



Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotecnológicas**

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

**Determinación y comparación del perfil aminoacídico de harina de larva de
Hermetia illucens y *Tenebrio molitor* como sustratos proteicos para la
alimentación animal, mediante la técnica de RP-HPLC**

Tesis presentada por:

Reategui Rios, Grazia Valeria

ORCID: 0009-0005-8221-1614

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor (a):

Dr. Jimenez Pacheco, Hugo Guillermo

ORCID: 0009-0001-5177-1126

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 08 de Marzo del 2026

Dictamen: 010674-C-EPIB-2026

Visto el borrador del expediente 010674, presentado por:

2017202242 - REATEGUI RIOS GRAZIA VALERIA

Titulado:

**DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DEL PERFIL AMINOACÍDICO DE HARINA DE LARVA DE
HERMETIA ILLUCENS Y TENEBRIO MOLITOR COMO SUSTRATOS PROTEICOS PARA LA
ALIMENTACIÓN ANIMAL, MEDIANTE LA TÉCNICA DE RP-HPLC**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO
DICTAMINADOR**



**44810251 - TERAN HILARES RULY
DICTAMINADOR**



**47604629 - TEJADA MEZA KEVIN
DICTAMINADOR**



Determinación y comparación del perfil aminoacídico de harina de larva de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* como sustratos proteicos para la alimentación animal, mediante la técnica de RP-HPLC

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

10%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to University of Warwick Trabajo del estudiante	<1 %
2	www.ijlpr.com Fuente de Internet	<1 %
3	cris.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
4	rua.ua.es Fuente de Internet	<1 %
5	aquahoy.com Fuente de Internet	<1 %
6	en.engormix.com Fuente de Internet	<1 %
7	rinacional.tecnm.mx Fuente de Internet	<1 %
8	wasblobstorage.blob.core.windows.net Fuente de Internet	<1 %

Dedicatoria

A Dios y a todos aquellos que creyeron en mí y me acompañaron en este proceso: a mis padres, mis abuelos, mi familia, mi enamorado y mis amigos.

A mi yo del pasado, que alguna vez dudó de su potencial, gracias por no rendirse y seguir adelante. Al final, sí lo logramos.

Y a mi yo del futuro, para que cuando el camino vuelva a parecer incierto, recuerde que con constancia, perseverancia, valentía y esfuerzo se puede escalar cualquier cima.



Agradecimientos

Agradezco ante todo a Dios, porque sin Él nada de esto habría sido posible. Gracias por guiarme y brindarme las oportunidades que me han traído hasta este momento.

A mis padres, Bertha y Juan, por haberme guiado y amado incondicionalmente desde que llegué a este mundo. Gracias, mamá y papá, por todo el esfuerzo y sacrificio que hicieron para que pueda cumplir mis sueños, por haberme inculcado el amor a la ciencia desde pequeña, y haber sido mi guía constante durante todas las etapas de mi vida. Gracias, por haberme enseñado a seguir el camino correcto, y por siempre darme el empujoncito y la fortaleza necesario para poder continuar cuando las dudas aparecían y el camino se hacía difícil. Gracias por creer en mí incluso cuando yo misma no estaba segura, y por enseñarme, con su ejemplo, que la constancia, la perseverancia y la honradez siempre valen la pena.

A mis tatas, Roberto y Maruja, gracias por su ternura, paciencia e infinito amor; por guiarme, amarme, engreírme y acompañarme de la manera más hermosa en la que unos abuelos pueden amar a su nieta. Gracias por llenar mi vida de cariño, sabiduría y recuerdos que atesoraré por siempre.

A toda mi familia, por siempre estar ahí para mí, en las buenas y en las malas, por su apoyo constante, sus palabras de aliento y su compañía. Podría enumerarlos a cada uno, pero eso solo haría que estas páginas sean más largas que el mismo desarrollo de la tesis, quiero expresarles que los aprecio y agradezco infinitamente.

A mi enamorado, Aarón, por creer en mí y acompañarme durante este proceso, por motivarme a ser una mejor persona, por aliviar las tensiones de mis hombros y demostrarme que, incluso en los momentos más exigentes, siempre hay calma, apoyo y amor cuando se camina con la persona correcta.

Agradezco también al doctor Hugo Jiménez y a todo el equipo del instituto INNOVERGY, especialmente a Stephanie y Naysha, por la confianza y paciencia depositadas en mí para poder concluir exitosamente esta tesis, así como su guía y asesoramiento durante todo este proceso.

Finalmente, quiero agradecer a todos los amigos que hice durante este recorrido. Tanto a mis amigos de la carrera y la facultad, como los amigos que conocí en el elenco de teatro, gracias por acompañarme en esta etapa tan importante de mi vida, por las anécdotas, las risas, los abrazos, los viajes, los consejos, por los buenos momentos que me regalaron y por hacer que los momentos difíciles fueran más llevaderos.

RESUMEN

La creciente demanda de fuentes proteicas sostenibles para la alimentación de animales de producción ha impulsado el estudio de determinadas especies de insectos como alternativas a las tradicionalmente usadas harinas de soya y de pescado. Dos de las especies de insecto más estudiadas son la mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) y el gusano amarillo de la harina (*Tenebrio molitor*), cuyas larvas pueden ser procesadas con el fin de preparar harina rica en proteínas. El objetivo de este estudio fue determinar y comparar el perfil aminoacídico de las harinas de larva de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* como sustratos proteicos en la alimentación animal, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Para esto, se recolectaron larvas de diferentes tamaños (pequeña, mediana, grande) de ambas especies, las cuales fueron procesadas para convertirlas en harina, sometidas a hidrólisis ácida y derivatizadas con el reactivo PITC (fenolisotiocianato) para poder ser leídas en el equipo de RP-HPLC. La metodología utilizada fue previamente validada calculando la linealidad, eficiencia, precisión y límites de detección y cuantificación. Así mismo, los resultados fueron analizados mediante el método de ANOVA para poder establecer la validez de estos. Los datos obtenidos (en g/100g de materia seca (MS)), permitieron identificar y cuantificar 16 aminoácidos, demostrando que ambas harinas presentan un perfil rico en aminoácidos, si bien con algunas diferencias en la concentración de estos: *Hermetia illucens* demostró ser más abundante en fenilalanina (15,504 g/100g MS), lisina (2,286 g/100g MS) y arginina (1,705g/100g MS); mientras que *Tenebrio molitor* presentó concentraciones superiores de metionina (15,281 g/100g MS), tirosina (1,672 g/100g MS) e isoleucina (1,608 g/100g MS). Los resultados obtenidos respaldan el potencial de ambas harinas de insecto como sustratos sostenibles en la formulación de dietas para animales de producción y su inclusión contribuiría a diversificar las fuentes proteicas, favoreciendo la sustitución de los insumos convencionales, como la harina de soya y de pescado, disminuyendo el impacto económico y ambiental que la fabricación de estos conlleva. Se pudo concluir que la utilización de las larvas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* se alinea con los principios de economía circular, logrando transformar residuos o biomasa de bajo valor en proteína de alta calidad, conllevando un impacto positivo en la sostenibilidad agraria.

Palabras claves:

Hermetia illucens, *Tenebrio molitor*, perfil aminoacídico

ABSTRACT

The growing demand for sustainable protein sources for animal feed has driven the study of certain insect species as alternatives to the traditionally used soybean and fish meals. Two of the most studied insect species are the black soldier fly (*Hermetia illucens*) and the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*), whose larvae can be processed in order to prepare protein-rich meal. The objective of this study was to determine and compare the amino acid profile of *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* larval meals as protein substrates in animal feed, using the technique of reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). In order to achieve this, larvae of different sizes (small, medium, large) from both species were collected, processed into flour, subjected to acid hydrolysis, and derivatized with the PITC reagent (phenylisothiocyanate) to be read in the RP-HPLC equipment. The methodology used was previously validated by calculating linearity, efficiency, precision, and limits of detection and quantification. Likewise, the results were analyzed using the ANOVA method in order to establish their validity. The data obtained (expressed in g/100g of dry matter) allowed the identification and quantification 16 amino acids, demonstrating that both flours have a rich amino acid profile, although with some differences in their concentrations: *Hermetia illucens* was found to be more abundant in phenylalanine (15.504 g/100g DM), lysine (2.286 g/100g DM), and arginine (1.705 g/100g DM); while *Tenebrio molitor* showed higher concentrations of methionine (15.281 g/100g DM), tyrosine (1.672 g/100g DM), and isoleucine (1.608 g/100g DM). The results support the potential of both insect meals as sustainable substrates in the formulation of diets for livestock production. Their inclusion would contribute to diversify the available protein sources, favoring the replacement of conventional substrates such as soybean and fish meal, while reducing the economic and environmental impact associated with their production. It was concluded that the use of *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* larvae aligns with the principles of circular economy, by transforming low-value residues or biomass into high-quality protein, thus generating a positive impact on agricultural sustainability.

Key words:

Hermetia illucens, *Tenebrio molitor*, amino acid profile

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	2
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
VARIABLES E INDICADORES	3
CAPITULO I.....	4
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Insectos como fuente proteica alternativa	5
1.1.1. Panorama del uso de insectos en la alimentación animal	5
1.1.2. Ventajas nutricionales y ambientales	6
1.1.3. Insectos aprobados y en estudio para alimentación animal	8
1.2. Características biológicas de las especies de estudio.....	10
1.2.1. Hermetia illucens	10
1.2.1.1. Ciclo biológico.....	11
1.2.1.2. Composición general de la larva	12
1.2.2. Tenebrio molitor	12
1.2.2.1. Ciclo biológico.....	13
1.2.2.2. Composición general de la larva	14
1.3. Elaboración de harina de insecto.....	15
1.3.1. Procesamiento de larvas para obtención de harina	15
1.3.1.1. Métodos aplicados en el procesamiento	16
1.3.1.2. Consideraciones para conservar perfil de aminoácidos	17
1.3.2. Comparación general entre harinas de H. illucens y T. molitor	19
1.4. Aminoácidos y su relevancia en la nutrición animal	20
1.4.1. Aminoácidos esenciales y no esenciales	21
1.4.2. Requisitos aminoacídicos en animales productivos.....	22
1.4.3. Aporte de las harinas de insectos al perfil aminoacídico deseado	23
1.5. Técnicas analíticas para determinación de aminoácidos.....	24
1.5.1. Métodos clásicos vs. Cromatográficos	24
1.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	25
1.5.2.1. Fundamentos del método HPLC y RP-HPLC	27
1.5.2.2. Detección de aminoácidos mediante HPLC	29
1.5.2.3. Parámetros críticos para cuantificación	30
CAPITULO II.....	32

2.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1.	Lugar de ejecución	33
2.2.	Materiales	33
2.2.1.	Material Biológico	33
2.2.2.	Insumos y reactivos	33
2.2.3.	Aparatos y Equipos	34
2.3.	Métodos	35
2.3.1.	Validación de la metodología de cuantificación de aminoácidos	35
2.3.1.1.	Linealidad.....	35
2.3.1.2.	Eficiencia	35
2.3.1.3.	Precisión	35
2.3.1.4.	Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	36
2.3.2.	Caracterización y determinación de la composición aminoacídica de la harina ... de larvas de <i>Hermetia illucens</i> y <i>Tenebrio molitor</i>	36
2.3.2.1.	Recolección de las larvas.....	36
2.3.2.2.	Preparación de las muestras de harina de larva	37
2.3.2.3.	Hidrólisis de las muestras	37
2.3.2.4.	Proceso de derivatización	38
2.3.2.5.	Procedimiento cromatográfico	38
2.3.2.6.	Cálculo de la concentración final de los aminoácidos	39
2.3.3.	Comparación la composición aminoacídica de harina de larva de <i>Hermetia illucens</i> y harina de larva de <i>Tenebrio molitor</i>	40
2.4.	Diagrama de Flujo de actividades	42
	CAPITULO III	43
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1.	Validación de la metodología RP-HPLC	44
3.1.1.	Método de linealidad y eficiencia	44
3.1.2.	Precisión y reproductividad	55
3.1.3.	Identificación de los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ)	56
3.2.	Perfil aminoacídico por especie y tamaño larval.....	57
3.2.1.	Resultados de composición aminoacídica en <i>Hermetia illucens</i>	57
3.2.2.	Resultados de composición aminoacídica en <i>Tenebrio molitor</i>	60
3.3.	Evaluación de especies en el perfil aminoacídico	62
3.3.1.	Efecto del tamaño larval en la concentración de aminoácidos.....	62
3.3.2.	Comparación global entre especies.....	63
3.4.	Discusión crítica de los resultados	70
3.4.1.	Influencia de la especie y del tamaño larval en la concentración de aminoácidos.....	70
3.4.2.	Concentración de aminoácidos.....	71
3.5.	Fortalezas y limitaciones	73
3.6.	Propuesta de aplicación del resultado	74
4.	CONCLUSIONES	76
5.	RECOMENDACIONES	78



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de variables	3
Tabla 2. Principales insectos utilizados en la alimentación animal, características nutricionales principales y regulación	8
Tabla 3. Comparación de perfiles nutricionales de harinas de larva de <i>Hermetia illucens</i> y <i>Tenebrio molitor</i>	19
Tabla 4. Funciones de los aminoácidos en la nutrición y el metabolismo animal	21
Tabla 5. Aminoácidos esenciales y no esenciales	22
Tabla 6. Ventajas y limitaciones de la técnica de HPLC	26
Tabla 7. Gradiente de elución de RP-HPLC	39
Tabla 8. Pesos moleculares de los aminoácidos	40
Tabla 9. Tiempo de retención de aminoácidos	46
Tabla 10. Validación del método RP-HPLC	46
Tabla 11. Desviación estándar relativa (%RSD) de las réplicas a 30 $\mu\text{mol/mL}$	55
Tabla 12. Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ) para Aminoácidos Esenciales determinados por RP-HPLC	56
Tabla 13. Concentración de aminoácidos (g/100g MS) en larvas de <i>Hermetia illucens</i> de diferente tamaño	58
Tabla 14. Concentración de aminoácidos (g/100g MS) en larvas de <i>Tenebrio molitor</i> de diferente tamaño	61
Tabla 15. Análisis de varianza para el efecto de tamaño larval sobre la concentración de aminoácidos	63
Tabla 16. Comparativa del perfil aminoacídico (g/100g MS) según especie y tamaño larval	64
Tabla 17. Comparación de la concentración aminoácidos esenciales (g/100g MS) en la harina de larva de <i>Hermetia illucens</i>	66
Tabla 18. Comparación de la concentración aminoácidos esenciales (g/100g MS) en la harina de larva de <i>Tenebrio molitor</i>	67
Tabla 20. Análisis de varianza para el efecto de la especie sobre la concentración de aminoácidos	69
Tabla 21. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para la verificación del supuesto de normalidad en el análisis del efecto del tamaño larval	108
Tabla 22. Resultados de la prueba de Levene para la verificación del supuesto de homocedasticidad en el análisis del efecto del tamaño larval	109
Tabla 23. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para la verificación del supuesto de normalidad en el análisis de la especie	110
Tabla 24. Resultados de la prueba de Levene para la verificación del supuesto de homocedasticidad en el análisis del efecto de la especie	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de la <i>Hermetia illucens</i>	12
Figura 2. Ciclo biológico del <i>Tenebrio molitor</i>	14
Figura 3. Ejemplo de un Cromatograma de HPLC. Cada pico corresponde a un compuesto diferente identificado en la muestra.	26
Figura 4. Diagrama básico de un equipo HPLC	28
Figura 5. Flujograma de actividades	42
Figura 6. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 10 µl del estándar de referencia.....	44
Figura 7. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 60 µl del estándar de referencia.....	45
Figura 8. Curva de calibración Arginina	49
Figura 9. Curva de calibración Histidina.....	50
Figura 10. Curva de calibración Treonina.....	51
Figura 11. Curva de Calibración Valina	51
Figura 12. Curva de Calibración Metionina.....	52
Figura 13. Curva de calibración de Isoleucina	53
Figura 14. Curva de Calibración de Leucina	53
Figura 15. Curva de Calibración de Fenilalanina	54
Figura 16, Curva de calibración de Lisina.....	54
Figura 17. Concentración de aminoácidos esenciales por tamaño de <i>Hermetia illucens</i> ..	59
Figura 18. Concentración de aminoácidos esenciales por tamaño larval en <i>Tenebrio molitor</i>	62
Figura 19. Comparativa de los promedios de concentración aminoacídica (g/100g MS) de <i>H. illucens</i> y <i>T. molitor</i>	68
Figura 20. Cromatograma de muestra de larva de <i>Hermetia illucens</i> de 6,5 – 9,5 mm ..	70
Figura 21. Sistema de RP-HPLC	90
Figura 22. Estándares de aminoácidos derivatizados y envasados en los viales, listos para ser leídos por el equipo de RP-HPLC	90
Figura 23. Larvas descongeladas de <i>Tenebrio molitor</i> y <i>Hermetia illucens</i>	91
Figura 24. Larvas descongeladas de <i>Hermetia illucens</i> siendo preparadas para ser desecadas	91
Figura 25. Larvas desecadas de <i>Hermetia illucens</i>	92
Figura 26. Separación de larvas de <i>Hermetia illucens</i>	92
Figura 27. Molienda de larvas de <i>Hermetia illucens</i>	93
Figura 28. Separación de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	93
Figura 29. Ebullición de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	94
Figura 30. Proceso de estrujado de larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	94
Figura 31. Muestras obtenidas de las larvas de <i>Tenebrio molitor</i> desgrasadas, antes del proceso de desecado	95
Figura 32. Muestras de <i>Tenebrio molitor</i> tras el proceso de desecado	95
Figura 33. Harinas de larva de <i>Hermetia illucens</i> y <i>Tenebrio molitor</i> obtenidas	96
Figura 34. Comparación detallada de harinas de <i>Hermetia illucens</i> y <i>Tenebrio molitor</i> ..	96

Figura 35. Pesado de las muestras de harina para el proceso de hidrólisis	97
Figura 36. Proceso de burbujeado de las muestras con una corriente de Nitrógeno.....	97
Figura 37. Muestras antes del proceso de hidrólisis (izquierda), y después del proceso de hidrólisis a 110°C durante 24 horas (derecha)	98
Figura 38. Proceso de derivatización de las muestras filtradas	98
Figura 39. Sistema de secado al vacío para la derivatización de las muestras	99
Figura 40. Muestras derivatizadas, envasadas en viales para su lectura en RP-HPLC ..	99
Figura 41. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 10 µl del estándar de referencia (Repetición).....	100
Figura 42. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 20 µl del estándar de referencia.....	101
Figura 43. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 20 µl del estándar de referencia (Repetición).....	102
Figura 44. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 30 µl del estándar de referencia.....	103
Figura 45. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 30 µl del estándar de referencia (Repetición).....	104
Figura 46. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 40 µl del estándar de referencia.....	105
Figura 47. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 40 µl del estándar de referencia (Repetición).....	106
Figura 48. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 60 µl del estándar de referencia (Repetición).....	107

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 01: SECUENCIA FOTOGRÁFICA.....	90
ANEXO 02: CROMATOGRAMAS	100
ANEXO 03: VERIFICACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	108



INTRODUCCIÓN

En base al crecimiento demográfico actual, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que para el año 2050, la producción de alimento deberá incrementarse hasta un 70% sobre el nivel actual (1). Para poder enfrentar la problemática ambiental y económica que este incremento de producción conllevará, será necesario buscar alimentos alternativos, capaces de satisfacer las necesidades alimenticias de la población sin causar impactos significativos en el medio ambiente y con capacidad para acoplarse en los modelos económicos ya existentes.

Actualmente, las harinas de soya y pescado son los principales ingredientes utilizados en la formulación de la mayoría de las dietas para animales de producción. Sin embargo, el aprovechamiento desmedido de estos ingredientes empieza a generar graves problemas ambientales. En el caso de la soya, el cultivo esta legumbre destina millones de hectáreas de terreno, conllevando un alto consumo de agua y utilizando fertilizantes y pesticidas que pueden provocar un importante deterioro ambiental (2,3). Con respecto a la harina de pescado, este recurso es dependiente de la pesca, por lo que su producción es variable y regulada por diversas leyes y decretos que, en algunas ocasiones, limitan que la demanda se vea completamente satisfecha, por lo cual, en algunos países surgen productores artesanales que se dedican a la pesca ilegal de este recurso para su conversión en harina, sin respetar los límites máximos de captura permitidos y trayendo como consecuencia un grave daño al ecosistema marino (4,5).

A fin de poder solucionar todas estas problemáticas y expectativas, se han identificado a los insectos como una potencial fuente de materias primas sostenibles para la alimentación animal; debido a que son capaces de cubrir los requerimientos dietéticos de los animales y poseen la capacidad de convertir residuos orgánicos en productos proteicos (6). Diversas especies de insectos han sido evaluadas para su implementación dentro de dietas animales, siendo las más prometedoras la mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*), el gusano amarillo de la harina (*Tenebrio molitor*), la mosca común (*Musca domestica*) y el grillo doméstico (*Acheta domesticus*).

A pesar de estas ventajas, muchas de las propiedades nutricionales de los insectos aún no han sido estudiadas a fondo, por ello; es necesario realizar trabajos de investigación donde se establezcan, recopilen y comparen estas características, las cuales permitirán que los insectos sean valorados como fuentes de alimentación proteica en animales de producción, y ayudarán a lograr la aceptación de estos insectos como sustratos por parte de las empresas, organismos

reguladores y usuarios en general (7). Es por ello que el presente estudio se enfoca en dos de las especies más atractivas para la industria: la mosca soldado-negra (*Hermetia illucens*) y el gusano amarillo de la harina (*Tenebrio molitor*).

Se sabe que el contenido de proteínas en larvas de *H. illucens* y *T. molitor* es comparable a las ya mencionadas, harina de pescado y soya. Las larvas de *Hermetia illucens* poseen hasta un 47% de proteína bruta, y han sido ampliamente reconocidas por su capacidad de manejo ambiental, pues este insecto resulta útil para reducir los desechos orgánicos y eliminar la presencia de otras plagas indeseables en las granjas (8). Por su parte, el *Tenebrio molitor* destaca por su alto contenido proteico y de ácidos grasos; así como su facilidad de reproducción y cría, lo que ha causado que sus larvas enteras sean producidas para ser utilizadas como alimento de mascotas, animales de zoológico e incluso peces y aves de corral (9). Adicionalmente, ambos insectos poseen la capacidad de convertir los desechos orgánicos en nutrientes: como proteínas, grasas y fibra; lo cual contribuye a reducir la carga ambiental y el potencial de contaminación que surge de la acumulación de desechos de la agricultura y ganadería (10).

Sin embargo, los reportes en cuanto a perfil de aminoácidos en ambos insectos aún son escasos, lo que limita la formulación de dietas adecuadas en base a estos, que puedan adaptarse a los requerimientos de las diferentes especies de animales. Es también necesario contar con una comparación directa, cuantitativa y cualitativa que permita impulsar el uso de estas especies en la elaboración de alimento, tanto a nivel artesanal como industrial; a fin de potenciar el creciente mercado de proteína de insectos y facilitar las legislaciones que algunos países van adoptando para permitir su consumo (11).

Por lo que el presente estudio tiene por objetivo determinar experimentalmente el perfil de aminoácidos esenciales de *H. illucens* y *T. molitor* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (RP-HPLC), a fin de realizar una comparación en su valor nutricional y su aplicabilidad en la formulación de dietas animales sostenibles.

HIPÓTESIS

Las especies *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* presentan perfiles aminoacídicos significativamente diferentes, lo cual influye en su aplicabilidad como sustratos proteicos en la alimentación animal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil aminoacídico de harina de larva de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* como sustratos proteicos para la alimentación animal, mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar la metodología de cuantificación de aminoácidos mediante la técnica RP-HPLC.
2. Determinar la composición aminoacídica de la harina de larvas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* mediante la técnica de RP-HPLC.
3. Comparar la composición aminoacídica de harina de larva de *Hermetia illucens* y harina de larva de *Tenebrio molitor*.

VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Cuadro de variables

Tipo de Variable	Variable	Indicador	Subindicador / Categoría
Independiente	Especie	Taxón	<i>Hermetia illucens</i> <i>Tenebrio molitor</i>
	Tamaño de larva	Longitud promedio (mm)	Pequeña: 6.5 - 9.5 mm Mediana: 9.50 - 12.50 mm Grande: 12.50 - 15.50 mm
	Etapas del ciclo biológico	Etapas de desarrollo	<i>T. molitor</i> : Estado larval <i>H. illucens</i> : Larva - 5
Dependiente	Perfil aminoacídico	Tipo de aminoácido identificado	Lisina, Metionina, Valina, otros.
		Concentración	g/100 g de materia seca



1. MARCO TEÓRICO

1.1. Insectos como fuente proteica alternativa

Históricamente, los insectos han sido consumidos por una gran variedad de culturas alrededor del mundo. Los primeros reportes de consumo de insectos datan del siglo VII a.c en el Oriente Medio. La FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas) estima que actualmente, se consumen cerca de 2000 especies diferentes de insectos en más de 140 países (12). Algunos de los tipos y familias de insectos mayormente consumidos son: los coleópteros (escarabajos), los lepidópteros (orugas), los himenópteros (avispa, abejas y hormigas), los ortópteros (saltamontes, grillos y langostas), los hemípteros (cigarras, chinches y cochinillas), los isópteros (termitas), los odonatos (libélulas) y los dípteros (moscas) (13).

La ONU estima que para el 2050 la población mundial supere los 9.8 billones (14), perspectiva que genera preocupación sobre la capacidad de los recursos agrícolas y ganaderos para alimentar a toda esta población. Ante esta preocupación, la sociedad se ve impulsada a desarrollar nuevas fuentes de alimentos para humanos y piensos para animales, que sean capaces de satisfacer las necesidades nutricionales y puedan obtenerse de manera sostenible, sin comprometer más los limitados recursos del planeta. Dentro de las nuevas alternativas alimentarias exploradas se encuentran los insectos, los hongos, la carne cultivada y las microalgas o macroalgas. Los insectos son uno de los grupos que más popularidad ha ganado en los últimos años, gracias a su valor nutricional, a los beneficios ambientales que presenta, a su capacidad de ser incluida en una economía circular, y a su flexibilidad para adaptarse tanto a la alimentación humana como a la alimentación animal (12).

1.1.1. Panorama del uso de insectos en la alimentación animal

La soja y la harina de pescado son las dos principales fuentes proteicas en la alimentación de los animales de ganado. Sin embargo, el aumento de los precios y los conflictos de sostenibilidad que presentan, son dos factores que impulsan la búsqueda de nuevas fuentes de alimentación proteica para alimentar a los animales de granja. Una de las principales alternativas para reemplazar a la soja y la harina de pescado son los insectos, dado que diversos estudios han demostrado que la harina de insectos puede tener valores proteicos similares a la harina de pescado y la de soja (10).

A pequeña escala la crianza de insectos para consumo animal se ve enfocada en la producción de cebos para pesca, presas para mascotas insectívoras o aplicaciones medicinales. Algunas especies empezaron a ser criadas en centros de acopio o investigación para atender la necesidad científica o académica, modelos que fueron escalando rápidamente hasta llegar a formar plantas a mediana o gran escala (15).

A fin de implementar alimentos hechos a base de insectos en la dieta animal, es necesario considerar las necesidades nutricionales del animal, así como la digestibilidad, palatabilidad e incluso la granulación. Actualmente, los piensos derivados de insectos ya han sido incluidos en muchos programas de alimentación animal, gracias a las alternativas sostenibles que presentan y al hecho de que los insectos forman parte de la dieta natural de algunos animales, hecho que facilitó su inclusión (16). Hoy en día, la industria de alimentos y piensos a base de insectos produce toneladas diariamente (15). Los principales productos derivados de insectos son la harina y los aceites, que son utilizados en la elaboración de piensos, sin embargo; debido a los altos costos de producción y a las bajas cantidades de demanda, las proteínas de insectos aún siguen manteniendo un costo alto, que no les permite competir con la harina de pescado o soja; se espera que este panorama pueda mejorar en los años próximos, gracias al aumento en la producción, disponibilidad, calidad, difusión y consistencia que estos productos están teniendo (16).

1.1.2. Ventajas nutricionales y ambientales

Uno de los principales beneficios de la producción de insectos es su capacidad para desarrollarse a partir de residuos agrícolas y orgánicos. Los insectos poseen la habilidad de bioconvertir materia orgánica residual en productos de valor agregado, lo que los convierte en una alternativa sostenible dentro de modelos de economía circular. Esta integración permite, entre otros beneficios, reducir los costos asociados a la gestión de residuos y disminuir la dependencia de recursos tradicionales, al aprovechar las proteínas y grasas obtenidas a partir de insectos como insumos en diversos sectores productivos (16).

Otro beneficio asociado a la cría de insectos es el aprovechamiento de sus excrementos y residuos (conocidos como frass) como fertilizante orgánico. No obstante, aunque algunos estudios indican que estos subproductos pueden favorecer el crecimiento de ciertos cultivos, existen reportes que advierten efectos retardantes y adversos cuando el

frass no ha sido adecuadamente tratado o cuando proviene de insectos alimentados con determinados sustratos. Por ello, es necesario profundizar en la investigación relacionada con las especies de insectos utilizadas, así como con el tipo de sustrato empleado en su alimentación, a fin de asegurar una aplicación segura y efectiva de estos residuos en la agricultura (12).

En relación con las características nutricionales de los insectos, se ha evidenciado que estas pueden variar significativamente según la etapa del ciclo biológico en la que se encuentre el organismo, así como en función del tipo de desarrollo que presenta la especie. En este sentido, existen diferencias nutricionales entre insectos holometábolos (aquellos con metamorfosis completa) y hemimetábolos (con metamorfosis incompleta), lo cual influye en la composición de sus tejidos y, por ende, en su valor como fuente alimenticia o proteica. De manera general, los insectos pueden llegar a tener un alto nivel de proteína, con un perfil aminoacídico capaz de satisfacer las necesidades humanas como animales. Esta proteína es altamente digerible, por lo tanto; los insectos pueden ser utilizados como fuente de proteína dietética, y si bien el perfil aminoacídico de los insectos suele ser bueno, en algunos casos algunos aminoácidos pueden encontrarse de manera limitada (17). Algunos estudios han demostrado que el valor nutricional de los insectos comestibles puede llegar a ser mayor que el de la carne de res, pollo o cerdo; teniendo también un índice de eficiencia proteica mayor (18).

Los lípidos continúan como el segundo nutriente más abundante, variando la composición de los ácidos grasos en base a la especie, etapa de vida, dieta y género del insecto. A pesar de que los carbohidratos se encuentran ausentes en el cuerpo de los insectos, estos cuentan con una alta cantidad de fibra, compuesta principalmente por quitina y proteínas esclerotizadas del exoesqueleto de los insectos; sin embargo, la presencia de la quitina disoluble en los insectos puede dificultar el considerarlos como fuente proteica (17,18).

La dieta de los insectos puede influir la composición de la mayoría de los nutrientes presentes en los mismos. La mayoría de los minerales (Calcio, hierro, zinc, potasio, fósforo, entre otros) se encuentran presentes en los insectos, en cantidades suficientes como para satisfacer las necesidades nutricionales de los animales, pudiendo ser incluso más altas en diferentes especies de insectos. Los contenidos de vitamina A y D son variables dependiendo de la dieta y radiación UV-B que el insecto reciba durante su

desarrollo. Las vitaminas E y B se encuentran en concentraciones adecuadas en la mayoría de las especies de insectos (17).

1.1.3. Insectos aprobados y en estudio para alimentación animal

En la Tabla 2 se enlistan las principales especies de insectos estudiadas para la elaboración de piensos, así como su nombre común, la etapa de desarrollo a la que generalmente son estudiados o utilizados, sus principales características nutricionales y la regulación existente para la especie.

