



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Propiedades nutracéuticas de la larva de *Ulomoides
dermestoides* (Chevrolat, 1878)
(Coleoptera: Tenebrionidae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JUAN PABLO DÁVILA VEGA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

LOS REYES IXTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora Ana Bertha Hernández Hernández

Fue revisado por los siguientes miembros del jurado:

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Mtra. Karla Stephanie Martínez Elizalde

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

Financiamiento UNAM-PAPIIT IN 212317

“No debería haber límites para el esfuerzo humano. Todos somos diferentes. Por mala que parezca la vida, siempre hay algo que puedes hacer y tener éxito. Mientras hay vida, hay esperanza”

Stephen Hawking.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Bertha Hernández Hernández, con quien tuve la oportunidad de trabajar desde el primer día que me incluí al laboratorio de Farmacognosia y quien supo guiarme a lo largo de este proceso, brindándome siempre su apoyo y consejos incondicionales. Más allá de visualizarla como una profesora, me brindó su amistad, mostrando siempre empatía y paciencia conmigo y con el trabajo. Le agradezco infinitamente todo el esfuerzo que destinó en la realización de este proceso.

A la Dra. Margarita Canales Martínez, a quien le agradezco enormemente por haberme dado la oportunidad de incorporarme al equipo de trabajo del laboratorio de Farmacognosia para poder llevar a cabo esta tesis. En todo momento me brindó sus enseñanzas, consejos, cariño y afecto, además de impulsarme siempre a ser mejor persona, día con día. Sin lugar a dudas, fue un pilar fundamental en este trabajo. Todo mi cariño y respeto para usted, doctora.

A la M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde, con quien trabajé durante el inicio de este proyecto. Gracias a ella, la investigación tomó un rumbo concreto y dio como fruto éste trabajo. Agradezco enormemente toda la dedicación que le brindó al trabajo, sus enseñanzas al momento de realizar la mayoría de las técnicas y el cariño y apoyo que siempre me mostró. Muchas gracias por todo maestra.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez por su ayuda, consejos y aportaciones para la realización y mejora de la tesis. Sin lugar a dudas, fue una parte fundamental tanto para el desarrollo de la investigación como para mi desarrollo profesional.

Al Dr. César Mateo Flores quien me brindó sus comentarios y correcciones al momento de la elaboración de la tesis, fue siempre parte fundamental del proyecto. Le agradezco enormemente el tiempo invertido en leer y corregir el presente trabajo.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla por brindar siempre su ayuda para los análisis en el laboratorio de Biogeoquímica. Le agradezco el tiempo que invirtió en llevar a cabo los análisis correspondientes.

Dedicatorias

A mis padres, Laura y José Luis, quienes siempre me alentaron a seguir mis sueños, me impulsaron a ser la persona que soy hoy en día y quienes me han apoyado siempre, sin importar lo difícil de las circunstancias. Es difícil poder expresar el amor que un hijo tiene hacia sus padres, pero como ustedes siempre lo dicen, el amor no se expresa con palabras, sino con hechos, y este trabajo es un hecho de ese amor que ustedes me han ofrecido durante toda mi vida. Este es el primero de muchos logros. Gracias por confiar en mí desde el primer día que ingresé a la universidad y por nunca dejarme caer, siempre han sido y serán mis mayores ejemplos a seguir.

A mis hermanos, Rodrigo y Viridiana, por apoyarme a lo largo de la carrera en todo lo que necesitaba, nunca se negaron a mostrarme su apoyo y cariño. Y a pesar de que muchas veces discutíamos, fueron parte fundamental de esta tesis. A José Ma, quien funcionó como mi motor de inspiración, todos los días buscaba ser un mejor ejemplo para ti, espero poder seguir siéndolo toda mi vida.

A mis abuelos, ustedes me mostraron que, a pesar de las dificultades de la vida, uno puede lograr cosas increíbles si se tienen los valores y la actitud. Cada que la vida parecía difícil, pensaba en ustedes y me alentaban a seguir adelante, aunque tal vez nunca se los he dicho. A pesar de que dos de ustedes ya no están aquí, siempre han estado en mis pensamientos y siempre han sido modelos a seguir. Gracias por todo.

Al laboratorio de Farmacognosia; Mary, Lucero, Brenda, Yatsiri, Uriel, Hatziri, Samara y Rebeca. Éste trabajo es un trabajo en equipo, nunca pude haberlo logrado sin la ayuda de cada uno de ustedes, cada quien me apoyó en diferentes etapas de la tesis y a cada uno de ustedes les agradezco enormemente por la amistad que siempre me han brindado. También le quiero agradecer al equipo de Inmunobiología; por apoyarme en todo momento, tanto en el laboratorio como en la amistad que he generado con la mayoría de ustedes, estoy orgulloso del trabajo de ambos laboratorios y de las cosas que se pueden lograr en conjunto.

A mis amigos; Lalo, Carlos, Héctor y Alex, quienes fueron mi equipo tanto en el laboratorio como en la vida, la universidad hubiera sido muy distinto sin ustedes, me brindaron una amistad que nunca pude haber imaginado tener, y he aprendido de cada uno de ustedes algo especial que llevo conmigo siempre, gracias por todo el apoyo brindado.

A mis amigos Ibran, Coyote, Sandy, Edith, Oscar, José, Mario, Shari, Héctor, Lili, Cristal, Viri y en general a todos mis amigos de la facultad que en algún momento me ayudaron a ser la persona que soy ahora.

A Gaby y Wilson, por ser los mejores amigos que uno pueda tener, siempre me alentaban a seguir mis metas, a no darme por vencido y a siempre buscar lo mejor, tanto profesional como personalmente. Gracias chicos, ustedes saben cuánto significan para mí.

A la maestra Inna Plaza por inculcarme el amor a la biología desde secundaria, y a la maestra Ana Lilia Moreno por impulsarme a seguir mi pasión en la preparatoria, sin duda fueron una parte fundamental en mi desarrollo como biólogo. Al Dr. Tonatiuh Cruz, quien fue el primero en iniciarme en los proyectos de investigación y a quien le agradeceré siempre enormemente.

Finalmente, este trabajo va dedicado para ti, quien está leyendo esto en busca de una técnica, una cita, o incluso una posible respuesta. Lo más valioso en esta vida es trascender de alguna forma, y esta tesis no tendría sentido si no trasciende.

Índice General

ÍNDICE DE APÉNDICES	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE CUADROS	III
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.	2
ANTECEDENTES	4
PROBLEMA.....	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS PARTICULARES.....	7
METODOLOGÍA	8
• CULTIVO DE <i>Ulomoides dermestoides</i>	8
• DETERMINACIÓN TAXONÓMICA.....	8
• DETERMINACIÓN DE BIOMOLÉCULAS	8
• CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	8
• CUANTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS REDUCTORES POR LA TÉCNICA DE NELSON-SOMOGYI.....	9
• EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE SOXHLET	9
• IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS POR CG-EM.....	9
• ELABORACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	9
• ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	10
• PRUEBAS CUALITATIVAS DE FLAVONOIDES, FENOLES Y QUINONAS.	10
• CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES DE SINGLETON.	10
• CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES POR EL MÉTODO DE DOWD...	10
• ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN HPLC	11
• IDENTIFICACIÓN DE FENOLES EN CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF).....	12
• CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO	12

RESULTADOS.....	13
• CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA.....	13
• PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LÍPIDOS.....	14
• ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	16
• ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	16
• CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES.....	17
• IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS MEDIANTE HPLC...17	
• ANÁLISIS DEL EXTRACTO METANÓLICO EN HPLC-MS.....	20
• CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	21
• CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	22
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	31
APÉNDICES.....	32
REFERENCIAS.....	52

Índice de Apéndices

Apéndice 1: Características diacríticas de Tenebrionidae.....	32
Apéndice 2: <i>Ulomoides dermestoides</i>	33
Apéndice 3: Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	36
Apéndice 4. Cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi.....	38
Apéndice 5. Método de extracción de lípidos mediante Soxhlet.....	40
Apéndice 6: Trans-esterificación de lípidos.....	41
Apéndice 7: Determinación de Lípidos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.....	42
Apéndice 8: Extracto de <i>U. dermestoides</i>	43
Apéndice 9: Evaluaciones cualitativas de Fenoles, Flavonoides y Quinonas.....	44
Ensayo de Fenoles.....	44
Ensayo de Flavonoides.....	44
Ensayo para Quinonas.....	44
Apéndice 10: Cuantificación de Fenoles Totales de Singleton.....	45
Apéndice 11: Determinación de Flavonoides por el método de Dowd.....	48
Apéndice 12: Capacidad Antioxidante por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).....	50

Índice de Figuras

Figura 1.- <i>Ulomoides dermestoides</i>	3
Figura 2.- Larva de <i>U. dermestoides</i> en su último estadio.....	8
Figura 3.- Colonia de <i>U. dermestoides</i> , fase adulta (A) y la fase larval (B).....	13
Figura 4.- Cromatograma obtenido mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas de los lípidos de la larva de <i>U. dermestoides</i>	14
Figura 5.- Cepas bacterianas utilizadas para el ensayo antimicrobiano.....	16
Figura 6.- Cromatograma obtenido mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de los compuestos fenólicos detectados en el extracto metanólico de la larva de <i>U. dermestoides</i>	18
Figura 7.- Cromatograma obtenido mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) del extracto metanólico de la larva de <i>U. dermestoides</i>	20
Figura 8.- Cromatografía en placa fina.....	21
Figura 9.- Características diacríticas de la familia Tenebrionidae.	32
Figura 10.- Características morfológicas de <i>U. dermestoides</i>	34
Figura 11.- Sistema Soxhlet empleado para la extracción de lípidos y lípidos aislados.	40
Figura 12.- Reacción de trans-esterificación de ácidos grasos.	41
Figura 13.- Extractos metanólicos de <i>Ulomoides dermestoides</i>	43
Figura 14.- Pruebas cualitativas de quinonas, fenoles y flavonoides.....	44
Figura 15.- Reacción redox en la cuantificación de fenoles.....	45

Índice de Cuadros

Cuadro 1.- Cepas bacterianas utilizadas para ensayo antimicrobiano.....	10
Cuadro 2: Datos taxonómicos y etnomedicinales de <i>U. dermestoides</i>	13
Cuadro 3: Evaluación de biomoléculas de la larva de <i>U. dermestoides</i>	13
Cuadro 4.- Compuestos lipídicos identificados mediante CG-EM de la larva de <i>U. dermestoides</i>	15
Cuadro 5.- Rendimiento expresado en gramos y porcentaje del extracto metanólico de la larva de <i>U. dermestoides</i>	16
Cuadro 6.- Resultados de las pruebas colorimétricas para demostrar la presencia de fenoles, flavonoides y quinonas.....	17
Cuadro 7.- Concentración de fenoles y flavonoides presentes en el extracto de <i>U. dermestoides</i>	17
Cuadro 8.- Compuestos determinados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con absorbancia máxima y curva obtenida.....	19
Cuadro 9- Compuestos determinados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS), especificando tiempo de retención y el ión detectado.	21
Cuadro 10.- Valores obtenidos de la separación de compuestos en cromatografía de placa fina (R_F)	22
Cuadro 11.- CA_{50} del del extracto de la larva de <i>U. dermestoides</i>	23

RESUMEN

Se conoce como coleopteroterapia a la ingesta de escarabajos con fines terapéuticos para tratar diferentes enfermedades. De las especies más utilizadas en la coleopteroterapia es *Ulomoides dermestoides*, conocida como gorgojo chino, la cual es una especie de la familia Tenebrionidae. Se han realizado diversas investigaciones con el adulto demostrando su efecto antiinflamatorio, antiproliferativo y antibacteriano, así como larvas de diferentes tenebriónidos presentan altos valores nutricionales, por lo cual el presente trabajo tiene como objetivo determinar las propiedades nutraceuticas de la larva de *U. dermestoides*. Se cuantificaron proteínas por el método de Bradford (0.03%/g), carbohidratos mediante la técnica de Nelson-Somogyi (0.027%/g), lípidos por extracción en Soxhlet (0.03%/g) y perfil lipídico mediante CG-EM, obteniendo 13 compuestos, entre los cuales destacan ácido palmítico y ácido esteárico. Por otra parte, para la evaluación de la actividad biológica se cuantificaron fenoles mediante el método de Singleton (1.1636 mg eq. AG/g), flavonoides mediante el método de Dowd (sin presencia), se evaluó la actividad antibacteriana empleando la técnica de Kirby-Baüer demostrando que no presenta actividad, se midió la capacidad antioxidante mediante la reducción del radical DPPH ($CA_{50}=80$ ppm), se analizó el extracto metanólico mediante HPLC y CCF demostrando que se presenta compuestos fenólicos y benzo conjugados, por otra parte, se analizó el extracto metanólico en HPLC-MS, en el cual se sugiere la presencia ceras y/o péptidos. Como conclusiones, este es el primer trabajo que se enfoca en las propiedades nutraceuticas de la larva de *U. dermestoides*, la concentración de proteínas y carbohidratos fue baja en comparación con otros tenebriónidos, los lípidos identificados presentaron propiedades biológicas importantes como antiinflamatorias y antioxidantes, no hubo actividad, se detectaron compuestos aromáticos mediante HPLC, y probablemente ceras y/o péptidos mediante HPLC-MS. El extracto presenta capacidad antioxidante, sin embargo, no es dosis dependiente. Finalmente, la larva de *U. dermestoides* puede ser empleada como un producto nutraceutico, por lo cual se recomienda un estudio de inocuidad.

PALABRAS CLAVE: tenebriónido, larva, nutraceutico, coleopteroterapia.

INTRODUCCIÓN.

