pupa de ticoco fueron líquidos a temperatura ambiente, lo cual es inusual para aceites de origen animal. Esto se puede atribuir a la

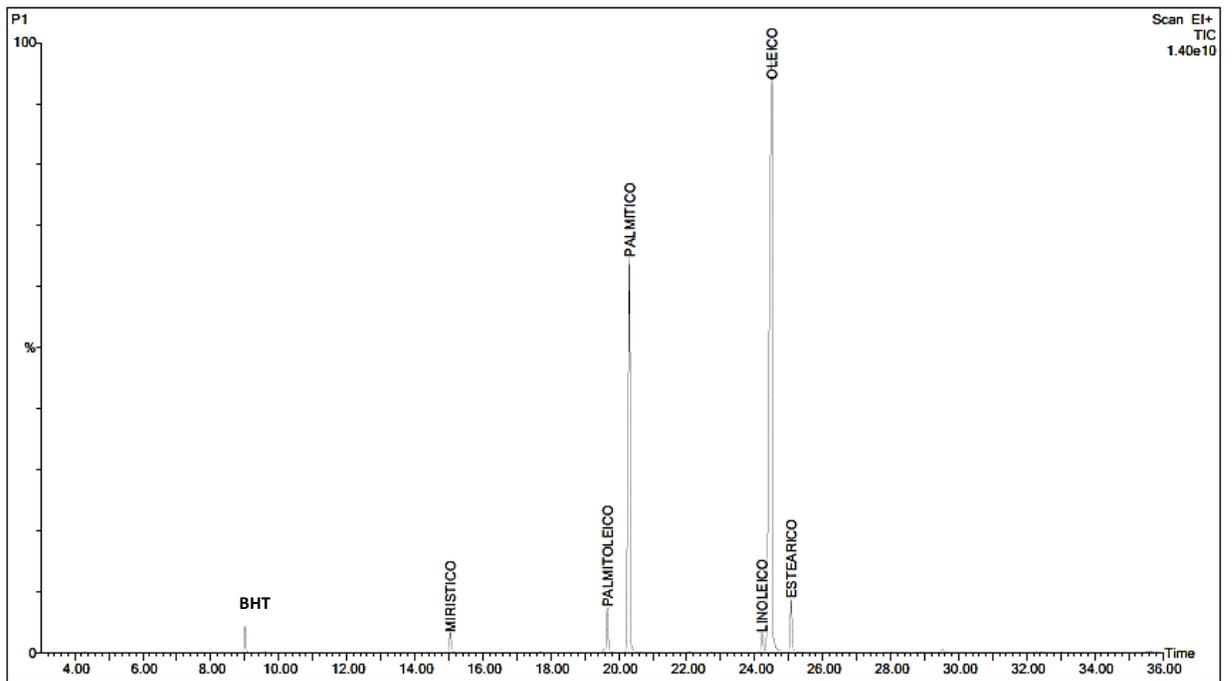
presencia de MUFAs y PUFAs. En ambos extractos se identificaron seis componentes mayoritarios Figura 14 (a) y (b), los que se dividen en SFA: ácido mirístico, que es común de la nuez moscada; ácido palmítico, predominante en el aceite de palma; ácido esteárico, que se encuentra generalmente en la manteca de cerdo. MUFAs como palmitoléico y oléico, usado como suplemento alimenticio y un PUFA: ácido linoléico, el cual es un ω -6 fundamental en la alimentación del ser humano debido a sus efectos funcionales.

Al comparar los dos estados, se encontró que la concentración media de ácido linoléico en las larvas fue significativamente mayor que en las pupas ($P \leq 0.05$), Tabla 9. Se sabe que el ácido linoléico es precursor de varias rutas metabólicas (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988; Morgan, 2010) y pudiese haber sido consumido en la fase de pupa. Por otro lado, los resultados obtenidos aquí sugieren que el insecto sintetiza una mayor cantidad de AGs ω -9 y en menor proporción AGs ω -6, debido a su alimentación a base de material vegetal (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988; Morgan, 2010). Cabe resaltar que el ácido linoléico se suele relacionar a una dieta vegetariana como la que llevan los insectos (Galli, Marangoni, 2006), por lo tanto los insectos tienden a almacenar AGs ω -6 y ω -9, al igual que los animales terrestres y acuáticos (Napolitano 1998; Koussoroplis *et al.* 2008).

En el caso del ácido mirístico, no se encontró diferencia significativa en el contenido de este ácido en las pupas y larvas del ticoco. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácido palmítico y esteárico ($P \leq 0.05$), siendo significativamente menor el contenido de ácido palmítico en larvas y significativamente mayor el contenido de ácido esteárico en larvas. Se ha de señalar que la variabilidad en el contenido de AGs incluso dentro de insectos denominados “ticoco”, se puede deber probablemente a los factores intrínsecos (estado de desarrollo, alimentación del insecto) que no se controlaron en el presente trabajo (Dridi, Romdhane, El Cafsi, 2008; Gimenez, Estevez, Henderson, Bell, 2008; Elsdon, 2010). El contenido de grasa insaturada encontrada en el ticoco está dentro del intervalo reportado en la literatura para otros tipos de insectos (Fontaneto *et al.*, 2011; Dufour, 1987).



(a)



(b)

Figura 14. Cromatogramas del extracto esterificado de ticoco, a) larva y b) pupa.

