



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias



Máster en Biotecnología Avanzada

Memoria do Traballo de Fin de Máster

Desarrollo y optimización de una metodología de extracción de larvas de *Tenebrio molitor* para la obtención de extractos con péptidos de interés biológico

Desenvolvemento e optimización dunha metodoloxía de extracción de larvas de *Tenebrio molitor* para a obtención de extractos con péptidos de interese biolóxico

Development and optimization of an extraction methodology from *Tenebrio molitor* larvae to obtain extracts with peptides of biological interest

Nerea González Puente

Curso: 2021 – 2022. Convocatoria: Julio

*Directora: Dra. María Ángeles Expósito Castro
Codirector: Dr. Manuel Becerra Fernández*

La Dra. María Ángeles Expósito Castro y el Dr. Manuel Becerra Fernández, como tutores de la alumna Dña. Nerea González Puente, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada, autorizan la presentación del Trabajo Fin de Máster: “Desarrollo y optimización de una metodología de extracción de larvas de *Tenebrio molitor* para la obtención de extractos con péptidos de interés biológico”, para su defensa ante el tribunal evaluador.

Firmado digitalmente
por 36117547A
ÁNGELES EXPÓSITO
(C:B27498146)
Fecha: 2022.07.07
10:20:27 +02'00'

BECERRA
FERNANDEZ
Z MANUEL
-
32820909R

Firmado digitalmente por
BECERRA FERNANDEZ
MANUEL - 32820909R
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-328209
09R, givenName=MANUEL,
sn=BECERRA FERNANDEZ,
cn=BECERRA FERNANDEZ
MANUEL - 32820909R
Fecha: 2022.07.07 10:54:12
+02'00'

GONZALEZ
PUENTE
NEREA -
33559740A

Firmado
digitalmente por
GONZALEZ
PUENTE NEREA -
33559740A
Fecha: 2022.07.07
13:16:04 +02'00'

ÍNDICE

RESUMEN/ RESUMO/ ABSTRACT

PALABRAS CLAVE/ PALABRAS CHAVE/ KEYWORDS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contextualización y legislación	1
1.2. Expectativas de futuro	3
1.3. Caracterización de Tenebrio molitor	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Materias primas	7
3.2. Procedimientos de extracción	7
3.2.1. <i>Procedimiento de extracción 1</i>	7
3.2.2. <i>Procedimiento de extracción 2</i>	8
3.3. Ensayos realizados	9
3.3.1. <i>Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos</i>	9
3.3.2. <i>Método de Bradford (Coomassie)</i>	11
3.3.3. <i>Capacidad antioxidante DPPH</i>	11
3.3.4. <i>Capacidad antimicrobiana</i>	12
3.3.5. <i>HPLC-DADtriple TOF</i>	13
4. RESULTADOS	15
4.1. Ensayos realizados	15
4.1.1. <i>Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos</i>	15
4.1.2. <i>Método de Bradford (Coomassie)</i>	16
4.1.3. <i>Capacidad antioxidante DPPH</i>	17
4.1.4. <i>Capacidad antimicrobiana</i>	20
4.1.5. <i>HPLC-DAD-triple TOF</i>	21
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27
7. ANEXOS	30