Desde hace unas décadas, la demanda alimenticia junto con la necesidad de nuevos fármacos ha ido en incremento, por lo que las investigaciones enfocadas en alimentos nutraceuticos han sido de gran relevancia. Se le considera un producto nutraceutico a aquellos que además de su contenido nutrimental, aporta beneficios a la salud, al contener sustancias que desempeñan acciones específicas dentro de la fisiología del organismo (Martínez, 2009). Generalmente las investigaciones de productos nutraceuticos tienen como sustento los estudios etnobiológicos, como es el caso de la etnoentomología y la entomofagia.

Se le denomina etnoentomología al estudio científico del conocimiento, presencia y percepción hacia los artrópodos, generalmente a los insectos, dentro de usos y costumbres de pueblos indígenas. Por otra parte, la entomofagia es el consumo de insectos como alimento, está ligada con la etnoentomología ya que muchos grupos de insectos comestibles han sido reportados dentro de la medicina tradicional, como es el caso de himenópteros, lepidópteros, ortópteros, hemípteros y coleópteros (FAO, 2013).

Los coleópteros son el orden más diverso dentro de los insectos, se caracterizan por tener una cabeza generalmente prognata, aparato bucal tipo masticador, el primer par de alas se encuentran endurecidas, a las cuales se les denomina élitros, mientras que el segundo par de alas es membranoso y lo utilizan para el vuelo, el abdomen carece de cercos y en posición ventral a menudo solo son visibles cinco metámeros. Son organismos holometábolos o hipermetábolos, con larvas de tipo escarabeiforme, campodeiforme, apodiforme, eruciforme, carabiforme o elateriforme (Deloya *et al.*, 2016).

Actualmente se reconocen cerca de 200 familias con más de 350 mil especies en todo el mundo. El 68% de todas las especies descritas se concentra en ocho familias taxonómicas, entre ellas Tenebrionidae (Cifuentes-Ruiz y Zaragoza-Caballero, 2014).

Tenebrionidae es la sexta familia más grande dentro de Coleoptera, sus principales características son: fórmula tarsal es 5-5-4, rara vez 4-4-4 o 3-3-3, élitros, si están estriados, con estriola escutelar; típicamente con 9 estrías, mientras que el edéago es típicamente no invertido. Por otra parte, algunas subfamilias como Zolodinae, Pimeliinae y algunos Lagriinae presentan glándulas defensivas abdominales (Pizarro-Araya y Flores, 2004) (Apéndice 1).

La mayoría de los estudios científicos realizados se han enfocado al ciclo de vida y a ciertos aspectos ecofisiológicos de especies o géneros introducidos, los cuales tienen importancia económica como plagas secundarias (*Palorus*, *Gnathocerus*), como alimento (*Tenebrio*) y para fines terapéuticos (*Ulomoides*), como es el caso de la coleopteroterapia (Cifuentes-Ruiz y Zaragoza-Caballero, 2014).

En varios países latinoamericanos como Argentina, Chile, Colombia y México, se conoce como coleopteroterapia a la ingesta de escarabajos adultos del género *Ulomoides* y con fines terapéuticos para tratar una amplia gama de enfermedades como asma, artritis, cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson, problemas oculares, inflamación, como suplemento dietético, reductores de peso, entre otras. El uso y eficacia de dichos organismos se divulga a partir de testimonios. La especie más utilizada en la coleopteroterapia es *Ulomoides dermestoides*, mejor conocida como gorgojo chino, la cual es una especie proveniente de Asia distribuida ampliamente en todo el mundo (Cupul-Magaña, 2010) (Apéndice 2).



Fig 1.- *Ulomoides dermestoides*

ANTECEDENTES

Se han realizado diversas investigaciones donde se ha demostrado que los insectos poseen altos valores nutricionales, la FAO (2017) reporta que alrededor del mundo se consumen más de 1900 especies de insectos comestibles. Sin embargo, esta cifra sigue aumentando a medida que se llevan a cabo más estudios sobre esta cuestión. Según los datos disponibles, las familias de insectos más consumidas son: Lepidoptera (18%), Hymenoptera (14%), Orthoptera (13%), Hemiptera (10%), Isoptera (3%), Odonata (3%), Diptera (3%) y finalmente Coleoptera (31%).

Dentro de Coleoptera, una de las especies más estudiadas ha sido *Tenebrio molitor*, miembro de la familia Tenebrionidae, el cual ha sido empleado como alimento en su etapa larval, tanto para mascotas como para el ser humano.

Valdez y Ontiveros (2010), llevaron a cabo la extracción y caracterización de aceites de las larvas de *T. molitor*. Se determinó un porcentaje de grasa de 38.44%. En el aceite se determinaron los índices de saponificación (192 mg KOH/g de grasa), yodo (89,8 g I/100 g de grasa), acidez (1.65%) y peróxidos (2.4 eq O₂/kg de grasa). Así mismo se realizó una cromatografía de gases del aceite, donde el 77.93% de los ácidos grasos eran insaturados.

Posteriormente Argueta y Ramos (2013), analizaron el contenido de proteína, grasa, calcio y fósforo de *Tenebrio molitor*. A partir de 100 gramos de larvas de *T. molitor* se obtuvo que un 20.23% correspondía a proteína, 16% a grasas, 4.28% a fibra, 0.47% a extracto libre de nitrógeno, 1% para cenizas y 0.27 % para fósforo, mientras que la cantidad de calcio fue de 57.37 ppm. Así mismo se estableció que la dieta influye directamente en la cantidad de compuestos químicos que posee la larva.

Por otra parte, se han realizado investigaciones utilizando *U. dermestoides* para demostrar diferentes propiedades biológicas, por ejemplo, se ha estudiado la actividad del extracto secretado por el coleóptero y se ha demostrado que las benzoquinonas pueden ser sustancias útiles en el tratamiento de algunas patologías

que involucran la aparición de células tumorales como es el caso del cáncer y la leucemia. Cowan (1999), indica que las benzoquinonas producen efectos perjudiciales en las células, ya que al proporcionar una fuente de radicales libres estables, interactúan con los núcleos de ciertos aminoácidos en las proteínas, lo cual conduce a una inactivación de la proteína y pérdida de función, sin embargo, Deloya-Brito y Deloya (2014), especifica que si se dirigen a estas células tumorales podrían ser útiles terapéuticamente como agentes anticancerígenos.

Santos *et al.* (2010), demostraron que el extracto acuoso de *U. dermestoides* en concentraciones de 8 y 16 mg/kg presentan un efecto antiinflamatorio en el modelo de edema plantar, también determinaron que la concentración de 12.5 mg/dL no presenta efecto citotóxico y actividad antiproliferativa. Crespo *et al.* (2011), evaluaron las dosis del extracto de 0.15 equivalente/mL de *U. dermestoides* (1 equivalente=cantidad de componentes extraídos por escarabajo), reduciendo significativamente la viabilidad de las células tumorales por debajo del 85% y por encima del 70% de las células mononucleares.

Mendoza y Maury (2013), evaluaron la capacidad antioxidante de los compuestos del extracto metanólico de *U. dermestoides*. Estos compuestos fueron moléculas captadoras de radicales libres, ya que contienen un grupo sustituyente hidrofóbico en el C4 del resorcinol, entre los compuestos se encuentran el ácido oleico y 4-etil-resorcinol. Villaverde *et al.* (2009), evaluaron la composición de la secreción de *U. dermestoides* encontrando que contiene principalmente MBQ y EBQ (metil-1,4-benzoquinonas, etil-1,4-benzoquinonas), alquenos (C₁₃ y C₁₅) y terpenos (limoneno), los cuales presentan actividad citotóxica en células A549.

Dávila *et al.* (2017), demostraron que el extracto metanólico de *U. dermestoides* presenta un efecto antiproliferativo en la concentración 0.0625 mg/mL en linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), demostrando que no existen diferencias significativas en comparación con el control positivo (Colchicina). La CL₅₀ del extracto fue de 0.156mg/ml, que de acuerdo con el Instituto Nacional de

Cáncer la concentración no es tóxica. Con respecto a la caracterización química del extracto, se determinó la concentración de fenoles totales (11.24 mgEAg/g) y flavonoides totales (0.033 mgEQ/g) así como la capacidad antioxidante (49.46 ppm).

Saint Remy (2017), demostró que el extracto etanólico de *U. dermestoides* presenta actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, demostrando un efecto bacteriostático en cepas de *S. aureus* y *V. cholerae*. Así mismo, utilizando un modelo de edema plantar en ratas comprobó que en una dosis de 750 mg/kg presenta un efecto antiinflamatorio. Finalmente, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) reportó compuestos como limoneno, ácido linoleico y catecoles, sugiriendo que estas moléculas pueden ser las responsables de sus propiedades medicinales, así como de la actividad antioxidante. Cabe destacar que este es el primer estudio enfocado a las propiedades antimicrobianas de *U. dermestoides*.

Cupul-Magaña (2010), reporta que los escarabajos deben comerse vivos, sin ser masticados y debe ser de manera exponencial y directamente proporcional al tiempo del tratamiento, que generalmente es de 70 días. Una vez llegado al límite de días, se siguen consumiendo, pero ahora de manera descendente. Cabe mencionar que la mayoría de los estudios enfocados a *U. dermesotides* toman en cuenta la manera tradicional de consumir al escarabajo dentro de la coleopteroterapia sin embargo, no toman en cuenta la parte de consumir el escarabajo vivo, lo cual es indispensable para los estudios que las pruebas a realizar sean con material fresco, debido a que los escarabajos, tanto larvas como adultos, secretan los componentes químicos únicamente al sentirse estresados o amenazados, como lo reporta Dávila *et al.* (2017).

PROBLEMA

Tomando en cuenta los antecedentes anteriormente mencionados, cabe destacar que existe un gran número de estudios para validar la eficacia terapéutica, así como las propiedades biomédicas de *U. dermestoides* en etapa adulta, sin embargo, no

existen antecedentes directos que se enfoquen en las propiedades nutraceuticas de la larva, por tal motivo este es el primer trabajo que se enfoca en el estudio especifico de la larva. Por lo cual se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles serán las propiedades nutraceuticas de la larva de *Ulomoides dermestoides*?

HIPÓTESIS

Si larvas de diferentes tenebrionidos presentan ácidos grasos, carbohidratos, altos valores de proteínas, fenoles, y en algunos casos, flavonoides y quinonas, los cuales han sido reportados por presentar actividades biomédicas como actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante y antiproliferativa, entonces se espera que la larva de *Ulomoides dermestoides* presente propiedades nutraceuticas de importancia nutricional y/o medicinal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las propiedades nutraceuticas de la larva de *Ulomoides dermestoides*.

Objetivos particulares.

De la larva de *U. dermestoides* se realizó lo siguiente:

1. Determinar la cantidad de proteínas hidrosolubles mediante el método de Bradford.
2. Determinar mediante la técnica de Nelson-Somogyi la concentración de carbohidratos reductores.
3. Determinar la concentración lipídica mediante el método de Soxhlet y caracterizar químicamente los lípidos por CG-EM.
4. Determinar cualitativamente la actividad antibacteriana del extracto metanólico mediante la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer.
5. Determinar de manera cualitativa y cuantitativa la presencia de fenoles, flavonoides y quinonas.
6. Analizar los compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* mediante HPLC.

7. Analizar el extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* mediante HPLC-MS.
8. Determinar la capacidad antioxidante (CA_{50}) mediante la técnica de reducción del radical DPPH.

METODOLOGÍA

Cultivo de *Ulomoides dermestoides*

Se obtuvo una colonia de *U. dermestoides* donada por un productor particular, la cual se mantuvo en un recipiente de plástico de 30x50 cm, 10 cm de profundidad y en obscuridad total, cubriendo el recipiente con una manta para permitir la ventilación. Los organismos fueron alimentados únicamente con avena como sustrato, cáscaras de plátano y pan integral, manteniéndolos a temperatura ambiente (Apéndice 2).

Determinación taxonómica

Se identificaron los organismos hasta nivel de familia, posteriormente para llegar a género se utilizaron claves de Brues y Melander (1932). Finalmente, para la determinación de especie se consultó con la Colección de Artrópodos de la FES Iztacala y se asignó un número de registro (Apéndice 2).

Determinación de biomoléculas

Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.

Para la extracción de proteínas se pesaron 1.0821 g de larvas en su último estadio (Fig. 1), previamente se sacrificaron por congelación. Posteriormente se maceraron con una mezcla de metanol-cloroformo-agua (12:5:3), se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, para poder resuspender la pastilla y se volvió a centrifugar. El sobrenadante recuperado fue empleado para la cuantificación mediante el método de Bradford, leyendo las muestras en un espectrofotómetro a 592 nm (Apéndice 3) (González y Peñalosa, 2000).



**Figura 2.- Larva de *U. dermestoides* en su último estadio.
Foto original de Juan Pablo Dávila Vega.**

Cuantificación de Carbohidratos reductores por la técnica de Nelson-Somogyi

Se realizó una extracción de carbohidratos utilizando 100 mg de larva de *U. dermestoides*, para posteriormente cuantificarlo mediante el método de Nelson-Somogyi (González y Peñalosa, 2000). Se utilizó 1 mL de la muestra problema, la cual se procesó de acuerdo con la curva patrón, el patrón utilizado fue glucosa 200 µg/mL (Apéndice 4).

Extracción de lípidos mediante Soxhlet

Para la extracción de los lípidos presentes en la larva primero se realizó un cartucho de papel filtro, dejándolo en un horno a 65°C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 4 g de larva fresca previamente sacrificada por congelación. A diferencia de otras técnicas, se optó por utilizar muestra fresca debido a la fragilidad de las larvas y la manera tradicional en que se consumen. Posteriormente se procedió a extraer los lípidos en un aparato Soxhlet utilizando hexano como solvente durante 4 horas. Se evaporó el exceso de hexano y se pesó la cantidad total de lípidos (González y Peñalosa, 2000) (Apéndice 5).