Tabla 9. Composición de AGs en larvas y pupas de ticoco g/100g

AG	Larva de ticoco	Pupa de ticoco
Mirístico	2.99±0.03	2.89±0.15
Palmítico	39.99±0.62	42.91±0.67*
Palmitoléico	2.36±0.24	2.97±0.05
Esteárico	7.88±0.88*	5.88±0.29
Oléico	40.98±0.39	42.00±0.86
Linoléico	5.78±1.60*	3.35±0.10
SFA	50.87±1.15	51.68±0.03
MUFA	43.35±0.21	44.97±0.05
PUFA	5.78±1.60	3.35±0.10

*Significativamente mayor en concentración ($P \leq 0.05$)

La Tabla 10 presenta un comparativo de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación con datos reportados por otros autores, para larvas de coleópteros comestibles. En la tabla se observa que la pupa de ticoco presentó la mayor concentración de ácido palmítico en comparación de las otras especies de coleópteros. En el caso del ácido oléico, la concentración está por debajo de la concentración determinada en larva de *R. Palmarum*⁴ (Linnaeus, 1758) (59.20%), pero se asemeja a la concentración de la larva de *R. Phoenicis*³ (Fabricius, 1801) (41.09±0.53%). Uno de los resultados más importantes fue que efectivamente se encontraron AGEs en el ticoco, donde el AG predominante fue el ácido oléico ω -9 seguido del ácido linoléico ω -6, que es considerado un componente importante en la dieta humana. Las concentraciones del ácido linoléico para la larva de ticoco fueron mayores a las reportadas para *R. Palmarum*⁴ (Linnaeus, 1758), y *R. Phoenicis*³ (Fabricius, 1801), pero menores a las reportadas para las larvas de *Oryctes owariensis*⁶, (Palisot, 1807).

Tabla 10. Composición de AGs (g/100g) de extractos lipídicos de coleópteros comestibles

AG	<i>R. phoenicis</i> ¹	<i>R. phoenicis</i> ²	<i>R. phoenicis</i> ³	<i>R. Palmarum</i> ⁴	<i>Copris nevinsoni</i> ⁵	<i>Holotrichia sp</i> ⁵	<i>Oryctes owariensis</i> ⁶	<i>Tenebrio molitor</i> ⁷	Larva de ticoco ⁸	Pupa de ticoco ⁸
Láurico	ND	ND	0.22±1.24	0,08	ND	ND	0.12±0.01	0.14	ND	ND
Mirístico	1.8	ND	3.69 ±0.94	2.76	0.29±0.02	ND	2.50±0.21	3.18	2.99±0.03	2.89±0.15
Palmítico	38.0	35.30±0.29	31.10±0.58	28,01	1.31±0.04	0.77±0.0	0.20±0.00	17.31	39.99±0.62	42.91±0.67
Palmitoléico	2.5	ND	2.96±0.25	1.20	ND	0.51±0.0	37.6±1.12	2.05	2.36±0.24	2.97±0.05
Esteárico	4.5	60.47±0.34	3.59 ±0.58	5.95	28.26±0.5	27.92±0	0.23±0.00	2.82	7.88±0.88	5.88±0.29
Oléico	46.2	0.72±0.08	41.09 ±0.53	59.20	3.68±0.01	5.59±0.0	5.24±0.13	49.15	40.98±0.39	42.00±0.86
Linoléico	5	3.51±0.19	12.50 ±0.44	1.14	ND	ND	45.46±1.0	23.35	5.78±1.60	3.35±0.10
ALA	1.5	ND	3.70 ±0.12	0.32	1.75±0.04	ND	4.19±0.08	0.85	ND	ND
γ Linoléico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.012	ND	ND	ND
Dihomo-γ Linolenico	ND	ND	ND	ND	10.36±0.11	13.86±0.08	ND	ND	ND	ND
ARA	ND	ND	1.15±0.22	ND	40.24±0.15	47.26±0.35	ND	ND	ND	ND
EPA	ND	ND	ND	ND	12.94±0.05	ND	ND	ND	ND	ND
DMA		ND	ND	ND	ND	3.39 ± 0.12	ND	ND	ND	ND
SFA	44.30	95.77	38.60	36.80	31.72±0.6	29.42±0.1	3.05±0.02	23.52	50.87±1.15	51.68±0.03
MUFA	48.70	0.72	44.05	60.4	3.68±0.01	6.11±0.07	43.63±0.79	52.01	43.35±0.21	44.97±0.05
PUFA	6.50	3.51	16.2	1.46	65.27±0.3	64.50±0.5	50.8±1.13	27.15	5.78±1.60	3.35±0.10

ND: no detectado, ¹Bukkens, 1997, ²Elemo *et al.*, 2011, ³Nzikou *et al.*, 2010, ⁴Landívar, 2012, ⁵Raksakantong *et al.*, 2010, ⁶Womeni *et al.*, 2009, ⁷Tzompa-Sosa *et al.*, 2014, ⁸Autores.

En base a lo anterior, los insectos terrestres serían una mejor fuente de ω -6 y ω -3, en comparación a los animales marinos los cuales requieren de un proceso de refinación para hacerlos agradables y seguros al consumidor (Domingo, Bocio, Falco, Llobet, 2007; Huang, Sathivel, 2010; Szlinder-Richert, Barska, Usydus, Grabic, 2010; Antelo, Lopes, Franco-Uría, Alonso, 2012). Cabe mencionar que en el ticoco no se detectaron los siguientes AGs: α -Linolénico ARA, EPA, DHA entre otros; lo que no necesariamente indica su ausencia en el extracto de ticoco porque podrían encontrarse en trazas y al momento de realizar la determinación, no fueron detectados por el equipo. Lo anterior implica que los componentes aquí reportados pueden corresponder únicamente a los que se encuentran en mayor concentración. Por otro lado, como se observa en Tabla 10, el ticoco en ambos estados contiene una mayor concentración de SFAs seguido de MUFAs y con una menor concentración de PUFAs. Además, de que el porcentaje de PUFAs en la larva del ticoco es menor que lo reportado para la especie de *Copris nevinsoni*⁵ (Waterhouse, 1891), *Holotrichia sp*⁵ y *Oryctes owariensis*⁶ (Palisot, 1807). También se observa que sólo el 50.87% (larva) y 51.68% (pupa) del aceite del ticoco corresponde a SFA, lo que representa una cantidad ligeramente menor a otros alimentos, como la carne.