Tabla 2. Principales insectos utilizados en la alimentación animal, características nutricionales principales y regulación

Especie	Etapa de desarrollo	Aporte nutricional principal	Situación regulatoria	Referencia
<i>Acheta domesticus</i> (Grillo doméstico)	Adulto	55–70 % proteína en base seca; lípidos insaturados; buen perfil de aminoácidos esenciales.	Autorizado en la UE para consumo humano y uso en piensos. Consumo tradicional en Asia.	(15,16,19,20)
<i>Tenebrio molitor</i> (Gusano amarillo de la harina)	Larva	45–60 % proteína; buena digestibilidad; bajo contenido de cenizas.	Aprobado en la UE para alimentación animal y humana.	(15,16,19,20)
<i>Gryllus bimaculatus</i> (Grillo de campo mediterráneo)	Adulto	Proteína elevada y presencia de lípidos insaturados.	Autorizado en Asia.	(16)
<i>Bombyx mori</i> (Gusano de la seda)	Larva, pupa	50-60% de proteína y grasa.	Uso extendido en Asia como subproducto de la sericultura.	(16,21)
<i>Musca domestica</i> (Mosca común)	Larva	Harina de larva presenta entre 40-55% de proteína.	En investigación, regulación limitada por el riesgo microbiológico.	(15,16,19)
<i>Lucilia sericata</i> (Mosca verde botella)	Larva	Contenido similar al de <i>Musca domestica</i> , con potencial en bioconversión.	No aprobada en la UE, uso limitado a investigación.	(16)
<i>Pachnoda marginata</i> (Escarabajo de las flores africano)	Larva	50-60% proteína.	Aprobado para alimentación animal en algunos países.	(16)
<i>Hermetia illucens</i> (Mosca soldado-negra)	Larva	Proteína 40–45 %; lípidos ricos en ácido láurico (10–20 %)	Usada y aprobada en la UE, Asia y América. Utilizado en piensos de peces, aves y porcinos.	(15,16,19,20)

<i>Zophobas morio</i> (Gusano gigante de la harina)	Larva	Altos niveles de proteína y lípidos	Uso experimental, sin aprobación.	(15,19)
<i>Gromphadorhina portentosa</i> (Cucaracha de Madagascar)	Adulta	Proteína 35–50 %; lípidos moderados.	Uso experimental.	(15,19)
<i>Allomyrina dichotoma</i> (Escarabajo rinoceronte japonés)	Larva	Larvas con 40–50 % proteína; contenido elevado de quitina.	Consumo tradicional en Asia, no regulado por la UE.	(18)
<i>Protaetia brevitarsis seulensis</i> (Escarabajo de flores de manchas blancas)	Larva	Larvas con 50–60 % proteína y ácidos grasos.	Uso en medicina tradicional y consumo humano en Asia, sin aprobación en la UE.	(18)

En cuanto a la regulación del uso de insectos en la alimentación animal, las exigencias regulatorias de cada país y las diferencias entre los mismos aún complican la comercialización y aceptación de productos derivados de insectos. La Unión Europea (UE) ya ha aprobado la inclusión de la harina de siete especies de insectos en modelos de alimentación para animales de producción, en el 2017 aprobó el uso de harina de insectos como alimento para peces, mientras que en el 2021 la aprobó para su inclusión en la alimentación de cerdos y aves de corral. Algunas de las especies permitidas para su uso en la alimentación de animales de acuicultura y mascotas son: *H. illucens*, *T.molitor*, *Musca domestica*, *Achaeta domesticus*, sin embargo; las rígidas legislaciones europeas respecto al sustrato con el cuál los insectos pueden ser alimentados suponen una barrera para el crecimiento de esta industria. En Estados Unidos, la regulación de los alimentos a base de insectos se encuentra a cargo de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), organismo que publicó un reglamento en el que se detallan los lineamientos para la utilización de insectos como piensos. Siguiendo estos lineamientos, algunos de los insectos que han sido aprobados son: *H. illucens*, tanto la larva entera seca como la harina de larva para su uso en salmónidos de acuicultura. En Canadá, la Agencia Canadiense de Inspección de alimentos aprobó el uso de *H. illucens* para la alimentación de pollos de engorde, salmónidos, patos, gansos y pavos. Las pupas de gusano de seda y larvas de *H. illucens* también son vendida como alimentos de mascota en Canadá (22,23).

La situación en Latinoamérica aún es emergente. En México, la legislación y normativa se encuentra especialmente detallada para las especies nativas: gusano del maguey

(*Aegiale hesperiaris*), escamoles (*Liometopum apiculatum*) y escarabajos de longicornios (*Cerambycidae*). En Brasil, los agricultores y las empresas han empezado a interesarse en la harina de *H. illucens* como reemplazo de la harina de soja, sin embargo; la legislación brasileña aún no contempla el uso de insectos como piensos en la alimentación animal, por lo que la utilización de la harina aún no puede ser usada a gran escala. En Argentina, ha empezado a surgir el interés de incorporar harina de grillos en la alimentación de animales de granja; por lo cual, se presentó una solicitud para reglamentarlo en el Código Alimentario Nacional, sin embargo; aún no se tienen datos de una respuesta al respecto (22).

La FAO indica que, gracias a su facilidad de producción comercial a gran escala y a que son capaces de satisfacer los requisitos dietéticos adecuados, las moscas soldado-negras y los gusanos amarillos de la harina son las especies de insecto más prometedoras para ser aplicadas en la alimentación animal (12).

1.2. Características biológicas de las especies de estudio

1.2.1. *Hermetia illucens*

La mosca soldado-negra (Black Soldier Fly o BSF, por sus siglas en inglés) *Hermetia illucens* es una especie de insecto perteneciente al orden Díptera, familia Stratiomyidae. Es una mosca holometábola (pasa por un proceso de metamorfosis completa), originaria de américa, pero capaz de adaptarse a climas tropicales y subtropicales alrededor de todo el mundo (24).

Gracias a la presencia de diversas enzimas digestivas en su intestino, las larvas de *Hermetia illucens* pueden alimentarse de una amplia gama de materiales orgánicos, que incluyen desde frutas y vegetales en descomposición hasta carne y excretas de ganado. Sin embargo, a pesar de su dieta, estas larvas no actúan como vectores de enfermedades; característica que la diferencia de otras especies similares. Estas cualidades han llevado a que los establos comiencen a criarlas como una alternativa biológica para el control de poblaciones de la mosca doméstica (*Musca domestica*) (25).

En la actualidad, sus larvas son consideradas como una alternativa para la alimentación de animales menores como aves de corral, cuyes, cerdos y truchas; gracias a los altos valores nutricionales que estas presentan: entre 37 a 63% de proteína y un contenido de 7 a 39% de grasa (26–28).

1.2.1.1. Ciclo biológico

El ciclo biológico de la *Hermetia illucens* (Hi) consta de cinco etapas: huevo, larva, prepupa, pupa e imago (adulto); con una duración total del ciclo biológico de entre 10 a 45 días, siendo capaz de extenderse o acortarse en base a las condiciones ambientales (temperatura y humedad) y de alimentación a la que se vea expuesta la mosca durante su período de crecimiento (29).

Los adultos de Hi presentan un parecido a las especies del género *Hymenoptera* (avispa), con una coloración oscura y alas de color negro o marrón. Las moscas adultas pueden llegar a medir 14.0 a 18.5 mm de longitud, solo viven entre 5 a 8 días. En condiciones esta etapa las moscas no ingieren ningún tipo de alimento, simplemente se abastecen de agua y las reservas de grasa acumuladas en la etapa larvaria; durante esta semana las moscas solo se aparearán, a fin de eclosionar la mayor cantidad de huevos, una hembra de *H. illucens* puede depositar alrededor de 600 huevos durante toda esta etapa (29,30).

Los huevos de Hi eclosionan aproximadamente 4 días después de la ovoposición. Suelen tener una longitud de entre 1,00 - 1,4 mm, con un diámetro de 0,4 -0,6 mm. La forma de estos es ovoide alargada, con una coloración que va de blanco lechoso a amarillento (29).

Las larvas de *H. illucens* presentan un color opaco y blanquecino, teniendo una forma alargada que puede medir entre 0,85 a 30 mm de largo; durante esta etapa las larvas pasan por cinco estadios larvarios (L1, L2, L3, L4 y L5), que suelen extenderse entre los 13 a 18 días. Durante la etapa de larva, estas se alimentan a su máxima capacidad y acumula grasa que le servirá durante la etapa adulta. La etapa de prepupa dura una semana, etapa en la que la larva empieza a perder motilidad y busca un espacio seco, protegido y alejado del sustrato para poder empupar. Finalmente, la etapa de pupa puede extenderse de 10 a 30 días, dependiendo de las condiciones ambientales y de alimentación durante las etapas anteriores (29,31).



Figura 1. Ciclo biológico de la *Hermetia illucens*
De izquierda a derecha: Larvas en estadio 5, pupa y mosca adulta.

1.2.1.2. Composición general de la larva

Los estudios realizados para determinar la composición nutricional de la especie *H. illucens* demuestran que la composición de esta varía durante todo su ciclo biológico, teniendo una mejor disponibilidad de proteínas, aminoácidos, grasas, vitaminas y minerales durante la etapa larvaria, razón por la cual se escoge esta etapa para la elaboración de la harina (32).

De manera general, los datos indican que las larvas pueden poseer entre 39.30 a 48.20% de proteína cruda, entre 25.6 a 38.36% de lípidos, entre 9.5 a 9.95% de fibra, valores entre 7.25 a 8.25% de cenizas, y un valor de 7.40 a 9.90% de humedad, estos valores pueden variar según el tipo de procesado al cual se sometan las larvas (33).

Si bien no hay muchos estudios enfocados en micronutrientes (vitaminas y minerales) presentes en las larvas de *Hermetia illucens*, algunos autores han podido determinar vitamina B1 (Tiamina), vitamina B2 (Riboflavina) y vitamina C (Ácido ascórbico). Los estudios también indican que el contenido de minerales suele aumentar en las últimas etapas larvarias y estado prepupal, si bien se ha podido detectar minerales como Calcio, Potasio, Fósforo, Sodio, Magnesio, Zinc, Hierro; en la mayoría de los casos los valores son muy bajos; lo que significaría que sería necesario suplementar estas vitaminas y minerales para poder utilizar las larvas como alimento (8,33).

1.2.2. *Tenebrio molitor*

El *Tenebrio molitor*, llamado comúnmente gusano amarillo de la harina o escarabajo de la harina, es una especie de escarabajo (orden Coleoptera, suborden Polyphaga,

familia Tenebrionidae), distribuido a nivel global y considerado una plaga de almacenamiento para alimentos como harina, cereales y granos. (34).

Son insectos omnívoros, capaces de alimentarse de plantas o productos provenientes de animales. Igualmente, este insecto posee la capacidad de reciclar nutrientes perdidos de los desechos orgánicos mediante la incorporación de ácidos grasos y aminoácidos residuales, por lo cual; también puede ser alimentado con desechos orgánicos provenientes de la agricultura o ganadería, volviéndolo una alternativa para su crianza dentro de economías circulares(35).

Sus larvas, poseen un alto valor nutricional, presentando un alto contenido de proteínas y grasas. Este insecto puede funcionar como una importante fuente de proteínas para animales o humanos, debido a su facilidad de crianza, alimentación y mantenimiento; así como el hecho de que pueden ser cosechadas en una etapa temprana de desarrollo y sus larvas pueden alcanzar un buen tamaño rápidamente (36).

1.2.2.1. Ciclo biológico

El *Tenebrio molitor* es un insecto holometábolo, lo que significa que pasa por un proceso de metamorfosis completa y su ciclo biológico posee cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulta. Al igual que otros insectos, su ciclo se ve afectado por las condiciones ambientales de su entorno, siendo especialmente afectados por la temperatura. La bibliografía indica que los *T. molitor* son capaces de completar exitosamente su desarrollo en todos los ciclos a una temperatura óptima entre 20 a 30°C. Si la temperatura supera los 30°C, las larvas dejan de crecer. De manera similar, la temperatura de su entorno afecta la duración del ciclo biológico de los tenebrios, siendo que la vida del *T. molitor* puede extenderse hasta 6.5 meses a una temperatura de 20°C, pero disminuir hasta 4.6 meses si la temperatura aumenta hasta 30°C (37).

En su estado adulto, son escarabajos color castaño-negruzco, de un tamaño aproximado de 1 cm, los escarabajos pueden sobrevivir entre 1 o 2 meses. Las hembras de *Tenebrio molitor* son capaces de poner entre 300 a 600 huevos durante toda su vida, los cuáles eclosionarán dentro de 3- 9 días (9).

Las larvas son de color amarillo, de forma cilíndrica y alargada, con pequeñas patas en su tórax, capaces de medir hasta 3.5cm aproximadamente. El estado larval se puede extender entre 1 a 3 meses. Durante esta etapa la alimentación es vital ya que los nutrientes y proteínas que reciba pueden afectar el tamaño y cualidades reproductivas de la edad adulta. Los *T. molitor*, son omnívoros por lo que pueden alimentarse de una diversa variedad de productos de origen animal o vegetal, sin embargo, para lograr unas óptimas condiciones de desarrollo, es recomendable que la dieta de las larvas esté compuesta por al menos un 20% de proteína (9,37).

Dependiendo de las condiciones ambientales y de alimentación, una vez que el *T. molitor* haya pasado por entre 13 a 20 mudas se convertirá en pupa, un estado de hibernación en el que se dará la metamorfosis que los convierta en adultos dentro de 10 – 28 días. En condiciones naturales, el ciclo biológico del tenebrio es anual, dándose el estado de pupa al finalizar el invierno para que el surgimiento de los imagos sea en primavera (34).



Figura 2. Ciclo biológico del *Tenebrio molitor*
De izquierda a derecha: larva, pupa y escarabajo

1.2.2.2. Composición general de la larva

La composición nutricional del *Tenebrio molitor* varía según el estado de desarrollo, la dieta y las condiciones de crecimiento; en el caso de esta especie, se puede observar que, a medida que su ciclo larval avanza, el contenido proteico se reduce y aumenta la cantidad de lípidos presentes en las larvas, como respuesta a una acumulación de energía para entrar al estado de pupa. De manera general, las larvas de *T. molitor* contienen entre 40 a 60% de proteínas, y un valor entre 25 a 35% de lípidos, constituidos principalmente por ácidos grasos insaturados como el oleico y el linoleico (9,38).

Es importante mencionar que las larvas de *T. molitor* poseen quitina en proporciones que van desde el 5 al 10% de la materia seca, lo que puede ser considerado como

fibra en las dietas animales. Las larvas también son capaces de aportar minerales como fósforo, magnesio y potasio; y vitaminas como riboflavina (B2), ácido pantoténico (B5), biotina (B7) y tocoferol (E) (9,39).

1.3. Elaboración de harina de insecto

La harina de insecto se presenta como una alternativa con diversas ventajas frente al uso directo de larvas frescas o de adultos. Su presentación resulta fácil de manipular, con mayor vida útil y propiedades sanitarias. Al mismo tiempo, la harina de insecto mantiene la calidad nutricional de las especies de origen, lo que la convierte en un sustrato competitivo y sostenible dentro de la industria alimentaria (40).

La inclusión de harina de insectos en la alimentación de animales de producción requiere seguir procedimientos y normas específicas durante su elaboración, con el fin de adaptarse tanto a las características propias de los insectos como a las exigencias regulatorias vigentes en algunos países (41).

Dado que uno de los objetivos principales en la producción alimentaria es ofrecer productos nutritivos y seguros para los consumidores, es de vital importancia garantizar la inocuidad de todos los alimentos producidos. Igualmente, en el caso de que los alimentos sean destinados a la cría de animales de producción, se debe asegurar el adecuado valor nutricional de los mismos (6).

Para la elaboración de la harina de insectos, es fundamental que los sistemas de cría y producción se adapten a las particularidades de cada especie, teniendo en consideración las características de crecimiento, alimentación, reproducción y susceptibilidad a patógenos de las mismas. De manera general, una de las principales dificultades al producir harina a partir de insectos es el elevado contenido de humedad de estos (entre 30 a 40%), lo cual requiere implementar un sistema de producción que garantice la calidad de producto pero que, a su vez; reduzca los costos del procesado (41).

1.3.1. Procesamiento de larvas para obtención de harina

La conversión de larvas en harina de insectos suele seguir los cuatro pasos u operaciones unitarias. El método y la manera en la que cada una de estas operaciones son llevadas a cabo puede afectar la proteína, disponibilidad de aminoácidos y la estabilidad lipídica (42).

- 1) **Sacrificio / desinfección:** Llevado a cabo con el fin de reducir la carga microbiana que pueda encontrarse en el tracto intestinal de los insectos (42).
- 2) **Desgrasado:** Opcional, realizado en especies con alto contenido lipídico (43).
- 3) **Secado:** Paso principal en la elaboración de harina, el método de secado utilizado puede afectar la digestibilidad de nutrientes y proteína (43).
- 4) **Molienda:** Paso final para producir harina.

1.3.1.1. Métodos aplicados en el procesamiento

Es importante manejar cuidadosamente los métodos involucrados en las etapas de procesamiento de los insectos. Los métodos térmicos y la degradación u oxidación de compuestos pueden afectar oxidación lipídica, la cual, a su vez; afecta la digestibilidad de las proteínas en el producto final (43).

Con respecto a la etapa de sacrificio de los insectos previa a su conversión en harina, lo ideal es que el proceso sea realizado de la manera más ágil posible, impidiendo que los insectos sufran estrés que pueda afectar el valor nutricional de la harina que se obtendrá. Los métodos más utilizados para sacrificio son los de congelación, el escaldado, y la asfixia por CO_2 . La congelación consiste en someter a los insectos a temperaturas bajo cero durante un determinado período de tiempo (generalmente -20°C durante 24 horas) hasta que las funciones vitales de los insectos se detengan, no reduce la carga de patógenos ni previene la lipólisis por enzimas. El escaldado puede usarse tanto como un método de sacrificio o como un método de desinfección. Consiste en sumergir los insectos en agua hirviendo durante un breve período, para seguidamente sumergirlos en agua helada o colocarlos bajo una corriente de agua fría para detener el proceso térmico; se ha demostrado que al someter los insectos a escaldado se puede reducir considerablemente el recuento microbiano de los mismos, e inactivar las enzimas degradativas que esos presentan. No se han reportado diferencias significativas en la composición química entre las larvas frescas y las escaldadas (40,42).

El proceso de secado puede abarcar desde métodos tradicionales (asar, freír), hasta métodos modernos (lío-filización, microondas). El secado permite aumentar la vida útil de los alimentos ya que reduce el contenido total de agua y, por lo tanto, el crecimiento microbiano, que es directamente dependiente de este elemento. Para la elaboración de harinas, se utiliza principalmente el secado al horno, al microondas

o la liofilización. Es necesario elegir un adecuado método de secado según la especie de insecto. Ya que, en insectos con alto contenido de grasa, la liofilización puede afectar la oxidación lipídica y disminuir la solubilidad proteica. Así mismo, el método de secado puede afectar algunos parámetros de calidad. El secado por horno o microondas puede resultar efectivo para diferentes especies de larvas de insectos (42).

El desgrasado puede ser realizado de manera parcial o completa, y puede influir en la formulación de alimentos ricos en proteínas. La grasa extraída puede ser utilizada para otros fines. Las técnicas de desgrasado pueden ser mecánicas o ser realizada mediante extracción por medio de solventes orgánicos. Los métodos con solventes pueden ser caros, y en algunos casos; los solventes pueden ser tóxicos. La extracción mecánica de los lípidos mediante prensado permite obtener harina con un buen perfil nutricional, por lo que es más utilizada que el método por disolventes (40).

La molienda de los insectos previamente desecados y desgrasados suele llevarse a cabo en molinos. Este método no suele interferir con las propiedades nutricionales de la harina. Lo que sí es importante considerar es la limpieza e higiene de los equipos utilizados en la molienda. Para poder conservar correctamente las propiedades de la harina, es recomendado almacenar la misma a -20°C después del proceso de molienda (40,42).

1.3.1.2. Consideraciones para conservar perfil de aminoácidos

Algunas investigaciones sugieren que el método de desecado podría influir en el perfil aminoacídico, alterando los aminoácidos predominantes y los limitantes en las muestras. Algunas investigaciones demuestran que las larvas de *H. illucens* desecadas por microondas tuvieron niveles más altos de ácido glutámico y a la valina como el aminoácido limitante; mientras que las larvas secadas mediante desecado convencional (horno a 60°C) presentaron niveles menores de lisina y al ácido aspártico como el aminoácido predominante. Sin embargo; la diferencia entre los valores no alteró significativamente el valor nutricional total, influyendo más que todo en el sabor y la palatabilidad de estos (44).

Igualmente, para conservar el perfil aminoacídico de la harina de larva de insectos, y el valor nutricional en general; no solo es necesario mantener un correcto manejo de las técnicas durante el proceso de elaboración, también es necesario cuidar la

alimentación de las larvas durante el proceso de cría. Es por ello, que es necesario desarrollar una dieta específica para cada especie de insecto, que maximice la producción de biomasa por las larvas pero que también, al mismo tiempo, reduzca el tiempo de desarrollo (45).

Sin embargo; en el caso de insectos holometábolos, como lo son *H. illucens* y *T. molitor*, la composición de aminoácidos no se ve significativamente afectada por la dieta, sino que es determinada por la etapa de vida en la que se encuentre el insecto (17). Aun así, para el correcto crecimiento de los insectos se tienen algunas consideraciones dietéticas a cumplir: en el caso de las larvas de *Hermetia illucens*, la dieta debe incluir una proporción de proteína: carbohidrato de 1:2 o 1:3; mientras que para las larvas de *Tenebrio molitor*, los estudios indican que una dieta adecuada debe considerar entre un 80-85% de carbohidratos (45,46).

A nivel industrial, el procesamiento de insectos también presenta diversos desafíos que pueden influir en la calidad y aprovechamiento de las harinas y su capacidad proteica. Uno de los principales problemas es la oxidación lipídica, proceso en el cual los lípidos reaccionan con el oxígeno causando subproductos que implican la pérdida de nutrientes, suele darse frecuentemente gracias al alto contenido de ácidos grasos de las especies *H. illucens* y *T. molitor*. Para reducir este efecto se utilizan estrategias como el desgrasado previo, la incorporación de antioxidantes en el producto final, así como controles rigurosos de humedad y temperatura durante el secado (47).

Otro aspecto para considerar es la digestibilidad real de las proteínas, la cual se puede ver afectada por la presencia de quitina. Así mismo, los tratamientos térmicos muy intensos pueden causar desnaturalización en aminoácidos sensibles como la lisina o el triptófano. Por lo que es necesario encontrar un método adecuado, que permita eliminar la humedad, conservando el valor nutricional y la integridad de los aminoácidos (48).

Finalmente, es necesario considerar los costos energéticos y la eficiencia que un escalamiento industrial del proceso conllevaría. Una ligera variabilidad en las condiciones de cría y procesamiento podría generar diferencias importantes en la composición final (49).

1.3.2. Comparación general entre harinas de *H. illucens* y *T. molitor*

Al comparar las harinas de larva de *H. illucens* y *T. molitor* se puede observar que ambas presentan un elevado contenido proteico, siendo la mayor diferencia el contenido lipídico, que es más alto en el caso del *T. molitor*, aunque resulta importante destacar que mientras los lípidos presentes en *T. molitor* son, predominantemente, ácidos grasos insaturados (ácido oleico y linoleico); en el caso de *H. illucens*, el contenido de lípidos es predominantemente de ácidos grasos saturados, especialmente el ácido láurico (9,32,50). En cuanto a minerales, se puede destacar que *H. illucens* contiene un mayor contenido de calcio que su contraparte, mientras que *T. molitor* presenta valores más equilibrados de fósforo y magnesio (38,39).

En cuanto al perfil aminoacídico de ambas harinas, se reporta que ambas cuentan con la presencia de todos los aminoácidos esenciales, aunque con diferencias en sus cantidades y proporciones. *Hermetia illucens* tiene mayor concentración de lisina y treonina; mientras que, *Tenebrio molitor* posee mayores niveles de lisina y leucina. Ambas harinas poseen concentraciones bajas de metionina y triptófano (9,32,45,50).

En la Tabla 3, se puede observar la comparación general entre ambas harinas de larva.

Tabla 3. Comparación de perfiles nutricionales de harinas de larva de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*

Nutrientes	<i>Hermetia illucens</i>	<i>Tenebrio molitor</i>	Referencias
Proteína (%)	33-55	45-60	(9,32,38,50)
Lípidos totales (%)	15-25	25-35	(9,45,51,52)
Cenizas (%)	10-15	2-5	(38,39,50)
Quitina (%)	5-8	5-10	(38,51)
Minerales destacados	Ca, P, K, Mg	P, Mg, K, Fe	(9,38,39)
Vitaminas reportadas	Vitamina E, Complejo B (en pequeñas cantidades)	Complejo B (B2, B3, B5, B7), vitamina E	(17,39)
Perfil lipídico	Predominio de ácidos grasos saturados (ácido láurico y ácido mirístico)	Predominio de ácidos grasos mono y poliinsaturados (ácido oleico y ácido linoleico)	(9,52)
Perfil aminoacídico	Concentraciones mayores de lisina, treonina, y leucina	Perfil más equilibrado. Posee concentraciones	(9,50)

	(con valores que varían entre el 1.0 – 4.5% de la materia seca)	mayores de lisina, valina y leucina (pueden alcanzar valores de entre el 1.5% – 5.7% de la materia seca)	
--	---	--	--

1.4. Aminoácidos y su relevancia en la nutrición animal

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que pertenecen al grupo de los carboxílicos, en los cuales un grupo amino sustituye a un átomo de hidrógeno en la cadena lateral específica. Están presentes en todas las células vivas, ya que desempeñan funciones esenciales: por un lado, actúan como unidades estructurales de las proteínas, al unirse entre sí mediante enlaces amida para formar cadenas polipeptídicas; y por otro, intervienen como productos del metabolismo celular, participando en múltiples procesos vitales para el equilibrio interno de la célula (53).

Aunque en la naturaleza existen más de 500 aminoácidos distintos, solo 20 de ellos participan en la conformación de las proteínas en los organismos animales. Estos aminoácidos tienen la capacidad de unirse entre sí mediante enlaces amida, formando largas cadenas que dan origen a péptidos y proteínas. En general, una proteína está compuesta por al menos 50 aminoácidos, aunque lo más común es que contenga entre 100 y 300 unidades (54).

En los organismos animales la principal fuente de aminoácidos proviene de las proteínas ingeridas en la dieta. Al ser compuestos esenciales que participan en la regulación de diversas funciones metabólicas celulares, la inclusión de los aminoácidos es importante en la alimentación, ya que su deficiencia podría causar diversos problemas de salud en el organismo del animal, que van desde problemas en el crecimiento, la nutrición, la reproducción o la respuesta inmune, hasta enfermedades más graves como afecciones hepáticas o cardiovasculares(54).

Algunas de las funciones más importantes de los aminoácidos en las especies de animales productivos, se listan en la Tabla 4.

Tabla 4. Funciones de los aminoácidos en la nutrición y el metabolismo animal

Categoría funcional	Funciones específicas de los aminoácidos
Síntesis y estructura	Componentes básicos en la formación de proteínas y péptidos; síntesis de enzimas; síntesis de colágeno; formación de plumas en aves.
Metabolismo y energía	Regulación del metabolismo energético; activación de la oxidación de la glucosa y ácidos grasos; inhibición de la síntesis de glucosa y lípidos; participación en el transporte de aguas, proteínas, glucosa, ácidos grasos, vitaminas y minerales.
Funciones celulares y moleculares	Señalización celular; metilación del ADN; síntesis de ADN y ARN.
Sistema inmunitario	Modulación de respuestas inmunitarias; participación en la recuperación de lesiones.
Reproducción y desarrollo	Regulación de la producción de leche; regulación de la fertilidad, del crecimiento y del desarrollo fetal.
Sistema endocrino y nervioso	Síntesis y secreción hormonal; funciones neurológicas; síntesis de neurotransmisores.
Funciones fisiológicas adicionales	Regulación del flujo sanguíneo y de la función cardiovascular; funciones digestivas; pigmentación, osmorregulación; funciones en el proceso de metamorfosis de los peces.

Nota: Adaptado de Wu et al, 2014 (55).

Los requerimientos de aminoácidos varían entre las diferentes especies de animales de producción y, a su vez, pueden verse modificados según la edad y el sexo de los animales, y diversos factores específicos tales como: la dieta, el estado fisiológico (embarazo, lactancia, actividad hormonal); la presencia de patología y hasta condiciones ambientales. Es gracias a ello que resulta necesario formular dietas y productos adaptados a las necesidades de cada especie productiva. La alimentación con una mezcla específica de aminoácidos es esencial para garantizar la salud de los animales y evitar un desperdicio de la proteína (55,56).

1.4.1. Aminoácidos esenciales y no esenciales

Los 20 aminoácidos capaces de sintetizar proteínas en los organismos animales se dividen en dos grupos: aminoácidos esenciales y aminoácidos no esenciales. La diferencia entre ambos grupos radica en la capacidad del ser humano de sintetizarlos o no. Mientras que el cuerpo humano es capaz de sintetizar los 11 aminoácidos no esenciales; los 9 aminoácidos esenciales deben ser adquiridos por medio de la dieta (54). En la Tabla 5 se detallan los aminoácidos esenciales y no esenciales.

Tabla 5. Aminoácidos esenciales y no esenciales

Aminoácidos esenciales	Aminoácidos no esenciales
Arginina *	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Ácido aspártico
Leucina	Ácido glutámico
Lisina	Cisteína
Metionina	Glutamina
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Valina	Tirosina

El caso de la arginina es singular, ya que; si bien en humanos se considera un aminoácido no esencial, es decir; el cuerpo humano puede sintetizarlo; en el caso de algunos animales de producción, especialmente aves, animales jóvenes y rumiantes, los cuáles pueden ser incapaces de sintetizarlo completa o parcialmente (57,58).

1.4.2. Requisitos aminoacídicos en animales productivos

Actualmente, la calidad de las proteínas, definida también como la idoneidad nutricional de las proteínas alimentarias para favorecer la salud y el crecimiento, se evalúan mediante el análisis de la composición de aminoácidos (59). Tal como se muestra en la Tabla 4, los aminoácidos no solo participan en la síntesis de proteínas, sino que también desempeñan funciones clave en la señalización celular, la regulación de la expresión génica y en la modulación de cascadas de fosforilación de proteínas. Además, actúan como precursores fundamentales en la biosíntesis de hormonas y otros compuestos nitrogenados. No obstante, es crucial mantener un equilibrio adecuado entre los aminoácidos obtenidos a través de la dieta y los presentes en la circulación sanguínea, ya que un exceso de estos compuestos y sus derivados puede inducir efectos patológicos, como estrés neurológico, daño oxidativo celular e incluso enfermedades cardiovasculares. En el caso de los animales de producción, diversos estudios han evidenciado que la suplementación con aminoácidos esenciales, no esenciales y funcionales puede favorecer parámetros productivos como el desarrollo muscular, la producción láctea, la calidad de la carne y los huevos, además de contribuir a la reducción de grasa corporal y adiposidad en determinadas especies (60).

Los requerimientos aminoacídicos en animales productivos no solo varían de acuerdo con la especie, sino también en base a diversos factores fisiológicos y ambientales.

Algunos de estos son: la etapa de desarrollo, el nivel energético, las interacciones entre aminoácidos y la digestibilidad real de la fuente proteica (61).

En aves, los requerimientos varían según la etapa de desarrollo y el objetivo de la producción (engorde o ponedoras). Los pollos de engorde requieren dietas que contengan entre 1.0 – 1.2% de lisina, 0.4 – 0.5% de metionina, 0.7 – 0.8% de treonina y 0.18 – 0.2% de triptófano. En cuanto a las gallinas ponedoras, la metionina es un aminoácido crítico para la producción de los huevos y la síntesis de plumas (58).

Los porcinos en crecimiento requieren un 0.9 – 1.1% de lisina, con proteínas de metionina y cisteína de entre el 55 - 60% de la lisina. Estos requerimientos se ven aumentados en etapas de lactancia, gestación, o de rápida deposición proteica (57). En cuanto a peces y crustáceos, la demanda de aminoácidos es más elevada: 5.5 – 6.0% de lisina en la proteína de la dieta, y 2 – 2.5% de metionina y cisteína (62).