Identificación de Lípidos por CG-EM

La identificación y el análisis de los compuestos lipídicos presentes en la larva de *U. dermestoides* fue mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (Apéndice 7). La fracción lipídica (3 mg) fue sometida a una transesterificación (Apéndice 6).

Elaboración del extracto metanólico.

Para la preparación del extracto se seleccionaron aleatoriamente 3 g de larvas en su último estadio (Fig. 1) posteriormente se realizó una maceración exhaustiva con metanol, dejándolo evaporar a temperatura ambiente (Apéndice 8).

Actividad antibacteriana

Se realizó un antibiograma de sensidicos mediante la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer. Cada disco fue impregnado con 4 mg de extracto, mientras que para el control positivo (cloranfenicol) se impregnaron con 25 µg. Las bacterias empleadas para este ensayo fueron las siguientes:

Cuadro 1.- Cepas bacterianas utilizadas para ensayo antimicrobiano

Tipo	Cepa	Número ATCC/ Clasificación/Donación de:
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	12398
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala
Gram negativas	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
	<i>Escherichia coli</i>	Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDBB-B-859, CINESTAV
	<i>Vibrio cholerae</i>	CASO CLÍNICO

Pruebas cualitativas de Flavonoides, Fenoles y Quinonas.

Para la detección de flavonoides se agregaron limaduras de Mg y gotas de HCl concentrado a 1 mL del extracto. Para fenoles se agregó cloruro férrico a 1 mL del extracto. En cuanto a quinonas se utilizó 1mL de NaOH al 5% y amoniaco al 2% al extracto (Apéndice 9).

Cuantificación de Fenoles Totales de Singleton.

La concentración de fenoles totales se obtuvo mediante la técnica de Fenoles Totales de Singleton, utilizando ácido gálico como patrón y 3 mg de extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* como muestra problema. Finalmente se leyó a 565 nm en un espectrofotómetro (Apéndice 10) (Singleton *et al.*, 1999).

Cuantificación de Flavonoides por el método de Dowd

Para la cuantificación de flavonoides totales presentes en la muestra se utilizó el método de Dowd utilizando $AlCl_3$ al 2%, quercetina en diferentes concentraciones (1-100 µg/mL) para realizar la curva patrón y 5 mg de extracto metanólico de la larva

de *U. dermestoides* como problema. Finalmente se leyó su en un lector de ELISA a una absorbancia de 450 nm (Apéndice 11) (Amaya y Portillo, 2013).

Análisis de compuestos fenólicos en HPLC

Se utilizó un equipo Agilent Technologies 1200 de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para determinar e identificar los compuestos fenólicos en el extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides*. Se utilizó una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.

Análisis del extracto metanólico en HPLC-MS

Se utilizó un equipo Agilent 1200 Infinity LC acoplado a un equipo Agilent 6230 TOF con una columna Agilent Dual ESI Source (ESI SG14289023) con Mass Hunter Workstation Software, versión B.05.01, Build 5.01.5125.3 operando en modo de ionización negativo. El voltaje de capilaridad fue de 4000 V, la temperatura del gas seco fue de 250 ° C; se usó nitrógeno como gas seco a una velocidad de flujo de 6 L/ min; la presión del nebulizador fue de 60 psi; fragmentor de 200 V; el rango de MS fue 50-1300 m/z. El rango de adquisición de MS fue de 1 espectro/s. La separación cromatográfica se realizó usando un HPLC (Infinity Series 1200, Agilent Technologiest, Alemania) equipado con una columna Kinetex 2.6 µ, C1800A (150 x 2.1 mm) (Phenomenex, EE. UU.). La temperatura de la columna se mantuvo a 25°C. Se utilizó el siguiente programa de gradiente, junto con una fase móvil que consistía en agua: acetonitrilo (90:10) con ácido fórmico al 0,1% (disolvente A) y metanol: acetonitrilo (90:10) con 0.1% de ácido fórmico (solvente B). Se llevó a cabo durante 3 minutos en una elución isocrática se compone de 100% de disolvente A seguido de 3-11 minutos: 65% de A-35% de B; 11-20 min: 55% A-45% B; 20-35 min: 100% B; y 25 min: 100% B, v / v. La tasa de flujo fue de 0.2 mL/min, y el volumen de inyección fue de 20 µL (3 mg/mL).

Identificación de fenoles en Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Se empleó una CCF para la identificación de fenoles con base en su R_F , se utilizó una placa de sílice (Merck, Germany) de 6x4 cm, empleando una fase móvil de cloroformo: acetato de etilo: ácido acético (6:3:1). La placa fue revelada con luz ultravioleta (365 nm) y con sulfato cérico, se utilizaron quercetina y ácido gálico como estándares.

Capacidad Antioxidante del extracto

Se determinó la capacidad del extracto mediante la reducción del radical 2,2-difenil, 1-picrilhidracil (DPPH). Se calculó la Concentración Antioxidante Media (CA_{50}) en concentraciones de 5,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,200,300,400 y 500 ppm. Se utilizó quercetina y catequina como controles positivos, la placa fue leída en un lector de ELISA a 540 nm (Apéndice 12) (Okusa *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Cultivo de *U. dermestoides*

Se obtuvo una colonia de *U. dermestoides* donada por un productor particular en el mes de julio de 2017. Los datos etnomedicinales se observan en el cuadro 2:

Cuadro 2: Datos taxonómicos y etnomedicinales de *U. dermestoides*

NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Ulomoides dermestoides</i>
NOMBRE COMÚN	Gorgojo chino
NÚMERO DE REGISTRO CAFESI	JDV2018JG000001
FAMILIA	Tenebrionidae
FASE UTILIZADA	Adultos
FORMA DE USO	El adulto se ingiere vivo de forma exponencial



Figura 3.- Colonia de *U. dermestoides*, fase adulta (A) y fase larval (B).

Caracterización bioquímica

Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas mediante la técnica de Bradford, carbohidratos reductores mediante la técnica de Nelson-Somogyi y lípidos totales mediante extracción por Soxhlet, se pueden observar en el cuadro 3 con los porcentajes correspondientes por cada gramo de larva fresca.

Cuadro 3: Evaluación de biomoléculas de la larva de *U. dermestoides*

Biomolécula	% por cada gramo de larva
Proteínas	0.03%
Carbohidratos	0.027%
Lípidos	0.03%

Perfil Cromatográfico de lípidos.

Se obtuvo un perfil cromatográfico mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Figura 4), y se pudieron identificar 10 compuestos (Cuadro 4).

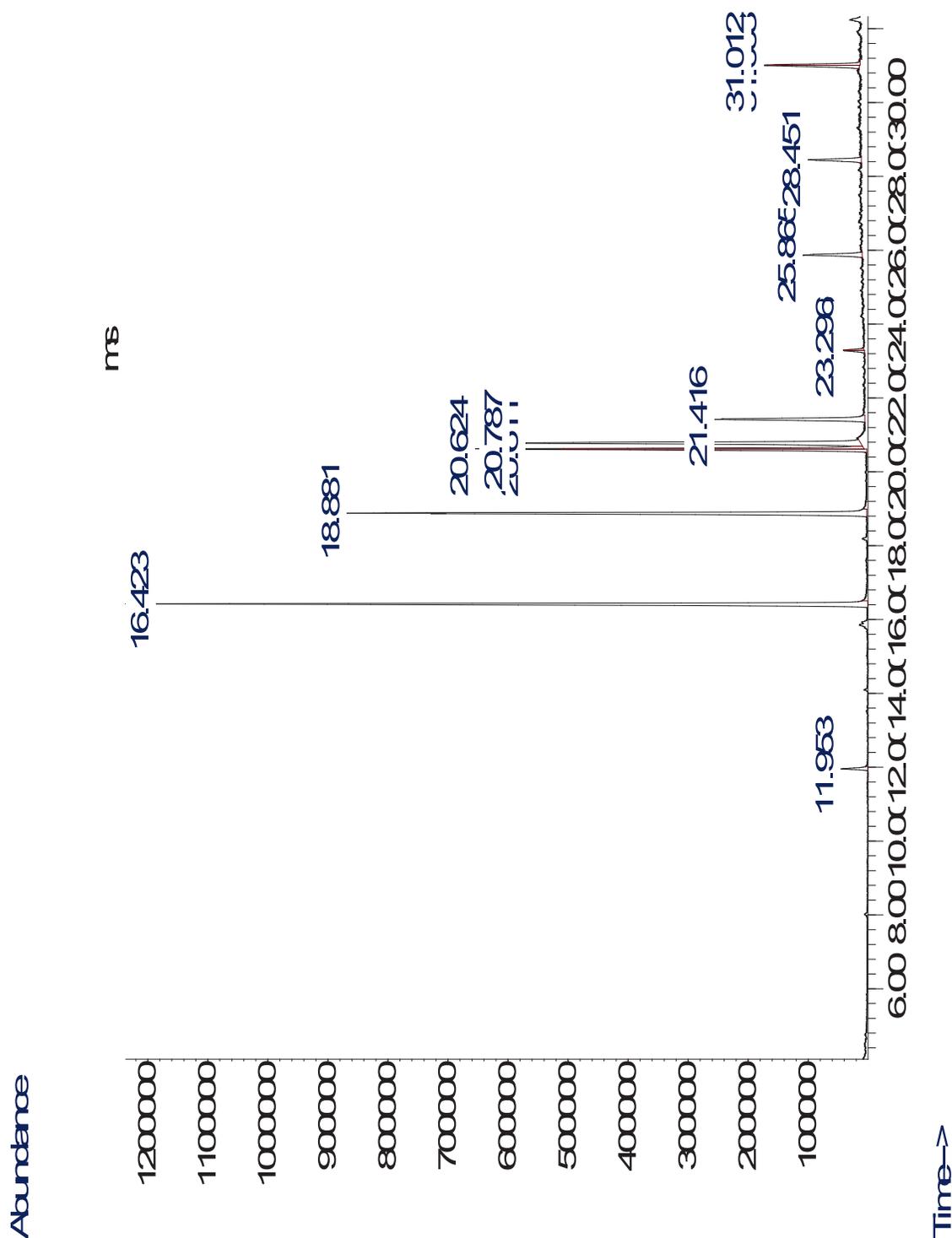
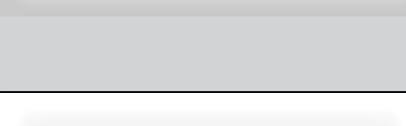


Figura 4.- Cromatograma obtenido mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas de los lípidos de la larva de *U. dermestoides*.

Cuadro 4.- Compuestos lipídicos identificados mediante CG-EM de la larva de *U. dermestoides*.

Nombre del compuesto	Tiempo de retención (min.)	Abundancia relativa (%)	Propiedades biomédicas	Estructura química
Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	16.423	27.151%	Actividad antioxidante (Fito, 2003).	
Metil 15-metilhexadecanoato	18.881	21.327%	Utilizado en tratamientos anticancerígenos (PubChem, 2017).	
Ácido octadecanoico (ácido esteárico)	20.624 20.787 21.416	29.84%	Reduce los niveles de colesterol (Carbajal, 2013).	
Triacotano	23.283	0.555%	Presente en cutícula de insectos para evitar deshidratación (Arellano <i>et al.</i> , 2013)	
Hentriacotano	23.296	0.471%	Presente en ceras de insectos. Presente en miel. (Arellano <i>et al.</i> , 2013)	
Tricosano	25.865	2.627%	Feromona sexual para localización de pareja (Arellano <i>et al.</i> , 2013)	
Pentacosano	31.003	2.870%	Molécula de reconocimiento en insectos (Arellano <i>et al.</i> , 2013)	

Actividad biomédica

A partir del extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* se calculó el rendimiento en gramos y en porcentaje, el cual se presente en el siguiente cuadro (Cuadro 5):

Cuadro 5.- Rendimiento expresado en gramos y porcentaje del extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides*.

Extracto metanólico	Rendimiento en gramos	Rendimiento en porcentaje
<i>Ulomoides dermestoides</i>	0.1027 gramos	4.56%

Actividad antibacteriana

De las 6 cepas utilizadas, el extracto de larvas no presentó un efecto inhibitorio en ninguna. Se utilizó cloranfenicol como control positivo, así como extracto de *U. dermestoides* adulto como un referente, en donde se observa que únicamente presentó actividad en *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* (Figura 5).