8.9 Comparativo del aceite de ticoco con aceites vegetales

En cuanto a la composición, la grasa extraída de larva y pupa del ticoco presenta un contenido elevado de ácido oléico (40.98% y 42.00%, respectivamente), superior al reportado para los aceites de girasol, soya y maíz (Scherr, Pinto, 2010); aunque menor respecto al aceite de canola. Del mismo modo, el contenido de ácido oléico es inferior al descrito por Oliveras (2005) para el aceite de oliva, como puede apreciarse en la Tabla 11. En lo referente al contenido de ácido linoléico, la grasa extraída de la larva y pupa (5.78% y 3.35%, respectivamente) presenta porcentajes menores frente a los aceites de canola, girasol y soya, sin embargo, con respecto al aceite de maíz y oliva se puede decir que tienen en promedio las mismas concentraciones, Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de AGs identificados en el ticoco con otros aceites de consumo tradicional.

AG	Larva de ticoco	Pupa de ticoco	Canola*	girasol*	Soya*	Maíz*	Oliva (extra virgen)**
SFAs	50.87	51.68	8.40	10.30	17.50	16.10	14.23
MUFAs	43.35	44.97	63.60	28.20	24.00	35.60	81.07
PUFAs	5.78	3.35	28.00	61.60	58.50	48.30	4.70
Palmítico	39.10	42.91	5.00	6.50	14.10	13.50	10.39
Oléico	40.98	42.00	62.20	28.00	23.40	35.30	80.44
Linoléico	5.78	3.35	21.40	61.50	53.30	4.60	4.13

Scherr, Pinto, 2010*; Oliveras, 2005**

Por otro lado, el aceite de ticoco supera a los aceites de origen vegetal en proporción global a SFA, no siendo el caso para MUFAs ya que está por debajo del aceite oliva y canola. Este comportamiento coincide con lo reportado por Ramos-Elorduy (2009), respecto a que en los insectos predominan los MUFAs y PUFAs, pese a que en este caso, el contenido de estos últimos fue relativamente bajo. En base a esto, se pudo corroborar el carácter saludable de los AGs presentes en los insectos, debido al elevado contenido de ácido oléico encontrado en el ticoco y que concuerda con Womeni *et al.*, (2009), en cuanto a que los insectos comestibles deben ser considerados como una alternativa potencial para mejorar la seguridad alimentaria. El alto contenido de ácido oléico demuestra un uso potencial dentro de la industria farmacéutica, debido a los efectos de éste compuesto sobre la incidencia de enfermedades cardíacas, la reducción de los niveles de colesterol en la sangre y sobre la respuesta inflamatoria (López-Huertas, 2010). Asimismo Gil (2005), reportó otros efectos saludables del ácido oléico como la reducción de la presión arterial, aumento de la vasodilatación arterial y mejoría del metabolismo de la glucosa en la diabetes. El aumento de la ingesta de AGs ω -9, ω -6 y ω -3, es beneficioso, ya que puede reducir los lípidos en la sangre, y sobre todo mejora el funcionamiento del cerebro.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Los insectos conocidos como ticoco abarcan una gran variedad de especies de coleópteros, en esta tesis se identificaron a las especies *Mallodonopsis mexicanus* (Thomson 1860) y *Derobrachus sp.*
- 9.2 Con el método EUA se tuvieron rendimientos aceptables (22.15% para larva y 23.25% para pupa), sin alterar la composición y propiedades químicas del extracto graso obtenido.
- 9.3 El tiempo de calentamiento en la reacción de *trans*-esterificación influyó en gran medida en la concentración de EMAGs, obteniéndose el tiempo óptimo de tres horas para *trans*-esterificar los TGs y AGs libres.
- 9.4 Se encontraron diferencias significativas en el contenido de ácido palmítico, linoléico y esteárico en los dos estados del ticoco ($P \leq 0.05$); para los otros ácidos no hubo diferencias significativas (palmitoléico, oléico y mirístico). En la larva de ticoco se observó una concentración significativamente mayor de ácido linoléico (AGE) en comparación de la pupa ($P \leq 0.05$).
- 9.5 En el aceite de la larva de ticoco se obtuvo un alto contenido de AGs insaturados, destacando los ácidos oléico ω -9 y linoléico ω -6 (AGE).
- 9.6 Los dos estados del ticoco pueden considerarse como fuentes alimenticias de AGs y AGEs, con valor nutritivo alto por su composición balanceada de SFAs y PUFAs.

10. PERSPECTIVAS

Las siguientes perspectivas para este trabajo tienen como finalidad, tener un conocimiento más completo sobre el insecto ticoco.

- 10.1 Identificar y caracterizar el ciclo de vida del ticoco estudiado en este proyecto de tesis, para reproducirlo en cautiverio.
- 10.2 Realizar análisis bromatológicos, nutricionales y sensoriales (proteínas, grasa bruta etc.) en los tres estados de ticoco (larva, pupa y parte abdominal del imago).
- 10.3 Realizar cromatografía en columna para fraccionar el extracto graso del ticoco para el análisis químico por CG-EM.
- 10.4 Determinar los AGs de cadena larga por medio de la CG-EM a alta temperatura tal como ha reportado Sutton *et al.*, (2013).
- 10.5 Caracterizar el aceite del ticoco mediante el análisis fisicoquímico, viscosidad, acidez titulable, índice de peróxidos, índice de refracción.
- 10.6 Determinar el contenido de vitaminas liposubles (vitamina A y E) del aceite de ticoco por HPLC.
- 10.7 Analizar la madera del árbol con vía a demostrar que la presencia de AGs en el insecto es debido al alimento o a la biosíntesis.