1.4.3. Aporte de las harinas de insectos al perfil aminoacídico deseado

Al comparar la harina de insectos con las principales fuentes proteicas en la alimentación animal, se sabe que las fuentes de proteína vegetal suelen ser deficientes en algunos aminoácidos esenciales como: lisina, metionina y leucina; mientras que los insectos son ricos en aminoácidos esenciales de buena calidad; por lo tanto, las harinas de insectos pueden perfilarse como una alternativa al uso de harina de soja o maíz (63). En cuanto a la harina de pescado, la mayoría de las harinas de insectos no demuestra una ventaja nutricional sobre la harina de pescado, sin embargo; algunas especies demuestran ser más ricas en determinados aminoácidos: como es el caso de un valor más alto de metionina en *Musca domestica* y hasta cuatro veces más histidina en *H. illucens* (10,63).

Los valores proteicos y aminoacídicos presentados por las harinas de insecto han permitido que estas sean consideradas como alternativas para alimentar animales. Para tener un valor de referencia, algunos autores usan el índice de aminoácidos esenciales (EAAI, por sus siglas en inglés), el cual es un valor que relaciona la cantidad de aminoácidos presentes en la fuente con los requerimientos descritos para el animal de interés. Al calcular este valor para determinadas harinas de insectos, los investigadores han podido determinar que las harinas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* llegan a cumplir los requerimientos en pollos de engorde y cerdos (64).

1.5. Técnicas analíticas para determinación de aminoácidos

Dado que la mayoría de los aminoácidos son moléculas alifáticas sin fluorescencia ni absorción UV, su análisis suele resultar difícil (65). Por lo tanto, los métodos empleados para la determinación de aminoácidos deben ser capaces, de identificar tantos aminoácidos primarios como secundarios, con un grado de especificidad que puede variar según el tipo de muestra analizada (66).

Entre las técnicas más utilizadas se encuentran los métodos electroforéticos, químicos y cromatográficos, los cuales permiten obtener resultados tanto cualitativos como cuantitativos (66). Algunos de los métodos utilizados para cuantificar aminoácidos son electroforesis, resonancia magnética nuclear, cromatografía líquida, espectrometría de masa o cromatografía de gases (65).

De manera general, el análisis de aminoácidos se suele dividir en las siguientes operaciones (59):

- 1) Hidrólisis de los aminoácidos de la estructura proteica
- 2) Separación de los aminoácidos
- 3) Detección y cuantificación de los aminoácidos separados

La elección del método más adecuado depende de las ventajas y limitaciones que presenta cada técnica, las cuales influyen directamente en la precisión, consistencia y aplicabilidad del análisis.

1.5.1. Métodos clásicos vs. Cromatográficos

Una de las técnicas más utilizadas para la determinación de aminoácidos es la cromatografía líquida de intercambio iónico, la cual se basa en la interacción de los grupos iónicos presentes en la muestra con un soporte de naturaleza ácida. La separación de los aminoácidos se lleva a cabo en etapas, comenzando por los ácidos, seguidos de los hidroxilados, luego los neutros y finalmente los básicos. Este procedimiento requiere una derivatización post-columna con ninhidrina, lo que permite su detección mediante absorbancia en la región UV-visible. A pesar de ofrecer resultados confiables, esta técnica presenta limitaciones como largos tiempos de preparación y análisis, así como una sensibilidad reducida frente a ciertos tipos de muestra (67).

Por otro lado, la cromatografía de gases (GC) también ha sido empleada para el análisis de aminoácidos, destacando por su alta sensibilidad, resolución y rapidez. Sin embargo, el procedimiento de derivatización necesario para volatilizar los aminoácidos, junto con la exigencia de grandes volúmenes de muestra y procesos de extracción complejos, ha restringido su aplicación práctica y ha favorecido la adopción de técnicas basadas en HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (68).

Asimismo, otras metodologías empleadas incluyen la electroforesis capilar (EC) y la resonancia magnética nuclear (RMN). La EC permite el análisis de volúmenes mínimos de muestra y separa los aminoácidos mediante su derivatización con isotiocianato de fluoresceína. No obstante, requiere tiempos prolongados de preparación y presenta límites de detección bajos, lo que limita su utilidad en algunos casos. Por su parte, la RMN permite detectar una variedad de compuestos presentes en las muestras, por lo que se utiliza principalmente en matrices complejas o cuando se busca realizar un análisis más amplio y general (67).

1.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (High Density Liquid Chromatography o HPLC) es una técnica de determinación, cuantificación y purificación de diversos compuestos, teniendo bastante aplicación en las ciencias biofarmacéuticas (69). Es actualmente la técnica más utilizada para la determinación y cuantificación de aminoácidos en diferentes muestras.

Los resultados obtenidos por un HPLC se expresan en un cromatograma, un registro gráfico en dos dimensiones que demuestra cómo los analitos eluyen de una muestra a lo largo del tiempo. En un cromatograma de HPLC, el eje X es la medida de tiempo (generalmente minutos), el eje Y mide la respuesta del detector (intensidad de señal, absorbancia, fluorescencia, conductividad) y los picos representan a cada uno de los compuestos analizados (70).

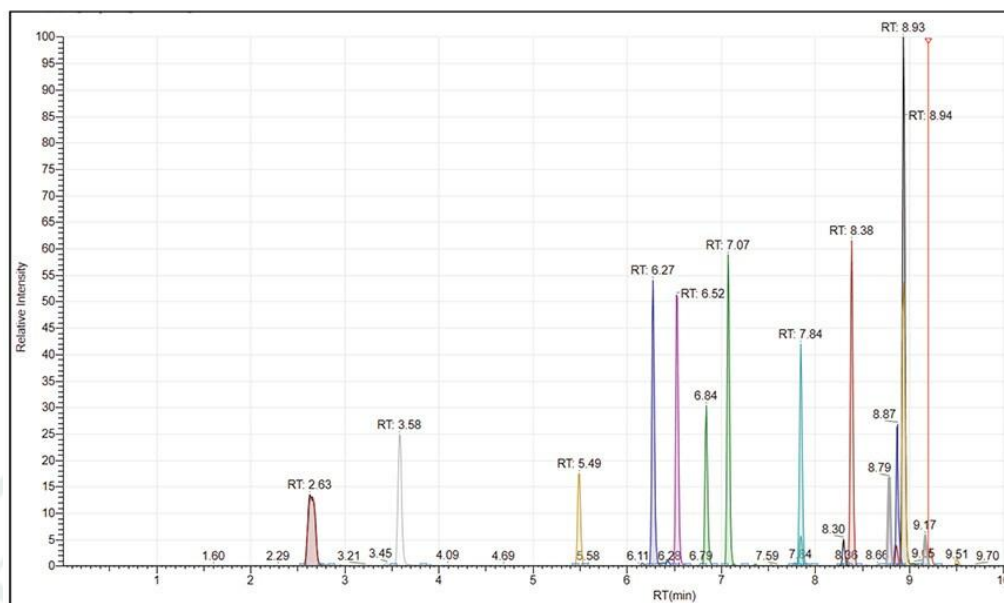


Figura 3. Ejemplo de un Cromatograma de HPLC. Cada pico corresponde a un compuesto diferente identificado en la muestra.

Nota: Extraído de Thermo Fisher Scientific (71).

La principal ventaja del HPLC, una de las razones por las cuáles es una de las técnicas analíticas más usadas actualmente, reside en la aplicabilidad de la técnica a diversos tipos de analitos. El HPLC es capaz de analizar desde pequeñas moléculas orgánicas o iones hasta biomoléculas y polímeros (72). En la Tabla 6 se detallan otras ventajas de la técnica de HPLC, así como las limitaciones de esta.

Tabla 6. Ventajas y limitaciones de la técnica de HPLC

Ventajas	Limitaciones
➤ Aplicable sobre una amplia diversidad de analitos y tipos de muestras ➤ Análisis cuantitativo, preciso y altamente reproducible ➤ Detección sensible ➤ La operación es flexible, personalizable y automatizable ➤ Alta capacidad de separación y recolección de los compuestos separados; pudiendo ser usada en purificación de muestras ➤ Flexible con variedad de técnicas (Cromatografía por partición, adsorción, intercambio de iones y exclusión molecular)	➤ Menor eficiencia de separación que la cromatografía de gases capilar ➤ Ausencia de un detector universal ideal, solo se pueden detectar compuestos cromóforos ➤ Difícil para principiantes, manipular el equipo requiere capacitación técnica ➤ Los costos de reactivos y equipos pueden ser elevados

Notas: Adaptado de Suarez et al, 2018 (69); Dong, 2013 (72); Timchenko, 2021 (73).

1.5.2.1. Fundamentos del método HPLC y RP-HPLC

El fundamento de la técnica de HPLC se da gracias a la interacción de dos fases con la muestra de interés. Las dos fases que participan son: una fase móvil líquida cuya función es transportar la muestra por medio de la fase estacionaria, que funciona como soporte. Las fuerzas físicas y químicas de los componentes de la muestra determinarán la velocidad de separación de los componentes de la mezcla. De manera general, los elementos con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán más lentos que aquellos que no posean esta afinidad, dando como resultado la separación de los componentes (69).

El equipo de HPLC debe ser capaz de realizar este proceso y genera un resultado. Generalmente, se compone de los siguientes instrumentos:

- **Reservorio:** Recibe su nombre ya que es donde se almacena la fase móvil (las cual suele ser una mezcla líquida de sustancias). Pueden requerirse más de uno si es que el proceso requiere un gradiente de concentración. También suele tener un desgasificador, que elimina todo el gas que pueda haber en el reservorio antes de bombearlo para el proceso (69,74).
- **Bomba:** Encargada de succionar la fase móvil del reservorio y transportarla a flujo constante a través del inyector, la columna y el detector (74).
- **Inyector:** Permite que la muestra sea introducida en la fase móvil. Debe ser capaz de funcionar de manera exacta y precisa durante todo el proceso, a fin de evitar errores en los resultados (74).
- **Horno (Columna):** Mantiene y regula la temperatura de la columna, la cual influye directamente en la selectividad y retención de la muestra. La columna es un tubo de acero inoxidable donde se encuentra la fase estacionaria, es la encargada de realizar el proceso de separación en el HPLC (69).
- **Detector:** Encargado de detectar variaciones en los efluentes de la columna y transmitirlos al registrador en forma de señales eléctricas. Pueden ser selectivos o universales y pueden medir tanto señales físicas como químicas de la mezcla o de los eluyentes (69).
- **Registrador:** Recolecta las señales procedentes del detector y genera un cromatograma que permita al usuario o sistema interpretarlas (69).

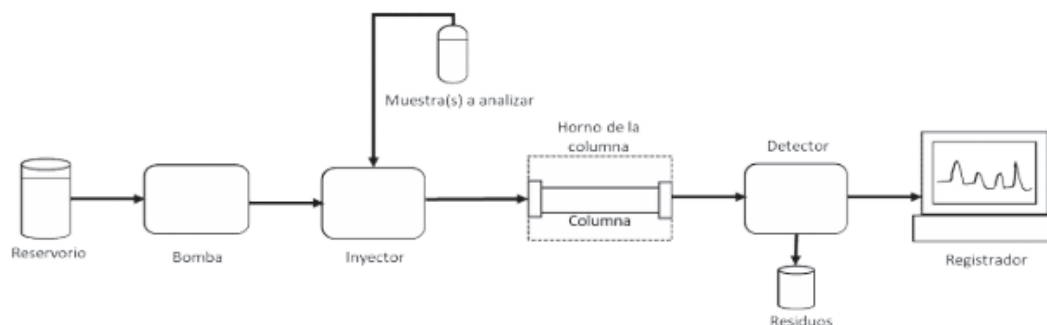


Figura 4. Diagrama básico de un equipo HPLC

Nota: Extraído de Suarez et al, 2018 (69).

Los equipos de HPLC se pueden clasificar de diferentes maneras, según el modo en el que estos operan, o en el principio de separación que utilizan, algunas de estas clasificaciones son:

- **Fase normal:** También llamado NP-HPLC por sus siglas en inglés. La fase estacionaria es polar, mientras que la fase móvil es apolar, por lo tanto; los analitos se separan en base a su polaridad. Generalmente utiliza sílice como la fase estacionaria y algún compuesto no acuoso como la fase móvil. Fue uno de los primeros modelos de HPLC creados (75).
- **Fase reversa:** Conocido como RP-HPLC. Utilizado para analizar muestras con sustancias neutras o no ionizadas, solubles, que se encuentran en mezclas de compuestos orgánicos o agua. La fase estacionaria es apolar, mientras que la fase móvil es un líquido moderadamente polar, generalmente una mezcla de agua con metanol o agua con acetonitrilo. Es el método más utilizado (69).
- **Cromatografía de intercambio iónico (IC):** Se utiliza cuando los compuestos presentan características iónicas o ionizables, generalmente siendo bases o cationes. Se basa en la atracción entre los iones del soluto y cargas unidas a la fase estacionaria, los solutos con la misma carga que los sitios de unión de la columna no se unirán a la misma, mientras que los solutos con la carga opuesta se verán atraídos por la misma. Los solutos retenidos por la columna pueden ser separados de la misma al cambiar las condiciones del solvente, por lo que este tipo de cromatografía suele utilizarse en purificaciones y preconcentraciones (75).

1.5.2.2. Detección de aminoácidos mediante HPLC

Para lograr la detección y cuantificación de los aminoácidos que componen las proteínas alimentarias es necesario modificarlos químicamente en un compuesto capaz de ser reconocido por el HPLC, es decir; es necesario convertirlos en derivados capaces de emitir o absorber fluorescencia en el rango de longitud de luz ultravioleta – visible (UV-vis) (76). Este proceso es llamado derivatización de aminoácidos.

Se han estudiado diferentes reactivos para poder llevar a cabo la derivatización, cada uno con sus diferentes ventajas y desventajas.

- **Ninhidrina:** Se usa para la derivación post-columna de aminoácidos separados por HPLC, lo que permite que sean detectados dentro de la región visible. Fue una de las primeras metodologías descritas y constituyó la base muchos analizadores comerciales, sin embargo; con el avance de los estudios y las metodologías fue difícil adaptarlo a usos más complejos (76).
- **Cloruro de Dansilo:** Puede formar complejos fluorescentes con los aminoácidos, sin embargo; carece de selectividad pues se puede unir a cualquier grupo hidroxilo (-OH) y aminas primarias (NH₂). Adicionalmente, requiere temperaturas altas y posee tiempos de reacción largos (76).
- **Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl):** Reacciona rápidamente con los aminoácidos, formando complejos fluorescentes altamente estables. La desventaja de este método es que necesita excesivas cantidades de reactivo, que luego deben ser extraídos de la mezcla para no interferir con los resultados lo que a menudo trae consigo la hidrólisis o pérdida de los aminoácidos (76).
- **O-ftalaldehído (OPA):** Reacciona con aminoácidos primarios a temperatura ambiente, formando rápidamente isoindoles altamente fluorescentes. Su desventaja es que posee una baja reactividad con los aminoácidos secundarios. Debido a esto, suele ser utilizado junto al FMOC, que se encarga de reaccionar con los aminoácidos secundarios (77).
- **Fenilisotiocianato (PITC):** Reacciona tanto con aminoácidos primarios como con secundarios, produciendo derivados de feniltiocarbamilo (PTC) estables y capaces de ser detectados por ultravioleta a una longitud de onda

de 254nm. Su desventaja es que, en comparación con los otros métodos mencionados, posee una baja sensibilidad (76).

En adición a la derivatización, la hidrólisis proteica de las muestras es un paso muy importante en el análisis de aminoácidos. La primera hidrólisis ácida realizada fue llevada a cabo en 1820, cuando Baconnot utilizó ácido sulfúrico para hidrolizar gelatina, lana y fibras musculares. A partir de entonces muchas metodologías han sido evaluadas con el propósito de hidrolizar las proteínas y conseguir aminoácidos. Actualmente, la mayoría de las técnicas de hidrólisis utilizan ácido clorhídrico a diferentes temperaturas y en condiciones de vacío, sin embargo; la hidrólisis ácida es un proceso que puede ocasionar pérdidas de enlaces amida y de algunos aminoácidos como serina, treonina y tirosina. A fin de evitar estas pérdidas, aún se investigan metodologías para optimizar la hidrólisis de las muestras a analizar (77).

1.5.2.3. Parámetros críticos para cuantificación

Para lograr el análisis exacto de un compuesto, es necesario seguir algunos parámetros estándar. Si se produce un cambio en alguno de los mismos, el resultado se puede ver afectado (75). Para garantizar que los resultados obtenidos en el HPLC son favorables, algunos de los parámetros para tener en cuenta son:

- **Tiempo y volumen de retención:** El tiempo de retención se define como el intervalo (generalmente medido en minutos) comprendido entre la inyección de la muestra en el sistema hasta la elución del analito. Se determina en el máximo ápice del pico cromatográfico. Es generalmente utilizado para la identificación de un compuesto en una mezcla, tras haber establecido previamente el tiempo de retención de un estándar de referencia. Por su parte, el volumen de retención se define como el volumen de la fase móvil necesario desde el momento de inyección hasta el tiempo de retención de un analito (78).
- **Eficiencia y selectividad:** La eficiencia sirve para cuantificar el rendimiento de una separación, demuestra la capacidad del HPLC para producir picos angostos, simétricos y definidos. Mientras que la selectividad es la habilidad del equipo para separar dos analitos (75).

- **Resolución:** Mide la separación entre los picos adyacentes del cromatograma, refiriéndose a la capacidad para distinguir entre picos diferentes (78).





CAPITULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

La investigación se llevó a cabo en la ciudad de Arequipa, provincia y distrito del mismo nombre. Geográficamente ubicada entre las coordenadas 14°36'06" y 17°16'54" de Latitud Sur, y 70°50'24" y 75°05'52" de Longitud Oeste. Arequipa se encuentra ubicada a más de 2,300 metros sobre el nivel del mar presenta un clima seco, con baja humedad y escasas precipitaciones pluviales. La temperatura promedio anual es de alrededor de 14°C, pero puede oscilar entre los 9°C y los 23°C, con variaciones significativas a lo largo del día y del año (79,80).

Las larvas de *Hermetia illucens* utilizadas en este proceso fueron obtenidas en la planta piloto ubicada en el fundo "La Católica" de la Universidad Católica de Santa María, localizada en el Pedregal, distrito de Majes, Provincia de Caylloma departamento de Arequipa, cuyas coordenadas geográficas son: Latitud: -16.3533. Longitud: -72.2472 Latitud: 16° 21' 12" Sur. Longitud: 72° 14' 50" Oeste (81).

Las larvas de *Tenebrio molitor* fueron recolectadas de la planta piloto de producción de larvas de Tenebrio, localizado en el laboratorio E-404 de la Universidad Católica de Santa María.

Para el procesamiento de las muestras se trabajaron en los laboratorios de biotecnología ambiental y de analítica, ubicado en los ambientes F-408 Y F-409 del instituto INNOVERGY, localizados en la Universidad Católica de Santa María.

2.2. Materiales

2.2.1. Material Biológico

- Larva de *Hermetia illucens*
- Larva de *Tenebrio molitor*

2.2.2. Insumos y reactivos

- Estándares de referencia de aminoácidos AAS18, marca Sigma-Aldrich
- Reactivo derivatizante fenilisotiocianato (PITC), marca Sigma-Aldrich
- Ácido acético glacial

- Acetonitrilo, grado HPLC
- Trietanolamina (TEA)
- Ácido clorhídrico
- Metanol
- Trihidrato de acetato de sodio
- Fosfato de sodio

2.2.3. Aparatos y Equipos

- Tubo de ensayo 20 ml con tapón rosca, 16 x 150 mm PYREX
- Tubo de ensayo de vidrio de 13x10mm
- Tubos eppendorf de 1.5 ml
- Filtro Whatman #41
- Matraz Kitasato 250 ml
- Embudo Büchner
- Viales de HPLC de 10x5 mm
- Cromatógrafo iónico acoplado a RP-HPLC – Marca: Thermo Fisher Scientific (Dionex UltiMate 3000), Modelo: ICS-6000 HPIC System
- Micropipeta de 100 y 1000 ul
- Tips para 100 y 1000 ul
- Sistema de purificación de agua – Marca: ELGA LabWater (Veolia), Modelo: PURELAB Quest (PQDIUVM1), Serie: PQ00021446
- Tanque de N₂
- Bomba de Vacío – Marca: Isolab, Modelo: 622.12.001
- Estufa – Marca: MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Modelo: Venticell 111-ECO line (VC111ECO)
- Balanza analítica - Marca Sartorius, Modelo: Entris 224-1S
- Hot-Plate – Marca: DLAB, Modelo: MS-H280-Pro
- Olla
- Equipo estrujador, prensa eléctrica de aceite – Modelo: HT-868

2.3. Métodos

2.3.1. Validación de la metodología de cuantificación de aminoácidos

2.3.1.1. Linealidad

La linealidad se evaluó mediante la elaboración de la curva de calibración de la solución estándar. Para esto, se tomaron 5 puntos de referencia, utilizando alícuotas del estándar a diferentes volúmenes (10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL y 60 µL). Estas alícuotas fueron sometidas al proceso de derivatización explicado en la sección 2.3.2.4, para seguidamente, ser analizados en el RP-HPLC mediante el procedimiento explicado en la sección 2.3.2.5. Con los resultados obtenidos se elaboraron las curvas de calibración para los 16 aminoácidos presentes en el estándar. Para cada aminoácido, se graficó la concentración del estándar utilizado en el eje X frente al área del pico obtenida mediante el análisis por RP-HPLC en el eje Y, con el fin de establecer la relación entre la respuesta del detector y la cantidad de analito presente en la muestra. La elaboración de la gráfica se llevó a cabo en el software Microsoft Excel.

2.3.1.2. Eficiencia

En base a la curva de calibración elaborada, se calculó la eficiencia analizando el factor R^2 de las curvas de calibración elaboradas en la sección anterior. De esta manera se pudo evaluar el grado de ajuste entre los valores experimentales obtenidos y los valores predichos por el modelo lineal (82). Este análisis fue realizado utilizando el software Microsoft Excel.

2.3.1.3. Precisión

Para calcular la precisión, se evaluó la repetibilidad. Para ello, se repitió el procedimiento de la sección 2.3.1.1 y se volvieron a analizar muestras de un volumen específico de estándar de aminoácidos. Se analizaron estos resultados por tres días consecutivos. Con los resultados obtenidos, se calcularon concentraciones de cada aminoácido, y se pudo expresar la precisión calculando el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (%RSD), utilizando la siguiente ecuación (82).

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}}$$

Donde: SD: Desviación estándar
 $\bar{X}$: Media Aritmética

Para realizar los cálculos se utilizó el programa Microsoft Excel.

2.3.1.4. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) fueron calculados a partir de la desviación estándar de las áreas de pico obtenidas en la sección 2.3.1.3 (82). Para ello se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S}$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

Donde: σ = desviación estándar de la respuesta
 S = Pendiente de la curva de calibración

Los cálculos se llevaron a cabo en Microsoft Excel.

2.3.2. Caracterización y determinación de la composición aminoacídica de la harina de larvas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*

2.3.2.1. Recolección de las larvas

Para la recolección de larvas, estas fueron separadas del sustrato un día antes de su sacrificio con el objetivo de permitir el vaciamiento intestinal y así reducir la posible presencia de coliformes o residuos gástricos en la harina obtenida. El sacrificio se realizó mediante congelación a -4°C durante 24 horas. Posteriormente, las larvas recolectadas fueron clasificadas en tres grupos según su tamaño: pequeñas, medianas y grandes.

La separación de las larvas en base a sus tamaños responde a la variación biológica y nutricional que estos insectos pueden presentar a lo largo de su desarrollo, en un mismo período de crianza. Se consideraron diferentes tamaños para poder tener una visión más representativa del perfil nutricional y evaluar cómo la etapa de desarrollo, en un mismo período de tiempo, puede influir en la calidad proteica de la harina. A continuación, se detallan las dimensiones consideradas para cada categoría:

➤ *Hermetia illucens*

- Larvas pequeñas: Entre 6,5 y 9,5 mm
- Larvas medianas: Entre 9,50 y 12,50 mm

- Larvas grandes: Entre 12,50 y 15,50 mm

➤ ***Tenebrio molitor***

- Larvas pequeñas: Entre 17,4 y 24,00 mm
- Larvas medianas: Entre 24,00 y 27,50 mm
- Larvas grandes: Entre 27,50 y 31,50 mm

2.3.2.2. Preparación de las muestras de harina de larva

➤ ***Preparación de harina de larva de *Hermetia illucens****

La preparación de la harina de larva de *Hermetia illucens* se inició con la desinfección de las larvas seleccionadas y previamente sacrificadas, las cuales fueron desinfectadas sumergiéndolas en una solución clorada al 0,5–1,0 %. Posteriormente, se enjuagaron cuidadosamente con agua para eliminar residuos del desinfectante. Las larvas fueron desecadas en un horno a 60 °C durante 30 minutos. Una vez finalizado el proceso de secado, se procedió a la molienda hasta obtener una harina de textura homogénea (83). Este proceso fue repetido de manera separada para los tres tamaños de larvas.

➤ ***Preparación de harina de larva de *Tenebrio molitor****

La elaboración de la harina de larva de *Tenebrio molitor* se llevó a cabo mediante una metodología ligeramente distinta a la empleada para *Hermetia illucens*. En primer lugar, las larvas previamente sacrificadas fueron desinfectadas mediante un lavado con agua. A continuación, se sometieron a ebullición durante 10 minutos y posteriormente a un proceso de estrujado con el fin de eliminar el exceso de grasa presente en los tejidos. El material obtenido fue desecado en un horno a 45 °C durante 24 horas. Finalmente, las larvas secas fueron molidas hasta obtener una harina de textura homogénea (84). Este procedimiento se repitió para cada uno de los tres tamaños de larva seleccionados.

2.3.2.3. Hidrólisis de las muestras

La hidrólisis de las muestras de harina se llevó a cabo pesando 0,1 g de muestra en tubos PIREX de 20 mL con tapa rosca, a los cuales se les añadieron 15 mL de ácido clorhídrico (HCl) 6N. Posteriormente, se burbujeó una corriente de nitrógeno (N₂) a través de cada tubo con el fin de eliminar el oxígeno disuelto y

generar condiciones anaeróbicas. Los tubos fueron sellados y colocados en un horno a 110 °C durante 24 horas para completar el proceso de hidrólisis. Transcurrido este tiempo, el contenido de cada tubo fue filtrado al vacío con los filtros Whatman y el volumen del filtrado se enrasó a 25 mL con agua ultrapura (76).

2.3.2.4. *Proceso de derivatización*

Para el proceso de derivatización, se tomó una alícuota de 150 µL de cada muestra hidrolizada, las cuales fueron transferidas a tubos de ensayo y posteriormente secadas al vacío a 65 °C durante 20 minutos. Paralelamente, se prepararon dos soluciones necesarias para la derivatización en tubos Eppendorf de 1,5 mL. La solución de trabajo 1 estuvo compuesta por una mezcla de metanol: agua: trietilamina (TEA) en proporción 2:2:1 (v/v), mientras que la solución de trabajo 2 consistió en metanol: agua: TEA: fenilisotiocianato (PITC) en proporción 7:1:1:1 (v/v). Transcurrido el primer secado, se añadieron 90 µL de la solución de trabajo 1 a cada muestra y se repitió el secado al vacío a 65 °C durante 20 minutos. Luego, se agregaron 90 µL de la solución de trabajo 2 y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente, los solventes residuales fueron eliminados bajo una corriente de nitrógeno (N₂) (76).

Con el objetivo de asegurar que los reactivos no generaran interferencias durante la detección cromatográfica, se preparó una muestra blanco utilizando 150 µL de agua ultrapura, la cual fue sometida a todo el procedimiento de derivatización en paralelo con las muestras de análisis.

2.3.2.5. *Procedimiento cromatográfico*

El análisis de aminoácidos se realizó en un sistema RP-HPLC Agilent 1260 Infinity, equipado con columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm) y detector UV de 190-900 nm. Se utilizó una fase móvil compuesta por acetato de sodio/acetonitrilo (80:20, v/v) con flujo de 1,0 mL/min. La cuantificación se basó en curvas de calibración con estándares Sigma AAS18, y los resultados finales se expresaron en g/100g materia seca (MS). Los ensayos se realizaron por duplicado, con inclusión de blancos de matriz y controles fortificados.

Previo a la inyección en el equipo RP-HPLC, se añadieron 450 µL de un diluyente compuesto por fosfato de sodio 5 mM con un 5 % de acetonitrilo a cada muestra, según el procedimiento descrito por (76). Para asegurar la calidad de los resultados, se incluyeron controles analíticos en cada corrida cromatográfica: se utilizaron viales con muestra en blanco (agua ultrapura) y viales con muestra blanco derivatizada tal y como indica el proceso 2.3.2.4, a fin de verificar la ausencia de contaminantes. Asimismo, las muestras fueron analizadas en duplicado para evaluar la reproducibilidad.

La separación de los aminoácidos derivados se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) a una temperatura de 30 °C, utilizando un sistema de elución en gradiente con dos fases móviles. La fase móvil A correspondió a un tampón acuoso preparado con 0,5 mL/L de trietilamina (TEA) en una solución de acetato de sodio 0,14 M, ajustado a pH 6,2 mediante ácido acético glacial. La fase móvil B consistió en una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción 60:40 (v/v). La detección se llevó a cabo mediante absorbancia UV a una longitud de onda de 254 nm. (76). El programa de gradiente se programó de la siguiente manera:

Tabla 7. Gradiente de elución de RP-HPLC

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	90	10
12	70	30
20	52	48
22	0	100
24	0	100
30	0	100
37	90	10

Nota: Extraído de Gónzales-Castro, et al (1997) (76).

2.3.2.6. Cálculo de la concentración final de los aminoácidos

La concentración obtenida de aminoácidos tuvo que ser convertida a µg/g, cantidad que fue calculada utilizando los datos de concentración obtenidos por el equipo de RP-HPLC (µmol/ml) y el peso molecular (PM) de cada aminoácido, los cuales figuran en la Tabla 8. Dado que, debido a los diversos reactivos involucrados en el proceso, sería incorrecto asumir una equivalencia directa entre volumen y masa (1ml

$\approx 1\text{g}$); fue necesario calcular un factor de dilución (FD) que permitiera establecer la relación entre las diluciones involucradas (85). La fórmula aplicada fue la siguiente:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \text{Concentración} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right) \times \text{PM} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \times \text{FD}$$

Donde el factor (FD) fue determinado por la siguiente fórmula:

$$\text{FD} = \left(\frac{\text{Volumen de Enrase (25ml)}}{\text{Masa de Muestra (0,1g)}} \right) \times \left(\frac{\text{Volumen de Redisolución (450}\mu\text{l)}}{\text{Volumen de alícuota (150}\mu\text{l)}} \right)$$

$$= 750 \frac{\text{ml}}{\text{g}}$$

Finalmente, a razón de poder expresar los resultados en g/100g de materia seca (MS), los resultados fueron divididos por 10^4 .

Tabla 8. Pesos moleculares de los aminoácidos

Aminoácido	PM (g/mol)
Arginina	174
Ácido Aspártico	133
Ácido Glutámico	147
Serina	105
Glicina	75
Histidina	155
Treonina	119
Alanina	89
Prolina	115
Tirosina	181
Valina	117
Metionina	149
Isoleucina	131
Leucina	131
Fenilalanina	165
Lisina	146

Nota: Extraído de Thermo Fisher Scientific (86)

2.3.3. Comparación la composición aminoacídica de harina de larva de *Hermetia illucens* y harina de larva de *Tenebrio molitor*.

Para la comparación de la composición aminoacídica entre *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* se realizaron dos análisis de varianza de una vía (ANOVA one-

way), ambos con un nivel de significancia de 0,05. El primer análisis evaluó el efecto del tamaño larval, considerando las tres categorías de tamaño ya establecidas: larvas pequeñas, larvas medianas y larvas grandes. El segundo análisis evaluó el efecto de la especie como fuente de estudio. Para realizar ambos análisis se utilizó el software OriginLab.