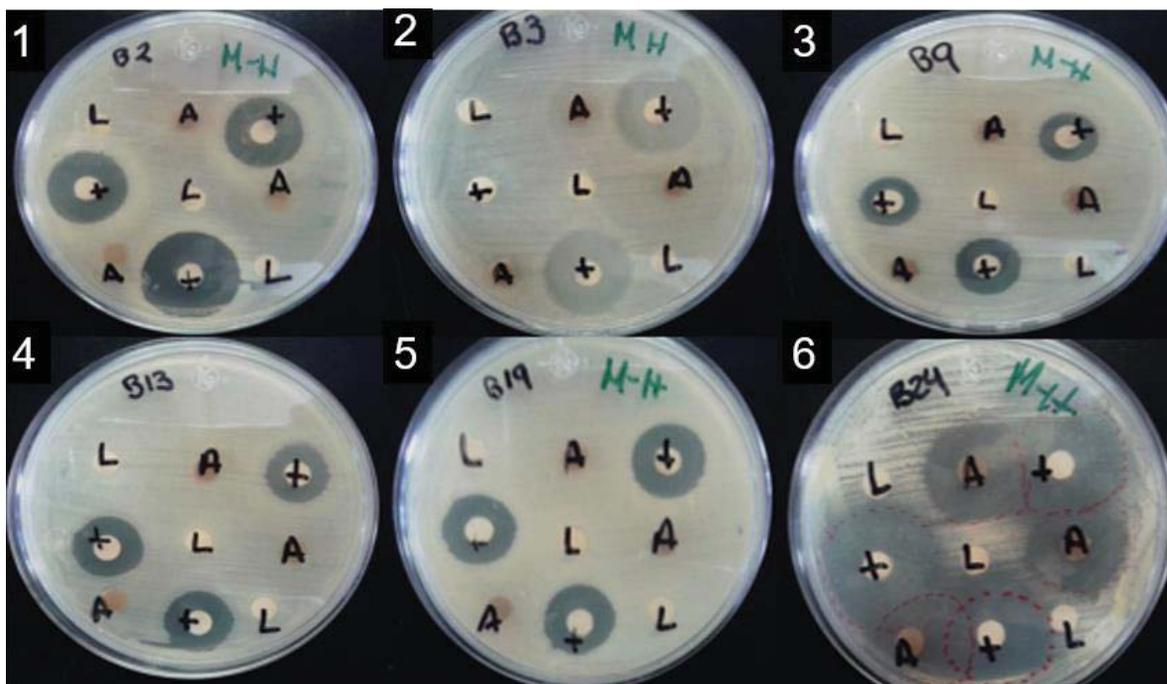


Figura 5- Cepas bacterianas utilizadas para el ensayo antimicrobiano con extracto de larva (L), adulto (A) y cloranfenicol como control positivo (+). *Staphylococcus aureus* 12398 (1), *Staphylococcus aureus* caso clínico (2), *Staphylococcus epidermidis* 12228 (3), *Escherichia coli* caso clínico (4) *Pseudomonas aeruginosa* cdbb-b-859, CINESTAV (5) *Vibrio cholerae* caso clínico (6)

Pruebas cualitativas para metabolitos secundarios

En el siguiente cuadro (Cuadro 6) se observan los resultados para las pruebas cualitativas de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico:

Cuadro 6.- Resultados de las pruebas colorimétricas para demostrar la presencia de fenoles, flavonoides y quinonas.

Prueba cualitativa	Resultado
<i>Fenoles</i>	++
<i>Flavonoides</i>	+
<i>Quinonas</i>	-

Alta presencia: ++. Mediana presencia: +. Ausencia: -

Cuantificación de fenoles y flavonoides

Se obtuvieron los siguientes resultados para la cuantificación de fenoles y flavonoides en el extracto metanólico (Cuadro 7):

Cuadro 7.- Concentración de fenoles y flavonoides presentes en el extracto de *U. dermestoides*.

Fenoles (mg eq. AG/g)	Flavonoides (µg(eQ)/g)
1.1636	-----

Identificación de compuestos fenólicos utilizando HPLC

Se obtuvo un cromatograma mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Figura 6). A partir del comportamiento de la curva y la absorción máxima, se determinó que los compuestos eran de naturaleza fenólica y benzo conjugados (Cuadro 8).

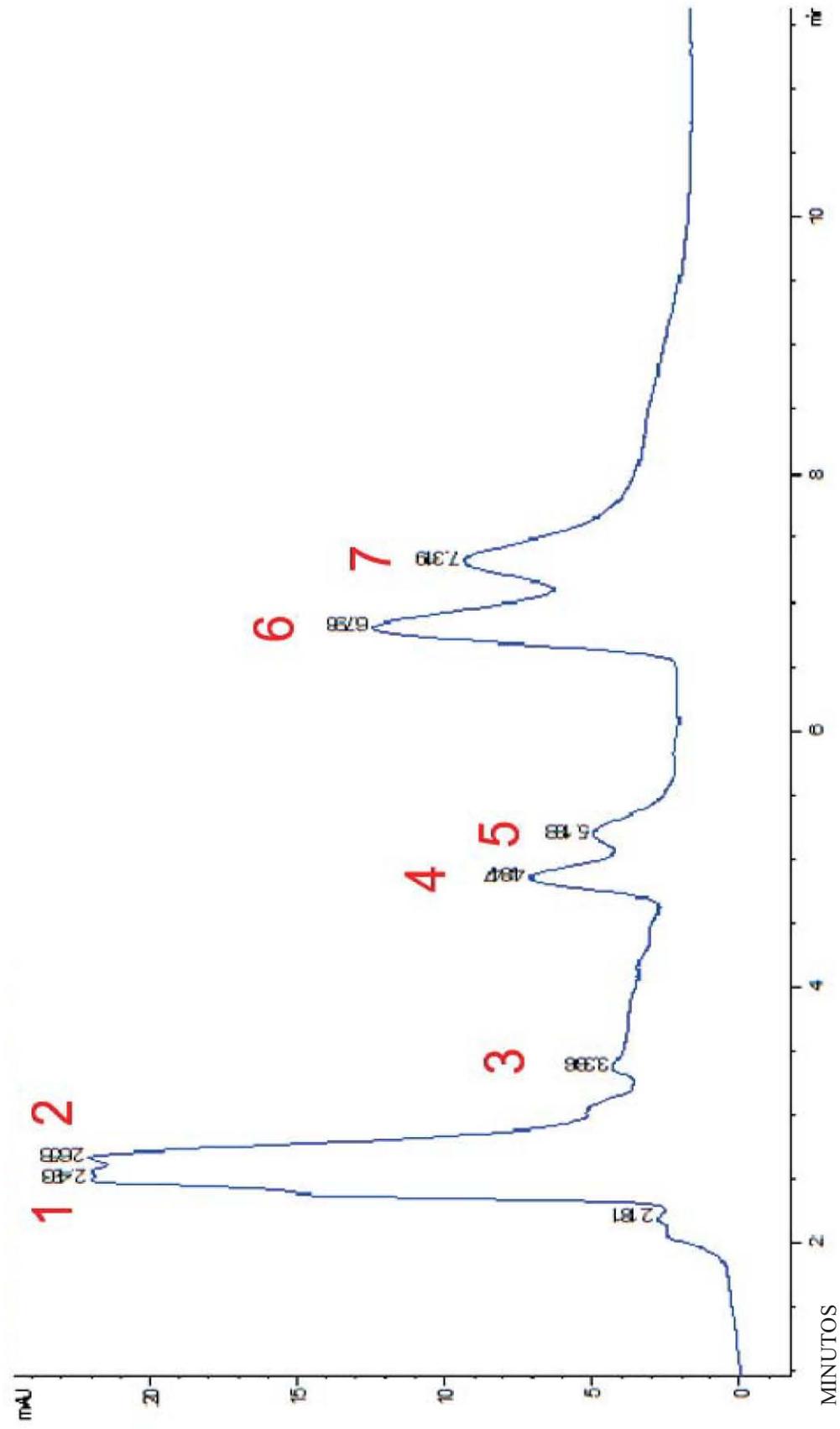
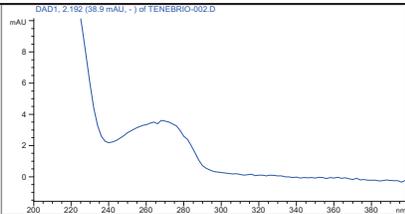
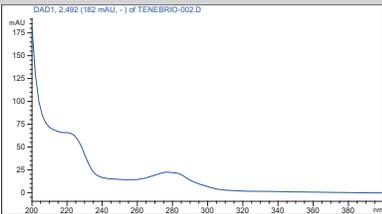
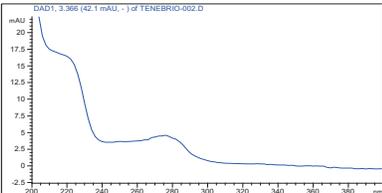
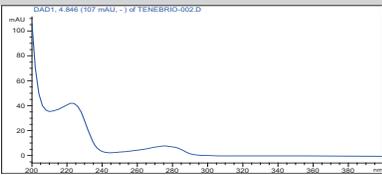
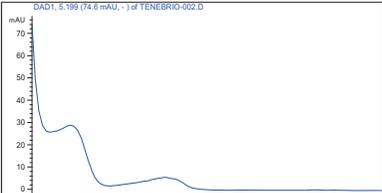
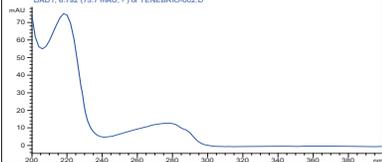
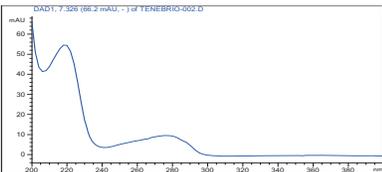


Figura 6.- Cromatograma obtenido mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de los compuestos fenólicos detectados en el extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides*.

Cuadro 8.- Compuestos determinados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

No. de compuesto	Compuesto	Absorbancia máxima (nm)	Curva obtenida.
1	Compuesto fenólico	268	
2	Benzo conjugado	278	
3	Benzo conjugado	276	
4	Benzo conjugado	276	
5	Benzo conjugado	278	
6	Benzo conjugado	278	
7	Benzo conjugado	278	

Análisis del extracto metanólico en HPLC-MS

El extracto metanólico fue analizado mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas para el análisis de compuestos bioquímicos (Figura 7).

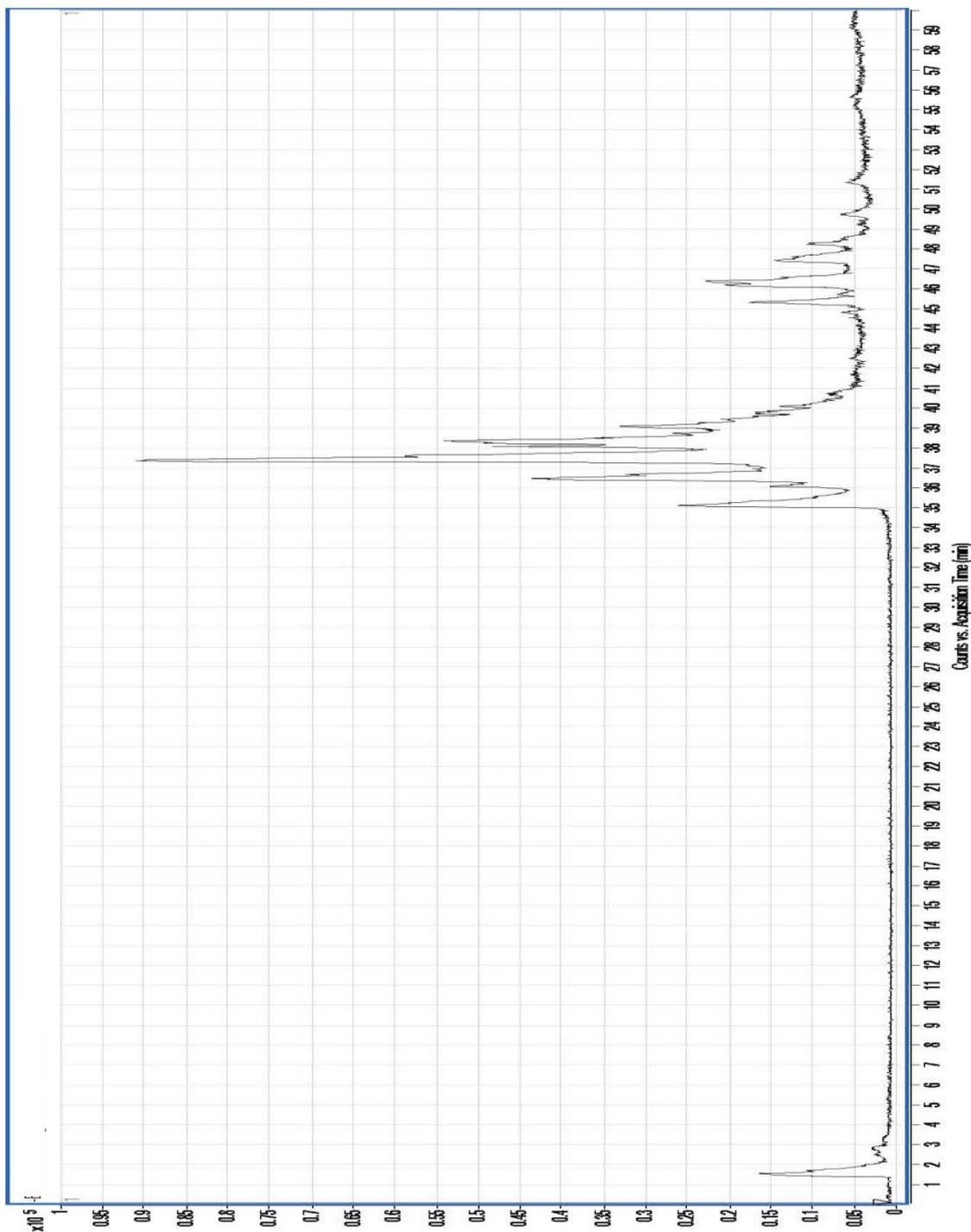


Figura 7.- Cromatograma obtenido mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) del extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides*.

Con base en el análisis por HPLC-MS se pudieron detectar 6 compuestos (Cuadro 9):

Cuadro 9- Compuestos determinados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS), especificando tiempo de retención y el ión detectado.

No. de compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión (m/z)
1	45.315	738.5412
2	46.178	826.5957
3	46.377	714.5397
4	47.423	802.5927
5	48.253	742.5705
6	49.730	728.5880

Cromatografía en Capa Fina

Debido a que los compuestos detectados en HPLC-MS no pudieron ser identificados, se decidió realizar una Cromatografía en Capa Fina para poder inferir la naturaleza de los compuestos. La placa fue revelada con luz ultravioleta (Figura 8).