11. REFERENCIAS

- Aliseda R.M. (2002). Estudio de la transesterificación de aceite vegetal con metanol. Trabajo de fin de carrera. Universidad Rey Juan Carlos. 26-28.
- Ajai A. I., Bankole M., Jacob J.O., Audu U.A. (2013). Determination of some essential minerals in selected. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 7(5), 194-197.
- Antelo L.T., Lopes C., Franco-Uría A., Alonso A.A. (2012). Fish discards management: Pollution levels and best available removal techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1277-1290.
- American Oil Chemists' Society, Instrumental Committee. (1966). *Journal American Oil Chemistry Society*, 43, 10A.
- Arango-Gutiérrez G. P. (2005). Los insectos: una materia prima alimenticia promisorio contra la hambruna. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 33-37.
- Azuala R., Vargas P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*, 20(4), 30-40.
- Badui S. (2006). lípidos. En B. S., *Química de los alimentos* (4 ed., págs. 245-297). México: Pearson.
- Barceló-Coblijn G., Murphy E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 355-374.
- Baum S.J., Kris-Etherton P.M., Willett W.C., Lichtenstein A.H., Rudel L.L., Maki K.C., Whelan J., Ramsden C.E., Block R.C. (2012). Fatty acids in cardiovascular health and disease: a comprehensive update. *Journal of Clinical Lipidology*, 6, 216-234.
- Birgit A.R., Oliver K.S. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 802-823.
- Bukkens S.G.F. (1997). The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition*. 36:2-4, 287-319.
- Cakmak O., Bashan M., Bolu H. (2007). The fatty acid compositions of predator *Picocoris luduris* (Heteroptera: Lygaeidae) and its host *Monostera unicostata* (Heteroptera: Tingidae) reared on almond. *Insect Science*, (14), 461-466.
- Canavoso L.E., Jouni Z.E., Karnas K.J., Pennington J.E., Wells M. A. (2001). Fat metabolism in insect. *Annual Review of Nutrition*, 21, 23-46.

- Chakravorty J., Ghosh S., Meyer-Rochow V.B. (2011). Practices of entomophagy and entomotherapy by members of the Nyishi and Galo tribes, two ethnic groups of the state of Arunachal Pradesh (North-East India). *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 5.
- Chavunduka D.M. (2010). Insects as a source of protein to the African. *Rhodesian Science News*, 9(2), 217-220.
- Choong Y., Lin H., Chen C. (1999). A rapid gas chromatographic method for direct determination of free sterols in animal and vegetable fats and oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 7(4), 279-290.
- Christie W.W. (1989). *Gas Chromatography and Lipids: a Practical Guide*. Ayr.
- De Foliar G. R. (1991). Insect fatty acids: Similar to those of poultry and fish in their degree of unsaturation, but higher in the polyunsaturates. *Food Insects Newsletter*, 4, 1-4.
- Domingo J. L., Bocio A., Falco G., Llobet J. M. (2007). Benefits and risks of fish consumption Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, 230, 219-226.
- Dridi S., M.S. Romdhane M. El Cafsi. (2008). Growth and seasonal variations of fatty acid composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the Bizert lagoon, Tunisia. *Belgian Journal of Zoology*, 138, 158-169.
- Dufour D. L. (1987). Insects as Food: A Case Study from the Northwest Amazon. *American Anthropological Association*, 89, 383-397.
- Elemo B.O., Elemo G.N., Makinde M.A., Erukainure O.L. (2011). Chemical evaluation of African palm weevil, *Rhychophorus phoenicis*, larvae as a food source. *Journal of Insect Science*, 11(146), 1-6.
- Elsdon T. S. (2010). Unraveling diet and feeding histories of fish using fatty acids as natural tracers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 386, 61-68.
- Elvevoll E.O., James D.G. (2000). potential Benefits of Fish for Maternal, Foetal and Neonatal Nutrition: a review of the Literature. *Food Nutrition and Agriculture*, 27, 28-39.
- Evershed R. (1992). Gas chromatography of lipids. En: Hamilton R.J., Hamilton S. *Lipid Analysis: A practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 113-150.
- Fadem, Barbara. (2008). *High-Yield Behavioral Science (High-Yield Series) Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-7817-8258-9*.
- Finke M.D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21(3), 269-285.

- Folch J., Lees H., Sloane G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal Biologic chemistry*, 226, 497-509.
- Fontaneto D., Tommaseo-Ponzetta M., Galli C., Risé P., Paoletti M.G. (2011). Differences in fatty acid composition between aquatic and terrestrial insects used as food in human nutrition. *Ecology of Food and Nutrition*, 50, 351-367.
- Galli C., Marangoni F. (2006). N-3 fatty acids in the Mediterranean diet. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75, 129-133.
- Galli C., Risé P. (2009). Fish consumption, omega 3 fatty acids and cardiovascular disease. The science and the clinical trials. *Nutrition and Health*, 20, 11-20.
- Gil A. (2005). Papel de los ácidos grasos poliinsaturados en la piel, enfermedades de la piel y otras patologías emergentes. En G. Á. Francisco, *Libro Blanco de los Omega-3*. Médica Panamericana, S.A.
- Gimenez G., Estevez A., Henderson R. J., Bell J. G. (2008). Changes in lipid content, fatty acid composition and lipid class composition of eggs and developing larvae (0–40 days old) of cultured common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus 1758). *Aquaculture Nutrition*, 14, 300-308.
- Grimm M.O.W., Rothhaar T.L., Grösgen S., Burg, V.K., Hundsdörfer B., Haupenthal V.J., Friess P., Kins S., Grimm H.S., Hartmann T. (2012). Trans fatty acids enhance amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 1214-1223.
- Gustone F.D. (1992). High resolution ¹³C NMR Spectroscopy of lipids. En; Christie W.W., *Advances in lipid methology-two*. Dundee. *The Oily Press*, 1-68.
- Hamilton R.J., Hamilton S. (1992). Lipid Analysis: A Practical Approach Oxford . *University Press, Oxford*. 1-4, 263-267.
- Hansen R.P., Smith J.F., (1966). *Lipids*, 1, 316-321.
- Harris D.C. (2007). Análisis químico cuantitativo. ISBN 978-84-291-7224-9(3).
- Herzner G., Schlecht A., Dollhofer V., Parzefall C., Harrar K., Kreuzer A., Pils L., Ruther J. (2013). Larvae of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* sanitize their host, the American cockroach, with a blend of antimicrobial. *PNAS Ecology*. 110(4), 1369-1374.
- Hitchcock C.H.S., Hammond E.W. (1980). The determination of lipids in foods. in '*Developments in Food Analysis Techniques Vol. 2*', pp 185-224 (ed. R.D.King, *Applied Sci. Pub., Barking*).
- Hoffmire C.A., Block R.C., Thevenet-Morrison K., van Wijngaarden E. (2012). Associations between omega-3 poly-unsaturated fatty acids from fish consumption and severity of depressive