2.4. Diagrama de Flujo de actividades

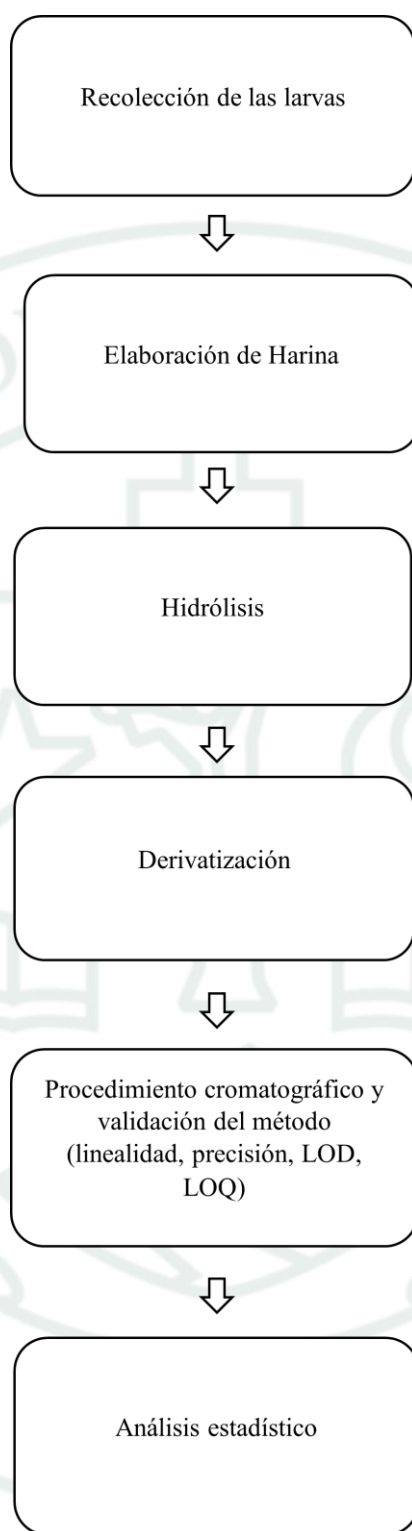


Figura 5. Flujograma de actividades



CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Validación de la metodología RP-HPLC

3.1.1. Método de linealidad y eficiencia

En las Figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis del estándar de aminoácidos (AAS18, Sigma Aldrich), a volúmenes de 10 μ l y 60 μ l del estándar de referencia. En ambos cromatogramas, se pueden observar múltiples picos definidos y separados entre sí, sin observar solapamientos entre los aminoácidos, lo cual confirma la correcta separación de estos mediante el método utilizado.

El tiempo de retención de los analitos oscila entre 2,5 y 25 minutos; sin embargo, el proceso utilizado empieza a generar interferencias a partir del minuto 22, que dificultan la visualización de los aminoácidos en el cromatograma. Es por este motivo que, a fin de evitar que las interferencias generadas afecten la visualización de los compuestos de interés, los cromatogramas fueron cortados entre los minutos 22 y 22,5.

Gracias a los cromatogramas obtenidos y a la bibliografía consultada se pudo determinar el tiempo de retención de los aminoácidos analizados.

Figura 6. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 10 μ l del estándar de referencia

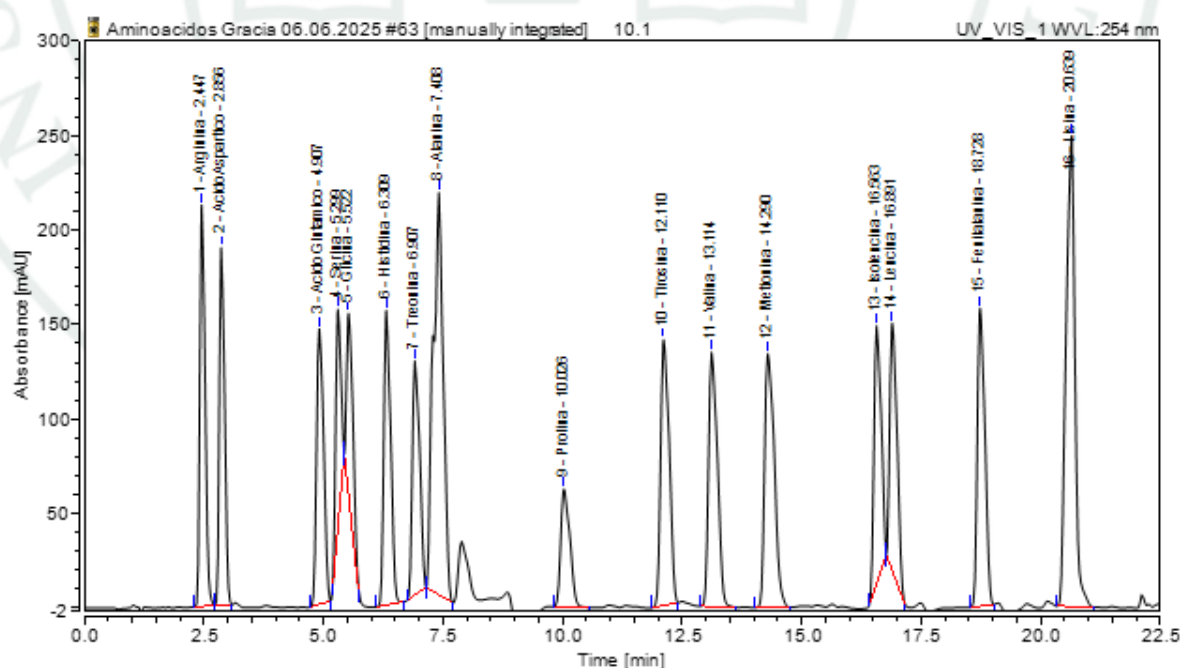
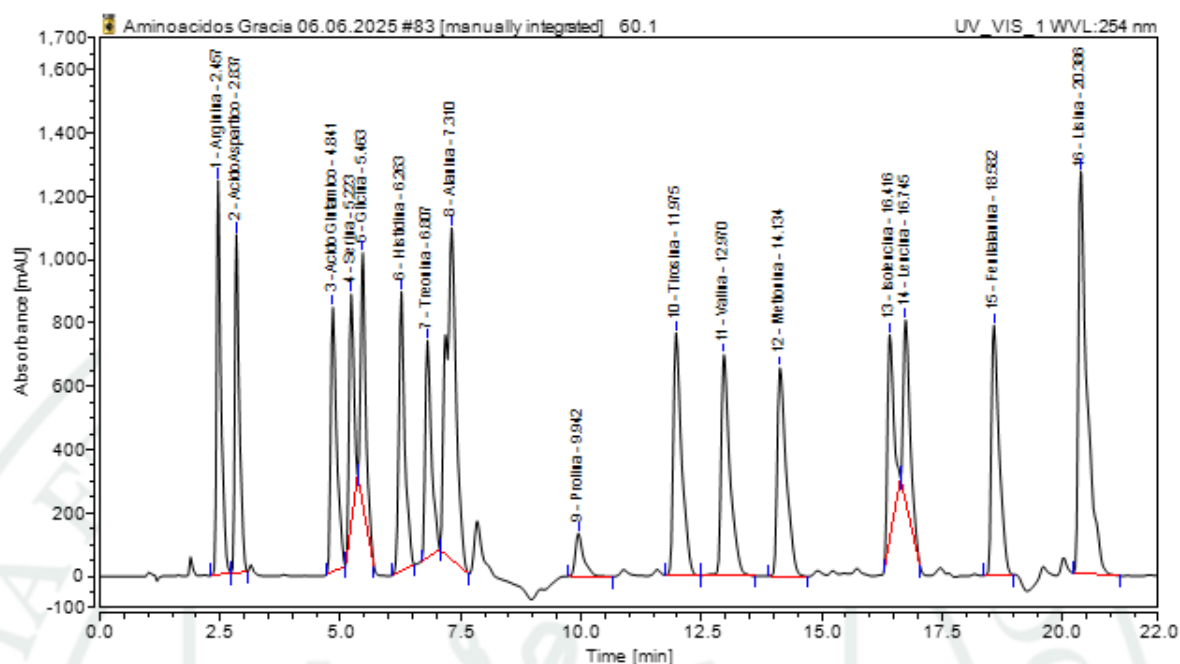


Figura 7. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 60 µl del estándar de referencia



A pesar de que el estándar utilizado (AAS18, Sigma Aldrich) cuenta con 17 aminoácidos, solo se lograron identificar 16 aminoácidos. La cistina (dímero formado a partir de dos moléculas del aminoácido cisteína) presente en el estándar no pudo ser identificada gracias a la limitada bibliografía disponible sobre su identificación en HPLC. Sin embargo, en todos los cromatogramas de los estándares se pudo observar un pequeño pico inmediatamente después de la alanina (aproximadamente entre 7,5 y 8 minutos), el cuál podría corresponder a este aminoácido o a residuos de este, dado que posee una alta inestabilidad. No obstante, esta observación solo puede considerarse como una hipótesis, dado que no se encontró bibliografía que la respalde.

El resto de los cromatogramas obtenidos, correspondientes tanto como para el resto de los volúmenes, así como para sus repeticiones; pueden ser consultados en el Anexo 2.

En la Tabla 9 se muestran los tiempos de retención (en minutos) correspondientes a cada uno de los 16 aminoácidos que se lograron evaluar en este estudio.

Tabla 9. Tiempo de retención de aminoácidos

	Aminoácido	Tiempo de Retención (min)
1	Arginina	2,4
2	Ácido aspártico	2,9
3	Ácido glutámico	4,9
4	Serina	5,3
5	Glicina	5,5
6	Histidina	6,3
7	Treonina	6,8
8	Alanina	7,4
9	Prolina	10,0
10	Tirosina	12,1
11	Valina	13,1
12	Metionina	14,2
13	Isoleucina	16,5
14	Leucina	16,9
15	Fenilalanina	18,7
16	Lisina	20,6

La Tabla 10 presenta los resultados de la validación analítica del método de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC) utilizado para la cuantificación de aminoácidos. Se muestran dos parámetros primordiales para cada aminoácido estándar: el coeficiente de determinación (R^2) y la pendiente (m) de la curva de calibración de 16 aminoácidos.

Tabla 10. Validación del método RP-HPLC

Aminoácido	R^2	Pendiente (m)
Arginina	0,9917	0,4931
Ac. Aspártico	0,9925	0,5595
Ac. Glutámico	0,9906	0,5317
Serina	0,9865	0,7319
Glicina	0,9963	0,6312

Histidina	0,9919	0,5133
Treonina	0,9897	0,6351
Alanina	0,9932	0,2503
Prolina	0,9917	0,4931
Tirosina	0,9922	0,4140
Valina	0,9946	0,4289
Metionina	0,9867	0,4576
Isoleucina	0,9709	0,7014
Leucina	0,9617	0,7360
Fenilalanina	0,9931	0,4305
Lisina	0,9977	0,2505

El parámetro R^2 evalúa la linealidad del método, es decir, la correlación entre la concentración del analito ($\mu\text{g/g}$) y la respuesta del detector (área del pico cromatográfico). En métodos cuantitativos validados, un valor de $R^2 \geq 0,990$ se considera adecuado (87,88). En este análisis, la mayoría de los aminoácidos evaluados presentaron un R^2 superior a 0,98, lo que indica un ajuste lineal aceptable a excelente.

Entre los aminoácidos con mejor comportamiento lineal destacan: Glicina ($R^2 = 0,9963$), Valina ($R^2 = 0,9946$), Alanina ($R^2 = 0,9932$), Ac. aspártico ($R^2 = 0,9925$) y Fenilalanina ($R^2 = 0,9931$). Estos resultados reflejan una alta reproducibilidad del método para estos analitos, lo que sugiere una derivatización eficiente, buena estabilidad y una señal cromatográfica consistente.

Por otro lado, se observa que la lisina presentó un R^2 de 0,9053, lo que representa el valor más bajo entre los compuestos evaluados. Este valor podría estar asociado a problemas durante el proceso de derivatización, a una baja sensibilidad del detector para este compuesto o a interferencias cromatográficas.

Respecto a la pendiente (m), este parámetro refleja la sensibilidad del método, es decir, la capacidad del sistema RP-HPLC para detectar cambios en la concentración del analito. Una pendiente más alta sugiere una mayor respuesta del detector por unidad de concentración (87,88). Los aminoácidos con mayor pendiente fueron: Leucina ($m = 0,7360$), Serina ($m = 0,7319$), Isoleucina ($m = 0,7014$) y Treonina ($m = 0,6351$). Con estos resultados se manifiesta una respuesta favorable del sistema cromatográfico para

los compuestos, posiblemente debido a una buena eficiencia en la separación y una derivatización más efectiva.

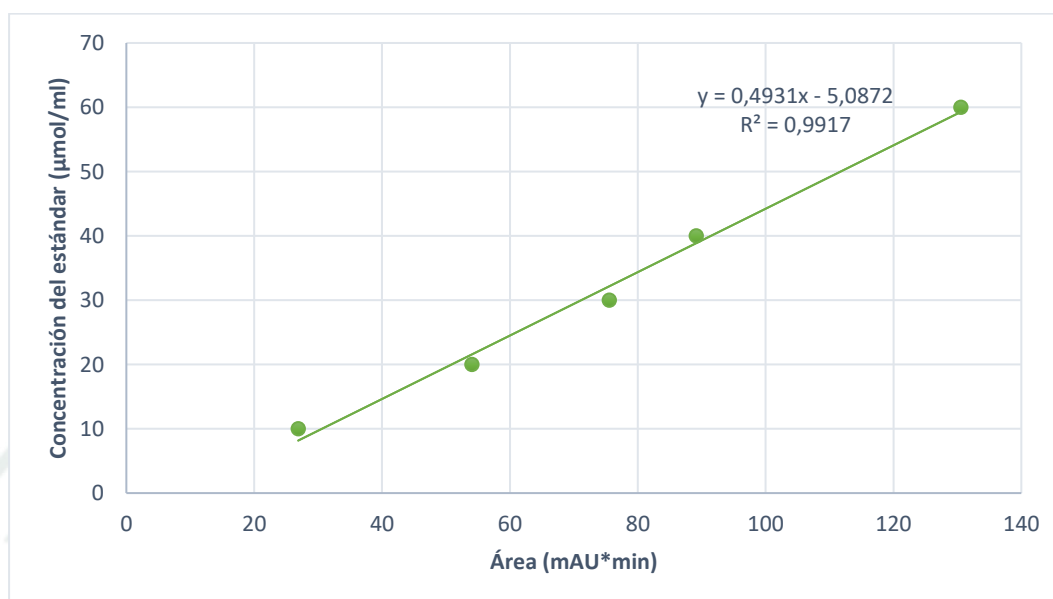
En contraste, lisina ($m = 0,2505$) y alanina ($m = 0,2503$) presentan pendientes bajas, lo que podría reflejar menor sensibilidad en su cuantificación y, en consecuencia, una mayor dificultad para detectar bajas concentraciones con exactitud (87,88). Sin embargo, este resultado es coherente con lo reportado en la bibliografía, donde se especifica que algunos aminoácidos, entre ellos lisina y alanina, poseen una menor eficiencia de cuantificación en sistemas basados en derivatización previa (89,90). Esta diferencia de sensibilidad resulta relevante en futuras aplicaciones, puesto que afecta de manera directa los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de estos aminoácidos (91).

En conjunto, los resultados de la Tabla 10 permiten inferir que el método RP-HPLC validado presenta una buena linealidad y sensibilidad para la mayoría de los aminoácidos analizados, cumpliendo con los estándares generalmente aceptados para métodos cromatográficos aplicados a compuestos nitrogenados. La baja linealidad observada en lisina y alanina justifica una revisión metodológica específica para cada uno de los analitos.

Para la elaboración de la curva de calibración de cada uno de los aminoácidos, se utilizaron las concentraciones conocidas del estándar y sus respectivas áreas del pico, detectadas por el equipo de RP-HPLC. En estos gráficos, el eje X representa el área de los picos cromatográficos, expresada en unidades de miliabsorbancia por minuto ($\text{mAU} \cdot \text{min}$); mientras que el eje Y indica la concentración del estándar inyectado, en unidades de micromoles/ml ($\mu\text{mol/ml}$).

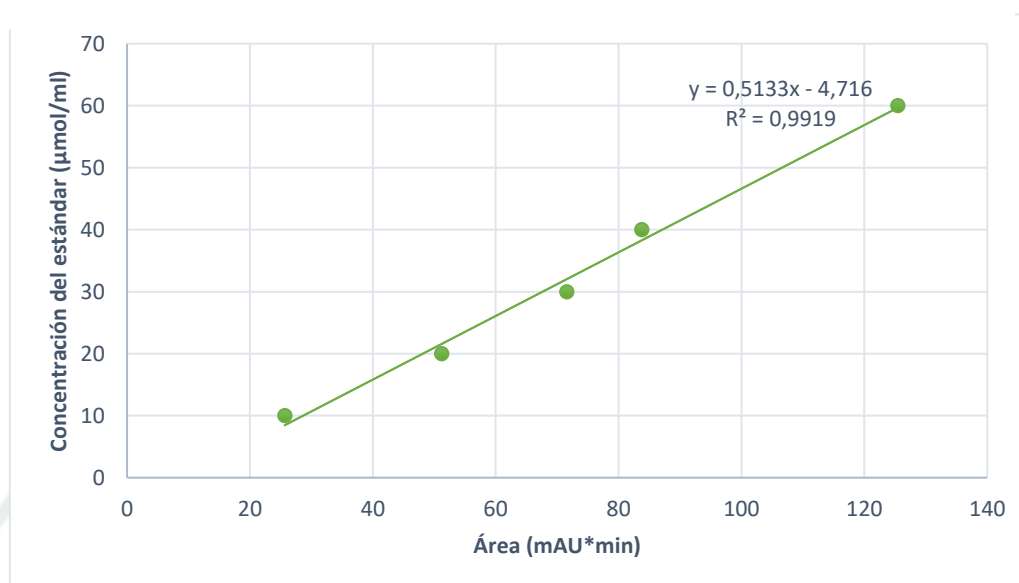
En la Figura 8, se observa la curva de calibración del aminoácido arginina. Se observa una relación lineal directa entre la señal cromatográfica (área) y la concentración del analito, lo cual se refleja en la alta correlación obtenida, con un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0,9917. Este valor indica que el 99.17 % de la variación en el área de los picos se puede explicar con los cambios de concentración utilizados, lo que demuestra un excelente ajuste al modelo lineal.

Figura 8. Curva de calibración Arginina



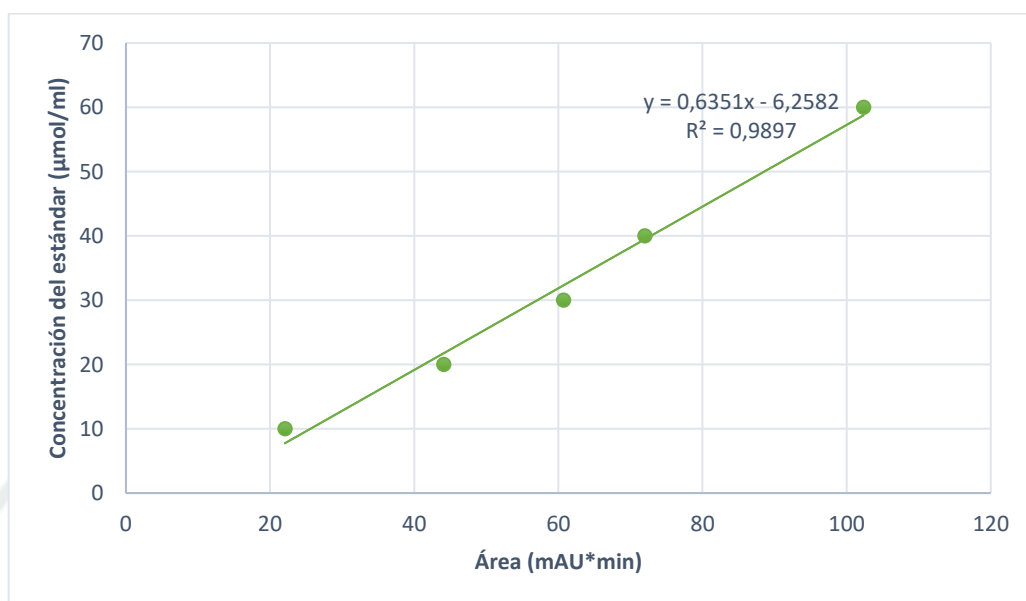
En la Figura 9, el valor de $R^2 = 0,9919$ indica que el modelo lineal explica el 99.19 % de la variabilidad en los datos experimentales, lo que evidencia una alta linealidad del método analítico en el rango de concentraciones evaluado. La pendiente, con un valor de 0,5133, representa la sensibilidad del detector frente a la concentración de histidina, mientras que el intercepto negativo (-4,716) es bajo y no afecta de manera significativa la confiabilidad del modelo. Estos resultados respaldan la validez del método de cuantificación de histidina por RP-HPLC, demostrando que es altamente confiable y repetible para su aplicación en muestras reales.

Figura 9. Curva de calibración Histidina



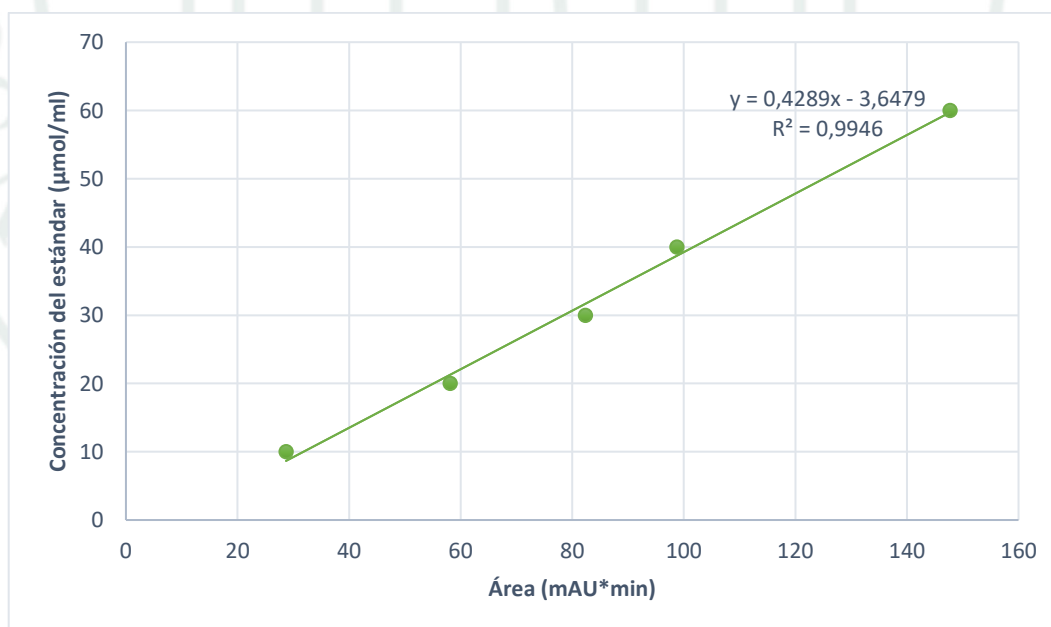
En la Figura 10, correspondiente al aminoácido Treonina, podemos observar que el valor de R^2 fue de 0,9897, lo que indica que la relación entre el área del pico y la concentración es altamente lineal, con un ajuste del 98,97 % de los datos experimentales al modelo lineal. Este nivel de correlación demuestra una muy buena capacidad del método para cuantificar treonina dentro del rango evaluado. La pendiente obtenida ($m=0,6351$) refleja una respuesta proporcional del detector frente a aumentos en la concentración, lo que sugiere una buena sensibilidad del método para la detección de este analito. El intercepto negativo (-6,2582) es un valor bajo, que no interfiere significativamente en la interpretación del modelo, ni la precisión de la cuantificación (87).

Figura 10. Curva de calibración Treonina



El alto valor de $R^2 = 0,9946$ obtenida para la Valina (Figura 11) indica una excelente correlación lineal, mostrando que el método es muy confiable para cuantificar la valina en el rango de concentraciones evaluado. La pendiente 0,4289 refleja la sensibilidad del método a los cambios en la concentración de valina

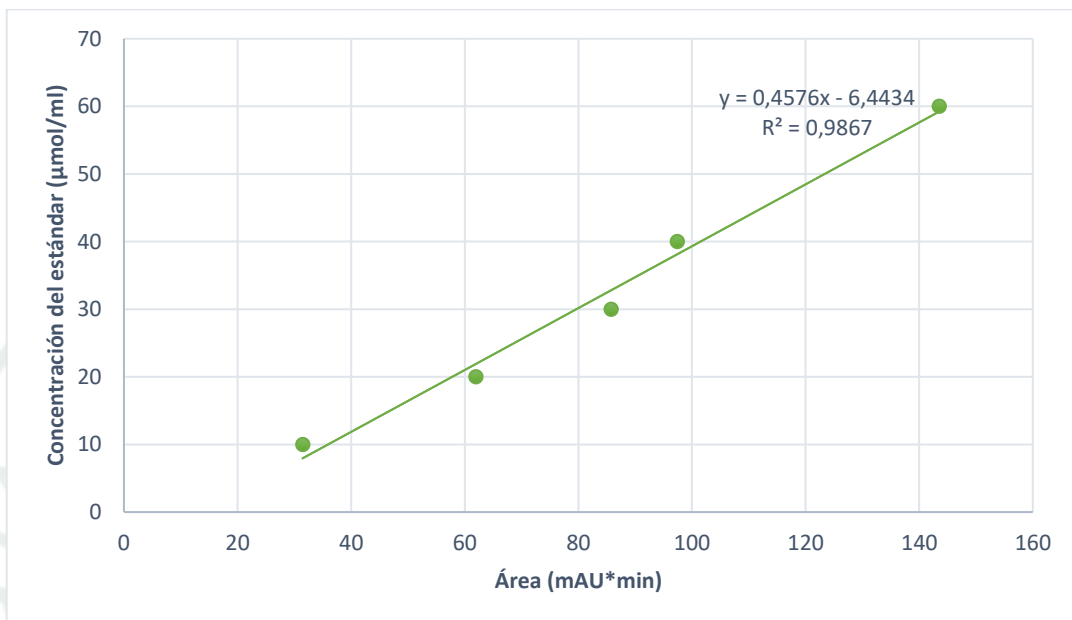
Figura 11. Curva de Calibración Valina



En el caso de la Metionina, demostrado en la Figura 12, la línea de calibración obtenida se describe mediante la ecuación $y = 0,4576x - 6,4434$, , presentando un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9867$. Este elevado valor de R^2 refleja una fuerte correlación lineal

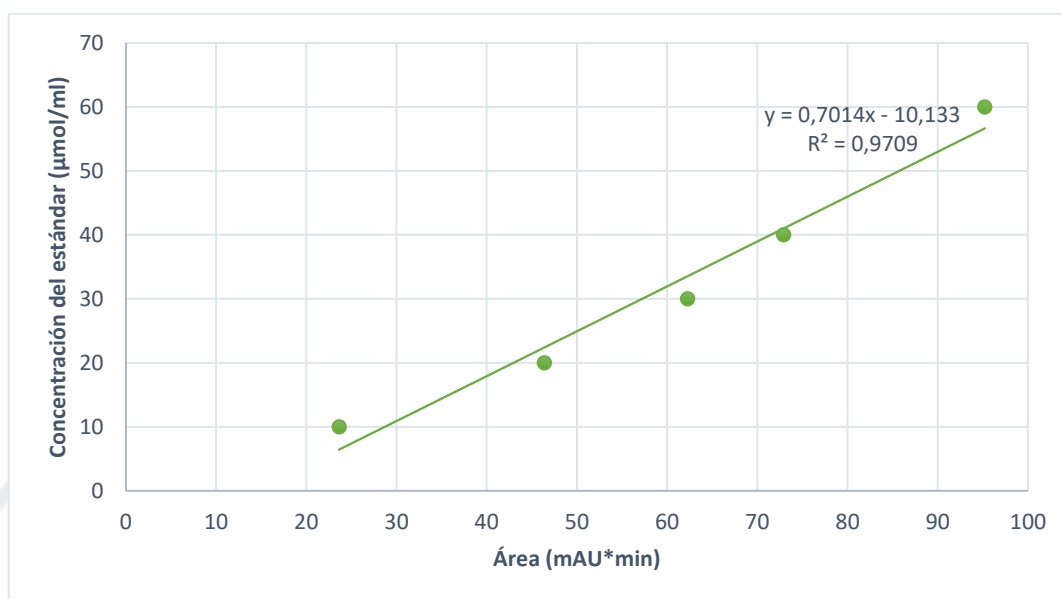
entre las variables, lo cual indica que el método utilizado es adecuado y confiable para la cuantificación de la metionina en el rango de concentración evaluado.

Figura 12. Curva de Calibración Metionina



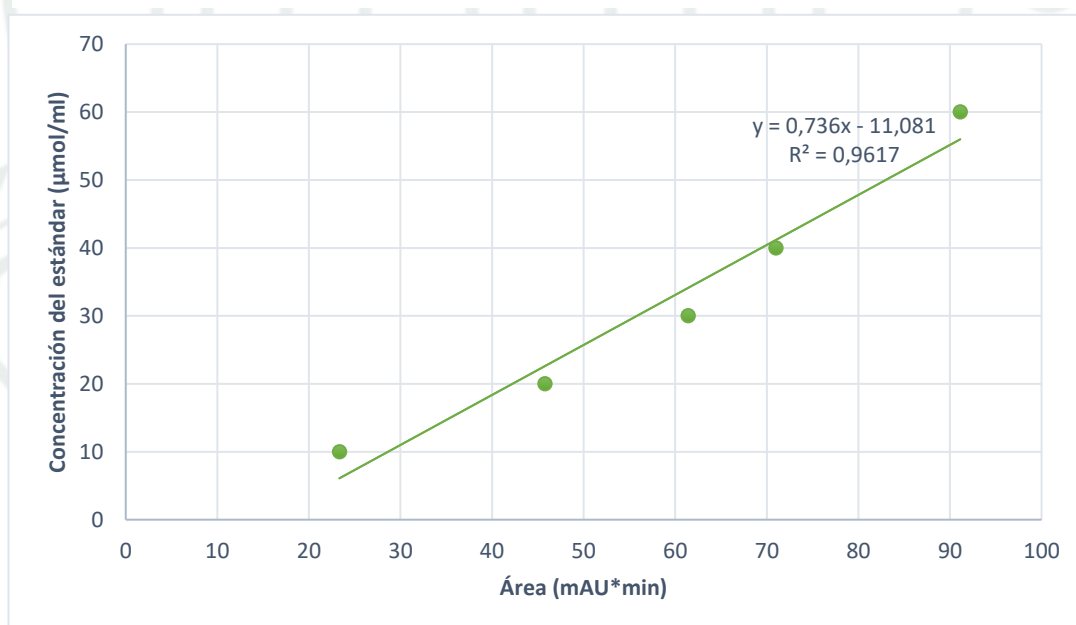
En la Figura 13, se muestra la curva de calibración para la Isoleucina, cuyo valor de $R^2 = 0,9709$, indica una correlación lineal bastante buena, aunque un poco menor que en los otros aminoácidos ya expuestos. Esto puede sugerir que, si bien el método es adecuado para cuantificar isoleucina, este puede presentar una mayor variabilidad en la respuesta analítica obtenida (88).

Figura 13. Curva de calibración de Isoleucina



En la Figura 14, se puede observar un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9617$ para Leucina, lo cual sugiere una buena correlación lineal entre la concentración y la respuesta instrumental. La pendiente de 0,736 refleja una sensibilidad adecuada del método para la detección de leucina.