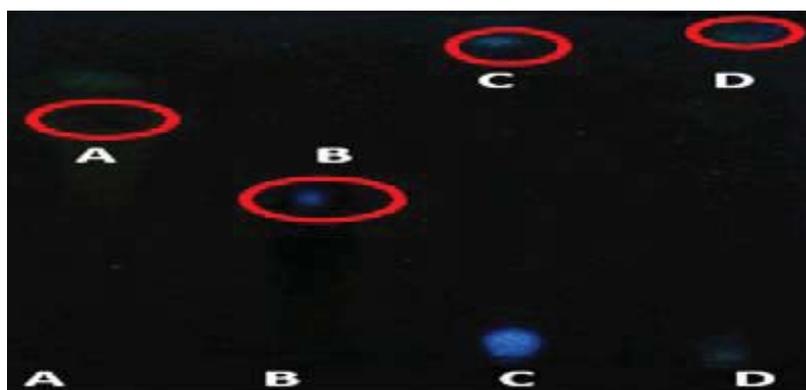


Figura 8.- Cromatografía en placa fina donde se aprecian las bandas separadas de los compuestos: quercetina (A), ácido gálico (B), extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* (C) y extracto metanólico del adulto de *U. dermestoides* (D)

Para el caso de los extractos metanólicos tanto de larva y adulto de *U. dermestoides*, si bien se pueden apreciar dos bandas fluoresciendo en la base de la placa, no se tomaron en cuenta para el cálculo de R_F debido a que se trata del punto de aplicación de la muestra.

Se obtuvo un valor de R_F de 0.9 para los compuestos separados del extracto metanólico de la larva, mientras que la quercetina obtuvo uno de 0.65 y el ácido gálico de 0.5 (Cuadro 10).

Cuadro 10.- Valores obtenidos de la separación de compuestos en cromatografía de placa fina (R_F)

COMPUESTO	R_F
Quercetina	0.7
Ácido gálico	0.5
Extracto metanólico de la larva de <i>U. dermestoides</i>	0.9
Extracto metanólico del adulto de <i>U. dermestoides</i>	0.97

Con base en la fluorescencia de ambos extractos (larva y adulto) se infiere que los compuestos presentes contienen al menos, un anillo aromático. (Figura 8).

Capacidad antioxidante

Con base en el porcentaje de reducción del radical DPPH, se determinó que el extracto de la larva de *U. dermestoides* presenta una capacidad antioxidante promedio del 29.2753%, con un porcentaje máximo de reducción del 43.12 %, alcanzando el porcentaje máximo de reducción a 80 ppm (Cuadro 11).

Cuadro 11.- CA_{50} del del extracto de la larva de *U. dermestoides* y del control positivo (quercetina), reportando el promedio de reducción y el porcentaje máximo de reducción.

Compuesto	CA ₅₀ (ppm)
Quercetina	4.0
Extracto de larva de <i>U. dermestoides</i>	80

Con base en los valores mencionados anteriormente se demostró que la capacidad antioxidante del extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* no es directamente proporcional a la concentración.

Discusión

Ulomoides dermestoides es considerado dentro de la medicina tradicional como un organismo que puede presentar alternativas para resolver problemas de salud, a partir de extractos realizados con el adulto se ha demostrado su capacidad antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante y antiproliferativa, sin embargo, no se tiene registro sobre características bromatológicas y propiedades nutraceuticas de la larva de este escarabajo. Otro aspecto importante que considerar es que la mayoría de los insectos cuando están en fase de larva contienen altos niveles de proteína, lípidos, carbohidratos y otras biomoléculas para poder llevar a cabo su crecimiento exponencial y entrar a fase de pupa de manera óptima, como lo reporta Castelli (2005).

La concentración de proteínas es un parámetro importante para poder evaluar el potencial nutraceutico de un alimento, ya que de acuerdo con la FAO (2017) las proteínas son las principales moléculas estructurales de las células y tejidos del cuerpo y además son necesarias para un óptimo crecimiento y desarrollo. Se han propuesto diferentes insectos como fuente de proteína, los tenebriónidos han sido de los más estudiados, principalmente la larva de *T. molitor*, en el cual se ha reportado por Yi (2015) que mediante la técnica de digestión con ácido la concentración de proteína cruda equivale entre 19% a 26% por cada gramo de larva, comparándolo con la larva de *U. dermestoides* la cual obtuvo una concentración de 0.3043 mg de proteína por cada gramo de larva, equivale al 0.03% de proteína. Cabe destacar que a la técnica de Bradford cuantifica únicamente proteínas hidrosolubles y que, al momento de centrifugar la muestra para la extracción, las proteínas de mayor peso molecular van al fondo. Por otra parte, la mayoría de los estudios realizados para la cuantificación de proteínas se realizan con peso seco, sin embargo, debido al tamaño y a la fragilidad de la larva de *U. dermestoides* las muestras se tienen que procesar frescas. Tomando en cuenta investigaciones como la de Yi (2015) y Mendoza (2013) quienes reportan que en promedio, el porcentaje de humedad de larvas de tenebriónidos es del 60%, se puede inferir que la larva de *U. dermestoides* presenta valores similares, por lo cual, la concentración de

proteínas, así como de otras biomoléculas, aumentarían si se trabajara con muestra seca. Así mismo, la mayoría de los estudios nutricionales relacionados a tenebriónidos cuantifican el total de nitrógeno en las muestras, tomando en cuenta todas las posibles biomoléculas con nitrógeno que contiene el insecto y no solo proteínas. Otro aspecto que considerar es lo reportado por Reyes y Ramos (2013), quienes establecen que la dieta puede alterar los valores nutricionales de cada organismo de acuerdo con los requerimientos nutricionales que se necesiten, encontrando que dependiendo el tipo de dieta, la concentración de proteína varía significativamente. Tomando en cuenta el cuidado empírico para *U. dermestoides* se puede inferir que la dieta que normalmente es utilizada (pan integral, plátano y avena) contiene menos del 10% de proteína, lo cual explicaría la baja concentración de proteínas respecto a *T. molitor*, para el cual se manejan dietas diversas, que incluyen desde avena, zanahoria, salvado de maíz, salvado de trigo, o bien, dietas ya procesadas con valores nutricionales establecidos.

La concentración de carbohidratos fue de 0.2728 mg por cada gramo de larva, lo que equivale al 0.027%. La técnica de Nelson-Somogyi cuantifica únicamente azúcares reductores, Torres *et al.* (2016), reportaron la presencia de fructuosa, xilosa, maltosa y trehalosa en escarabajos de la familia Melolonthidae, destacando que glucosa y fructuosa se encontraron en mayor proporción, esto debido a la presencia de quitina, la cual es un polisacárido que es parte esencial del exoesqueleto de artrópodos. En este estudio la concentración de carbohidratos se vio afectado debido a que la cutícula de la larva de *U. dermestoides* no se disuelve totalmente, por consiguiente, la mayoría de los azúcares presentes en el organismo no se cuantificaron totalmente, o bien, fueron parte del contenido estomacal de la larva, esto debido a que durante la etapa larval la mayoría de los insectos se dedican únicamente a consumir alimento para crecer exponencialmente y tener reservas energéticas durante el estado de pupa.

Mediante la técnica de separación por Soxhlet se obtuvo un total de 3 g de lípidos por cada 100 gramos de larva, Yi (2015), reporta que mediante separación de ácidos

grasos por Soxhlet el porcentaje de lípidos en algunas larvas de insectos comestibles como *T. molitor* y *A. domesticus* varía de 6% a 12%, así mismo, reporta que probablemente la mayor parte de estos lípidos sean parte de la epicutícula del insecto. Villaverde (2009) explica este punto tomando en cuenta que la epicutícula de los insectos tiene una estructura compleja, principalmente está formada de proteínas, quitina y una mezcla compleja de lípidos no polares, principalmente hidrocarburos lineales y ramificados de muy largas cadenas (entre 20 y 40 átomos de carbono), alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres. La principal función de la mezcla lipídica es evitar la pérdida de agua, esto funciona debido a las propiedades hidrofóbicas de los hidrocarburos, por otra parte, Villaverde (2009) sugiere que estos lípidos cuticulares poseen otras funciones, como la comunicación química entre los organismos.

Los lípidos obtenidos fueron sometidos a un análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas y se pudieron identificar diferentes hidrocarburos: triacontano, hentriacontano, tricosano, pentacosano, los cuales son componentes básicos en la estructura cuticular de larvas y su función es evitar la deshidratación y la comunicación, como lo explica Arellano *et al.*, (2013). Por otra parte, se encontraron ácidos grasos de importancia médica como el ácido palmítico que ha sido reportado como antioxidante por Fito (2003) y del mismo modo, fue mencionado por Saint-Remmy (2017) y Mendoza (2013) como un componente abundante en extractos etanólicos del adulto de *U. dermestoides*. Se identificó Metil 15-metilhexadecanoato el cual según lo descrito por el portal PubChem® ha sido utilizado en tratamientos anticancerígenos. Por otra parte, el ácido octadecanoico fue determinado por Carbajal (2013) como reductor de los niveles de colesterol, esto se explica debido a que las grasas saturadas aumentan la síntesis de las lipoproteínas que transportan el colesterol LDL (Lipoproteínas de Baja Densidad).

Para evaluar la actividad biológica se realizó un ensayo de actividad antibacteriana, este tipo de ensayos son importantes para determinar las características nutracéuticas de un alimento, ya que las enfermedades ocasionadas por bacterias

han ido en aumento en los últimos años, así como la búsqueda de medicamentos naturales que funcionen como alternativas para este tipo de enfermedades. Se decidieron usar cepas Gram positivas y Gram negativas de interés médico, por otra parte, las bacterias fueron seleccionadas debido al tratamiento empírico por lo que la gente consume *U. dermestoides*. Cabe destacar que algunas bacterias como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* son bacterias oportunistas que suelen presentarse como microbiota natural, sin embargo, en pacientes inmunodeprimidos (como las personas que practican la coleopteroterapia) ocasionan infecciones graves. Los resultados de esta prueba fueron negativos, no hubo inhibición en ninguna de las cepas, sin embargo, ha sido reportado por Saint-Remy (2017) que el extracto etanólico del adulto de *U. dermestoides*, si presenta una actividad antibacteriana en cepas tanto Gram positivas como Gram negativas. De acuerdo con el estudio previamente mencionado, la actividad antimicrobiana depende de moléculas como catecoles y benzoquinonas, que son derivados de ácidos fenólicos, como lo reporta Crespo (2011).

La concentración de fenoles totales fue de 1.1636 mg eq. AG/g. Mendoza (2013) reporta que la concentración de fenoles totales en extractos hidrometanólicos del adulto de *U. dermestoides* fue de 22.94 mg eq. AG/g, mientras que Saint-Remy (2017) reporta que para extractos etanólicos la concentración es de 70 mg eq AG/g. Sin embargo, no se tiene registro de una evaluación fenólica para larvas de *U. dermestoides*, aunque cabe destacar que la mayor parte de las investigaciones que reportan la presencia de fenoles en larvas de tenebriónidos se enfocan en los compuestos presentes en la cutícula de los insectos.

Al realizar el ensayo para la cuantificación de flavonoides totales se determinó que el extracto metanólico de la larva no posee flavonoides. Por lo cual, se sometió el extracto metanólico a un análisis de HPLC. Se pudo determinar que los compuestos son de naturaleza fenólica y benzo conjugados. Si bien ha sido reportado en estudios previos como el de Saint-Remy (2017) que extractos etanólicos de *U. dermestoides* adulto presentan fenoles como catecol y derivados del catecol, en

larvas no se ha podido identificar un compuesto específico, ya que de los picos registrados, ninguno coincidió con los estándares de la base de datos. A partir de lo observado en el análisis de HPLC, se optó por realizar una Cromatografía en Placa Fina para poder inferir la naturaleza de los compuestos fenólicos con base en su R_F , tal y como lo realizó Kanehisa (1977) para analizar las secreciones de defensa de *Tenebrio molitor*, argumentando que éste tipo de cromatografía son de gran utilidad para realizar un prospectivo acerca de los compuestos químicos, por otra parte, el autor recalca la importancia de colocar un estándar en la placa para observar las similitudes al momento de calcular el R_F . Debido a que se desconocía la identidad de los compuestos en la muestra, se optó por utilizar como fase móvil la planteada por Ferry y Larson (1991), la cual está estandarizada para compuestos fenólicos y polifenólicos. A pesar de todo lo mencionado anteriormente, el valor de R_F no coincidió con ningún fenol propiamente identificado; Ferry y Larson (1991) reportan únicamente como “fenol” a la muestra con un R_F de 0.9. Sin embargo, Misra *et al.*, (1998) reportan que en una fase móvil donde el cloroformo se encuentra en mayor proporción y que con una R_F de 0.9, o cercano a este valor, el fenol que corresponde es el β -naftol, sin embargo, esto es poco probable ya que no existe evidencia de que esta molécula esté presente en insectos. Debido a todo lo mencionado anteriormente, lo único que se puede inferir es que el extracto metanólico de la larva de *U. dermestoides* presenta moléculas con al menos, un anillo aromático.

Por otra parte, la presencia de fenoles y/o compuestos aromáticos podría indicar dos cosas; se ha reportado que en adultos de *U. dermestoides* están presentes benzoquinonas, las cuales son derivados de catecoles mediante la acción de una enzima denominada polifenol oxidasa. Se sabe que esta enzima está presente en la cutícula de insectos, los productos de esta enzima les permite soportar condiciones en escasez de agua, como fue reportado por Sugumaran (1990). Por otra parte, los fenoles son componentes básicos en la estructura cuticular del insecto, se encuentran intercalados con moléculas de quitina para brindarle una mayor estabilidad y dureza al organismo.