- symptoms: An analysis of the 2005–2008 National Health and Nutrition Examination Survey. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 86, 155-160.
- Hu F.B., Bronner L., Willett W.C., Stamfer M.J., Rexrode K.M., Albert C.M., Hunter D., Manson J.E. . (2002). Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *Journal of the American Medical Association*, 287, 1815-1821.
- Huang J., Sathivel S. (2010). Purifying salmon oil using adsorption, neutralization, and a combined neutralization and adsorption process. *Journal of Food Engineering*, 96, 51-58.
- James A.T., Martin A.T.J. (1952). Gas-liquid partition chromatograph: The separation and microestimation of volatile fatty acids. *Biochemical Journal*, 50, 679-690.
- Joseph B., Ramteke P. W., Thomas G. (2008). Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnology Advances*, 26(5), 457-470.
- Kandhro A., Sherazi S.T.H., Mahesar S.A., Bhangar M.I., Talpur Y .M., Rauf A. (2008). GC-MS quantification of fatty acid profile including trans FA in the locally manufactured margarines of Pakistan. *Food Chemistry*, 109, 207-211.
- Koussoroplis A. M., C. Lemarchand A. Bec, C. Desvillettes, C. Amblard, C. Fournier, P. Berny, and G. Bourdier. (2008). From aquatic to terrestrial food webs: Decrease of the docosahexaenoic acid/linoleic acid ratio. *Lipids* , 43, 461–466.
- Kris-Etherton P.M., Harris W.S., Appel L.J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Journal of the American Heart Association*, 19, 2747-2758.
- Larsson S.C., Kumlin M., Ingelman-Sundberg M., Wolk A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 935-945.
- Landívar M.D.V. (2012). TESIS: Evaluación del método de digestión alcalina para la extracción de grasa de larvas de *rhynchophorus palmarum* l. Universidad estatal Amazónica.
- Lehninger A.L. (1980). Bioquímica. *Barcelona; omega*, 285-289.
- Liu K.S., (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological material. *Journal American Oils Chemistry Science*, 71, 1179-1187.
- Lokeshwari R. K., Shantibala T. (2010). A Review on the fascinating world of insect resources: Reason for thoughts. *Psyche*, 70(doi:10.1155/2010/207570.), 1-11.
- López-Hernández A., Salazar-Govea A.Y, Santiago-Gómez M.P., González-Mondragón E. G. (2012). Determinación nutricional de larvas y pupas de Ticoco. *VI Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1-12.

- López-Huertas E. (2010). Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks, A review of intervention studies. *Pharmacological Research*, 61, 200-207.
- Márquez L. J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 37, 385-408.
- McLafferty F.W., Turecek F. (1993). Interpretation of Mass Spectra. *University Science Books*, 374.
- Metherel A.H., Taha A.Y., Izadi H., Stark K.D. (2009). The application of ultrasound energy to increase lipid extraction throughput of solid matrix samples (flaxseed). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81, 417-423.
- Micha R., Mozaffarian D. (2008). Trans fatty acids: Effects on cardiometabolic health and implications for policy. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79, 147-152.
- Moreno-Gil J.S. (1995). *Manual de estadística universitaria: inductiva* (Ilustrada ed.). ESIC.
- Morgan D.E. (2010). Fatty acid and cuticular hydrocarbons in *Biosynthesis in insects*. *Royal Society of chemistry*. 66-95.
- Murray R.K. (2001). Bioquímica de Harper. Mexico: Manual Modern.
- Napolitano G. E. (In Lipids in freshwater ecosystems, ed. M. T. Arts, and B. C. Wainman, 21-44. New York: Springer. de 1998). Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. En Springer (Ed.), *Lipids in freshwater ecosystems*. (págs. 21-44). New York: M. T. Arts, and B. C. Wainman.
- Nzikou J.M. Mbemba F., Mvoula-Tsiéri M., Diabangouaya-Batéla B., Malela K.E., Kimbonguila A., Ndangui C.B., Pambou-Tobi N.P., Silou Th., Desobry S. (2010). Characterisation and Nutritional Potentials of *Rhynchophorus phoenicis* Larva Consumed in Congo-Brazzaville. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 2(3), 189-194.
- Oliveras M. J. (2005). Calidad del Aceite de Oliva Virgen Extra. *Antioxidantes y Función Biológica*, 76-77.
- Osasona A.I., Olaofe O. (2010). Nutritional and functional properties of *Cirina forda* larva from Ado-Ekiti, Nigeria. *African Journal of Food Science*, 4, 775-777.
- Raksakantong P., N. Meeso J. Kubola S. Siriamornpun. (2010). Fatty acids and proximate composition of eight Thai edible terricolous insects. . *Food Research International*, 43, 350-355.
- Ramos-Elorduy J. (2009) Anthro-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability [Publicación periódica] // *Entomological Research*. - [s.l.]: The Entomological Society of Korea and Blackwell Publishing Asia Pty Ltd., - 39. 271-288.