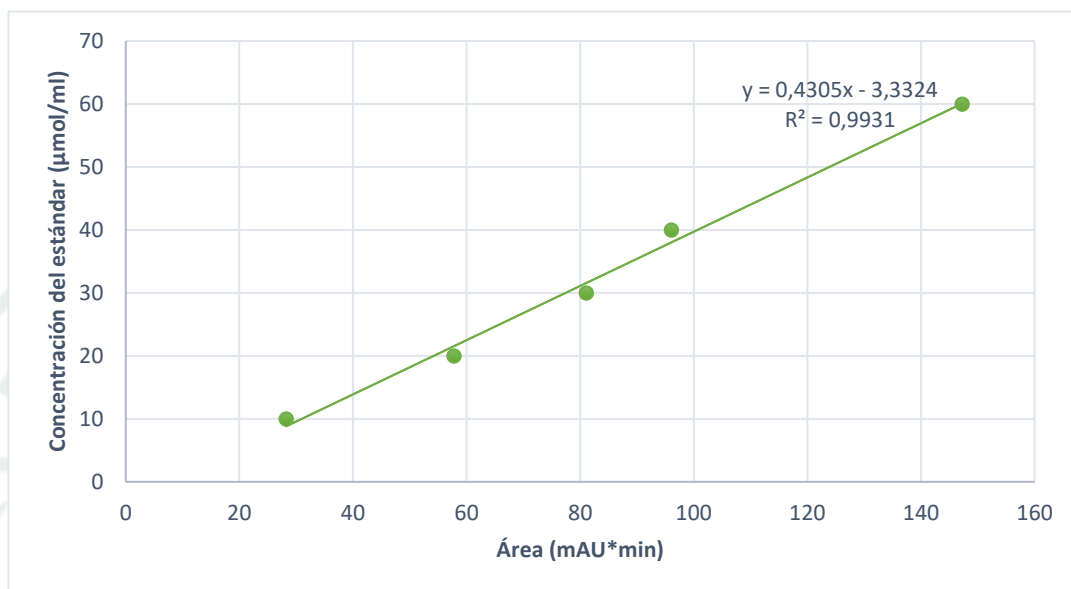
Figura 14. Curva de Calibración de Leucina



La recta de calibración obtenida para la fenilalanina, representada en la Figura 15, tiene la siguiente ecuación $y = 0,4305x - 3,3324$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9931$. Este alto valor de R^2 evidencia una excelente correlación lineal entre el área

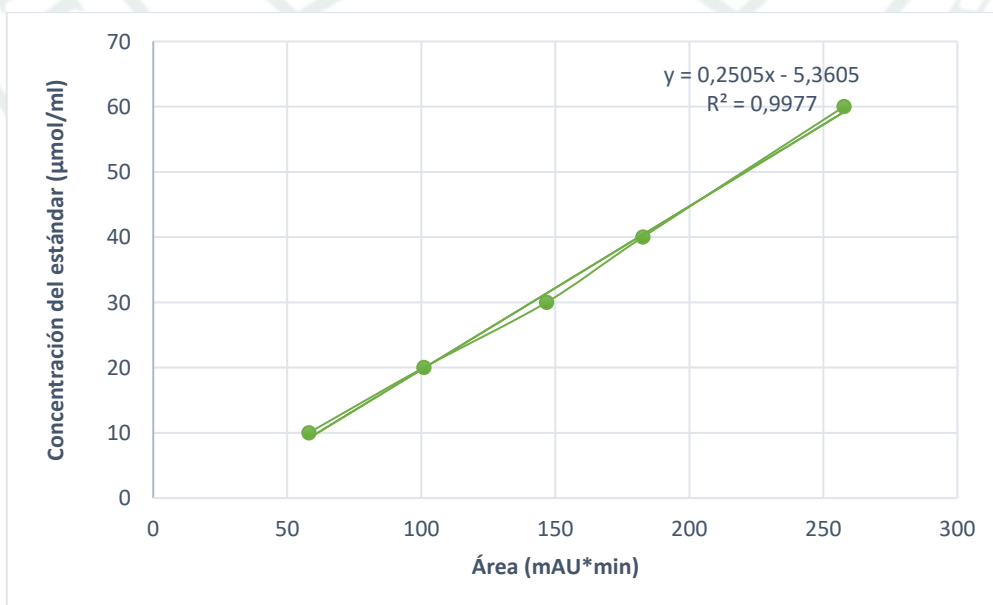
del pico y la concentración, lo que confirma la alta confiabilidad del método para la cuantificación de este aminoácido.

Figura 15. Curva de Calibración de Fenilalanina



Finalmente, en la Figura 16 se observa la curva de calibración correspondiente a la lisina. La ecuación que describe su línea de calibración es $y = 0,2505x + 5,3605$, con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0,9977$. Este valor indica una correlación lineal aceptable entre la señal del detector y la concentración, aunque la pendiente inferior a la de otros aminoácidos analizados puede indicar una menor exactitud para cuantificar concentraciones bajas (91).

Figura 16, Curva de calibración de Lisina



3.1.2. Precisión y reproductividad

Para determinar la precisión intermedia y la reproducibilidad del método de cuantificación de aminoácidos por RP-HPLC, se realizaron dos corridas analíticas con réplicas a cinco niveles de concentración. Sin embargo, se seleccionó la concentración de 30 $\mu\text{mol/mL}$ como referencia para esta evaluación, ya que fue el punto en el que se observó una mayor estabilidad de las mediciones y los valores más bajos de %RSD, lo que permitió una comparación más homogénea entre compuestos.

En la Tabla 11 se pueden observar los valores de media aritmética ($\bar{x}$), desviación estándar (σ), y desviación estándar relativa (%RSD) para las corridas realizadas, a un valor referencial de 30 $\mu\text{mol/mL}$.

Tabla 11. Desviación estándar relativa (%RSD) de las réplicas a 30 $\mu\text{mol/mL}$

Aminoácido	R1 (Área)	R2 (Área)	$\bar{x}$	σ	%RSD
Arginina	75,60	72,59	74,09	2,13	2,88%
Ác. Aspártico	66,42	63,78	65,10	1,87	2,87%
Ác. Glutámico	70,31	68,11	69,21	1,56	2,25%
Serina	40,20	37,70	38,95	1,77	4,54%
Glicina	46,67	45,67	46,17	0,71	1,53%
Histidina	70,50	67,86	69,18	1,87	2,70%
Treonina	60,65	58,13	59,39	1,80	2,99%
Alanina	145,23	142,16	143,69	2,17	1,51%
Prolina	33,74	32,92	33,33	0,58	1,74%
Tirosina	86,61	84,82	85,71	1,27	1,48%
Valina	82,10	80,86	81,48	0,88	1,07%
Metionina	85,15	80,62	82,89	3,21	3,87%
Isoleucina	61,88	60,65	61,26	0,87	1,42%
Leucina	61,25	59,28	60,26	1,40	2,32%
Fenilalanina	81,97	80,05	81,01	1,36	1,68%
Lisina	75,66	86,39	81,03	7,59	9,36%

Los valores de %RSD para 15 de los 16 aminoácidos evaluados fueron inferiores al 5%, lo cual cumple con los criterios establecidos por la ICH Q2(R1), que sugiere que para métodos cuantitativos, un valor de %RSD inferior al 5% se considera indicativo de una buena repetibilidad del sistema analítico.

Solo lisina presentó un valor de %RSD de 9,36%, posiblemente asociado a una mayor variabilidad instrumental o una menor estabilidad en el tiempo de retención, lo que debe considerarse en evaluaciones futuras.

Este resultado está alineado con lo reportado previamente (91), donde se indica que en la validación de métodos bioanalíticos, valores de %RSD menores al 15% son generalmente aceptables, especialmente en análisis por cromatografía líquida

3.1.3. Identificación de los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ)

Los valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se calcularon como parte de la validación del método cromatográfico utilizado para la determinación de aminoácidos esenciales mediante RP-HPLC.

En la Tabla 12 vemos los valores de límite de detección y cuantificación, los cuales fueron obtenidos utilizando las fórmulas establecidas por la guía ICH Q2(R1) (87) como se indicó en el capítulo II:

$$LOD = 3,3 \frac{\sigma}{S}$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{S}$$

Donde: σ = desviación estándar de la respuesta
 S = Pendiente de la curva de calibración

Tabla 12. Límites de Detección (LOD) y Cuantificación (LOQ) para Aminoácidos Esenciales determinados por RP-HPLC

Aminoácido	LOD	LOQ
Arginina	9,27	28,09
Histidina	8,40	25,46
Treonina	4,93	14,93
Valina	10,89	32,99
Metionina	13,22	40,06
Isoleucina	5,14	15,57
Leucina	4,79	14,52
Fenilalanina	12,19	36,93
Lisina	13,11	39,72

Se eligió el nivel de 10 μ L para el cálculo de σ debido a que representa el límite inferior del rango analítico, lo cual permite una estimación más conservadora del LOD y LOQ, de acuerdo con lo recomendado por la literatura especializada (92). Al trabajar con datos

de baja concentración, se asegura que los límites reportados realmente representen la capacidad del método para detectar o cuantificar analitos cercanos al mínimo detectable.

Los LOD obtenidos varían entre 4,79 $\mu\text{mol/mL}$ (Leucina) y 13,22 $\mu\text{mol/mL}$ (Metionina). Del mismo modo, los LOQ fluctúan entre 14,52 $\mu\text{mol/mL}$ y 40,06 $\mu\text{mol/mL}$, siendo Lisina, Fenilalanina y Metionina los compuestos con mayores límites.

Estos resultados indican que el método presenta una sensibilidad aceptable para todos los aminoácidos evaluados, permitiendo su detección dentro del rango de trabajo experimentalmente definido.

De acuerdo con criterios generalmente aceptados en la validación de métodos (ICH Q2(R1), EMA, FDA), un método es considerado suficientemente sensible cuando el LOD y el LOQ están por debajo o dentro del rango de concentración analizado. En este caso, todos los LOQ se encuentran dentro del intervalo experimental (10–60 $\mu\text{mol/mL}$), lo que indica una correcta capacidad cuantitativa del método para los fines del análisis.

Adicionalmente, los valores son consistentes con lo reportado en otros estudios de cuantificación de aminoácidos por HPLC, en los que los LOQ típicamente oscilan entre 10 y 40 $\mu\text{mol/mL}$ dependiendo del sistema de detección y el derivatizante empleado (89,90).

3.2. Perfil aminoacídico por especie y tamaño larval

3.2.1. Resultados de composición aminoacídica en *Hermetia illucens*

El análisis del perfil aminoacídico de las larvas de *Hermetia illucens* mostró variaciones en la concentración (g/100g MS) de los aminoácidos evaluados según el tamaño larval (HP: pequeña, HM: mediana, HG: grande). En general, la prolina y la fenilalanina presentaron las mayores concentraciones en todos los tamaños, destacando la prolina con valores de 13,894 g/100g MS en HP, 15,200 g/100g MS en HM y 17,370 g/100g MS en HG, y la fenilalanina con 1,722 g/100g MS en HP, 22,599 g/100g MS en HM y 22,191 g/100g MS en HG.

En contraste, aminoácidos como la alanina (0,094 g/100g MS en HP; 0,280 g/100g MS en HM; 0,020 g/100g MS en HG) y la isoleucina (0,795 g/100g MS en HP; 0,098 g/100g MS en HM; 0,088 g/100g MS en HG) presentaron concentraciones bajas, que disminuyeron en relación indirecta con el tamaño de la larva evaluada.

En la Tabla 13 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de aminoácidos (en g/100g MS) en los tres tamaños de larvas de *Hermetia illucens*.

Tabla 13. Concentración de aminoácidos (g/100g MS) en larvas de *Hermetia illucens* de diferente tamaño.

Aminoácido	HP	HM	HG
Arginina	1,917	1,514	1,684
Ácido aspártico	1,725	1,017	0,988
Ácido glutámico	0,838	0,375	0,265
Serina	0,851	1,118	0,984
Glicina	0,748	1,074	0,118
Histidina	0,429	0,186	0,429
Treonina	0,893	0,250	1,321
Alanina	0,094	0,280	0,020
Prolina	13,894	15,200	17,370
Tirosina	1,274	0,664	0,163
Valina	0,431	0,132	0,605
Metionina	1,165	0,515	0,179
Isoleucina	0,795	0,098	0,088
Leucina	0,461	0,285	0,333
Fenilalanina	1,722	22,599	22,191
Lisina	0,415	2,286	0,602

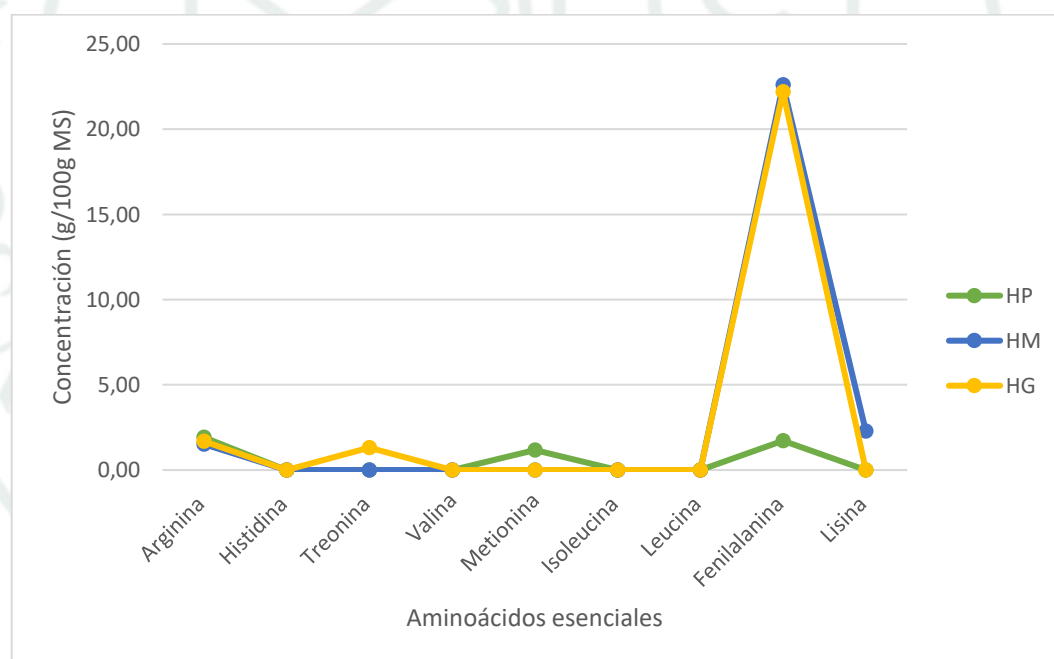
Se observó que algunas concentraciones variaron de manera marcada entre tamaños, como en el caso de la glicina, que pasó de 0,748 g/100g MS en HP a 1,074 g/100g MS en HM y descendió a 0,118 g/100g MS en HG, o la treonina, que mostró un incremento notable en HG (1,321 g/100g MS) respecto a HM (0,250 g/100g MS).

Estos resultados evidencian que la composición aminoacídica de *H. illucens* no se mantiene constante a lo largo de los tamaños larvales, mostrando un patrón diferencial en la concentración de aminoácidos esenciales y no esenciales (32), lo que podría influir en su valor nutricional para su aplicación como sustratos proteicos en la alimentación animal.

Respecto a la variabilidad en la concentración de aminoácidos esenciales según el tamaño larval, se observa que la concentración de aminoácidos esenciales no es una propiedad estática durante el desarrollo de la larva de *Hermetia illucens*, sino que fluctúa significativamente durante su desarrollo (32). En la Figura 17 se puede observar la variabilidad de los aminoácidos esenciales en durante las tres etapas de desarrollo

evaluadas. El aspecto más resaltante del gráfico es el incremento exponencial de la fenilalanina en los tamaños de larva median (HM) y larva grande (HG), que superan los valores de 20,00 g/100g con respecto a la etapa de larva pequeña (HP), cuyo valor se encuentra por debajo de los 2,00 g/100g. Por otro lado, la metionina sufrió un pico de concentración exclusivamente en el tamaño de larva pequeña (HP), disminuyendo notoriamente en HM y HG. Estas tendencias consisten con lo reportado por la bibliografía, donde se indica que la composición nutricional de la mosca soldado negra varía a lo largo de su ciclo biológico, siendo así que, la composición nutricional de la larva puede variar según el momento de cosecha, donde algunos nutrientes o aminoácidos pueden servir para realizar un crecimiento acelerado de tejidos o realizar funciones metabólicas en etapas tempranas, mientras que otros aminoácidos se acumulan en etapas avanzadas (como puede ser el caso de la fenilalanina) para servir como una reserva pre-pupa (32,33,93).

Figura 17. Concentración de aminoácidos esenciales por tamaño de *Hermetia illucens*



Esta variabilidad sugiere que el perfil aminoacídico de *Hermetia illucens* está estrechamente vinculado a las demandas metabólicas propias de cada etapa larval. En fases tempranas, la larva podría priorizar aminoácidos involucrados en la síntesis rápida de tejidos y en la acumulación de reservas, mientras que, en etapas avanzadas, las concentraciones reflejan una reestructuración metabólica orientada a la transformación morfológica. Desde el punto de vista nutricional, este patrón implica que el

aprovechamiento de la biomasa larval para formulaciones alimenticias podría optimizarse seleccionando tamaños específicos según el requerimiento proteico y el balance de aminoácidos deseado (32,93,94).

3.2.2. Resultados de composición aminoacídica en *Tenebrio molitor*

Respecto a la composición aminoacídica de *Tenebrio molitor*, se observó que la prolina presentó las concentraciones más elevadas en los tres tamaños evaluados, con valores de 18,895 g/100g para el tenebrio pequeño (TP), 16,618 g/100g para el mediano (TM) y 16,670 g/100g para el grande (TG), lo que sugiere que este aminoácido constituye un componente estructural y metabólico relevante en la especie (38). La metionina también presentó valores considerablemente altos en comparación con el resto de los aminoácidos, con 15,247 g/100g en TP, 14,990 g/100g en TM y 15,605 g/100g en TG, indicando que su alto valor se puede deber a su papel esencial en procesos de síntesis de azufre y producción proteica (55).

En el grupo de aminoácidos con concentraciones intermedias se ubicaron la serina, con 1,151 g/100g en TP, 1,614 g/100g en TM y 1,252 g/100g en TG; la arginina, con valores entre 1,267 y 1,541 g/100g; el ácido aspártico con 1,048 g/100g en TP, 0,868 g/100g en TM y 0,909 g/100g en TG; la tirosina, entre 1,558 y 1,805 g/100g; y la fenilalanina, cuyo valor más alto (1,398 g/100g) se registró en TM, mientras que el menor (0,965 g/100g) se observó en TG. Asimismo, la isoleucina presentó valores homogéneos, entre 1,549 y 1,669 g/100g. En contraste, el ácido glutámico presentó variaciones marcadas, iniciando con 0,959 g/100g en TP, para disminuir hasta 0,662 g/100g en TM y aumentar a una concentración de 1,114 g/100g en TG. Entre los aminoácidos con concentraciones bajas se encuentran la treonina (0,304 – 0,420 g/100g), alanina (0,320 – 0,414 g/100g), glicina (0,315 – 0,444 g/100g) y leucina (0,216 – 0,452 g/100g). La histidina no fue detectada en ninguno de los tamaños evaluados, lo que puede estar relacionado con las limitaciones del método analítico o una concentración inferior al límite de detección. La valina (0,227 – 0,290 g/100g) presentó un valor bajo pero homogéneo entre los distintos tamaños evaluados. Finalmente, la lisina registró valores bajos en todos los tamaños (0,219 – 0,283 g/100g), siendo ligeramente mayor en TP.

En la Tabla 14 se pueden visualizar todos los resultados obtenidos para la evaluación de las harinas de *Tenebrio molitor*.

Tabla 14. Concentración de aminoácidos (g/100g MS) en larvas de *Tenebrio molitor* de diferente tamaño.

Aminoácido	TP	TM	TG
Arginina	1,541	1,267	1,370
Ácido aspártico	1,048	0,868	0,909
Ácido glutámico	0,959	0,662	1,114
Serina	1,151	1,614	1,252
Glicina	0,315	0,444	0,428
Histidina	ND	ND	ND
Treonina	0,339	0,420	0,304
Alanina	0,320	0,414	0,401
Prolina	18,985	16,618	16,670
Tirosina	1,805	1,558	1,653
Valina	0,255	0,227	0,290
Metionina	15,247	14,990	15,605
Isoleucina	1,669	1,549	1,607
Leucina	0,452	0,354	0,216
Fenilalanina	1,125	1,398	0,965
Lisina	0,383	0,307	0,219

ND: No detectable

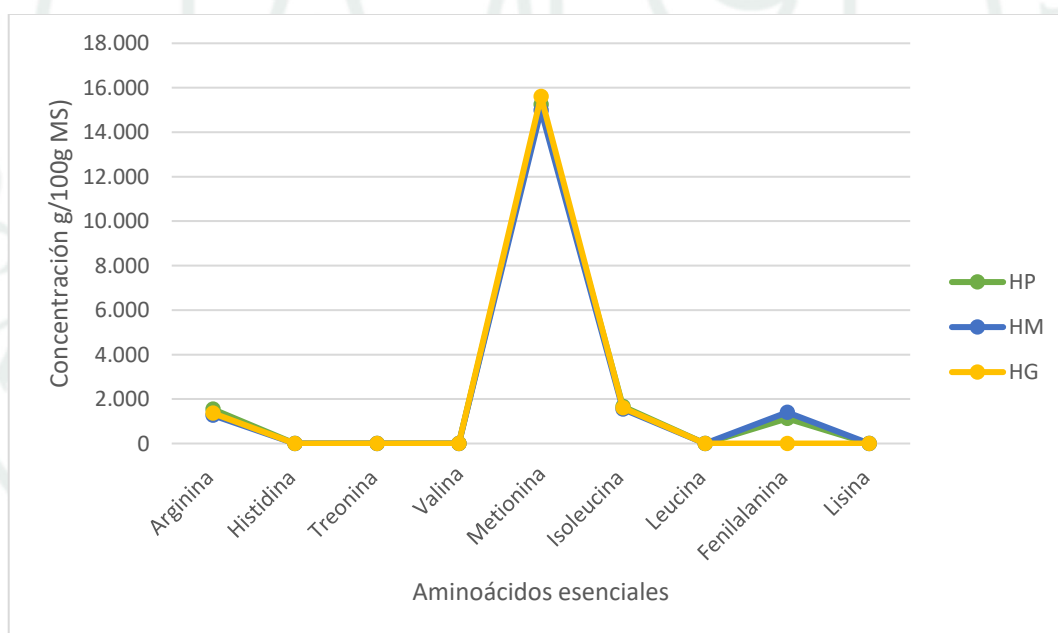
Con respecto a la histidina, la ausencia de este aminoácido en las muestras de *Tenebrio molitor*, puede deberse a diversos factores. En primer lugar, la histidina es un aminoácido inestable frente a la hidrólisis ácida, por lo cual, durante esta etapa del proceso pudo haber sufrido una degradación a límites por debajo de los detectables en el procedimiento de RP-HPLC. En segundo lugar, se ha reportado que el grupo imidazol presente en la estructura de la histidina posee una reactividad baja con los agentes derivatizantes, causando picos de baja resolución. Para finalizar, la ausencia de histidina también puede deberse gracias a las características propias de la especie, diversos autores han reportado niveles bajos de histidina en las larvas de *Tenebrio molitor*, lo cual, sumado a la posible degradación en la hidrólisis y baja reacción en derivatización de las muestras, puede haber impedido la detección de este aminoácido por el equipo cromatográfico (95–97).

En la Figura 18 se puede observar la variabilidad entre los tres tratamientos (HP, HM y HG) de *Tenebrio molitor*, y su respuesta en concentración (g/100g MS) de aminoácidos esenciales. En términos generales se puede observar que no existe una variación significativa entre tratamientos y el resultado de la concentración de aminoácidos. La

alta concentración de la metionina, que supera significativamente al resto de los aminoácidos, concuerda con la literatura consultada, donde se establece que el *Tenebrio molitor* contiene un contenido relevante en aminoácidos azufrados (9,35). En contraste, aminoácidos como la treonina, valina, lisina y leucina se encuentran con concentraciones muy cercanas al límite de detección, lo cual puede ser atribuido tanto a la variación natural de la composición del insecto, como a causas relacionadas a la metodología utilizada (eficiencia de la hidrólisis, derivatización, o sensibilidad instrumental) (59,82).

La similitud observada entre los perfiles de TP, TM y TG sugiere que los diferentes tamaños evaluados no producen alteraciones en la composición aminoacídica del *Tenebrio molitor*, lo cual se muestra acorde a las investigaciones consultadas, las cuales reportan una composición estable al mantener las mismas condiciones de crianza en la etapa larval (45).

Figura 18. Concentración de aminoácidos esenciales por tamaño larval en *Tenebrio molitor*



3.3. Evaluación de especies en el perfil aminoacídico

3.3.1. Efecto del tamaño larval en la concentración de aminoácidos

Para evaluar el efecto del tamaño larval sobre la concentración de aminoácidos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA one-way), considerando las tres categorías de tamaños (Pequeña, mediana y grande) para ambas especies evaluadas. Los resultados de este ANOVA se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis de varianza para el efecto de tamaño larval sobre la concentración de aminoácidos

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F	p-valor
Tamaño larval	2	0,00139	0,000694	2,7196	0,1443
Error (residual)	6	0,00153	0,000255		
Total corregido	11	0,00472			

El análisis de varianza mostró un valor de F bajo y un valor de p superior a 0,05, lo que indica que el factor evaluado no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de aminoácidos. Por lo tanto, se puede decir que; respecto al factor tamaño larval, el análisis de varianza indicó que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tamaños evaluados (Pequeñas, Medianas, Grandes).

Las medias obtenidas fueron de $0,1326 \pm 0,01845 \mu\text{mol/ml}$ para las larvas pequeñas, $0,10641 \pm 0,02300 \mu\text{mol/ml}$ para las larvas medianas y $0,11701 \pm 0,01553 \mu\text{mol/ml}$ para las larvas grandes. Si bien no se halló significancia estadística, se observó una tendencia numérica en la que las larvas pequeñas presentaron valores promedio más elevados, seguidas de las grandes y, finalmente, las medianas. Es importante aclarar que, el análisis de varianza (ANOVA one-way) se realizó utilizando los valores obtenidos directamente del sistema RP-HPLC, expresados en $\mu\text{mol/ml}$. La posterior conversión de los resultados a g/100g de materia seca no modifica la significancia estadística ni las conclusiones del análisis.

Para finalizar esta sección, estos resultados sugieren que el tamaño larval, bajo las condiciones evaluadas, no constituye un factor determinante en la concentración aminoacídica, aunque la tendencia observada podría cobrar relevancia en investigaciones con un mayor tamaño muestral o diferentes condiciones experimentales.

3.3.2. Comparación global entre especies

La comparación del perfil aminoacídico promedio entre *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* revela diferencias marcadas. En la Tabla 16 se pueden observar las concentraciones obtenidas para cada uno de los aminoácidos evaluados para ambas especies (*Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*).

Tabla 16. Comparativa del perfil aminoacídico (g/100g MS) según especie y tamaño larval

Tamaño larval Aminoácido	Especie					
	<i>Hermetia illucens</i>			<i>Tenebrio molitor</i>		
	HP	HM	HG	TP	TM	TG
Arginina	1,917	1,514	1,684	1,541	1,267	1,370
Ácido aspártico	1,725	1,017	0,988	1,048	0,868	0,909
Ácido glutámico	0,838	0,375	0,265	0,959	0,662	1,114
Serina	0,851	1,118	0,984	1,151	1,614	1,252
Glicina	0,748	1,074	0,118	0,315	0,444	0,428
Histidina	0,429	0,186	0,429	ND	ND	ND
Treonina	0,893	0,250	1,321	0,339	0,420	0,304
Alanina	0,094	0,280	0,020	0,320	0,414	0,401
Prolina	13,894	15,200	17,370	18,985	16,618	16,670
Tirosina	1,274	0,664	0,163	1,805	1,558	1,653
Valina	0,431	0,132	0,605	0,255	0,227	0,290
Metionina	1,165	0,515	0,179	15,247	14,990	15,605
Isoleucina	0,795	0,098	0,088	1,669	1,549	1,607
Leucina	0,461	0,285	0,333	0,452	0,354	0,216
Fenilalanina	1,722	22,599	22,191	1,125	1,398	0,965
Lisina	0,415	2,286	0,602	0,383	0,307	0,219

ND: No detectable

La característica común más resaltante entre ambas especies es la prolina como el aminoácido con mayor concentración, con valores que oscilan entre 13,894 y 17,370 g/100g en *H. illucens* y entre 16,618 y 18,985 g/100g en *T. molitor*, lo que sugiere un papel estructural relevante en proteínas relacionadas con la cutícula y el exoesqueleto (35).

Sin embargo, se observan divergencias notables en otros aminoácidos. La metionina destaca especialmente en *T. molitor*, con valores superiores a 14,900 g/100g en todos los tamaños, mientras que en *H. illucens* las concentraciones fueron sustancialmente menores (0,179 – 1,165 g/100g). Este hallazgo es relevante desde el punto de vista nutricional, dado que la metionina es un aminoácido esencial limitante en muchas dietas animales.

En el caso de la fenilalanina, *H. illucens* presentó un comportamiento atípico: mientras que en la mayoría de tamaños su concentración se mantuvo en el rango de 1,722 g/100g

(HP), los tamaños medianos y grandes (HM y HG) registraron valores muy elevados (22,599 y 22,191 g/100g, respectivamente), superando ampliamente a *T. molitor* (0,965 – 1,398 g/100g). Esto podría responder a diferencias en rutas metabólicas o a una acumulación asociada a la etapa de desarrollo larval.

La glicina mostró un patrón inverso entre especies: *H. illucens* tuvo valores muy altos en larvas medianas (1,074 g/100g) y bajas en larvas grandes (0,118 g/100g), mientras que en *T. molitor* la variabilidad fue menor (0,315 – 0,444 g/100g). Por su parte, la serina fue más abundante en *T. molitor* (1,252 – 1,614 g/100g) que en *H. illucens* (0,851 – 1,118 g/100g), lo que puede estar relacionado con su participación en rutas metabólicas vinculadas al crecimiento y a la síntesis de proteínas estructurales.

Otros aminoácidos como la lisina, la isoleucina y la valina también presentaron diferencias de especie. La lisina alcanzó un pico en *H. illucens* mediana (2,286 g/100g), mientras que en *T. molitor* se mantuvo en valores bajos (0,219 – 0,383 g/100g). La isoleucina fue más alta en *T. molitor* (1,549 – 1,669 g/100g) que en *H. illucens* (0,088 – 0,795 g/100g), mientras que la valina se presentó en rangos similares, pero ligeramente superiores en *H. illucens*.

Un aspecto llamativo es la ausencia total de histidina en *T. molitor*, mientras que en *H. illucens* estuvo presente en bajas concentraciones (0,186 – 0,429 g/100g). Esto podría deberse a diferencias en la disponibilidad dietética durante la cría, a la degradación del aminoácido en procesos vinculados al procesamiento de las larvas, o a las bajas concentraciones del aminoácido, características de la especie (9).

Se evidencia que, aunque ambas especies comparten una base común en su perfil aminoacídico, *T. molitor* aporta mayores concentraciones de aminoácidos azufrados como la metionina e isoleucina, mientras que *H. illucens* destaca por sus picos de fenilalanina y lisina en determinados tamaños. Estas diferencias tienen implicancias directas en su uso como ingrediente proteico, ya que la elección de la especie podría orientarse según las necesidades específicas de aminoácidos esenciales en las dietas animales.

La Tabla 17 nos muestra la comparación de la media de los valores de aminoácidos esenciales obtenidos para la especie de *Hermetia illucens* en el presente estudio (en g aminoácido/100g de materia seca), y los resultados obtenidos en estudios recopilados en la literatura. Al comparar estos resultados, podemos observar que la Lisina presentó

un contenido idéntico al reportado por Lu et al (94). La mayoría de aminoácidos restantes se encuentra en concentraciones inferiores a los reportados por los autores. Se destaca el caso de la Fenilalanina, cuyo contenido supera considerablemente el reportado por Lu et al; esta diferencia podría atribuirse a las operaciones unitarias realizadas en el procesamiento de la muestra, o a la composición del sustrato utilizado en la alimentación de las larvas. Al realizar la comparación con Dalmoro et al (98), solo se pudieron comparar cinco aminoácidos, ya que el resto no fueron reportados por los autores, en el caso de metionina y lisina, las concentraciones resultan similares, aunque ligeramente inferiores; leucina, isoleucina y valina se encuentran en concentraciones considerablemente inferiores a los reportados en otros estudios.