En cuanto al análisis del extracto metanólico en HPLC-MS, los compuestos registrados no pudieron ser comparados con ningún dato de la biblioteca del sistema, los iones tampoco corresponden con ningún compuesto reportado en estudios previos. Sin embargo, a partir del tiempo de retención y del ión detectado (m/z) se infiere que se puedan tratar de s tipos de biomoléculas: ceras y péptidos. Se sabe que las ceras son componentes estructurales primordiales de la cutícula de todos los insectos, por lo cual, se podría inferir este tipo de moléculas, como lo reportan Sutton *et. al.* (2013), quienes explican que en HPLC-MS las ceras que existen en la cutícula de diferentes insectos presentan una estructura, de por al menos, 35 C, con tiempos de retención mayores a 18 minutos. Lo anterior, iría relacionado con lo encontrado en el análisis de lípidos mediante CG-MS, donde se reportan hidrocarburos que son componentes cuticulares. Sin embargo, y con base en el análisis de las moléculas detectadas en HPLC-MS, se pudieron determinar que existían algunas moléculas compuestas de nitrógeno, lo cual, da pauta para inferir que se pueda tratar de un péptido. Davis y Lee (1998), reportan iones (m/z) de péptidos desde 700 hasta 1200 identificados mediante HPLC-MS, lo cual coincide con los valores encontrados en el presente estudio. A pesar de todo lo mencionado anteriormente, los compuestos reportados en el extracto metanólico de *U. dermestoides* siguen estando sin identificar concretamente.

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto metanólico mediante la reducción del radical DPPH. Se determinó que el extracto posee una capacidad antioxidante promedio de 29.2753%, con un máximo de 80 ppm, lo cual indica que, sin importar la concentración, el extracto solo reduce en promedio cerca del 30%. Se conoce que los compuestos con actividad antioxidante deben tener al menos un grupo hidroxilo, por lo cual se infiere y basándose en la baja concentración de fenoles y la nula presencia de flavonoides, que ninguna de las moléculas presentes en el extracto posee un grupo funcional OH, como lo reporta Canales (2017). Sin embargo, de los lípidos identificados mediante CG-EM destaca el ácido palmítico, el cual ha sido reportado como una molécula antioxidante.

Finalmente, cabe destacar que todos los estudios que se han enfocado en trabajar con las diferentes actividades biológicas del adulto de *U. dermestoides* se basan en un peso específico y no por individuo, generalmente dejando a un lado el consumo tradicional. Ligando esta metodología con la manera en la que se consume *U. dermestoides* tradicionalmente, y planteando hipotéticamente que se consumieran las larvas en lugar del adulto, se consumirían cerca de 5000 insectos durante todo un tratamiento, lo cual equivale aproximadamente a consumir 118 gramos de larva. Debido a lo mencionado anteriormente, las propiedades nutricionales aumentarían respecto a la concentración de biomoléculas. Para ejemplificar este punto y basándose en el tratamiento tradicional, se puede estimar que la cantidad total de biomoléculas serían; 35 mg de proteína, 32 mg de azúcares reductores, 3.5 gramos de lípidos y 137 mg eq. AG para el caso de fenoles. Con base en las cantidades ya mencionados, todas las propiedades biológicas, como la capacidad antioxidante, se verían aumentadas, beneficiándose así la persona que consume la larva.

A partir de todo lo encontrado, tanto química como biológicamente, la larva de *U. dermestoides* tiene potencial como un producto nutracéutico, si bien hacen falta más investigaciones donde se estudien más propiedades biológicas, lo encontrado en el presente trabajo abre un panorama innovador para el estudio de nuevos productos nutracéuticos de origen animal, como es el caso de los insectos.

Conclusiones

- La larva de *U. dermestoides* puede ser empleada como un producto nutracéutico.
- La concentración de proteínas y carbohidratos fue baja en comparación con otros tenebriónidos.
- Los lípidos identificados han sido reportados por presentar propiedades biológicas importantes como antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas.
- No hubo actividad antibacteriana.
- Se determinaron compuestos aromáticos en el extracto metanólico.
- Se infiere la presencia de ceras y/o péptidos en el extracto metanólico.
- El extracto presenta capacidad antioxidante.
- Se recomiendan estudios sobre la inocuidad de las larvas.

Apéndices.

Apéndice 1: Características diacríticas de Tenebrionidae

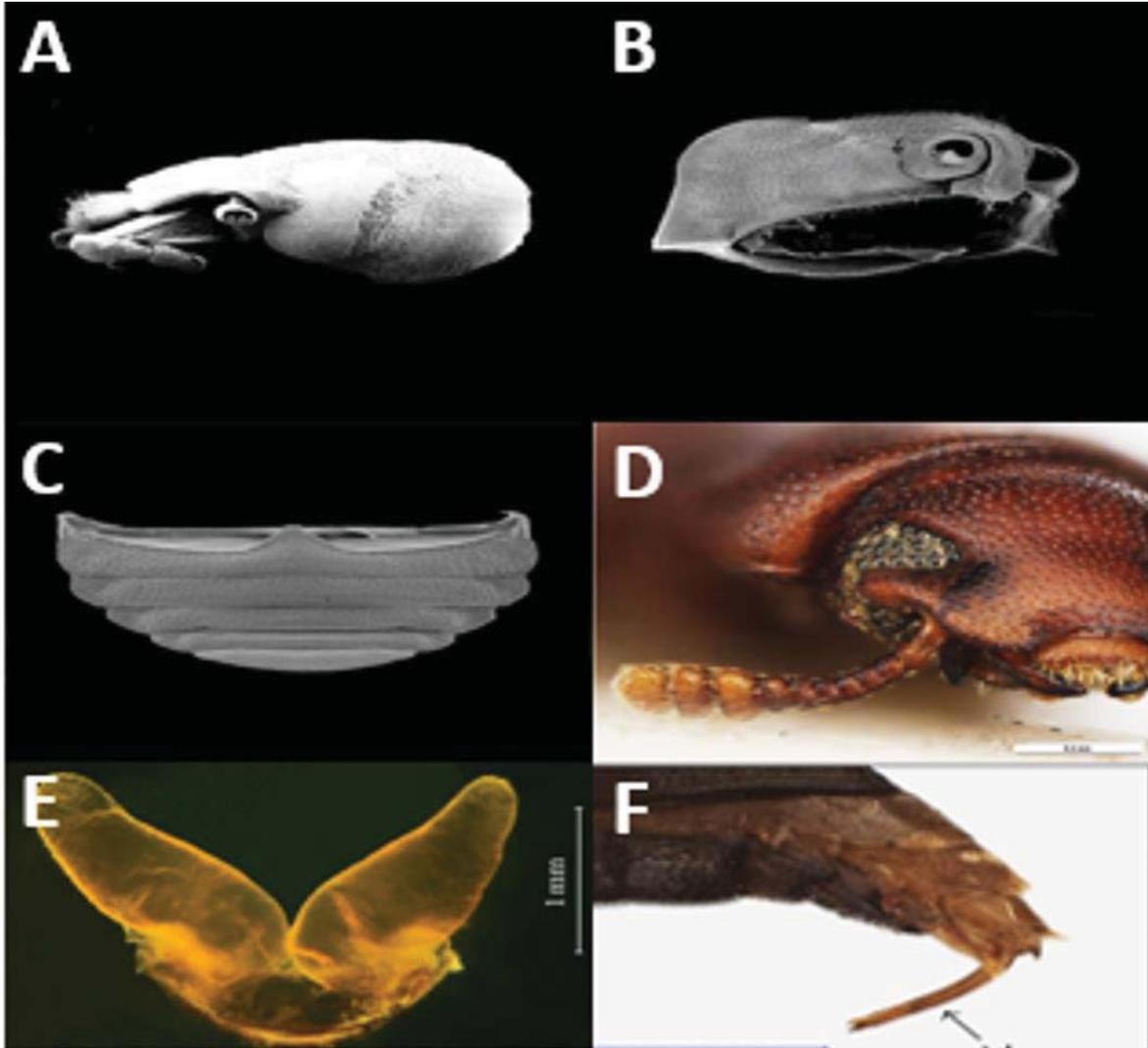


Fig 9.- Características diacríticas de la familia Tenebrionidae: Inserciones antenales escondidas y ojos emarginados (A), cavidades procoxales cerradas y proceso prosternal curvado (B), ventrículos conados (C), antenas insertadas por debajo de la frente con 11 antenómeros (D), glándulas odoríferas defensivas (E) y edeago no invertido (Condamine *et al.*, 2011)

Apéndice 2: *Ulomoides dermestoides*

Taxonomía

Reino: Animalia.

Filo: Arthropoda.

Subfilo: Hexapoda.

Clase: Insecta.

Orden: Coleóptera.

Familia: Tenebrionidae.

Género: *Ulomoides*

Especie: *Ulomoides dermestoides*.



Descripción y generalidades de la especie

Ulomoides dermestoides es un escarabajo perteneciente a la familia Tenebrionidae, que generalmente es conocido como gorgojo. Estos organismos presentan forma del cuerpo es oblonga, aplanada, la cabeza es tipo prognata, ojos compuestos prominentes, fácilmente diferenciables en cualquier posición de los adultos y poseen fuertes mandíbulas. Son de color negro en su etapa adulta y miden aproximadamente 5 mm de largo (Chevrolat, 1878). Necesitan ciertas condiciones ambientales para proliferar, la temperatura de crecimiento tiene un rango desde los 18° hasta los 31°C, una temperatura mayor o menor a partir del rango establecido pueden afectar su crecimiento y su tasa de reproducción. Necesitan humedad, generalmente entre un 50-70% y se desarrollan mejor en oscuridad

Durante su desarrollo tiene 3 etapas, larva en la que duran aproximadamente de 15-20 días dependiendo de las condiciones ambientales, pupa y gorgojo adulto. Tienen una vida promedio de 60-90 días, aunque se puede extender si el alimento es abundante y las condiciones de temperatura son apropiadas (Castelli, 2005).

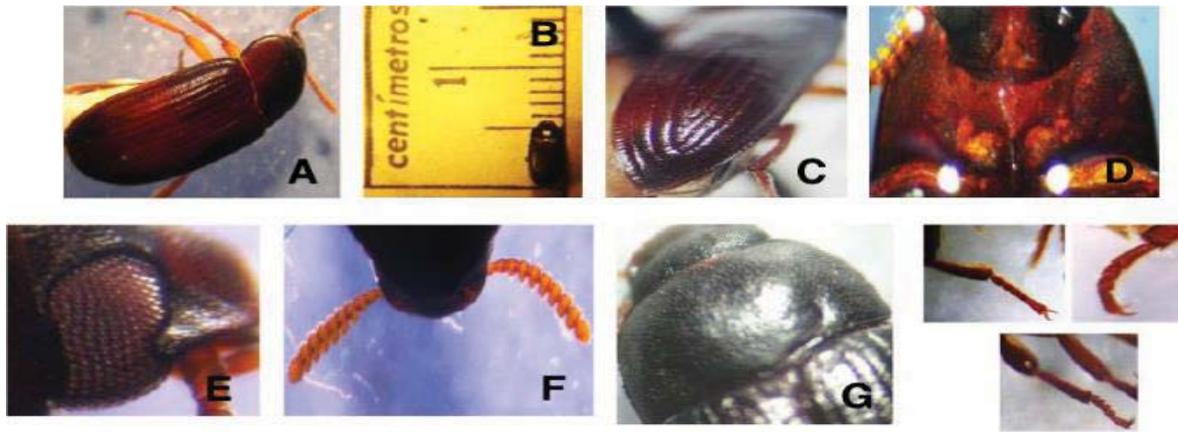


Fig. 10.- Características morfológicas de *U. dermestoides*. (A) Cuerpo en forma oblongada y color sombrío. (B). Longitud de 5-6 mm. (C) Interestriados y siete unidas al final. (D). Frente con cavidad cocal cerrada (E) Ojos prominentes divididos por una cresta dorsal. (F) Antenas largas con 11 metámeros. (G). Puntuación en el pronoto más separado que en la cabeza. (H) Fórmula tarsal 5-5-4 (Mendoza y Maury, 2013).

Distribución

Se presume que estos coleópteros son provenientes de Asia, en específico China y Mongolia, posteriormente fueron introducidos a Sudamérica en donde fueron considerados plaga en países como Argentina, Colombia y Chile donde atacaban almacenes y cultivos de cereales. Hace unos años fueron usados en la coleópteroterapia y se distribuyeron en casi toda Latinoamérica a excepción de Brasil (Castelli, 2005).

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *U. dermestoides* consta de cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras ovopositan sobre residuos del alimento, comúnmente denominado humus, el huevo está recubierto con una fina película mucilaginosa en la cual se adhieren residuos de alimento y/o excremento. Una vez terminado el proceso de maduración emerge el primer estadio de las larvas, las cuales presentan una coloración blanco-cremosa uniforme, conforme transcurre el tiempo la cantidad de pigmentos dentro de su cuerpo las vuelve amarillas. Así mismo las larvas presentan un crecimiento exponencial, esto se debe a que la única actividad que

realizan es alimentarse para poder llegar a la fase de pupa con una gran de nutrientes. Antes de iniciar la fase de pupa, la larva detiene su crecimiento disminuye así su metabolismo. La pupa es del tipo exarata, de color blanco lechoso a café claro. El estado pupal, es crítico ya que existe un alto índice de muerte por deshidratación. Una vez terminada la maduración como pupa emergen los primeros adultos que carecen de coloración, sin embargo, conforme van creciendo adoptan una coloración cada vez más oscura, este color va relacionado directamente de lo que se alimentan (Rodríguez-Palma *et al.*, 2014; Castelli, 2005).