- Ramos-Elorduy B.J., Pino, M.J. M., Martínez, C.V.H. (2012). Could grasshoppers be a nutritive meal? *Food and Nutrition Sciences*, 3, 164-175.
- Ramos-Elorduy J., Pino, J.M.M. (2001). Contenido de vitaminas de algunos insectos comestibles de México. *Sociedad de Química de México*, 45, 66-76.
- Ramos-Elorduy J., Pino-Moreno J.M. (1989). los insectos comestibles en el México antiguo. En A. E. S.A. (Ed.), *Estudio Etnoentomológico*. México.
- Ramos-Elorduy, J., Medeiros, C.N.E., Ferreira dos, S.J., Pino, M.J.M., Landero, T.I., Ángeles, C.S.C., García, P.Á. (2006). Estudio comparativo del valor nutritivo de varios coleóptera comestibles de México y *Pachymerus nucleorum* (Fabricius, 1972) (Bruchidae) de Brasil. *Interciencia*, 31, 512-516.
- Ramos-Elorduy, J., Muñoz, J., Pino, M.J.M. (1998). Determinación de minerales en algunos insectos comestibles de México. *journal of the Mexican Chemical Society*, 42, 18-33.
- Ramos-Elorduy, J., Pino, M. J.M., Prado, E.E., Pérez, M.A., Otero, J.L., de Guevara, O.L. (1997). Nutritional value of edible insects from the State of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 142-157.
- Ratcliffe N.A., Mello C.B., Garcia E.S., Butt T.M., Azambuja P. (2011). Insect natural products and processes: New treatments for human disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(10), 747-769.
- Ray A.M., Žunič A., Alten R.L., McElfresh J.S., Hanks L.M., Millar J.G. (2011). cis-Vaccenyl Acetate, A Female-Produced Sex Pheromone Component of *Ortholeptura valida*, A Longhorned Beetle in the Subfamily Lepturinae. *Journal of Chemistry Ecology*, 37, 173-17.
- Rodstein J., Millar J.G., Barbour J.D., McElfresh J.S., Wright I.M., Barbour K.S Ray A.M., Hanks L.M. (2011). Determination of the Relative and Absolute Configurations of the Female-produced Sex Pheromone of the Cerambycid Beetle *Prionus californicus*. *Journal of Chemistry and Ecology*, 37, 114-124.
- Santos-Silva A., Thomas M.C., Wappes J.E. (2011). A new genus of Prioninae (Coleoptera, Cerambycidae). *Insecta Mundi*, 0175, 1-8.
- Scherr C., Pinto J.R. (2010). Grasas en Lácteos, Huevos, Margarinas y Aceites: Implicaciones para la Aterosclerosis. *Archivos de la Sociedad Brasileña de Cardiología*, 01(95), 55-60.
- Silveira-Rodríguez M.B. Monereos-Megías S., Molina-Baena B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? *España Salud Pública*, 77(3), 317-331.
- Simopoulos A.P. (2002). Omega-3-fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21, 495-505.

- Singh O.T., Nabom S., Chakravorty J. (2007). Edible insects of nishi tribes of Arunachal Pradesh. *Hexapoda*, 14, 56-60.
- Siriamornpun S. Thammapat P. (2008). Insects as a delicacy and a nutritious food in Thailand. En G. L. Robertson, *Using food science and technology to improve nutrition and promote national Development*. International Union.
- Skoog D.A., Crouch S.R., Holler F.J. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning.
- Srivastava S.K., Babu N., Pandey H. (2009). Traditional insect bioprospecting as human food and medicine. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 8(4), 485-494.
- Stanley-Samuelson D.W., Jurenka R.A., Cripps C. Blomquist G.J. de Renobales M. (1988). Review article: Fatty acid in insects, composition, metabolism, and biologic significance. *Archives of Insects Biochemistry and Physiology*, 9:1-33.
- Supelco. (1997). Inc. Comparison of 37 Component FAME's Standard on Four Capillary GC Columns. *Bulletin Number 907*, 5, 2-6.
- Sutton P.A., Wilde M.J., Martin S.J., Cvačka J., Vrkoslav V., Rowland S.J. (2013). Studies of long chain lipids in insects by high temperature gas chromatography and high temperature gas chromatography-mass spectrometry. *Journal Chromatographic A*, 1297, 236-240
- Szlinder-Richert J., Barska I., Usydus Z., Grabic R. (2010). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in selected fish species from the southern Baltic Sea. *Chemosphere*, 78, 695-700.
- Tang Y.-L., Shi Y.-H., Zhao W., Hao G., Le G.-W. (2008). Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 4(48), 1187-1194.
- Terry P.D., Rohan T.E., Wolk A. (2003). Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormonelated cancers; a review of the epidemiologic evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 532-543.
- Trusheva B., Trunkova D., Bankova V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(doi:10.1186/1752-153X-1-13.), 13.
- Tzompa-Sosa D.A., Yi L., van Valenberg H.J.F., van Boekel M.A.J.S, Lakemond C.M.M. (2014). Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based. *Food Research International*, 62, 1087-1094.
- Verkerk M.C., Tramper J., van Trijp J.C.M., Martens D.E. (2007). Insect cells for human food. *Biotechnology Advances*, . 25:, 198–202.