Tabla 17. Comparación de la concentración aminoácidos esenciales (g/100g MS) en la harina de larva de *Hermetia illucens*

	Presente estudio. 2026	Lu et al. 2022 (94)	Dalmoro et al. 2023 (98)
Metionina	0,62	0,80	0,65
Lisina	1,10	1,10	1,25
Leucina	0,36	1,28	1,40
Isoleucina	0,33	0,93	0,80
Fenilalanina	15,50	1,64	NR
Treonina	0,82	0,78	NR
Arginina	1,54	1,99	NR
Valina	0,39	2,82	1,00
Histidina	0,35	1,30	NR

NR: No reportado

La Tabla 18 nos muestra la comparación de la media de los valores de aminoácidos esenciales obtenidos para la especie de *Tenebrio molitor* en este estudio (en g aminoácido/100g de materia seca), con los resultados obtenidos en diversos estudios recopilados en la literatura. Podemos observar que, también existen diferencias respecto a los estudios recopilados, aunque, en algunos casos, las concentraciones de algunos de los aminoácidos superan las reportadas por los autores. La metionina, isoleucina y arginina se encuentran en valores superiores a los reportados por los autores, aunque; en el caso de la metionina, el valor fue considerablemente mayor. La variación de concentración de este aminoácido puede estar relacionada al método analítico utilizado o a variaciones en la alimentación de las larvas de *T. molitor*. Por el contrario,

aminoácidos como lisina, leucina, treonina y valina fueron encontrados en concentraciones inferiores a las descritas en los estudios.

Tabla 18. Comparación de la concentración aminoácidos esenciales (g/100g MS) en la harina de larva de *Tenebrio molitor*

	Presente estudio. 2026	Kröncke & Benning 2023 (45)	Noyens et al. 2024 (99)	Silva et al. 2021 (100)	Van Peer et al. 2021 (101)
Metionina	15,28	0,60	0,58	0,68	0,50
Lisina	0,30	1,20	1,35	1,30	0,90
Leucina	0,34	1,35	1,33	1,41	1,30
Isoleucina	1,61	0,70	0,72	0,74	0,80
Fenilalanina	1,16	1,98	NR	NR	NR
Treonina	0,35	1,20	NR	0,79	0,8
Arginina	1,34	1,25	NR	NR	NR
Valina	0,26	0,55	NR	NR	NR

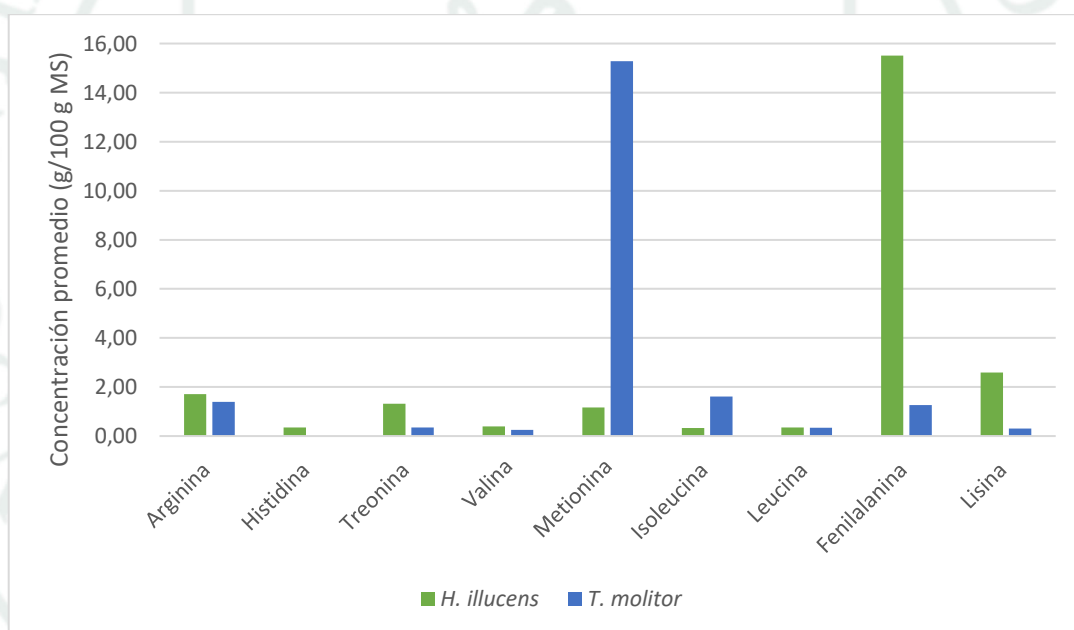
NR: No reportado

En base a las dos tablas presentadas, se puede mostrar que tanto *H. illucens* como *T.molitor* presentan un perfil aminoacídico equilibrado, con valores similares a los reportados por los autores. La mayoría de autores hizo énfasis en los aminoácidos metionina, lisina, leucina e isoleucina ya que resultan fundamentales en la alimentación animal (60,61). De estos aminoácidos, metionina se encuentra dentro, e incluso por encima de los valores detectados por los autores; mientras que, lisina e isoleucina varían su concentración entre ambas especies, encontrándose en valores mayores o inferiores a los reportados por los autores. La leucina, se encuentra, en ambas especies, en valores inferiores a los reportados por los autores. Toda esta comparación nos puede llevar a inferir que, si bien tanto *Hermetia illucens* como *Tenebrio molitor* presentan proteína de buena calidad, con alta capacidad de aprovechamiento en animales de producción; su reducida concentración en algunos de los aminoácidos limitantes sugiere que, por sí solas; pueden no resultar capaces para satisfacer las necesidades de las especies.

En la Figura 19 podemos observar una gráfica compativa sobre la variabilidad de los promedios de concentración aminoacídica en los aminoácidos esenciales calculados para ambas especies. Se puede observar que, si bien ambos aumentos de concentración

en metionina y fenilalanina, la concentración de ambos aminoácidos es significativamente diferente. Siendo la metionina el aminoácido más alto en *T. molitor*, y la fenilalanina el aminoácido mayor en *H. illucens*. Por otra parte, algunos de los aminoácidos con cambios significativos entre ambas especies fueron lisina, treonina e isoleucina. Lisina y treonina, aminoácidos vitales en la síntesis muscular, el crecimiento óseo, la salud intestinal y la respuesta inmunológica (60), alcanzaron niveles mayores en *Hermetia illucens*; mientras que la isoleucina, un aminoácido con funciones en reparación muscular y regulación energética (55), fue superior en *Tenebrio molitor*. El resto de aminoácidos (arginina, valina y leucina) se mantuvieron similares entre ambas especies. Destacar que, en el caso de la histidina, este aminoácido no pudo ser detectado en *T. molitor* y; así mismo, también mantuvo concentraciones bajas en *H. illucens*.

Figura 19. Comparativa de los promedios de concentración aminoacídica (g/100g MS) de *H. illucens* y *T. molitor*



El análisis de varianza de una vía (ANOVA one-way) evidenció diferencias significativas entre especies ($p = 0,03997$), indicando que la concentración promedio de aminoácidos esenciales difiere entre *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*. En términos generales, *Hermetia illucens* presentó un valor medio superior ($0,1307 \pm 0,0169$) respecto a *T. molitor* ($0,1066 \pm 0,0176$), lo que sugiere una mayor concentración promedio de aminoácidos esenciales en la primera especie. Esta diferencia, aunque numéricamente moderada, fue estadísticamente relevante, lo que respalda la existencia de una variabilidad interespecífica en el perfil aminoacídico.

En la Tabla 18 se puede observar el ANOVA efectuado para comparar el efecto de la especie. Es importante resaltar que, este análisis se realizó cuando los datos de concentración aún se encontraban en la unidad original que nos dio el equipo de RP-HPLC ($\mu\text{mol/ml}$). Sin embargo, la conversión de los valores a g/100g MS no afecta la significancia ni la conclusión de este análisis.

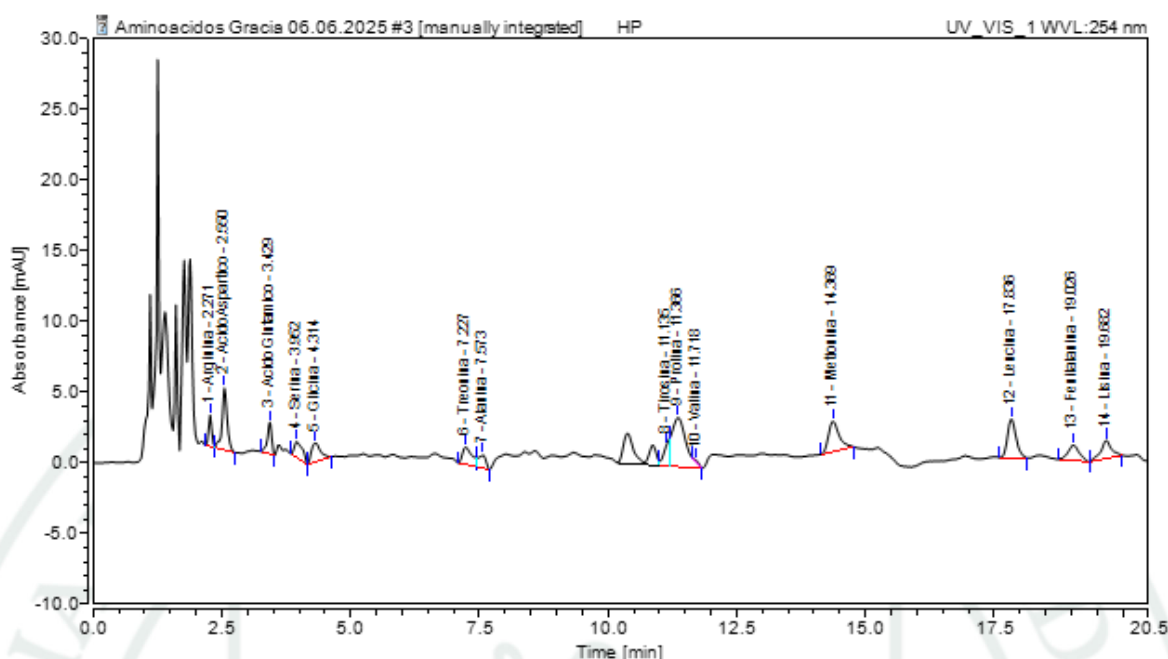
Tabla 19. Análisis de varianza para el efecto de la especie sobre la concentración de aminoácidos

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	F	p-valor
Especie	1	0,00174	0,000174	6,8268	0,03997
Error (residual)	6	0,00153	0,000255		
Total corregido	11	0,00472			

Desde una perspectiva biológica, esta diferencia significativa entre las concentraciones aminoacídicas de ambas especies podría relacionarse con diferencias metabólicas y fisiológicas entre ambas, así como con las características de su dieta y tasa de crecimiento. En términos de uso potencial en alimentación animal, la mayor concentración observada en *H. illucens* podría conferirle una ventaja como fuente proteica de alto valor biológico, especialmente en formulaciones donde la calidad del perfil de aminoácidos esenciales es un factor determinante. La elección entre ambas especies para su potencial uso en alimentación., debe basarse en la demanda específica de la dieta del animal.

En la Figura 20 se puede observar el cromatograma generado para las larvas de *Hermetia illucens* de tamaños entre 6,5 y 9,5 mm, correspondientes al grupo de larva de *H. illucens* pequeña (HP).

Figura 20. Cromatograma de muestra de larva de *Hermetia illucens* de 6,5 – 9,5 mm



Se puede observar que todos los aminoácidos se encuentran dentro del rango de retención establecido en la validación del método. Sin embargo, al tratar de exportarlos del software utilizado, se pudo observar que la mayoría presentaban problemas de resolución mostrando los picos de aminoácidos con muy baja intensidad en relación con las interferencias presentes. Este problema causó que en muchas ocasiones, los aminoácidos no puedan ser distinguidos en la gráfica. En el ejemplo de la Figura 20, se presenta el cromatograma más representativo de todas las corridas. Sin embargo, la figura solo reconoce 14 de los 16 aminoácidos identificados, omisiones que se repiten y aumentan en las corridas de las otras muestras. Debido a estas limitaciones técnicas, dichos cromatogramas no fueron utilizados para el análisis final de aminoácidos.

3.4. Discusión crítica de los resultados

3.4.1. Influencia de la especie y del tamaño larval en la concentración de aminoácidos

El análisis de varianza mostrado en la Tabla 18 indicó que la especie influye significativamente en la concentración promedio de aminoácidos esenciales ($F = 6,83$; $p = 0,03997$). El contenido fue mayor en *Hermetia illucens* ($0,1307 \pm 0,0169 \mu\text{mol/ml}$) que en *Tenebrio molitor* ($0,1066 \pm 0,0176 \mu\text{mol/ml}$). Esto sugiere que *H. illucens* ofrece un aporte proteico esencial más concentrado. Estudios recientes indican que, aunque la composición de proteína en *H. illucens* puede ser relativamente estable bajo diferentes

sustratos, los instares tempranos muestran mayor contenido proteico en insectos como *T. molitor* (38).

En cuanto al tamaño larval, para ambas especies, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tamaños ($p = 0,1443$). No obstante, observamos una tendencia: las larvas pequeñas registraron el valor promedio más alto, seguidas por las grandes y luego las medianas, resultados que pueden ser constatados en la Tabla 16. Este comportamiento es coherente con estudios en *T. molitor*, que muestran que los instares intermedios pueden tener una disminución en aminoácidos esenciales como triptófano, leucina y azufrados en comparación con instares más tempranos (38).

Asimismo, en *H. illucens*, la composición proteica suele ser mayor en instares tempranos y más estable a lo largo del desarrollo larval, aunque con variaciones menores según el sustrato (94,102).

3.4.2. Concentración de aminoácidos

Los resultados obtenidos en el presente estudio para *H. illucens* y *T. molitor* muestran un perfil de aminoácidos que coincide parcialmente con lo reportado en la literatura (26) para harina y extracto proteico de larvas de *H. illucens*. En este caso, la harina obtenida presentó concentraciones de aminoácidos esenciales (AAE) dentro del rango encontrado por dichos autores, aunque con diferencias atribuibles principalmente a la metodología de procesamiento y al estado fisiológico de las larvas. Reportaron para la harina de *H. illucens* una suma total de AAE de 295,8 mg/g proteína bruta, mientras que, en nuestro estudio, dependiendo del tamaño larval, este valor fue superior en el caso de las larvas grandes y similar o ligeramente inferior en las larvas pequeñas.

En el presente estudio, se observó que la especie influyó significativamente sobre la concentración de aminoácidos, tal como se muestra en la Tabla 18; siendo *Hermetia illucens* la que presentó valores más elevados en comparación con *Tenebrio molitor*. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura (27), donde se destaca el alto contenido de proteína cruda ($42,16 \pm 3,67\%$ MS) de la harina de larva de *Hermetia illucens*, lo que respalda su potencial como fuente proteica de calidad en la alimentación animal. Si bien el trabajo citado se enfocó en *Cavia porcellus* (cuyes), el hecho de que el reemplazo parcial de harina de soja por harina de *H. illucens* no afectara negativamente la ganancia de peso ni el peso corporal, y que incluso mejorara la

conversión alimenticia en ciertos niveles de inclusión, sugiere que la calidad y el perfil de aminoácidos de esta especie son adecuados para cubrir requerimientos nutricionales con menor cantidad de alimento. De esta manera, la mayor concentración de aminoácidos observada en *H. illucens* en nuestro análisis se alinea con la evidencia de que esta especie posee un perfil proteico de alta biodisponibilidad y potencial para su uso en dietas animales como sustituto parcial de insumos tradicionales.

En el presente estudio, la diferencia significativa en la concentración de aminoácidos entre *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* evidencia que la primera especie posee un mayor potencial como fuente proteica (Tablas 16 y 17), lo que coincide con lo descrito en la literatura (28), donde se evaluó la inclusión de harina de larva de mosca soldado negra en dietas para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Dichos autores reportaron que la sustitución de hasta el 50% de la harina de pescado por harina de *H. illucens* no afectó negativamente el peso corporal ni la longitud total de las truchas, manteniendo un adecuado desempeño productivo incluso en condiciones ambientales exigentes como las del Lago Titicaca. Esto sugiere que el perfil de aminoácidos de *H. illucens*, reflejado en nuestras mayores concentraciones, puede ser aprovechado eficientemente por especies acuícolas de alto valor comercial, respaldando su uso como un ingrediente proteico alternativo de calidad comparable a fuentes convencionales como la harina de pescado.

Con respecto a los aminoácidos limitantes, en la comparación entre *H. illucens* y *T. molitor* demuestra que, en ambas especies, la metionina y la isoleucina se encuentran en concentraciones bajas. Si bien estas concentraciones se encuentran dentro de los rangos reportados por la literatura (26), siguen siendo inferiores a las requeridas para aminoácidos esenciales en la formulación de dietas balanceadas para animales. La baja proporción de ambos aminoácidos puede deberse a la composición de las proteínas estructurales en ambas especies (sobre todo la quitina y proteínas de cutícula), o a factores de cría o de procesamiento de las larvas o la harina (39). Dado que la metionina y la isoleucina son aminoácidos importantes en la nutrición animal, cuya deficiencia se puede ver asociada a problemas de crecimiento, metabolismo energético y ganancia muscular, especialmente en aves y cerdos; es importante considerar la complementación proteica de las harinas de larva para equilibrar el perfil aminoacídico al formular dietas proteicas con este sustrato (64,93).

3.5. Fortalezas y limitaciones

El presente estudio representa una contribución inicial al análisis comparativo del perfil aminoacídico de harinas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*, evaluadas como posibles sustratos proteicos para la alimentación animal. Una de las principales fortalezas de esta investigación radica en que constituye un análisis pionero realizado con muestras locales, generando datos primarios relevantes que pueden servir de referencia para futuras evaluaciones de ingredientes alternativos. Además, el estudio contempló una diferenciación por tamaños (pequeño, mediano y grande) en ambas especies de insectos, lo cual permitió obtener promedios representativos del contenido de aminoácidos, considerando posibles variaciones fisiológicas asociadas al desarrollo larval.

Desde el punto de vista analítico, se empleó un método validado de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), el cual mostró una adecuada linealidad para la cuantificación de aminoácidos, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,98 en la mayoría de los casos. Asimismo, se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), lo que permitió evaluar la sensibilidad del método y garantizar la confiabilidad de los datos reportados, especialmente en aminoácidos presentes en bajas concentraciones.

El diseño experimental contempló dos corridas analíticas para cada concentración de los patrones, cada una con su respectiva réplica, lo cual mejoró la precisión y permitió calcular desviaciones estándar y %RSD como medida de la repetibilidad. Esta estrategia fortaleció la calidad de los resultados obtenidos en cuanto a validación del método y control de variabilidad instrumental.

Sin embargo, aunque el análisis se centró en los aminoácidos, no se incluyeron otros nutrientes de relevancia, como lípidos, minerales o fibra, ni se evaluaron propiedades funcionales o parámetros de digestibilidad, parámetros clave para una caracterización completa del valor nutricional.

Por otro lado, algunas concentraciones bajas o ausencias aparentes de determinados aminoácidos (como la histidina en *T. molitor*) podrían atribuirse a valores por debajo del límite de detección o a posibles interferencias durante la derivatización, lo que sugiere la necesidad de ensayos complementarios para confirmar estos resultados.

A pesar de estas limitaciones, el presente estudio proporciona una base técnica sólida para futuras investigaciones orientadas a integrar harinas de larvas en la formulación de dietas balanceadas para animales monogástricos y rumiantes, con enfoque en sostenibilidad y aprovechamiento de subproductos locales.

3.6. Propuesta de aplicación del resultado

Los resultados obtenidos en esta investigación, que comparan el perfil aminoacídico de harinas de *H. illucens* y *T. molitor*, permiten proyectar su aplicación como sustratos proteicos complementarios en la formulación de dietas para animales productivos. Desde el punto de vista nutricional, la metionina y la lisina son los aminoácidos limitantes más importantes en las dietas de aves y peces. Por ello, la mezcla de harinas de *H. illucens* y *T. molitor* en proporción 60:40 mejora el balance aminoacídico, incrementa la eficiencia alimenticia (FCR) y reduce la necesidad de suplementos sintéticos (98,99). Ambas especies presentan presencia variable de aminoácidos esenciales, con diferencias marcadas en la concentración de algunos como lisina, metionina e isoleucina, que son comúnmente limitantes en sistemas intensivos de producción animal.

Estudios previos respaldan el uso de estas especies como ingredientes alternativos en alimentación animal. Por ejemplo, *T. molitor* ha demostrado buenos resultados como reemplazo parcial de harina de pescado en dietas para aves y peces (103,104), mientras que *H. illucens* se ha utilizado con éxito en dietas para cerdos, cuyes, aves y rumiantes, gracias a su perfil proteico y eficiencia de conversión alimenticia (105,106).

Pese a que ninguna de las especies por sí sola presenta un perfil perfectamente equilibrado para cubrir todos los requerimientos esenciales de especies como aves, cerdos, ovinos o caprinos, su incorporación estratégica en las dietas puede complementar otras fuentes proteicas. Por ejemplo, *H. illucens* mostró mayores niveles de arginina, lisina y fenilalanina, mientras que *T. molitor* se destacó en metionina e isoleucina. Por tanto, su combinación podría mejorar la adecuación del perfil aminoacídico general en raciones balanceadas.

Una vía adicional para potenciar su aplicabilidad es la optimización de su perfil proteico mediante el manejo nutricional de los insectos durante su crianza. Se ha demostrado que dietas ricas en nitrógeno o aminoácidos específicos pueden modificar significativamente el contenido y proporción de aminoácidos esenciales en los insectos

(107). Asimismo, procesos tecnológicos como el desgrasado ("defatting") permiten aumentar la concentración relativa de proteínas en la harina final, facilitando su incorporación en fórmulas concentradas (108).

Desde una perspectiva más amplia, el uso de harinas de insecto se alinea con los principios de la economía circular y sostenibilidad local. Ambas especies pueden criarse sobre sustratos orgánicos de bajo valor, como subproductos agroindustriales o residuos hortofrutícolas, lo que permite transformar residuos en biomasa proteica de alto valor. Este enfoque contribuye a reducir la presión sobre recursos tradicionales (como la soya y la harina de pescado), minimiza impactos ambientales y fortalece la seguridad alimentaria a nivel local y regional (12,109).

La determinación del perfil aminoacídico de *H. illucens* y *T. molitor* aporta una base técnica para su valorización como ingredientes funcionales en nutrición animal, y permite orientar futuras investigaciones hacia la formulación de dietas específicas por especie productiva, buscando el equilibrio nutricional, la sostenibilidad económica y el aprovechamiento eficiente de recursos.

4. CONCLUSIONES

PRIMERA: Se validó el método de cuantificación de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), obteniendo coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,98 en la mayoría de los aminoácidos analizados. Asimismo, se establecieron los valores de pendiente, límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ), que evidenciaron la sensibilidad y linealidad del método. Los valores de %RSD obtenidos fueron inferiores al 5% para la mayoría de los compuestos, confirmando la precisión y reproducibilidad de la técnica empleada para los niveles de concentración trabajados.

SEGUNDA: Se caracterizó el perfil aminoacídico de las harinas de larvas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* mediante la técnica validada de RP-HPLC. Se identificaron y cuantificaron los principales aminoácidos esenciales y no esenciales presentes en ambas especies, con diferencias en la concentración relativa de cada compuesto. Entre los aminoácidos más abundantes en *H. illucens* destacaron la fenilalanina, lisina y arginina, mientras que en *T. molitor* se observaron niveles superiores de metionina e isoleucina.

TERCERA: al comparar la composición aminoacídica de ambas harinas, se observó que tanto *H. illucens* como *T. molitor* presentan perfiles complementarios, con variabilidad en el contenido de aminoácidos esenciales. *H. illucens* mostró mayor contenido en la mayoría de los aminoácidos analizados, con excepción de metionina e isoleucina, que fueron más elevadas en *T. molitor*.

CUARTA: los resultados obtenidos en este estudio respaldan el uso potencial de harinas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* como ingredientes alternativos ricos en aminoácidos para la alimentación animal. La validación metodológica asegura la confiabilidad de los datos generados, mientras que la caracterización y comparación de ambos insectos permite identificar sus ventajas nutricionales particulares. Adicionalmente, la comparación de los perfiles aminoacídicos de las harinas de larva de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* demuestra que cada una presenta fortalezas en cuanto a concentración de aminoácidos. Un uso combinado de ambas podría representar una estrategia para la formulación de dietas animales, puesto que la complementariedad

entre ambas harinas podría para subsanar las deficiencias individuales y reforzar el potencial nutricional y la calidad de proteína ofrecida.



5. RECOMENDACIONES

- Sería relevante investigar sobre el efecto de diferentes dietas de cría sobre el perfil aminoacídico de las larvas, dado que se ha demostrado que la alimentación influye en la calidad nutricional del insecto. Tener más información al respecto permitiría manipular y optimizar las dietas de las larvas para que se ajusten con mayor exactitud al perfil nutricional requerido por cada especie animal.
- Es necesario realizar ensayos de digestibilidad y biodisponibilidad, tanto in vitro como in vivo, en animales de producción, con el objetivo de determinar el verdadero aprovechamiento de los aminoácidos presentes en las harinas de insecto.
- Se recomienda desarrollar estudios de alimentación animal utilizando estas harinas como ingrediente principal o suplementario, a fin de evaluar su impacto en el crecimiento, eficiencia productiva, salud digestiva y calidad del producto final (carne, huevo, leche, entre otros).
- Es recomendable empezar a realizar estudios de escalabilidad, costos de producción y estudios de ciclo biológico de las larvas, que permitan evaluar la viabilidad técnica, económica y ambiental de la incorporación de harinas de insectos en la nutrición animal a gran escala.
- Finalmente, se destaca la importancia de seguir promoviendo el desarrollo de esta alternativa proteica en el contexto de la economía circular y la sostenibilidad agroalimentaria, contribuyendo a sistemas de producción más resilientes y responsables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siddiqui SA, Elsheikh W, Ucak İ, Hasan M, Perlita ZC, Yudhistira B. Replacement of soy by mealworms for livestock feed - A comparative review between soy and mealworms considering environmental aspects. *Environment, Development and Sustainability*. Springer Science and Business Media B.V.; 2024. doi:10.1007/s10668-024-04874-1
2. USDA Foreign Agricultural Service – IPAD. Peru Soybean Area, Yield and Production [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 6]. Available from: <https://ipad.fas.usda.gov/countrysummary/Default.aspx?id=PE&crop=Soybean>
3. Makwana K. Soybeans for Global Nutrition: A Numbers Story - Sustainable Nutrition Initiative® [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 6]. Available from: <https://sustainablenutritioninitiative.com/soybeans-for-global-nutrition-a-numbers-story/>
4. SENACE. Aprueban el Reglamento de la Ley General de Pesca DECRETO SUPREMO N° 012-2001-PE [Internet]. 2001 [cited 2025 Sep 6]. Available from: <https://www.senace.gob.pe/wp-content/uploads/filebase/senacenormativa/NAS-4-8-02-DS-012-2001-PE.pdf>
5. Grillo J, Gozzer R, Sueiro JC, Riveros JC. Producción ilegal de harina de pescado en Perú a partir de anchoveta extraída por la flota artesanal y de menor escala. 2019.
6. Gasco L, Biancarosa I, Liland NS. From waste to feed: A review of recent knowledge on insects as producers of protein and fat for animal feeds. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. Elsevier B.V.; 2020. p. 67–79. doi:10.1016/j.cogsc.2020.03.003
7. Sogari G, Amato M, Biasato I, Chiesa S, Gasco L. The potential role of insects as feed: A multi-perspective review. *Animals*. MDPI AG; 2019. doi:10.3390/ani9040119
8. Abd El-Hack ME, Shafi ME, Alghamdi WY, Abdelnour SA, Shehata AM, Noreldin AE, et al. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) meal as a promising feed ingredient for poultry: A comprehensive review. *Agriculture (Switzerland)*. MDPI AG; 2020. p. 1–31. doi:10.3390/agriculture10080339
9. Hong J, Han T, Kim YY. Mealworm (*Tenebrio molitor* larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: A review. *Animals*. MDPI AG; 2020. p. 1–20. doi:10.3390/ani10112068
10. Sánchez-Muros MJ, Barroso FG, Manzano-Agugliaro F. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *Journal of Cleaner Production*. 2014. p. 16–27. doi:10.1016/j.jclepro.2013.11.068
11. Insect Protein Market Report by Source (Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera, Hemiptera, Diptera, and Others), Distribution Channel (Offline, Online), Application (Animal Nutrition, Food and Beverages, Pharmaceutical and Supplements,

- Personal Care and Cosmetics), and Region 2025-2033 [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 5]. Available from: <https://www.imarcgroup.com/insect-protein-market>
12. FAO. Looking at edible insects from a food safety perspective. Looking at edible insects from a food safety perspective. FAO; 2021. doi:10.4060/cb4094en
 13. Lange KW, Nakamura Y. Edible insects as future food: chances and challenges. *Journal of Future Foods*. Beijing Academy of Food Sciences; 2021. p. 38–46. doi:10.1016/j.jfutfo.2021.10.001
 14. United Nations. World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100 | United Nations [Internet]. 2019 [cited 2025 Jul 20]. Available from: <https://www.un.org/en/desa/world-population-projected-reach-98-billion-2050-and-112-billion-2100>
 15. Francuski L, Beukeboom LW. Insects in production – an introduction. *Entomol Exp Appl*. 2020 Jul 1;168(6–7):422–31. doi:10.1111/eea.12935
 16. Hancz C, Sultana S, Nagy Z, Biró J. The Role of Insects in Sustainable Animal Feed Production for Environmentally Friendly Agriculture: A Review. *Animals*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024. doi:10.3390/ani14071009
 17. Oonincx DGAB, Finke MD. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. *J Insects Food Feed*. 2021;7(5):639–59. doi:10.3920/JIFF2020.0050
 18. Kim TK, Yong HI, Chun HH, Lee MA, Kim YB, Choi YS. Changes of amino acid composition and protein technical functionality of edible insects by extracting steps. *J Asia Pac Entomol*. 2020 Jun 1;23(2):298–305. doi:10.1016/j.aspen.2019.12.017
 19. Pinheiro NA, Silva LJG, Pena A, Pereira AMPT. Entomophagy: Nutritional Value, Benefits, Regulation and Food Safety. *Foods* 2025, Vol 14, Page 2380. 2025 Jul 4;14(13):2380. doi:10.3390/FOODS14132380
 20. Garino C, Zagon J, Braeuning A. Insects in food and feed – allergenicity risk assessment and analytical detection. *EFSA Journal*. 2019 Sep 1;17(S2). doi:10.2903/J.EFSA.2019.E170907
 21. International Platform of Insects for Food and Feed (IPIFF). Insects As Feed EU Legislation – Aquaculture, Poultry & Pig Species [Internet]. 2021 [cited 2025 Aug 30]. Available from: <https://ipiff.org/insects-eu-legislation-general>
 22. Lähteenmäki-Uutela A, Marimuthu SB, Meijer N. Regulations on insects as food and feed: a global comparison. *J Insects Food Feed*. 2021;7(5):849–56. doi:10.3920/JIFF2020.0066
 23. Sogari G, Bellezza Oddon S, Gasco L, van Huis A, Sprangers T, Mancini S. Review: Recent advances in insect-based feeds: from animal farming to the acceptance of consumers and stakeholders. *Animal*. Elsevier B.V.; 2023. doi:10.1016/j.animal.2023.100904 PubMed PMID: 37500376.