Alimentación

La alimentación de estos escarabajos se basa principalmente en cereales como el trigo, avena, harina, cebada, entre otras; aunque es necesario alimentarlos de manzana y lechuga ya que de ahí obtienen su fuente de agua. Se ha demostrado que también se pueden alimentar de productos como tortilla y pan integral (Castelli, 2005)

Apéndice 3: Cuantificación de proteínas por método de Bradford.

Fundamento:

Este método se basa en la unión de un colorante (Comassie Blue G-250) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre, la coloración azul de este complejo se debe a la presencia de un ácido y por encontrarse en un entorno hidrofóbico del interior de la proteína (Bradford, 1976).

Procedimiento:

Para la extracción de proteínas se pesan 1.0821 g de larvas en su último estadio, posteriormente se añaden 4 mL de una mezcla de metanol-cloroformo-agua, se centrifuga a 3500 rpm por 5 minutos, se resuspende la pastilla y se vuelve a centrifugar. El sobrenadante se recupera (6.3 mL). Se utilizaron dos concentraciones diferentes de la muestra problema, las cuales fueron interpoladas en la siguiente curva:

Reactivos	Blanco	1	2	3	4	5	6	Muestra 1	Muestra 2
Agua destilada (mL)	1	0.95	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.875	0.750
BSA (100 µg/mL)	-	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-	-
Problema (µL)	-	-	-	-	-	-	-	125	250
Reactivo de Bradford (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Finalmente se lee en el espectrofotómetro a 595 nm, se realiza una regresión lineal para interpolar los valores desconocidos de la muestra, y se saca el porcentaje de proteínas por cada gramo de larvas.

Apéndice 4: Cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogyi.

Fundamento:

Para este método es necesario hacer reaccionar un azúcar reductor, la cual forma un óxido cuproso de color rojo, debido a la donación de electrones del reductor al oxidante. Ya que el óxido cuproso precipitado insoluble no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con reactivo de arsenomolibdato para transformarse a un ión verdoso que se mide en el fotocolorímetro. Al estar los reactivos en exceso el agente reductor es el factor limitante; por lo cual se puede usar para determinar la cantidad de Cu_2O que es proporcional a la cantidad de glucosa originalmente presente. La sensibilidad es de 25 a 250 $\mu\text{g/mL}$ (González y Peñalosa, 2000).

Procedimiento:

1. A partir de la siguiente serie de tubos:

Tubos	Patrón de glucosa (200 $\mu\text{g/mL}$) (mL)	Agua destilada (mL)	Problema (mL)	Reactivo de cobre (mL)
1	-	1	-	1
2	0.25	0.75	-	1
3	0.50	0.50	-	1
4	0.75	0.25	-	1
5	1	-	-	1
6	-	-	1	1

2. Se tapan los tubos con papel aluminio y se colocan en baño maría hirviendo por 20 minutos, enfriar con agua corriente.
3. Se agrega a cada tubo 1 mL del reactivo de arsenomolibdato.
4. Agregar a cada tubo 7.5 mL de agua destilada.
5. Mezclar por inversión cada tubo y leer en el espectrofotómetro a 565 nm utilizando el tubo 1 como blanco.

Se construye una curva patrón y se interpola la absorbancia de los tubos problema.

- **Patrón de glucosa (200 µg/mL):** disolver 1mg de glucosa en 5 mL de agua destilada.
- **Reactivo de Cobre:** 400 mL de agua destilada + 40 g de carbonato de sodio anhidro y disolver. Agregar 7.5 g de ácido tartárico y disolver otra vez. Enfriar si es necesario. Agregar 4.5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y disolver. Aforar a 1 L y envasar en frasco ámbar. Dejar madurar por 2 semanas.
- **Reactivo de Arsenomolibdato:** Disolver 50 g de molibdato de amonio en 900 mL de agua destilada, agregar 42 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente y añadir 50 mL de solución de ortoarseniato disódico al 12% (Na_2HAsO_4). Mezclar bien e incubar a 37°C durante 24 a 48 horas. Envasar en frasco ámbar

Apéndice 5. Método de extracción de lípidos mediante Soxhlet

Fundamento

La extracción Soxhlet es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. Puede ser usada como técnica preparativa de muestra como paso previo al análisis mediante otra técnica instrumental. El procedimiento para llevar a cabo su extracción se basa en la extracción sólido-líquido en continuo, empleando un disolvente, con posterior evaporación de éste y pesada final del residuo (González y Peñalosa, 2000).

Procedimiento

Para la extracción de los lípidos presentes en la larva primero se realizó un cartucho de papel filtro de 15x6 cm, se coloca en un horno a 65°C por 24 hrs. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron 4 g de larva previamente sacrificada por congelación. A diferencia de otras técnicas, se optó por utilizar muestra fresca por la fragilidad de las larvas. Posteriormente se procedió a extraer los lípidos utilizando hexano como solvente durante 4 horas. Se evaporó el exceso de hexano y se pesó la cantidad total de lípidos. El resultado representa el contenido de sustancias extraíbles, que mayoritariamente son grasas, aunque también hay otras sustancias como las vitaminas liposolubles y pigmentos en el caso de determinación en alimentos.



Figura 11.- Sistema Soxhlet empleado para la extracción de lípidos y lípidos aislados.

Apéndice 6: Trans-esterificación de lípidos

Fundamento

Una reacción de transesterificación es un proceso químico en el cual un triglicérido reacciona con un alcohol, generalmente ligero, bajo la acción de un catalizador, generando una mezcla de ésteres de ácidos grasos y glicerina, lo cual facilita volatizar un ácido graso, que a su vez permite ser detectado en el Cromatógrafo de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (Marrero, 2006).

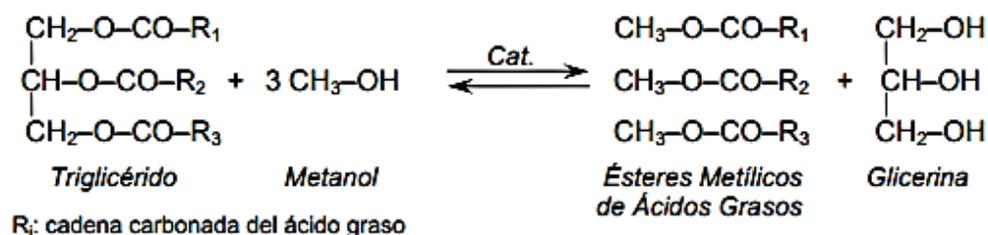


Fig. 12.- Reacción de trans-esterificación de ácidos grasos.

Procedimiento

Se tomaron 80 g de lípidos de la larva de *U. dermestoides* extraídos previamente en un aparato Soxhlet, posteriormente se agregaron 100 µL de estándar de ácido heptadecanoico, se dejó evaporar y posteriormente se añadieron 500 µL de trifloruro de bario (12%), se dejó ebulir la muestra por 20 minutos. Finalmente se agregó 1 µL de la solución al CG-EM.

Apéndice 7: Determinación de Lípidos por Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas.

Fundamento

La cromatografía de gases-masas es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad (Universidad COMPLUTENSE de Madrid, 2018).

Procedimiento

Se inyectó 1 µL de muestra, en un equipo 6850 GC METHOD con una columna Agilent 19091S-433E, utilizando helio. La temperatura inicial fue de 250°C y la final de 325°C, gradiente de 3°C/min. La inyección se efectúa mediante Split 1/80 con modo de adquisición Full Scan, con una presión de 8.72 psi. Se llevó a cabo una identificación de los compuestos con base en la biblioteca del equipo.

Apéndice 8: Extracto de U. dermestoides.

Fundamento:

Para la realización de un extracto es necesario aislar los componentes esenciales de la muestra que se desea estudiar, esto mediante polaridades de diferentes sustancias en relación a los componentes esenciales de la muestra. En el caso del metanol se trata de un disolvente polar prótico con punto de ebullición de 65°C. Esto quiere decir que el MeOH posee un grupo funcional capaz de ceder protones, tiene la capacidad de formar puentes de H⁺ con moléculas con partes negativas y positivas.

Procedimiento:

La larva fue pesada (3 g) y sacrificada en el congelador durante 2 horas, posteriormente se colocó en un mortero de porcelana y se maceró exhaustivamente con metanol. El extracto fue filtrado utilizando papel filtro y se dejó reposar durante 24 horas. Finalmente el extracto fue colocado en agitación y con temperatura (60°C) para la evaporación total del metanol (Crespo, 2011).



Figura 13.- extractos metanólicos de la larva (izq.) y adulto (der.) de *Ulomoides dermestoides*.

Apéndice 9: Evaluaciones cualitativas de Fenoles, Flavonoides y Quinonas.

Ensayo de Fenoles

Se toma una muestra de extracto diluido en 5 mL de metanol. Se agrega cloruro férrico. En caso de dar positivo para fenoles se obtendrá un precipitado verde oscuro que sugiere derivados de catecol o un color azul intenso indicando derivados de pirogalol (Domínguez, 1973).

Ensayo de Flavonoides

Se toma 1 mL de solución de extracto metanólico de la muestra en un tubo de ensayo limpio. Añadir algunas limaduras de Mg y por la pared del tubo, unas gotas de HCl concentrado. La solución se teñirá de color anaranjado si existe la presencia de flavonoides en la solución (Galeano *et al.*, 2008).

Ensayo para Quinonas

Se coloca en un tubo de ensayo 5 mL de filtrado acuoso. Añadir 1 mL de peróxido de hidrógeno al 20% y 1 mL de ácido sulfúrico al 50%. Se calienta la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Enfriar. Añadir 5 mL de tolueno. Agitar sin emulsionar. Recuperar la fase toluénica. Transvasar 2 mL fase toluénica a un tubo de ensayo. Añadir 1 mL de una solución de NaOH al 5% con amoníaco al 2%. Agitar sin emulsionar. Si la capa acuosa toma una coloración rosada a roja intensa es prueba positiva de la presencia de quinonas en la muestra (Martínez *et al.*, 2008).

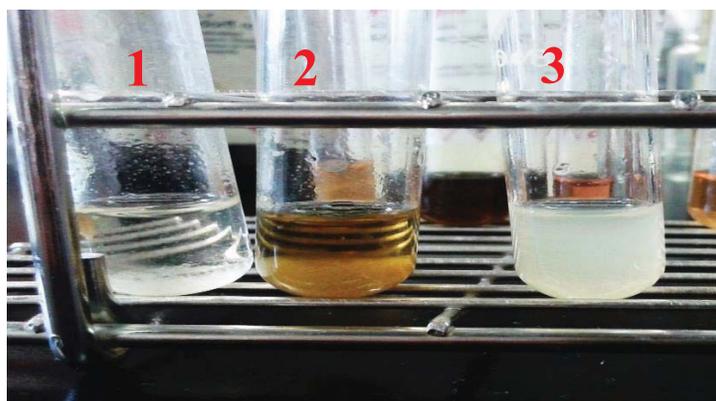


Fig. 14.- pruebas cualitativas de quinonas (1), fenoles (2) y flavonoides (3)

Apéndice 10: Cuantificación de Fenoles Totales de Singleton.

Fundamento

Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra.

El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles (Singleton *et al.*, 1999).

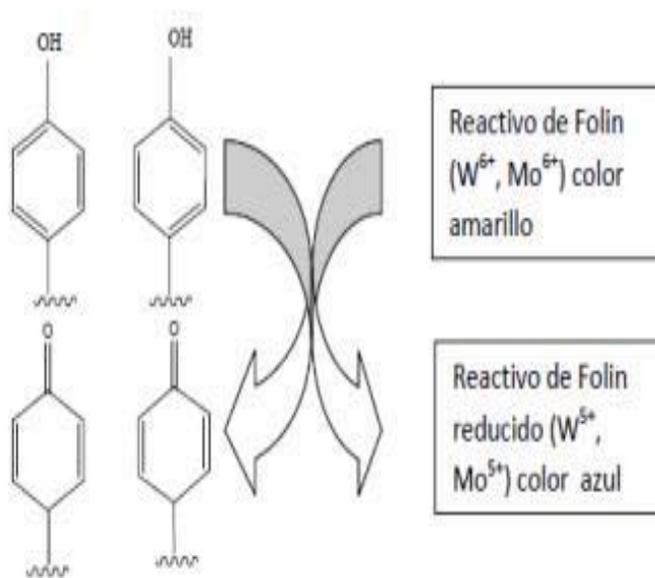


Fig. 15.- Reacción redox en la cuantificación de fenoles.

El mecanismo de reacción es una reacción redox. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (Singleton *et al.*, 1999).

Procedimiento

Preparación de ácido gálico

1. Para preparar la concentración de ácido gálico se pesa 1 mg y se disuelve en 5 mL de agua destilada, procurando que la agitación sea lentamente para evitar que se sature.
2. Una vez disuelto se debe mantener fuera del alcance de la luz, cubriendo el frasco donde se preparó con papel aluminio

Preparación de Na_2CO_3

3. Se pesan 3 g de Na_2CO_3 y se disuelven en 15 mL de agua destilada.
4. La solución debe ser preparada lentamente para evitar que se sature, debe estar en constante agitación en una parrilla con agitador magnético.

Preparación del problema:

5. Se debe preparar una solución con una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de la cual se toma un volumen de 250 μL y se le agregan 750 μL de agua destilada para tener un volumen final de 1 mL.