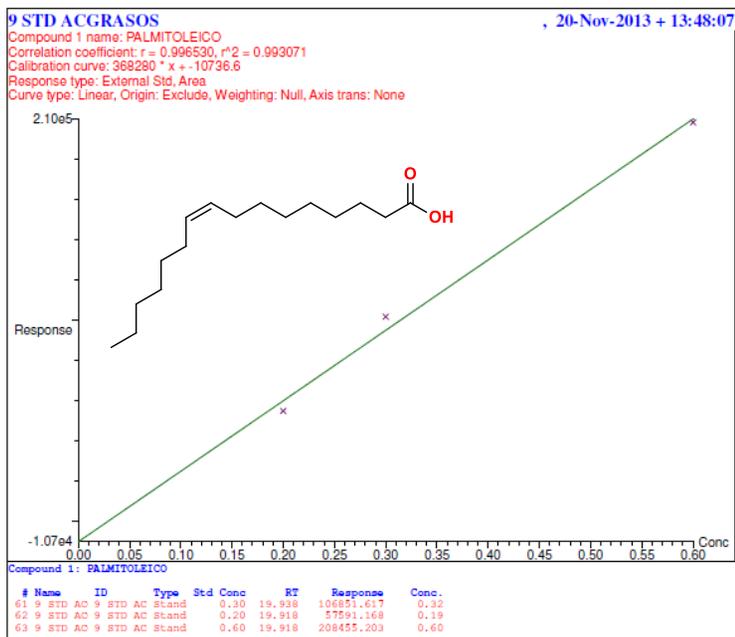
- Viesca G.F.C. Romero C.A.T. (2009). La entomofagia en México. Algunos aspectos culturales. *El Periplo Sustentable*, 16, 57-83.
- Wade L. G. (1993). Lípidos en Química Orgánica, 1219-1223. 2d Edición. Edi Pearson.
- Wei F., Gao G-Z., Wang X-F., Dong X-Y., Li P-P., Hua W., Wang X., Wu X-M., Chen H. (2008). Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction combined with gas chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15, 938-942.
- Win D.T. (2005). Oleic acid-The anti-breast cancer component in olive oil. *AU Journal of Technology*, 9, 75-78.
- Womeni H.M., Linder M. B., Thiencheu F.T., Mbiapo P., Villeneuve J., Fanni., M Parmentier. (2009). Oils of *Oryctes owariensis* and *Homocoryphus nitidulus* consumed in Cameroon; sources of linoleic acid. *Journal of food Technology*, 7, 54-58.
- Yang L.F., Siriamornpun S., Li D. (2006). Polyunsaturated fatty acid content of edible insects in Thailand. *Journal of Food Lipids*, 13, 277-285.
- Yi L. Y., Lakemond C. M. M., Sagis L. M. C., Eisner-Schadler V., van Huis A., van Boekel M.A.J.S. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect. *Food Chemistry*, 141(4), 3341-3348.
- Zhang Z-S., Wang L-J., Li D., Jiao S-S., Chen X.D., Mao Z.H. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 62, 192-198.

Páginas electrónicas Web

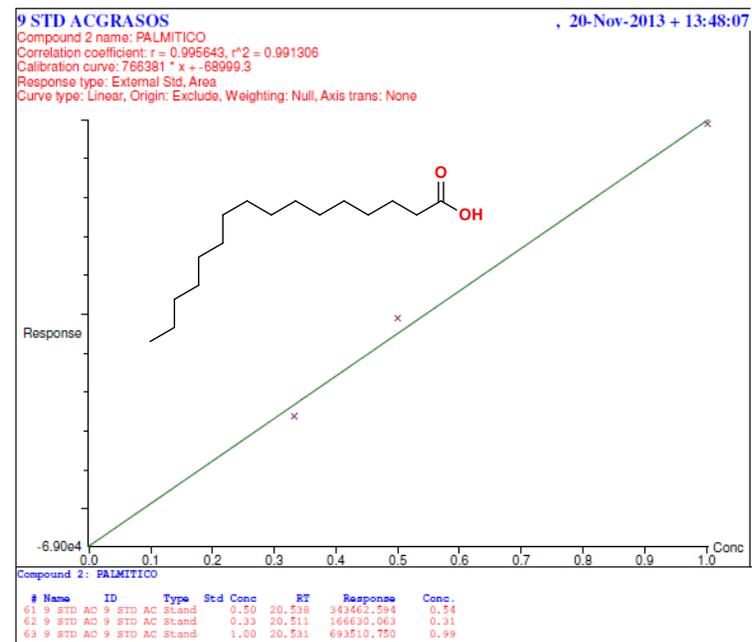
- Corral P.A. **2006**. Fundamentos y funciones de la espectrometría de masa. Universidad de Valencia. Facultad de Farmacia. <http://mural.uv.es/calooan/>. Consultado el 9 de abril de 2012.
- FAO/Wur. **2013**. Edible insects: future prospects for food and feed security. Rome, FAO. Consultado en línea en: <http://www.fao.org>.
- Wikipedia. **2013**. *Derobrachus_sp_bl.jpg* consultado en <http://wikimedia.org>.
- WHO. The World Health Organisation. **2003**. Diet nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of the WHO/FAO Joint Expert Consultation, WHO, Technical Report Series 916.

APÉNDICES

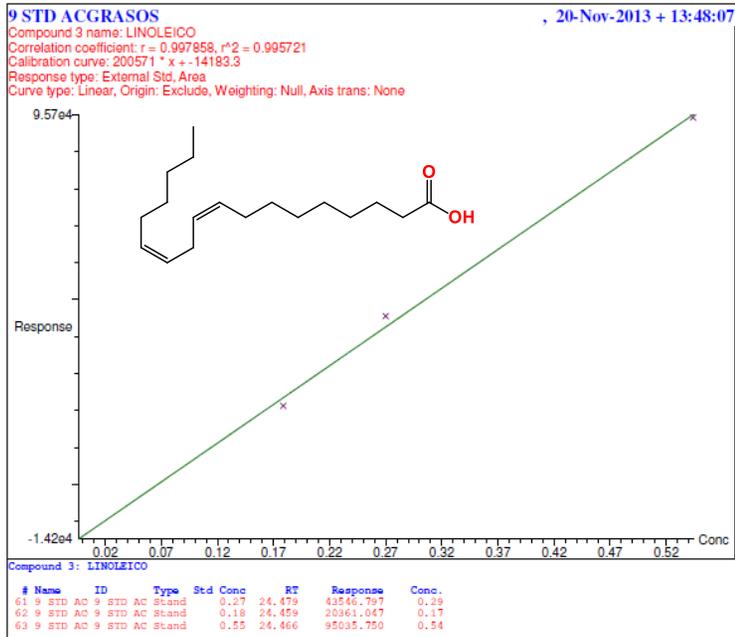
APÉNDICE I. Curvas de calibración de los AGs mayoritarios.