24. Wang YS, Shelomi M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods*. MDPI AG; 2017. doi:10.3390/foods6100091
25. Giraldo M, Rodríguez N, Benavides P. USO POTENCIAL DE *Hermetia illucens* (LINNAEUS) (DIPTERA: STRATIOMIDAE) PARA TRANSFORMACIÓN DE PULPA DE CAFÉ: ASPECTOS BIOLÓGICOS. *Cenicafé*. 2019;70(2):81–90.
26. Queiroz LS, Regnard M, Jessen F, Mohammadifar MA, Sloth JJ, Petersen HO, et al. Physico-chemical and colloidal properties of protein extracted from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Int J Biol Macromol*. 2021 Sep 1;186:714–23. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.07.081 PubMed PMID: 34274399.
27. Reátegui J, Barriga X, Obando A, Moscoso G, Manrique P, Salazar I. Harina de larva de *Hermetia illucens* (Diptera Stratiomyidae) como ingrediente proteico de reemplazo parcial de harina de soja en la alimentación de *Cavia porcellus* (Cuy) efecto en el consumo, ganancia de peso y conversión alimenticia. *Scientia Agropecuaria*. 2020 Dec 1;11(4):513–9. doi:10.17268/SCI.AGROPECU.2020.04.06
28. Banegas-Mango DY, Aranibar MJ, Réategui-Ordoñez JE, Yossa MI, Palo P, Obando-Sánchez A. La mosca soldado negra como fuente proteica para la trucha arcoíris en el lago Titicaca-Perú: Resultados preliminares. In: XXIX Jornada de Acuicultura IALL 2023. Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos; 2023. p. 74–9.
29. Ahmed I, Inal F, Riaz R, Ahsan U, Kuter E, Ali U. A review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as a potential alternative protein source in broiler diets. *Annals of Animal Science*. 2023. doi:10.2478/aoas-2022-0094
30. Chirinos Aguirre YA. Estudio del ciclo biológico de *Hermetia illucens* (Diptera Stratiomyidae) bajo las condiciones de laboratorio en la irrigación Majes, Caylloma, Arequipa. [Arequipa]: Universidad Católica de Santa María; 2019.
31. Gobbi FP. Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de *Hermetia illucens* (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa. Alicante; 2012.
32. Liu X, Chen X, Wang H, Yang Q, Ur Rehman K, Li W, et al. Dynamic changes of nutrient composition throughout the entire life cycle of black soldier fly. *PLoS One*. 2017 Aug 1;12(8). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0182601, PubMed PMID: 28796830.
33. Zulkifli NFN, Seok-Kian AY, Seng LL, Mustafa S, Kim YS, Shapawi R. Nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae processed by different methods. *PLoS One*. 2022 Feb 1;17(2):e0263924. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0263924 PubMed PMID: 35213590.
34. Arias JP. Nuevos abonos a partir de excrementos de insecto: el caso del gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) New fertilizers from insect's excreta: the mealworm (*Tenebrio molitor*) case. *Rev. Ingeniería y Región*. 2018;19.

35. De Marco M, Martínez S, Hernandez F, Madrid J, Gai F, Rotolo L, et al. Nutritional value of two insect larval meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*) for broiler chickens: Apparent nutrient digestibility, apparent ileal amino acid digestibility and apparent metabolizable energy. *Anim Feed Sci Technol.* 2015;209:211–8. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.08.006
36. Costa S, Pedro S, Lourenço H, Batista I, Teixeira B, Bandarra NM, et al. Evaluation of *Tenebrio molitor* larvae as an alternative food source. *NFS Journal.* 2020 Nov 1;21:57–64. doi:10.1016/j.nfs.2020.10.001
37. Parsa SH, Kheiri F, Fathipour Y, Imani S, Chamani M. Yellow meal worm (*Tenebrio molitor* L.) development time of life stages duration and survival rate at different temperatures in laboratory conditions. *Arthropods* [Internet]. 2023;12(1):16–26. Available from: www.iaees.org
38. Yu X, He Q, Wang D. Dynamic Analysis of Major Components in the Different Developmental Stages of *Tenebrio molitor*. *Front Nutr.* 2021 Sep 20;8:689746. doi:10.3389/FNUT.2021.689746/BIBTEX
39. Rumpold BA, Schlüter OK. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol Nutr Food Res.* 2013 May;57(5):802–23. doi:10.1002/MNFR.201200735, PubMed PMID: 23471778.
40. Varga T, Fabrikov D, Vargas García MDC, Pérez Jiménez A, Rufino Palomares EE, Trenzado CE, et al. How different successive elaboration methods affect *Hermetia illucens* meals? Macronutrients, in vitro protein digestibility, oxidative status and hygienic-sanitary quality. *J Insects Food Feed.* 2025;11(7):1273–87. doi:10.1163/23524588-00001136
41. Fondevilla M, Fondevilla G. Harina de insectos: *Tenebrio* y *Mosca Soldado Negra*. XXXVIII Curso de especialización FEDNA. Zaragoza; 2023 Dec.
42. Melgar-Lalanne G, Hernández-Álvarez AJ, Salinas-Castro A. Edible Insects Processing: Traditional and Innovative Technologies. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019 Jul 1;18(4):1166–91. doi:10.1111/1541-4337.12463 PubMed PMID: 33336989.
43. Hurtado-Ribeira R, Hernández DM, Villanueva-Bermejo D, García-Risco MR, Hernández MD, Vázquez L, et al. The Interaction of Slaughtering, Drying, and Defatting Methods Differently Affects Oxidative Quality of the Fat from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae. *Insects.* 2023 Apr 1;14(4). doi:10.3390/insects14040368
44. Huang C, Feng W, Xiong J, Wang T, Wang W, Wang C, et al. Impact of drying method on the nutritional value of the edible insect protein from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae: amino acid composition, nutritional value evaluation, in vitro digestibility, and thermal properties. *European Food Research and Technology.* 2019 Jan 3;245(1):11–21. doi:10.1007/s00217-018-3136-y

45. Kröncke N, Benning R. Influence of Dietary Protein Content on the Nutritional Composition of Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor* L.). *Insects*. 2023 Mar 6;14(3):261. doi:10.3390/insects14030261
46. Eggink KM, Donoso IG, Dalsgaard J. Optimal dietary protein to carbohydrate ratio for black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J Insects Food Feed*. 2023;9(6):789–98. doi:10.3920/JIFF2022.0102
47. Purschke B, Brüggem H, Scheibelberger R, Jäger H. Effect of pre-treatment and drying method on physico-chemical properties and dry fractionation behaviour of mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.). *European Food Research and Technology*. 2018 Feb 1;244(2):269–80. doi:10.1007/S00217-017-2953-8/FIGURES/4
48. Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, Eisner-Schadler V, Huis A Van, Boekel MAJSV. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chem*. 2013 Dec 15;141(4):3341–8. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2013.05.115 PubMed PMID: 23993491.
49. Smetana S, Spykman R, Heinz V. Environmental aspects of insect mass production. *J Insects Food Feed*. 2021;7(5):553–71. doi:10.3920/JIFF2020.0116
50. Spranghers T, Ottoboni M, Klotwijk C, Oryn A, Deboosere S, De Meulenaer B, et al. Nutritional composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) prepupae reared on different organic waste substrates. *J Sci Food Agric*. 2017 Jun 1;97(8):2594–600. doi:10.1002/JSFA.8081;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION PubMed PMID: 27734508.
51. Caligiani A, Marseglia A, Leni G, Baldassarre S, Maistrello L, Dossena A, et al. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. *Food Research International*. 2018 Mar 1;105:812–20. doi:10.1016/J.FOODRES.2017.12.012 PubMed PMID: 29433277.
52. Ewald N, Vidakovic A, Langeland M, Kiessling A, Sampels S, Lalander C. Fatty acid composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) – Possibilities and limitations for modification through diet. *Waste Management*. 2020 Feb 1;102:40–7. doi:10.1016/j.wasman.2019.10.014 PubMed PMID: 31655329.
53. Dolowy M, Pyka A. Application of TLC, HPLC and GC methods to the study of amino acid and peptide enantiomers: A review. *Biomedical Chromatography*. 2014. p. 84–101. doi:10.1002/bmc.3016 PubMed PMID: 23946167.
54. Sillanpää M. Determination of amino acids in foods and beverages. [Helsinki]: University of Helsinki; 2021.
55. Wu G, Bazer FW, Dai Z, Li D, Wang J, Wu Z. Amino acid nutrition in animals: Protein synthesis and beyond. *Annu Rev Anim Biosci*. 2014;2:387–417. doi:10.1146/annurev-animal-022513-114113 PubMed PMID: 25384149.

56. Karau A, Grayson I. Amino acids in human and animal nutrition. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2014 Mar 28;143:189–228. doi:10.1007/10_2014_269 PubMed PMID: 24676880.
57. National Research Council. Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition. Nutrient Requirements of Swine. 2012 Jul 5. doi:10.17226/13298
58. National Research Council (NCR). Nutrient Requirements of Poultry. Nutrient Requirements of Poultry. 9th ed. National Academies Press; 1994. doi:10.17226/2114
59. Otter DE. Standardised methods for amino acid analysis of food. *British Journal of Nutrition.* 2012 Aug;108(SUPPL. 2). doi:10.1017/S0007114512002486 PubMed PMID: 23107533.
60. Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 2009 May;37(1):1–17. doi:10.1007/s00726-009-0269-0 PubMed PMID: 19301095.
61. Wu G. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: A paradigm shift in protein nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* BioMed Central Ltd.; 2014. doi:10.1186/2049-1891-5-34 PubMed PMID: 24999386.
62. National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. 2011 May 31. doi:10.17226/13039
63. Shah SRA, Çetingul IS. Nutritive Value of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Economical and Alternative Feedstuff for Poultry Diet. *J Worlds Poult Res.* 2022;12(1):01–7. doi:10.36380/jwpr.2022.1
64. Veldkamp T, Bosch G. Insects: A protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets. *Animal Frontiers.* 2015 Apr 1;5(2):45–50. doi:10.2527/af.2015-0019
65. Xu W, Zhong C, Zou C, Wang B, Zhang N. Analytical methods for amino acid determination in organisms. *Amino Acids.* Springer; 2020. p. 1071–88. doi:10.1007/s00726-020-02884-7 PubMed PMID: 32857227.
66. Pino R, Costa E, Rodriguez J. Determinación de Aminoácidos en Fluidos Biológicos por Cromatografía Gas-Líquido. *Acta Farm Bonaerense.* 1989;8(1):49–60.
67. Callejón R. Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales [Trabajo de investigación]. Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. España [Internet]. [Sevilla]: Universidad de Sevilla. España; 2008 [cited 2023 May 22]. Available from: Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. España
68. Ali Qureshi G, Fohlin L, Bergström J. Application of high-performance liquid chromatography to the determination of free amino acids in physiological fluids. *Journal of Chromatography .* 1984 Aug;297:91–100. doi:10.1016/S0021-9673(01)89032-4

69. Suarez D, Morales Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. América Revista Semilleros: Formación Investigativa. 2018;4.
70. Shimadzu. What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography)? SHIMADZU (Shimadzu Corporation) [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 21]. Available from: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html
71. ThermoFisher Scientific. HPLC Basics | Thermo Fisher Scientific - PE [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 21]. Available from: https://www.thermofisher.com/pe/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html?erpType=Global_E1
72. Dong M. The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities [Internet]. Vol. 16. MJH Life Sciences; 2013 [cited 2025 Aug 17]. p. 24-29–24–29. Available from: <https://www.chromatographyonline.com/view/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities-0>
73. Timchenko Y V. Journal of Environmental Analytical Chemistry Brief Report Advantages and Disadvantages of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Brief Report. 2021.
74. Moldoveanu S, David V. Overview of HPLC instrumentation and its use. In: Essentials in Modern HPLC Separations [Internet]. Elsevier; 2022 [cited 2025 Aug 18]. p. 21–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323911771000156?via%3Dihub> doi:10.1016/B978-0-323-91177-1.00015-6
75. Abdu Hussen A. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. Annals of Advances in Chemistry. 2022 Jun 20;6(1):010–20. doi:10.29328/journal.aac.1001026
76. Gonzáles-Castro M, López-Hernández J, Simal-Lozano J, Oruña-Concha M. Determination of Amino Acids in Green Beans by Derivatization with Phenylisothiocyanate and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. Journal of Chromatography Science. 1997;35:181–5.
77. Jajic I, Krstovic S, Glamocic D, Jakšić S, Abramovic B. Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. Journal of the Serbian Chemical Society. 2013;78(6):839–50. doi:10.2298/JSC120712144J
78. Moldoveanu S, David V. Parameters for the characterization of HPLC separation. In: Essentials in Modern HPLC Separations. Elsevier; 2022. p. 63–105. doi:10.1016/b978-0-323-91177-1.00004-1
79. Ministerio de Agricultura y Riego CNF. Arequipa [Internet]. [cited 2025 Aug 6]. Available from: <https://www.cnf.org.pe/Cartilla/AREQUIPA/Arequipa.html>

80. Peru Travel Expert. Clima en Arequipa y Festividades: Mejor Época para Visitar - Arequipa.com [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 6]. Available from: <https://www.arequipa.com/es/clima-en-arequipa/>
81. Advercity. Majes en el departamento de Arequipa - Municipio y municipalidad de Perú [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 6]. Available from: <https://www.distrito.pe/distrito-majes.html>
82. Vakili H, Talebpour Z, Haghighi F. Development, validation, and uncertainty measurement of HPLC-DAD method for determination of some free amino acids in infant formula and medical food products for inborn errors of metabolism. Food Chem. 2022 Oct 1;390. doi:10.1016/j.foodchem.2022.133204 PubMed PMID: 35609503.
83. Reátegui J. DISEÑO DE INGENIERÍA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LÍNEA DE PRODUCCIÓN PILOTO DE SUSTRATO PROTEICO A BASE DE LARVAS DE HERMETIA ILLUCENS. 2021.
84. Laurent S, Jury V, de Lamballerie M, Fayolle F. Effect of two defatting processes on the physicochemical and flow properties of *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* larvae powders. J Food Process Preserv. 2022;46:10. doi:10.1111/jfpp.16853
85. Harris D, Lucy C. Quantitative Chemical Analysis. 10th ed. W. H. Freeman, editor. 2019.
86. Thermo Fisher Scientific. Proteins and Amino Acids | Thermo Fisher Scientific - PE [Internet]. [cited 2025 Nov 19]. Available from: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/references/ambion-tech-support/rna-tools-and-calculators/proteins-and-amino-acids.html>
87. Borman P, Elder D. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Ich Quality Guidelines: An Implementation Guide. 2017 Jan 1;127–66. doi:10.1002/9781118971147.CH5;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
88. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics Second Edition 2014 i Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics Second edition Acknowledgements [Internet]. 2014 [cited 2025 Sep 7]. Available from: www.eurachem.org.
89. Gałęzowska G, Ratajczyk J, Wolska L. Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: critical review. Amino Acids. 2021 Jul 1;53(7):993–1009. doi:10.1007/S00726-021-03002-X, PubMed PMID: 34028614.
90. Santos F, Domingues V, Soares C, Delerue-Matos C. Optimizing Amino Acid Derivatization in Food Matrices. Proceedings 2024, Vol 105, Page 104. 2024 May 28;105(1):104. doi:10.3390/PROCEEDINGS2024105104

91. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2011;2(1):21. doi:10.4103/2229-5186.79345
92. Ribani M, Beatriz C, Bottoli G. Validation for chromatographic and electrophoretic methods [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/262433172>
93. Barragan-Fonseca KB, Dicke M, van Loon JJA. Nutritional value of the black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) and its suitability as animal feed - a review. *Journal of Insects as Food and Feed*. Wageningen Academic Publishers; 2017. p. 105–20. doi:10.3920/JIFF2016.0055
94. Lu S, Taethaisong N, Meethip W, Surakhunthod J, Sinpru B, Sroichak T, et al. Nutritional Composition of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens* L.) and Its Potential Uses as Alternative Protein Sources in Animal Diets: A Review. *Insects* 2022, Vol 13, Page 831. 2022 Sep 13;13(9):831. doi:10.3390/INSECTS13090831
95. White JA, Hart RJ, Fry JC. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *J Automat Chem*. 1986;8(4):170. doi:10.1155/S1463924686000330 PubMed PMID: 18925132.
96. Cohen SA, Michaud DP. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1993;211(2):279–87. doi:10.1006/abio.1993.1270
97. Zhao X, Vázquez-Gutiérrez JL, Johansson DP, Landberg R, Langton M. Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. *PLoS One*. 2016 Feb 1;11(2):e0147791. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0147791 PubMed PMID: 26840533.
98. Dalmoro YK, Franceschi CH, Stefanello C. A Systematic Review and Metanalysis on the Use of *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* in Diets for Poultry. *Vet Sci*. 2023 Dec 1;10(12):702. doi:10.3390/VETSCI10120702/S1
99. Noyens I, Van Peer M, Goossens S, Ter Heide C, Van Miert S. The Nutritional Quality of Commercially Bred Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Compared to European Union Nutrition Claims. *Insects* 2024, Vol 15, Page 769. 2024 Oct 5;15(10):769. doi:10.3390/INSECTS15100769
100. Silva LB, De Souza RG, Da Silva SR, Feitosa ADC, Lopes EC, Lima SBP, et al. Development of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) on Poultry Litter-Based Diets: Effect on Chemical Composition of Larvae. *Journal of Insect Science*. 2021 Jan 1;21(1). doi:10.1093/JISESA/IEAA145 PubMed PMID: 33480430.
101. Van Peer M, Frooninckx L, Coudron C, Berrens S, Álvarez C, Deruytter D, et al. Valorisation Potential of Using Organic Side Streams as Feed for *Tenebrio molitor*, *Acheta domesticus* and *Locusta migratoria* [Internet]. 2021. doi:10.3390/insects

102. Beniers J, Graham R. Effect of protein and carbohydrate feed concentrations on the growth and composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae [Internet]. doi:10.3920/JIFF2018.0001
103. Soares de Lima J, Linhares Pittaluga M, de Menezes Lovatto N, Aline Veiverberg C, Borille R, Lazzari R. Mealworm (*Tenebrio molitor*) potencial in fish nutrition: a review. Research, Society and Development. 2021 Dec 12;10(16):e269101623229–e269101623229. doi:10.33448/RSD-V10I16.23229
104. Nascimento Filho MA, Pereira RT, Oliveira ABS, Suckeveris D, Burin Junior AM, Soares CAP, et al. Nutritional value of *Tenebrio molitor* larvae meal for broiler chickens: metabolizable energy and standardized ileal amino acid digestibility. Journal of Applied Poultry Research. 2021 Mar 1;30(1):100102. doi:10.1016/J.JAPR.2020.10.001
105. Henry M, Gasco L, Piccolo G, Fountoulaki E. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. Anim Feed Sci Technol. 2015 May 1;203(1):1–22. doi:10.1016/J.ANIFEEDSCI.2015.03.001
106. Makkar HPS, Tran G, Heuzé V, Ankers P. State-of-the-art on use of insects as animal feed. Anim Feed Sci Technol. 2014 Nov 1;197:1–33. doi:10.1016/J.ANIFEEDSCI.2014.07.008
107. Oonincx DGAB, Van Broekhoven S, Van Huis A, Van Loon JJA. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. PLoS One. 2015 Dec 1;10(12). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0144601, PubMed PMID: 26699129.
108. Purnamasari L, Lopez Z, Flores De la Cruz J. A Review: Evaluation of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Meal as a Dietary Protein Source in Poultry Diets. Biotropika: Journal of Tropical Biology. 2022 Nov 7;10(3):191–202. doi:10.21776/UB.BIOTROPIKA.2022.010.03.05
109. Van Huis A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annu Rev Entomol. 2013 Jan 7;58:563–83. doi:10.1146/ANNUREV-ENTO-120811-153704, PubMed PMID: 23020616.



ANEXO 01

SECUENCIA FOTOGRÁFICA

Figura 21. Sistema de RP-HPLC



- Se muestra el equipo de RP-HPLC modelo Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) implementado en el laboratorio F-409 del campus de la UCSM.

Figura 22. Estándares de aminoácidos derivatizados y envasados en los viales, listos para ser leídos por el equipo de RP-HPLC



- Se muestran los viales con las soluciones estándar a los diferentes volúmenes utilizados, previamente derivatizadas y listas para ingresar en el sistema de RP-HPLC.

Figura 23. Larvas descongeladas de *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens*



- Comparación visual entre las larvas descongeladas de *Tenebrio molitor* (arriba) y las larvas descongeladas de *Hermetia illucens* (abajo).

Figura 24. Larvas descongeladas de *Hermetia illucens* siendo preparadas para ser desecadas



- Proceso de distribución homogéneo de las larvas descongeladas de *Hermetia illucens* en los envases donde serán desecados en un horno a 60°C durante 30 minutos.

Figura 25. Larvas desecadas de *Hermetia illucens*



- Larvas de *Hermetia illucens* tras el proceso de desecado. Se puede observar un ligero cambio en la tonalidad de estas, así mismo, las larvas secas son mucho más ligeras, indicando que ya no presentan humedad en su interior.

Figura 26. Separación de larvas de *Hermetia illucens*



- Separación de las larvas desecadas de *Hermetia illucens* en base a tres tamaños: pequeñas (arriba), medianas (centro) y grandes (abajo).

Figura 27. Molienda de larvas de *Hermetia illucens*



- Proceso de molienda de las larvas desecadas y separadas de *Hermetia illucens* para obtener harina de larva.

Figura 28. Separación de larvas de *Tenebrio molitor*



- Separación de las larvas congeladas de *Tenebrio molitor* para su conversión en harina. El proceso de conversión en harina de las larvas de *Tenebrio molitor* se realizó de manera diferente al de *Hermetia illucens*, gracias al mayor contenido de grasa de las larvas de tenebrio.

Figura 29. Ebullición de larvas de *Tenebrio molitor*



- Las larvas de *Tenebrio molitor* fueron puestas a ebullición durante 10 minutos, este proceso se utiliza para desinfectar a las larvas y, así mismo, facilitar el proceso de desgrasado siguiente.

Figura 30. Proceso de estrujado de larvas de *Tenebrio molitor*



- Se realizó un proceso de estrujado o desgrasado a las larvas de *Tenebrio molitor*, a fin de eliminar más eficientemente grasas y líquidos de estas.

Figura 31. Muestras obtenidas de las larvas de *Tenebrio molitor* desgrasadas, antes del proceso de desecado



- Tras el proceso de desgrasado se obtuvieron muestras de una fracción sólida de las larvas, las cuáles fueron puestas a desecado en horno a 45°C durante 24 horas.

Figura 32. Muestras de *Tenebrio molitor* tras el proceso de desecado



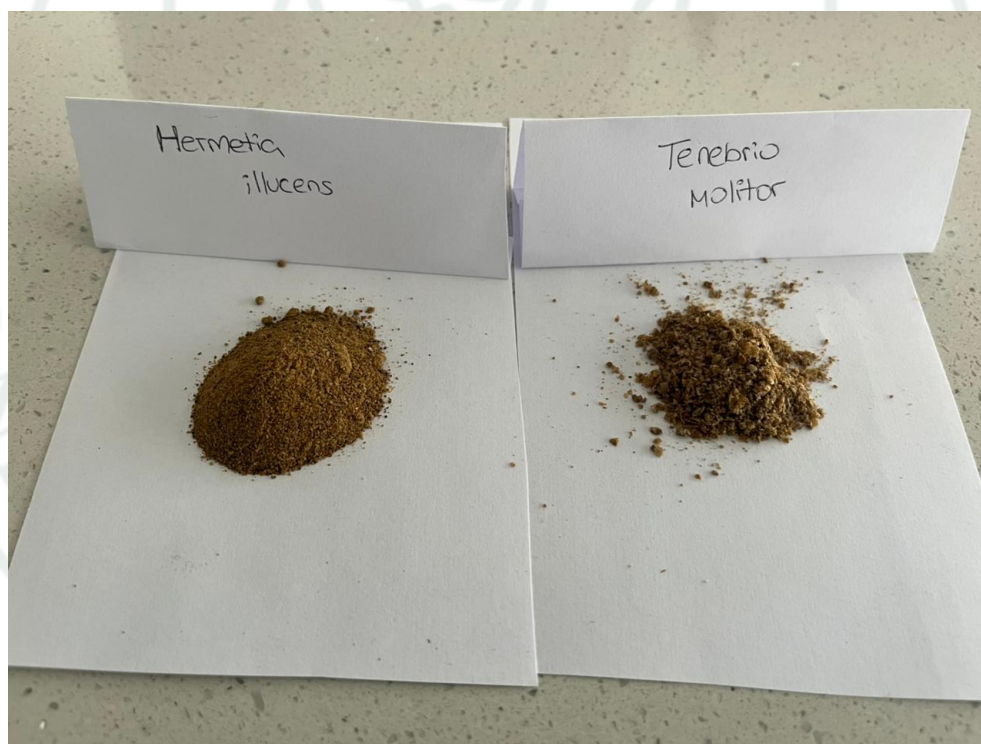
- Estado de las muestras tras el proceso de desecado, se puede observar un cambio en el color y tamaño de estas. Tras este proceso, las muestras fueron molidas para finalmente obtener la harina de larva de *Tenebrio molitor*.

Figura 33. Harinas de larva de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor* obtenidas



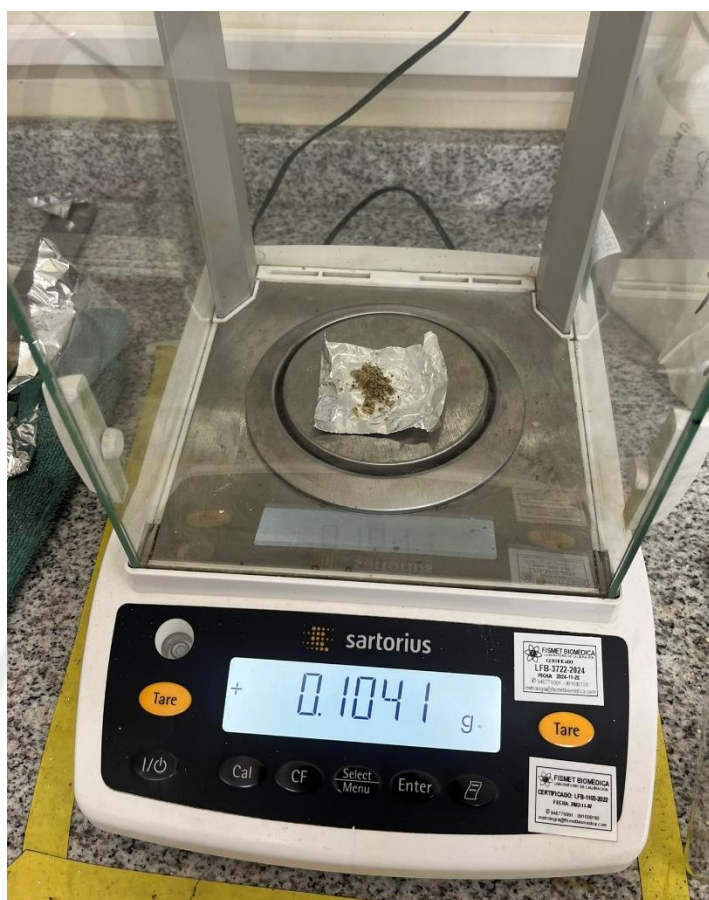
- Harinas de larva de *Hermetia illucens* (fila de arriba) y *Tenebrio molitor* (fila de abajo) obtenidas tras todos los procesos anteriores.

Figura 34. Comparación detallada de harinas de *Hermetia illucens* y *Tenebrio molitor*



- Se observa las harinas obtenidas. A la izquierda: Harina de larva de *Hermetia illucens*. A la derecha: Harina de larva de *Tenebrio molitor*. La harina de *H. illucens* obtenida presentó de color oscuro, con apariencia uniforme y partículas finas de aspecto pulverulento; mientras que la harina de *T. molitor* presentó un color marrón oscuro con diferencias de tonalidad, sus partículas se mostraron menos uniformes, con grumos visibles.

Figura 35. Pesado de las muestras de harina para el proceso de hidrólisis



- Pesado de 0.1g de harina para iniciar el proceso de hidrólisis y derivatización de las muestras.

Figura 36. Proceso de burbujeado de las muestras con una corriente de Nitrógeno



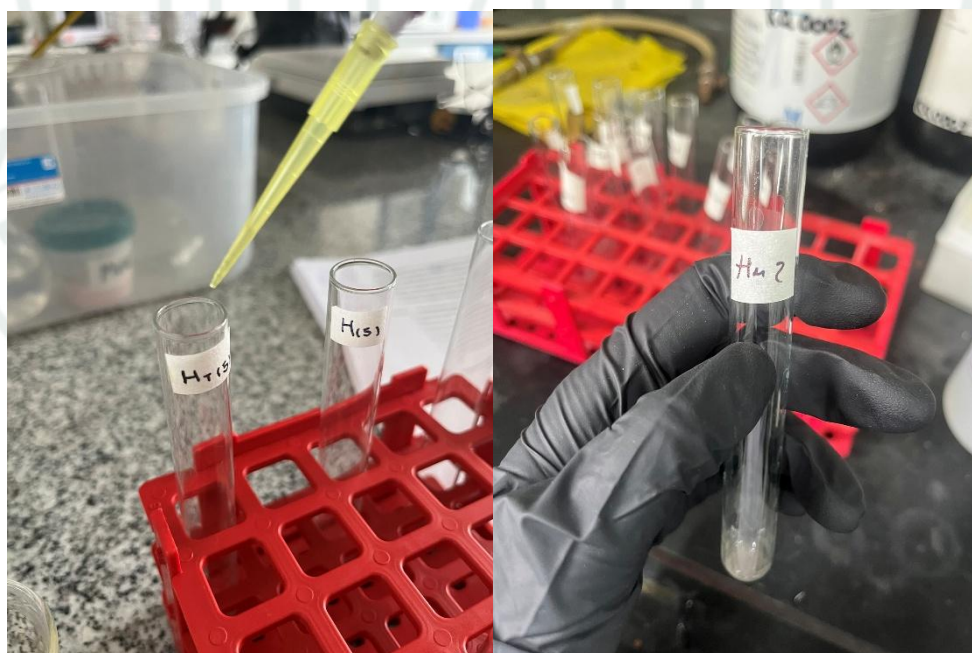
- Las muestras de harina pesadas anteriormente fueron colocadas en tubos Pirex de 20ml, rotuladas, se les añadieron 15 ml de HCl 6N y finalmente fueron burbujeadas con N_2 a fin de eliminar todo el O_2 presente y favorecer la hidrólisis.

Figura 37. Muestras antes del proceso de hidrólisis (izquierda), y después del proceso de hidrólisis a 110°C durante 24 horas (derecha)



- A la izquierda: estado de los tubos con las muestras antes de ingresar a la estufa a 110°C durante 24 horas (Proceso de hidrólisis ácida). A la izquierda: tubos tras el proceso de hidrólisis. Se puede observar el notorio cambio de color de las muestras. Estas muestras fueron filtradas al vacío y enrasadas a 25ml con agua ultrapura.

Figura 38. Proceso de derivatización de las muestras filtradas



- Derivatización de las muestras. Para esto se tomaron alícuotas de 150 µl de las muestras filtradas y para añadirles los reactivos de derivatización (metanol, PITC, TEA), en las concentraciones indicadas en la sección 2.3.2.4.

A clear plastic container with a blue lid and a brass valve on top, connected to a blue and white machine. A clear tube is attached to the bottom of the container.