Curva patrón

6. Para la preparación de la curva patrón se debe tomar en cuenta lo siguiente:
 - a) Los tubos de ensayo deben tener una capacidad mínima de 20 mL
 - b) Primero se debe agregar el agua destilada, se recomienda utilizar una micropipeta de 100-100 μL para los volúmenes más grandes y una micropipeta de 1-10 μL para añadir los volúmenes más pequeños.
 - c) En seguida debe agregarse el ácido gálico
 - d) Posteriormente se agregan los 3.5 mL de agua destilada a todos los tubos.
 - e) Se agrega el reactivo de Folin-Ciocalteu, 250 μL a cada tubo
 - f) Se deben dejar reposar los tubos por 5 minutos antes de añadir el Na_2CO_3

Tubos	Ácido gálico mg/mL	Patrón (ácido gálico μL)	Agua destilada μL	Agua destilada mL	Folin-Ciocalteu μL	Na_2CO_3 mL
Blanco	-	-	-	3.5	250	0.75
1	0.003125	15.625	984.375	3.5	250	0.75
2	0.00625	31.25	968.75	3.5	250	0.75
3	0.0125	62.5	937.5	3.5	250	0.75
4	0.0250	125	875	3.5	250	0.75
5	0.05	250	750	3.5	250	0.75
6	0.1	500	500	3.5	250	0.75
Problema	-	125	875	3.5	250	0.75

Lectura de absorbancias:

7. Los tubos deben reposar por 2 horas a 37°C antes de leerlos en el espectrofotómetro
8. Una vez transcurridas las 2 horas se lee a una absorbancia de 760 nm, cada concentración se debe leer por triplicado.

Apéndice 11: Determinación de Flavonoides por el método de Dowd.

Fundamento:

Se basa en el uso de cloruro de aluminio. El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, que se producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales (Amaya y Portillo, 2013).

Procedimiento:

Preparación de stocks:

1. Se prepara un stock de quercetina, tomando 3 mg de quercetina en 3 mL de metanol grado HPLC.
 - Para los primeros 5 tubos (1-5 ppm) del stock de quercetina se toman 20 μ L y se disuelven en 180 μ L de metanol grado HPLC.
2. A partir del extracto o la muestra problema se prepara una dilución 1:1, tomando 3 mg de extracto disolviéndolo en 3 mL de metanol grado HPLC
 - Para los volúmenes se utiliza una micropipeta de 100-1000 μ L
 - Tanto para el stock de quercetina como para la muestra problema se debe disolver lentamente para evitar que la solución se sature.
 - Las soluciones pueden ser preparadas en frascos viales de 50 mL para evitar que se evapore el metanol

Preparación de $AlCl_3$:

3. Para preparar la concentración de $AlCl_3$ al 2% se pesan 0.6 g del reactivo y se aforan en 20 mL de metanol HPLC
 - La solución debe disolverse lentamente para evitar que se sature, utilizando un vaso de precipitado de 50 mL en constante agitación en una parrilla con agitador magnético.

PPM	μL stock de quercetina	μL de MeOH HPLC	AlCl_2 al 2% mL
1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1
50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

Curva patrón:

4. A partir de la siguiente tabla, se preparan la curva patrón:

Problema:

5. Para preparar el tubo problema, utilizando una micropipeta de 100-1000 μL se coloca 1 mL del stock del problema y se le adiciona 1 mL de AlCl_2 al 2%

Lectura de absorbancias:

6. Con una micropipeta de 20-200 μL se toman 200 μL de cada tubo, y se colocan por triplicado en una placa ELISA de 96 pozos (fondo plano), así como del problema, el blanco y el control negativo (metanol grado HPLC)
7. La placa debe ser cubierta por papel aluminio, déjandola reaccionar a temperatura ambiente por 10 minutos
8. Una vez transcurridos los 10 minutos se coloca en un lector de ELISA y se lee a una absorbancia de 450 nm

Apéndice 12: Capacidad Antioxidante por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

Fundamento:

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración, de violeta oscura a amarillos, de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (ppm), por medio de espectrometría UV-VIS (Okusa *et al.*, 2007).

Reactivos:

- Solución DPPH (100 mL): pesar 4 mg de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), verter en un matraz aforado de 100 mL, aforar a 100 mL con Metanol grado HPLC.
- Solución Stock 1: tomar 3 mg de quercetina y disolver 3 mL de metanol grado HPLC.

Procedimiento:

Muestra

1. Triturar muestra fresca con 3 mL Metanol HPLC.
2. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min.
3. Preparar serie de tubos de acuerdo al
4. Lavar 1 placa de ELISA con un hisopo y alcohol etílico al 96% cada pozo.
5. Añadir 50 µL de cada tubo tres veces en 3 pocitos.
6. Añadir 150 µL de solución DPPH a cada uno de los pozos con los 50 µL de la serie de tubos, completando un volumen final de 200 µL
7. Añadir 200 µL de Metanol en 3 pozos como control negativo y 200 µL de DPPH en otros 3 como control positivo
8. Medir la absorbancia en lector de ELISA a 515 nm.
9. Determinar el porcentaje de reducción (capacidad antioxidante) se aplicando la siguiente ecuación:

$$\underline{\% \text{ de reducción} = (C-E/C) \times 100}$$

Dónde:

C= Absorbancia del control positivo

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema)

Curva:

1. Hacer solución stock 1 de ácido ascórbico, para lograr las concentraciones de 1-100 ppm de acuerdo a la tabla 1.
2. Preparar solución Stock 2, tomando 10, 20,30 y 40 μL para lograr las ppm 1, 2, 3 y 4 respectivamente y completar a 1 mL con Metanol de acuerdo Al cuadro 3.3
3. Lavar 1 placa de ELISA con un hisopo y alcohol etílico al 96% cada pozo.
4. Añadir 50 μL de cada tubo tres veces por tubo en 3 pocitos.
5. Añadir 150 μL de solución DPPH a cada uno de los pozos con los 50 μL de la serie de tubos, completando un volumen final de 200 μL
6. Añadir 200 μL de Metanol en 3 pozos como control negativo y 200 μL de DPPH en otros 3 como control positivo
7. Medir la absorbancia en lector de ELISA a 515 nm.
8. Determinar el porcentaje de reducción (capacidad antioxidante) se aplicando la siguiente ecuación: **% de reducción= (C-E/C) x 100**

Referencias

- Amaya, R., y Portillo, K. 2013. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el Ingenio Chaparrastique por el método de Espectrofotometría Ultravioleta-Visible. Universidad de el Salvador. Tesis de Licenciatura. San Salvador.
- Argueta, L. y Ramos, G. 2013. Contenido de proteínas, lípidos, calcio y fósforo en larvas del escarabajo molinero (*Tenebrio molitor*) alimentadas en diferentes sustratos y fuentes de agua; para ser utilizados como alimento para animales. Tesis de Licenciatura., Universidad de San Salvador. 1-57.
 - Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1): 248-254.
 - Brues, C., y Melander, A. L. 1932. Order Homoptera in Classification of insects a key to the known families of insects and other terrestrial Arthropods. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*. Cambridge, Mass 73: 1-672.
 - Canales, A. O. 2017. Estudio preliminar de la actividad cicatrizante del aceite esencial de *Bursera schlechtendalii* ENGLER. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 92.
 - Chevrolat, A. 1878. Diagnoses de diapérides nouveaux. *Petites nouvelles entomologiques*. 2. 209-210
 - Cifuentes-Ruiz, P. y Zaragoza-Caballero, S. 2014. Biodiversidad de Tenebrionidae (Insecta: Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85:325-331.
 - Condamine, F., Soldati, F., Jean, R. y Kergoat, G., 2011. New insights on systematics and phylogenetics of Mediterranean Blaps species (Coleoptera: Tenebrionidae: Blaptini), assessed through morphology and dense taxon sampling. *Systematic Entomology*. 36: 340–361.
 - Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 565-582.
 - Crespo, R., M. Villaverde, L., Girotti, J., Güerci, A., Juárez, M. y Bravo, M. 2011. Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cell. *Journal of Ethnopharmacology*. 136: 204-209.

- Cupul-Magaña, F. 2010. Sobre el caso de *Ulomoides dermestoides* en la coleopterapia. Notas científicas. Universidad de Guadalajara. México.
- Davis, M. T., y Lee, T. D. 1998. Rapid protein identification using a microscale electrospray LC/MS system on an ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 9(3): 194–201.
- Deloya, C., Ponce, J., Reyes, P. y Aguirre, G. 2016. Escarabajos del estado de Michoacán (Coleoptera Scarabaeoidea). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 1-19.
- Deloya-Brito, G. y Deloya, C. 2014. Sustancias producidas por el coleóptero *Ulomoides dermestoides*: efecto antiinflamatorio y citotóxico. *Acta Zoológica Mexicana*. 30(3):655-661.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica, Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Limusa. México. 134-189.
- Fito, C.M. 2003. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 68-79.
- Galeano, J., Jiménez, U., Martínez, A., Mesa, M., y Valencia G., 2008. Manual de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. Medellín. 96.
- González, M. S., y Peñalosa, C. I. 2000. Biomoléculas (Métodos de Análisis). Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Edo. De México. 256.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. Edible insects Future prospects for food and feed security. FAO. Roma. 1-55.
- Ferry, J. y Larson, R. 1991. A Mixed Solvent for Rapid TLC Analysis of Phenolic Compounds. *Journal of Chromatographic Science*. (29):476-477.
- Kanehisa, K. 1977. Comparative study of the abdominal defensive systems in tenebrionid beetles. *Applied Entomology and Zoology* 12: 225-235.
- Marrero, D. 2006. Obtención y determinación de ácidos grasos de muy elevada masa molecular. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. (37):1. 1-12.

- Martínez, A., Amparo, G., Jiménez, N., Mesa, M., y Galeano, E., 2008. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 12-13
- Martínez, E. K. S. 2009. Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth.. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Escuela Superior de Medicina. IPN. México. 52.
- Mendoza D., y Maury, C.F, 2013. Antioxidant capacity of whole-body methanolic extracts of the beetle *Ulomoides dermestoides*. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. 25:135-141.
- Misra, A., Agarwal, S., Kumar, S. y Rajpur, R. 1998. Thin Layer chromatographic separation and identification of some phenols on calcium phosphate. Indian Journal of Chemical Technology. (5):383-386.
- Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., y Duez, P. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). Journal of Ethnopharmacology. 112, 476-481.
- Pizarro–Araya, J. y Flores, G. E. 2004. Two new species of *Gyriosomus* Guérin–Méneville from Chilean coastal desert (Coleoptera: Tenebrionidae: Nycteliini). Journal of the New York Entomological Society, 112: 121–126.
- Reyes, L.A. y Ramos, M.G.A. 2013. Contenido de Proteína, Grasa, Calcio, Fósforo en larvas de Escarabajo molinero (Coleoptera: Tenebrionidae: *T. molitor*) alimentadas con diferentes sustratos y fuentes de agua; para ser utilizadas como alimento de animals silvestres. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador. 65.
- Rodríguez-Palma, E., Betzabeth, C., Pérez-Torres, A., Aragón-García, A., Cuate, V., Cinco, J., Ibarra, C. y Juárez, D. 2014. Ciclo de vida de *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae) en condiciones controladas de temperatura y humedad. Entomología Mexicana. 1: 431 – 435.
- Saint-Remy, S. 2017. Propiedades biológicas de *Ulomoides dermestoides* (Gorgojo chino). Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.México. 95.

- Santos, V.C., Lunardelli, A., Caberlon, E., Bastos, A.M., Nunes, B.F., Pires, S.G., Biolci, V., Paul, L.E., Viera, C.B., Aquino, C.R, Corseuil, E., y Olivera, R.J.2010. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. *Inflammation*. 33:3 173-179.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 299:152-178.
- Sugumaran, M., y Nellaiappan, K. 1990. On the latency and nature of phenoloxidase present in the left colleterial gland of the cockroach *Periplaneta americana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 15: 165-181
- Sutton, P. A., Wilde, M. J., Martin, S. J., Cvačka, J., Vrkoslav, V., y Rowland, S. J. 2013. Studies of long chain lipids in insects by high temperature gas chromatography and high temperature gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*.1297: 236–240
- Torres, D., Cortés,C. y Ayala, A. 2016. Identificación de carbohidratos y lípidos y cuantificación de ácidos grasos de la larva de *Ancognatha ustulata* (Coleoptera: Melolonthidae). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. 56:257-264.
- Valdez, C. y Ontiveros, G. 2010. Extracción y caracterización del aceite de las larvas de *Tenebrio molitor*. *Revista de la Sociedad Química*. 76(4): 278- 282.
- Villaverde,M., Girotti, J., Mijailovsky,S., Pedrini, N., y Juárez, M. 2009. Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the beetle *Ulomoides dermestoides*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 154 381–386.
- Yang, W., Adamec, J., Regnier, F. 2007. Enhancement of the LC/MS analysis of fatty Acids through derivatization and Stable Isotope Coding. *Analytical Chemistry*. 79.5150-5157
- Yi, L. 2015. A Study on the potential of insect protein and lipid as a food source. Tesis de Doctorado. Wageningen University. Wageningen, NL. 190.

Referencias electrónicas

- FAO. Proteínas y requisitos nutricionales [Recuperado el 14 de noviembre de 2017 en]: <http://www.fao.org/nutrition/requisitos-nutricionales/proteins/es/>
- Universidad COMPLUTENSE de Madrid

[Recuperado el 1 de mayo de 2018 en]:

<https://www.ucm.es/tecnicasgeologicas/cromatografia-de-gases-masas-gc-ms>

- Castelli, H. 2005. Descripción y Cría: *Palembus Ulomoides dermestoides*. [Recuperado el 1 de mayo de 2018 en]: www.lapureza.com.ar/gorgojos
- Carbajal A. 2013. Manual de Nutrición y Dietética. Universidad Complutense de Madrid. [Recuperado el 16 de abril de 2018 en]: <https://www.ucm.es/nutricioncarbajal/manual-de-nutricion>
- PubChem®. [Recuperado el 20 de noviembre de 2017 en]: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>