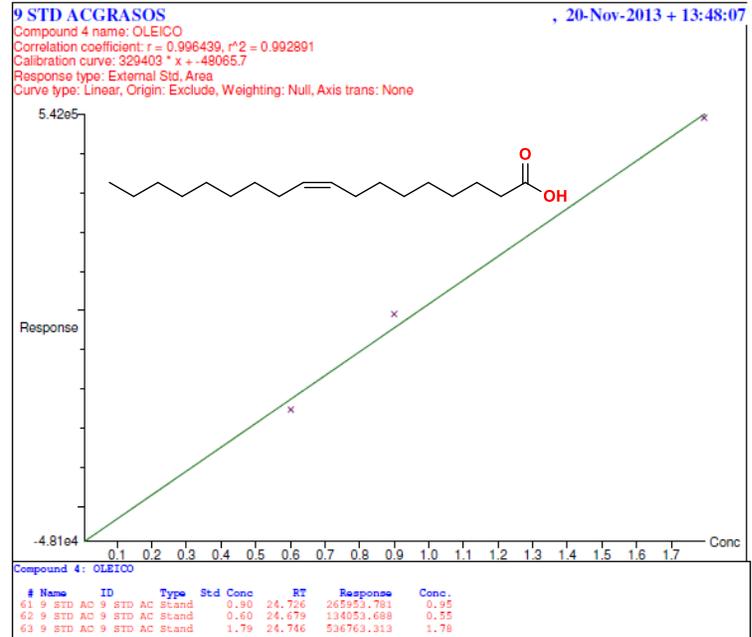
AI.I. Ácido pamiloléico



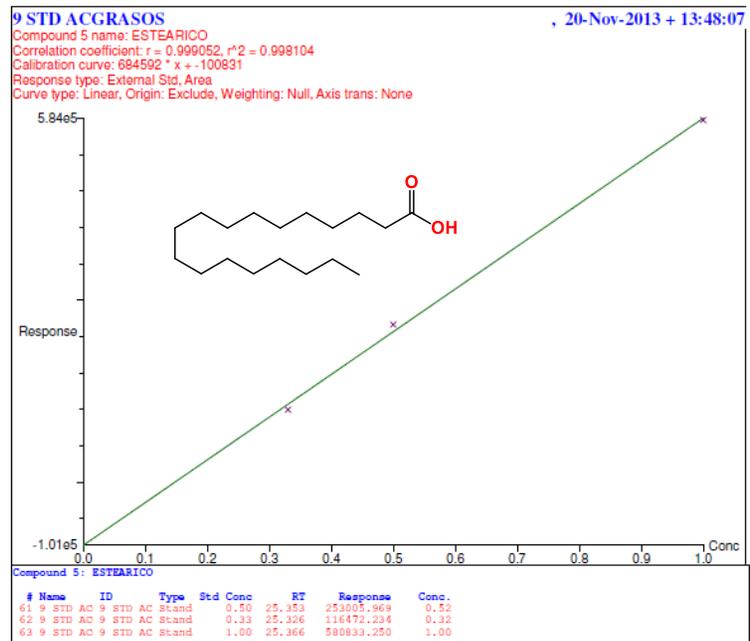
AI.II. Ácido palmítico.



AI.III. Ácido linoléico.



AI.IV. Ácido oléico.



AI.IV. Ácido esteárico.

Apéndice II. Análisis estadístico

III.I. Prueba F para varianzas de dos muestras

	Mirístico*		Palmitoléico**		Palmitico**		Linoléico*		Oléico*		Esteárico**	
	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa
Media	2.9905	2.8939	2.3649	2.9733	39.9927	42.9064	5.7840	3.3483	40.9844	41.9994	7.8836	5.8788
Varianza	0.0016	0.1365	0.0467	0.0399	0.3435	1.3266	2.0529	0.0939	0.1589	1.1378	0.6346	0.3889
Observaciones	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Grados de libertad	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
F	0.0116		1.1725		0.2589		21.8563		0.1397		1.6319	
P(F<=f) una cola	0.0001		0.4328		0.0822		0.0021		0.0249		0.3020	
Valor crítico para F (una cola)	0.1399		0.1399		0.1399		0.1399		0.1399		0.1399	
Valor crítico para F (una cola)	7.1464		7.1464		7.1464		7.1464		7.1464		7.1464	

* suponiendo varianzas desiguales, ** suponiendo varianzas iguales.

AII.II. Prueba t para dos muestras

	Mirístico*		Palmitoléico**		Palmítico**		Linoléico*		Oléico*		Esteárico**	
	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa
Media	2.9905	2.8939	2.3649	2.9733	39.9927	42.9064	5.7840	3.3483	40.9844	41.9994	7.8836	5.8788
Varianza	0.0016	0.1365	0.0467	0.0399	0.3435	1.3266	2.0529	0.0939	0.1589	1.1378	0.6346	0.3889
Observaciones	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
varianza agrupada	-		0.0433		0.83504393		-		-		0.5117	
Diferencia hipotética de las medias	0		0		0		0		0		0	
Grados de libertad	5		10		10		5		6		10	
Estadístico t	0.6369		-5.064		-5.5228		4.0720		-2.1832		4.8542	
P(T<=t) una cola	0.2761		0.0002		0.0001		0.0048		0.0359		0.0003	
Valor crítico de t (una cola)	2.0150		1.8125		1.8125		2.0150		1.9432		1.8125	
P(T<=t) dos colas	0.5522		0.0005		0.0003		0.0096		0.0717		0.0007	
Valor crítico de t (dos colas)	2.5706		2.2281		2.2281		2.5706		2.4469		2.228	

* suponiendo varianzas desiguales, ** suponiendo varianzas iguales