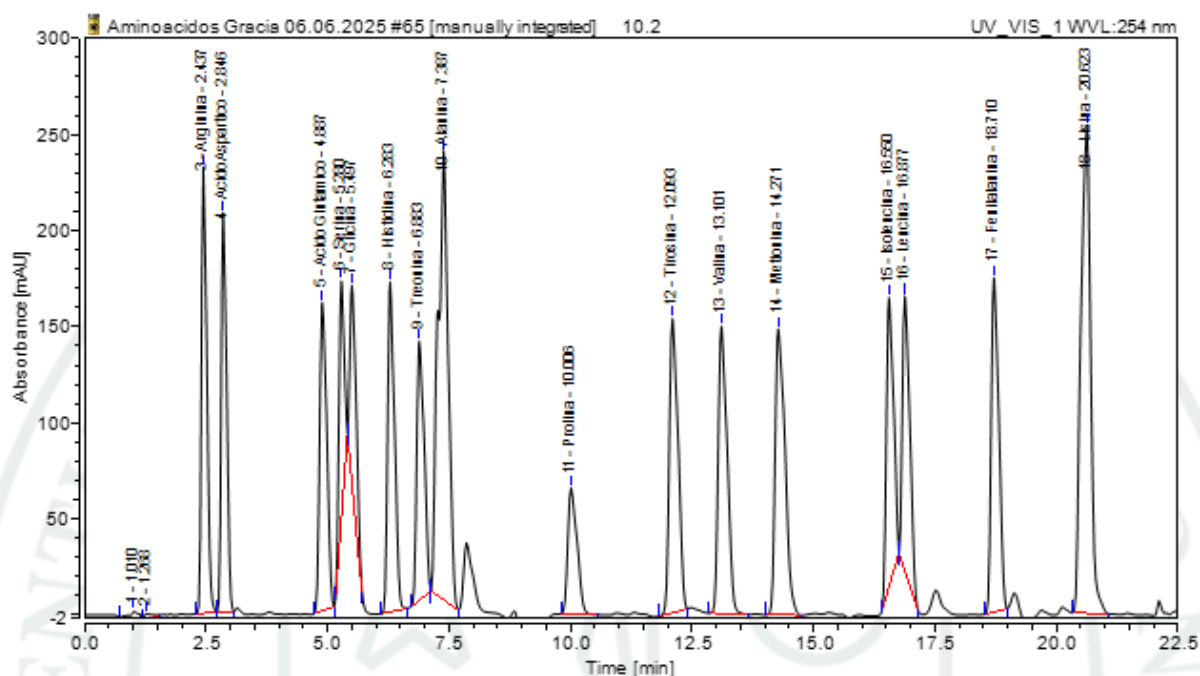
- Figura 40. Muestras derivatizadas, envasadas en viales para su lectura en RP-HPLC**



- 99

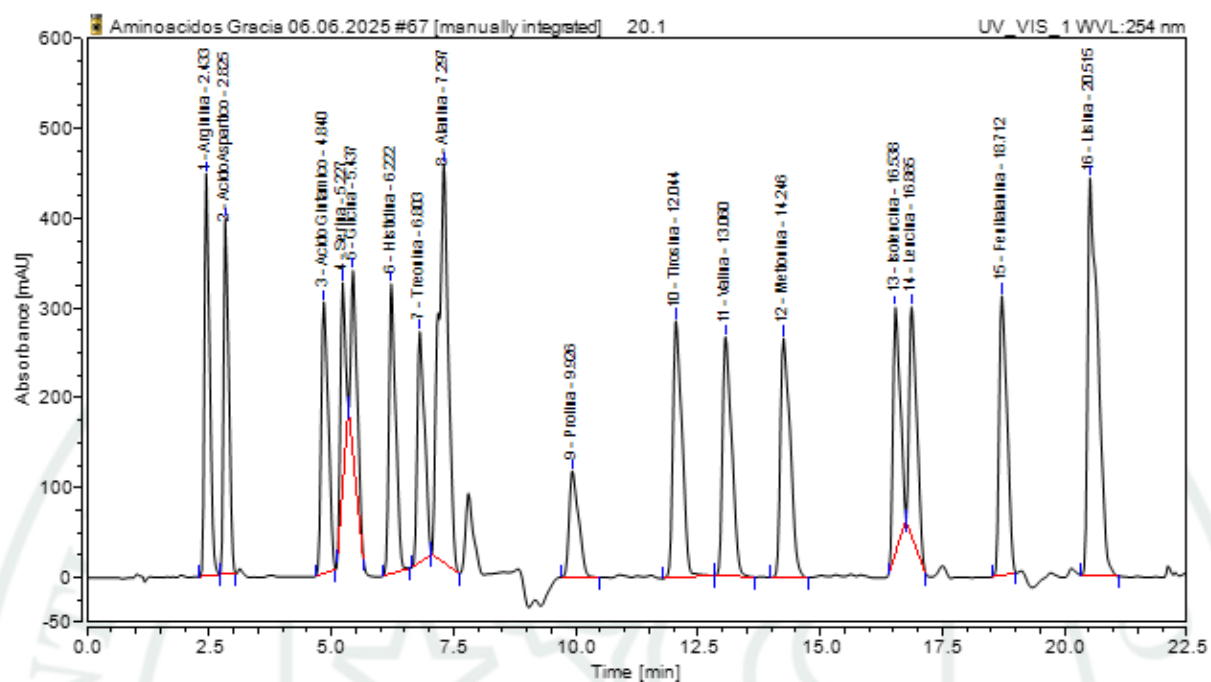
ANEXO 02 CROMATOGRAMAS

Figura 41. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 10 µl del estándar de referencia (Repetición)



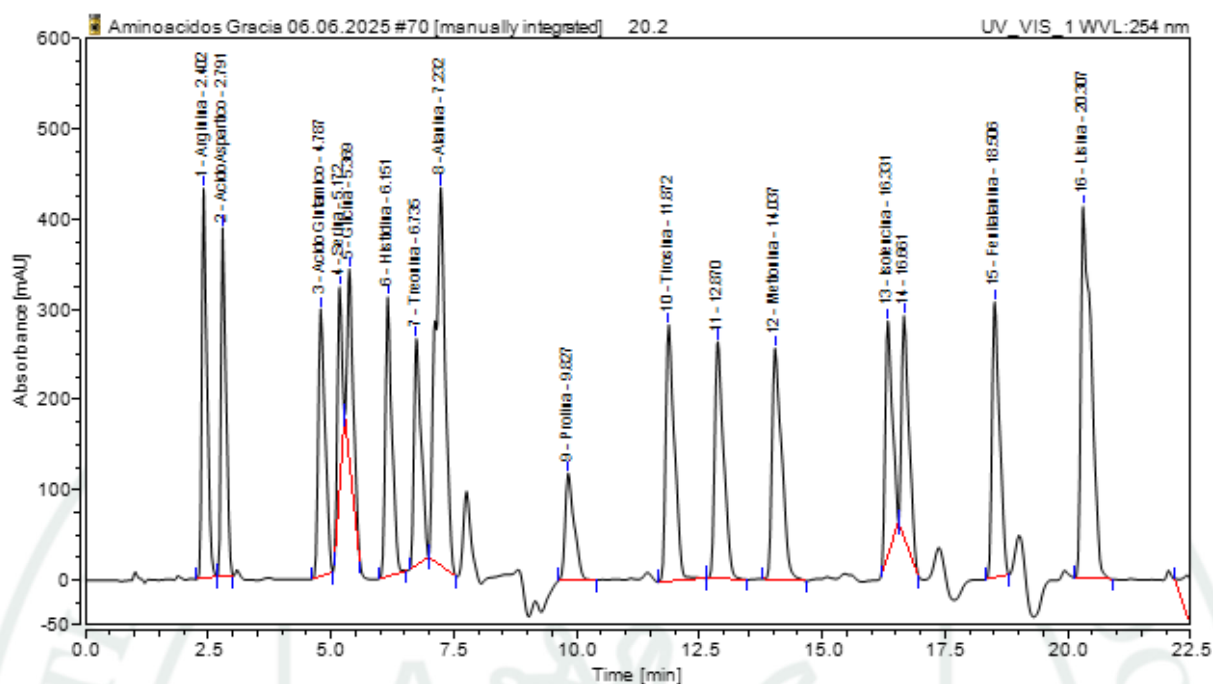
- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, repetición del volumen de estándar de 10µl, se logran observar todos los picos de aminoácidos separados entre sí.

Figura 42. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 20 µl del estándar de referencia



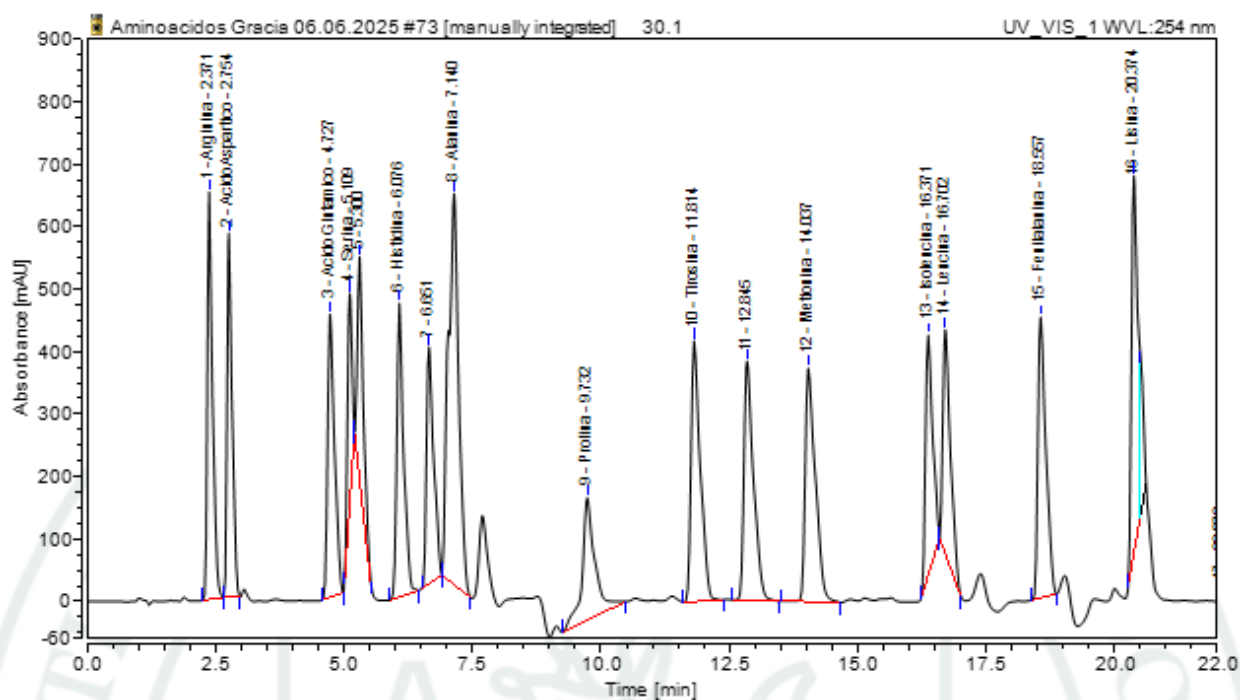
- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, volumen de estándar de 20µl, los picos se logran ver más altos, indicador de mayor concentración de los aminoácidos.

Figura 43. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 20 µl del estándar de referencia (Repetición)



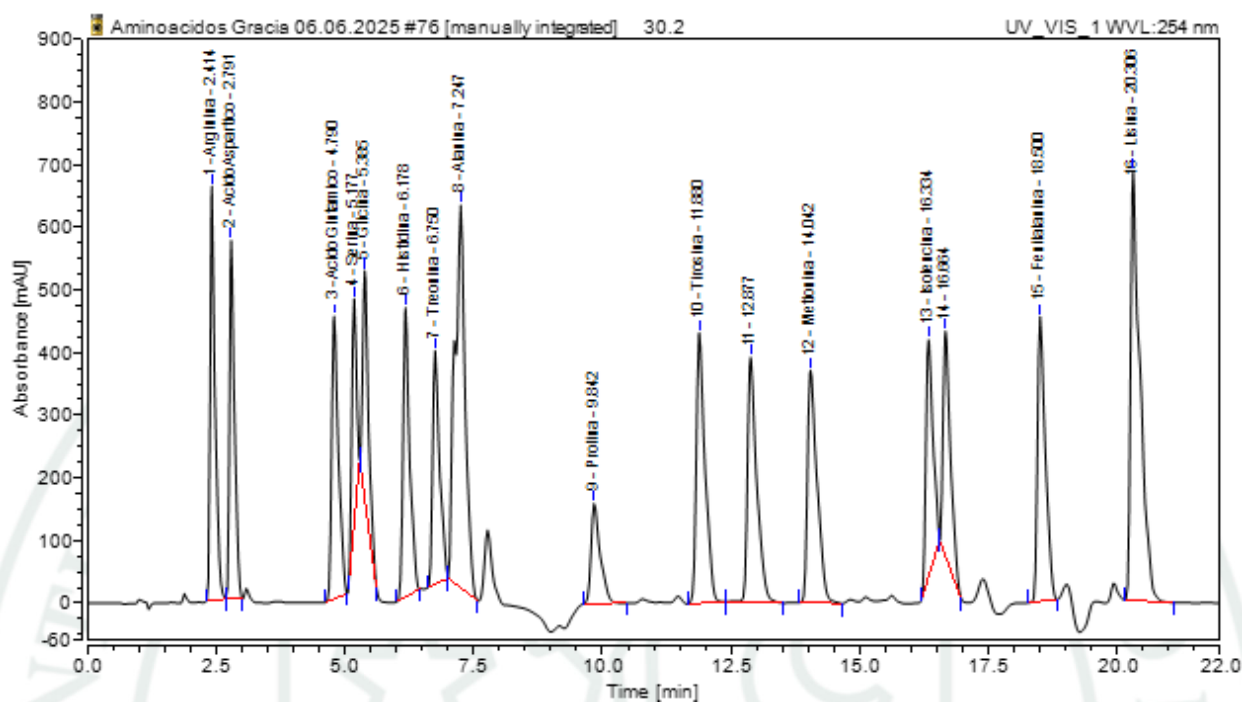
- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, repetición del volumen de estándar de 20µl, los picos se ven más pequeños debido a que aumenta la absorbancia máxima gracias a una interferencia, sin embargo; la absorbancia de los aminoácidos se mantiene estable.

Figura 44. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 30 µl del estándar de referencia



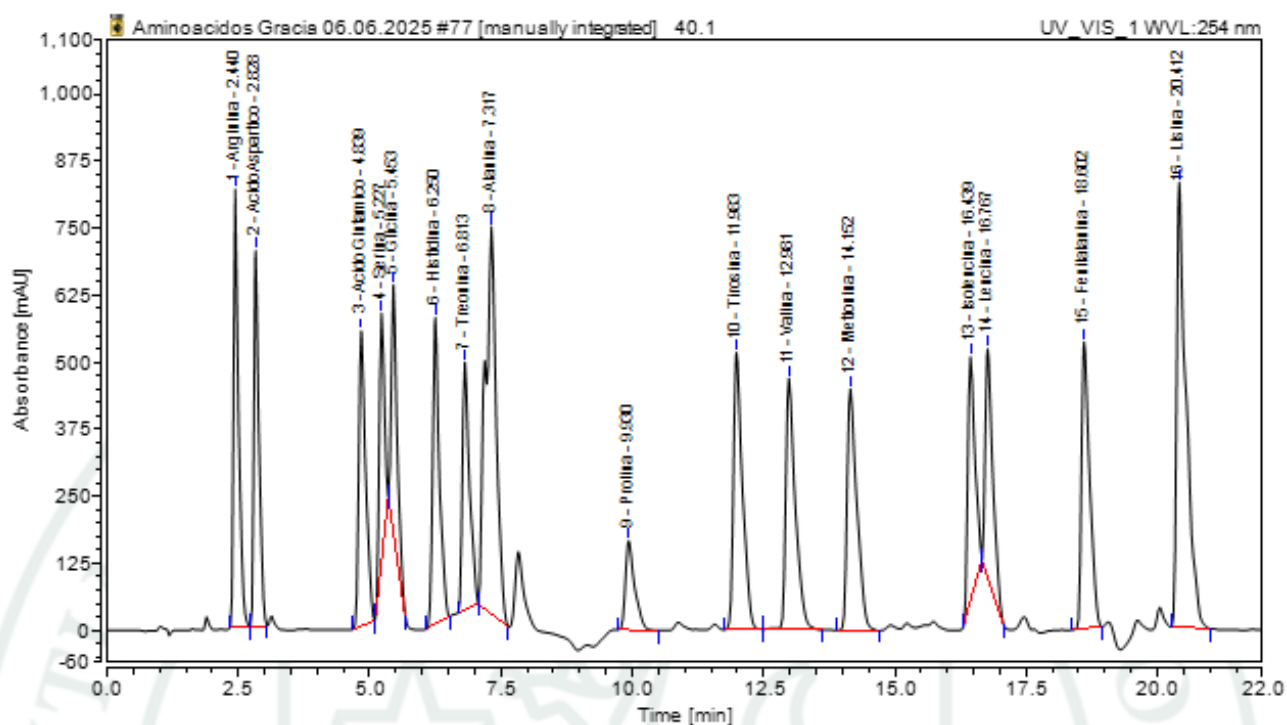
- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, volumen de estándar de 30µl, los picos de aminoácidos alcanzan una absorbancia mayor.

Figura 45. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 30 µl del estándar de referencia (Repetición)



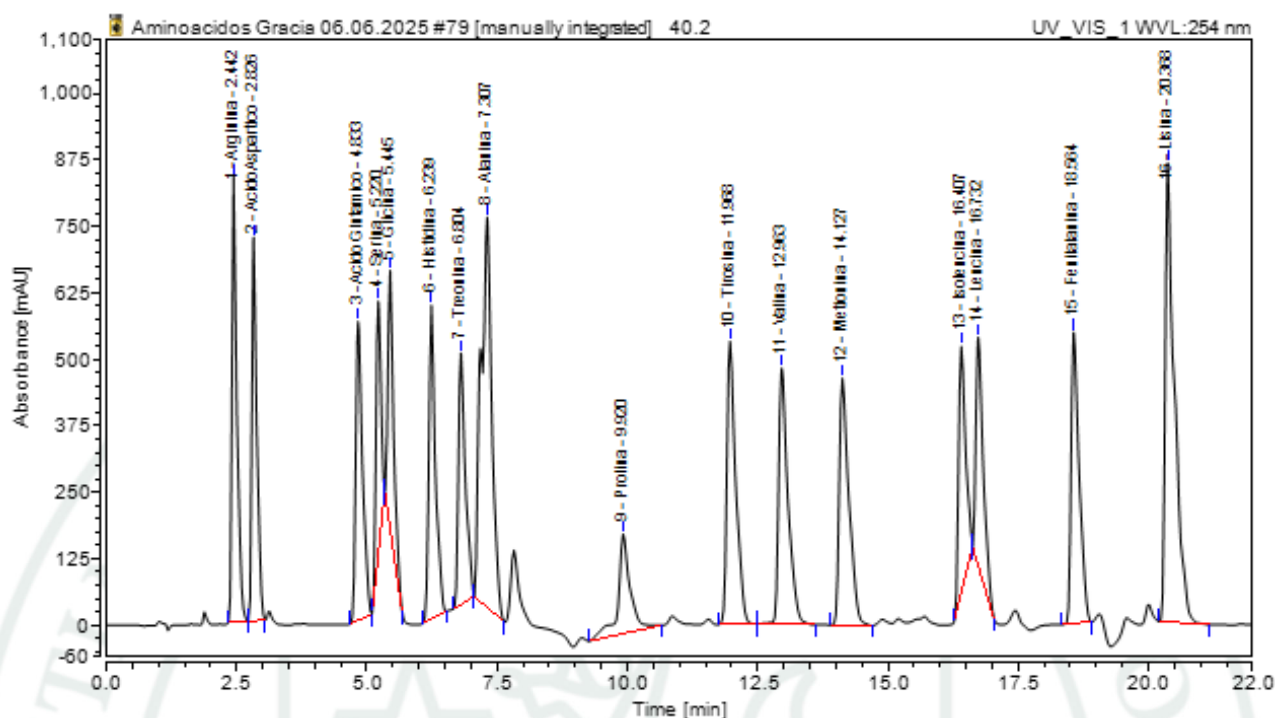
- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, repetición del volumen de estándar de 30µl, se mantiene una absorbancia de los picos similar al de la imagen anterior.

Figura 46. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 40 µl del estándar de referencia



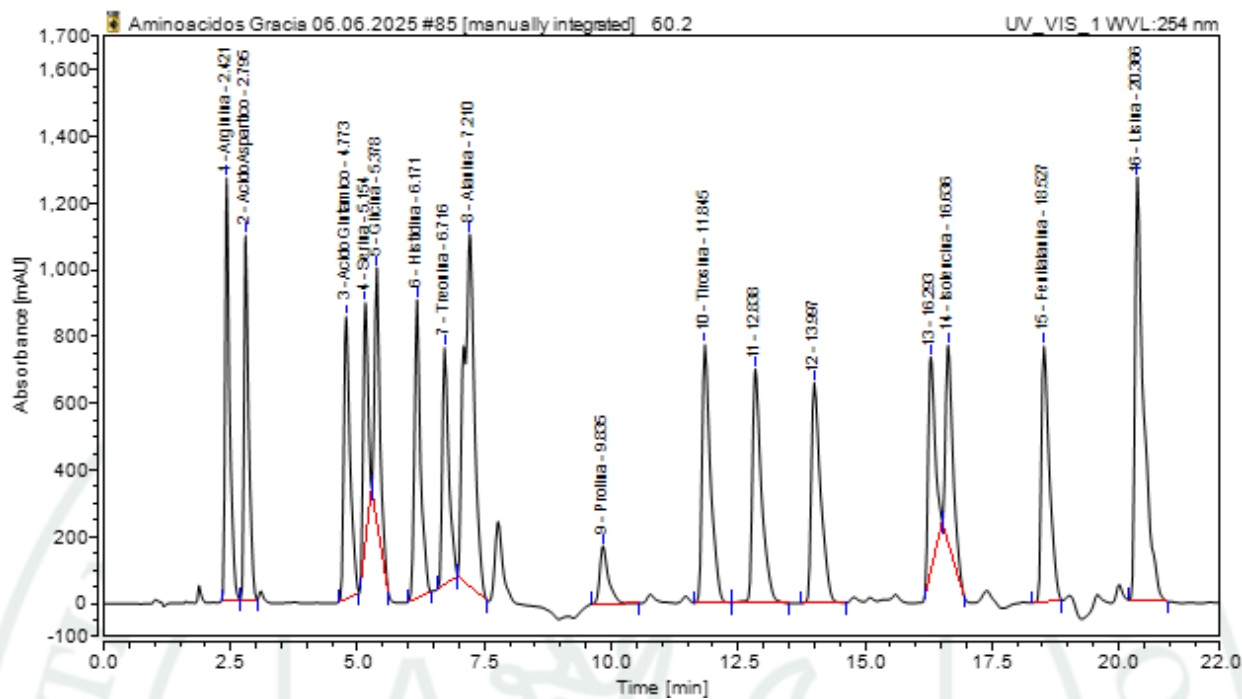
- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, el volumen de estándar de 40µl, se observa mayor absorbancia de los picos de aminoácidos.

Figura 47. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 40 µl del estándar de referencia (Repetición)



- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, repetición del volumen de estándar de 40µl, se mantiene una absorbancia de los picos similar al de la imagen anterior.

Figura 48. Cromatograma de aminoácidos estándar a volumen de 60 µl del estándar de referencia (Repetición)



- Cromatograma correspondiente a la etapa de validación del proceso, repetición del volumen de estándar de 60µl, los picos de aminoácidos alcanzan su máximo nivel de absorbancia.

ANEXO 03

VERIFICACIÓN DE LOS SUPUESTOS DE LOS ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Para la evaluación de los supuestos necesarios para la aplicación de la prueba de análisis de varianza (ANOVA), se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$) para evaluar la normalidad y la prueba de Levene ($\alpha=0,05$) para evaluar la homocedasticidad (homogeneidad de varianzas).

1. Verificación de supuestos para la prueba ANOVA de efecto del tamaño larval

1.1. Normalidad

La prueba de Shapiro-Wilk indicó que, de un total de 48 evaluaciones (16 aminoácidos evaluados en tres tamaños de larvas), 40 grupos cumplieron con la normalidad, representando un porcentaje de 83,3% del total. Las desviaciones se observaron en determinados aminoácidos. Se evidencia que la mayoría de los grupos evaluados presentó una distribución normal.

Tabla 20. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para la verificación del supuesto de normalidad en el análisis del efecto del tamaño larval

Aminoácido	Grupo	Estadístico W	p-valor	Cumple Normalidad
Arginina	P	0,903771	0,450029	Sí
Arginina	M	0,849953	0,226006	Sí
Arginina	G	0,871302	0,302818	Sí
Ácido aspártico	P	0,861564	0,265848	Sí
Ácido aspártico	M	0,864396	0,276261	Sí
Ácido aspártico	G	0,913813	0,502833	Sí
Ácido glutámico	P	0,856343	0,247371	Sí
Ácido glutámico	M	0,983079	0,919829	Sí
Ácido glutámico	G	0,780274	0,071294	Sí
Serina	P	0,948260	0,705265	Sí
Serina	M	0,990960	0,962334	Sí
Serina	G	0,761368	0,049064	No
Glicina	P	0,892710	0,395757	Sí
Glicina	M	0,927755	0,581267	Sí
Glicina	G	0,800369	0,102884	Sí
Histidina	P	0,841596	0,200096	Sí
Histidina	M	0,730381	0,024857	No
Histidina	G	0,757334	0,045130	No
Treonina	P	0,866991	0,286044	Sí
Treonina	M	0,929319	0,590400	Sí
Treonina	G	0,808256	0,117870	Sí
Alanina	P	0,798602	0,099736	Sí
Alanina	M	0,858543	0,255045	Sí
Alanina	G	0,807047	0,115469	Sí
Prolina	P	0,860656	0,262570	Sí

Prolina	M	0,909005	0,477148	Sí
Prolina	G	0,951787	0,727290	Sí
Tirosina	P	0,903994	0,451166	Sí
Tirosina	M	0,936404	0,632528	Sí
Tirosina	G	0,774356	0,063621	Sí
Valina	P	0,865093	0,278864	Sí
Valina	M	0,697046	0,010722	No
Valina	G	0,852719	0,235088	Sí
Metionina	P	0,769179	0,057458	Sí
Metionina	M	0,782584	0,074480	Sí
Metionina	G	0,748972	0,037778	No
Isoleucina	P	0,826638	0,159204	Sí
Isoleucina	M	0,764423	0,052222	Sí
Isoleucina	G	0,759687	0,047393	No
Leucina	P	0,813599	0,128929	Sí
Leucina	M	0,989475	0,954763	Sí
Leucina	G	0,908580	0,474911	Sí
Fenil alanina	P	0,928547	0,585883	Sí
Fenil alanina	M	0,749305	0,038051	No
Fenil alanina	G	0,731996	0,025812	No
Lisina	P	0,835480	0,182545	Sí
Lisina	M	0,770433	0,058905	Sí
Lisina	G	0,770180	0,058611	Sí

1.2.Homogeneidad de varianzas

La prueba de Levene demuestra que 8 de los 16 aminoácidos evaluados (50,0%) cumplen con el supuesto de homocedasticidad. Los aminoácidos que no presentan igualdad de varianzas entre tamaños larvales son: ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, prolina, tirosina, isoleucina, fenilalanina y lisina. Esto indica que existe heterogeneidad en algunos aminoácidos específicos. Sin embargo, dado que el diseño experimental es balanceado y robusto se procedió a utilizar e interpretar los resultados de este análisis ANOVA en el presente trabajo.

Tabla 21. Resultados de la prueba de Levene para la verificación del supuesto de homocedasticidad en el análisis del efecto del tamaño larval

Aminoácido	Estadístico	p-valor	Cumple Homocedasticidad
Arginina	0,118083	0,889977	Sí
Acido aspartico	10,034184	0,005113	No
Acido glutamico	7,838616	0,010685	No
Serina	1,448945	0,284758	Sí
Glicina	1,070614	0,382730	Sí
Histidina	1,938512	0,199490	Sí
Treonina	9,213875	0,006641	No
Alanina	1,273961	0,325705	Sí
Prolina	11,531369	0,003289	No

Tirosina	13,346078	0,002030	No
Valina	1,204338	0,343980	Sí
Metionina	3,454001	0,077059	Sí
Isoleucina	8,556995	0,008283	No
Leucina	0,680538	0,530603	Sí
Fenil alanina	2159,648711	0,000000	No
Lisina	549,440804	0,000000	No

2. Verificación de supuestos para la prueba ANOVA de efecto de la especie

2.1. Normalidad

De las 32 evaluaciones realizadas (16 aminoácidos en 2 especies), 25 grupos cumplieron el supuesto de normalidad, representando un 78,1% del total.

Tabla 22. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para la verificación del supuesto de normalidad en el análisis de la especie

Aminoácido	Grupo	Estadístico W	p-valor	Cumple Normalidad
Arginina	<i>Hermetia</i>	0,976881	0,935045	Sí
Arginina	<i>Tenebrio</i>	0,801644	0,060807	Sí
Ácido aspártico	<i>Hermetia</i>	0,922588	0,524195	Sí
Ácido aspártico	<i>Tenebrio</i>	0,976465	0,932698	Sí
Ácido glutámico	<i>Hermetia</i>	0,919394	0,501007	Sí
Ácido glutámico	<i>Tenebrio</i>	0,758081	0,023872	No
Serina	<i>Hermetia</i>	0,846066	0,146236	Sí
Serina	<i>Tenebrio</i>	0,681471	0,003920	No
Glicina	<i>Hermetia</i>	0,823070	0,093801	Sí
Glicina	<i>Tenebrio</i>	0,929522	0,576419	Sí
Histidina	<i>Hermetia</i>	0,802162	0,061461	Sí
Histidina	<i>Tenebrio</i>	1,000000	1,000000	Sí
Treonina	<i>Hermetia</i>	0,931704	0,593323	Sí
Treonina	<i>Tenebrio</i>	0,914402	0,465980	Sí
Alanina	<i>Hermetia</i>	0,712952	0,008440	No
Alanina	<i>Tenebrio</i>	0,897831	0,361267	Sí
Prolina	<i>Hermetia</i>	0,918840	0,497046	Sí
Prolina	<i>Tenebrio</i>	0,910621	0,440493	Sí
Tirosina	<i>Hermetia</i>	0,935824	0,625765	Sí
Tirosina	<i>Tenebrio</i>	0,913611	0,460574	Sí
Valina	<i>Hermetia</i>	0,968707	0,883636	Sí
Valina	<i>Tenebrio</i>	0,960961	0,827117	Sí
Metionina	<i>Hermetia</i>	0,848227	0,152283	Sí
Metionina	<i>Tenebrio</i>	0,921148	0,513670	Sí
Isoleucina	<i>Hermetia</i>	0,755667	0,022621	No
Isoleucina	<i>Tenebrio</i>	0,961915	0,834368	Sí

Leucina	<i>Hermetia</i>	0,888452	0,310157	Sí
Leucina	<i>Tenebrio</i>	0,861288	0,193630	Sí
Fenil alanina	<i>Hermetia</i>	0,666086	0,002661	No
Fenil alanina	<i>Tenebrio</i>	0,763630	0,026994	No
Lisina	<i>Hermetia</i>	0,717829	0,009476	No
Lisina	<i>Tenebrio</i>	0,900970	0,379694	Sí

2.2.Homogeneidad de varianzas

Esta prueba indicó que 12 de los 16 aminoácidos presentan homogeneidad entre especies (75,0%). Estos resultados demuestran un mayor cumplimiento en este supuesto en comparación con el análisis por tamaño larval.

Tabla 23. Resultados de la prueba de Levene para la verificación del supuesto de homocedasticidad en el análisis del efecto de la especie

Aminoácido	Estadístico	p-valor	Cumple Homocedasticidad
Arginina	0,057217	0,815782	Sí
Acido aspartico	6,508829	0,028803	No
Acido glutamico	0,629331	0,446015	Sí
Serina	0,570288	0,467558	Sí
Glicina	4,135263	0,069393	Sí
Histidina	5,188796	0,045950	No
Treonina	16,451801	0,002301	No
Alanina	0,496484	0,497131	Sí
Prolina	0,152791	0,704081	Sí
Tirosina	5,894959	0,035574	No
Valina	4,805701	0,053139	Sí
Metionina	0,709807	0,419202	Sí
Isoleucina	2,114886	0,176529	Sí
Leucina	0,005039	0,944807	Sí
Fenil alanina	2,551987	0,141239	Sí
Lisina	2,463964	0,147557	Sí

A pesar de que, no todos los aminoácidos cumplen satisfactoriamente las pruebas de los supuestos, la robustez que el análisis ANOVA presenta ante violaciones moderadas de los supuestos, especialmente cuando los tamaños de muestra son iguales (como en este estudio), permite mantener la validez de las conclusiones principales del análisis.