RESUMEN

Los insectos comestibles están cobrando especial importancia para la comunidad científica gracias a sus beneficiosas características tanto para la salud humana como animal, así como para su empleo en la agricultura sostenible. Esto es debido a su reconocido valor nutricional ya que se ha visto que poseen compuestos bioactivos a base de lípidos, proteínas y/o péptidos de interés agronómico. Sin embargo, sus características organolépticas no son atractivas para los consumidores y por ello, numerosas investigaciones estudian métodos de extracción de proteínas de insectos para agregarlos a diferentes productos alimentarios o a diversos formulados comercializables como bioestimulantes agrícolas. Actualmente, se desperdician grandes cantidades de residuos provenientes de la industria hortofrutícola que pueden ser empleados para la cría de estos insectos comestibles aplicando así los principios de bioeconomía y economía circular. El principal objetivo a abordar en el presente estudio es la puesta a punto de una metodología de extracción eficaz que permita el aislamiento de péptidos y/o proteínas bioactivas a partir de larvas de *Tenebrio molitor* alimentadas con pienso control, para su posterior empleo en diversos productos con potencial interés comercial tanto en el campo de la sanidad animal como vegetal. Para ello, se probaron dos métodos de extracción, con y sin ultrasonidos, realizando una eliminación de lípidos antes o después de la extracción, a dos proporciones de biomasa de insecto:disolvente cada uno (1:3 y 1:5) y llevando a cabo una o dos extracciones consecutivas. Posteriormente, se ha evaluado la eficacia de las extracciones teniendo en cuenta diversos factores: la cantidad de extracto obtenido, su contenido total de proteínas, su actividad antimicrobiana y antioxidante y la cantidad de péptidos detectados e identificados. Tras los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se ha determinado que el método de extracción más adecuado para obtener el mayor rendimiento de los extractos es un método de extracción basado en un paso previo de eliminación de lípidos, seguido de una extracción empleando sonicación directa, ya que, el residuo sólido obtenido gracias al mismo fue mayor. Además, como era de esperar cuando se realizan dos extracciones se obtienen más gramos de residuo sólido. Estos resultados se ven apoyados por la concentración proteica obtenida mediante Bradford, el porcentaje de inhibición de DPPH y el número de péptidos aislados. Sin embargo, no se ha encontrado ningún péptido con actividad biológica.

Palabras clave: bioactividad, economía circular, insectos, péptidos, *Tenebrio molitor*.

RESUMO

Os insectos comestibles cobran especial importancia para a comunidade científica grazas ás súas características beneficiosas para a saúde humana e animal, así como polo seu emprego na agricultura sostible. Isto débese ao seu recoñecido valor nutricional, posto que se comprobou que posúen compostos bioactivos a base de lípidos, proteínas e/ou péptidos de interese agronómico. Porén, as súas características organolépticas non son atractivas para os consumidores e, por iso, numerosas investigacións estudan métodos de extracción de proteínas dos insectos para engadila a diferentes produtos alimenticios ou a diversas formulacións comercializables como bioestimulantes agrícolas. Na actualidade, desperdicianse grandes cantidades de residuos da industria hortofrutícola que poden ser utilizados para a cría destes insectos comestibles, aplicando así os principios da bioeconomía e da economía circular. O principal obxectivo a tratar neste estudo é o desenvolvemento dunha metodoloxía de extracción eficiente que permita o illamento de péptidos e/ou proteínas bioactivas de larvas de *Tenebrio molitor* alimentadas con penso control, para o seu posterior uso en diversos produtos con potencial interese comercial tanto no ámbito da sanidade animal e vexetal. Para iso probáronse dous métodos de extracción, con e sen ultrasóns, realizando unha eliminación de lípidos antes ou despois da extracción, en dúas proporcións de biomasa de insectos:disolvente cada unha (1:3 e 1:5) e realizando unha ou dúas extraccións consecutivas. Posteriormente, avaliouse a eficacia das extraccións tendo en conta diversos factores: a cantidade de extracto obtido, o seu contido total de proteínas, a súa actividade antimicrobiana e antioxidante e a cantidade de péptidos detectados e identificados. Tralos resultados obtidos nas diferentes probas, determinouse que o método de extracción máis axeitado para obter o maior rendemento dos extractos é un método de extracción baseado nun paso previo de eliminación de lípidos, seguido dunha extracción mediante sonicación directa, xa que, o residuo sólido obtido grazas a el foi maior. Ademais, como era de esperar, cando se realizan dúas extraccións obtéñense máis gramos de residuo sólido. Estes resultados están apoiados pola concentración de proteína obtida por Bradford, a porcentaxe de inhibición de DPPH e o número de péptidos illados. Non obstante, non se atopou ningún péptido con actividade biolóxica.

Palabras chave: bioactividade, economía circular, insectos, péptidos, *Tenebrio molitor*.

ABSTRACT

Edible insects are gaining special importance for the scientific community thanks to their beneficial characteristics for both human and animal health, as well as for their use in sustainable agriculture. This is due to its recognized nutritional value, since it has been seen that they have bioactive compounds based on lipids, proteins and/or peptides of agronomic interest. However, its organoleptic characteristics are not attractive to consumers and, therefore, numerous investigations study methods of extracting proteins from insects to add them to different food products or to various marketable formulations as agricultural biostimulants. Currently, large amounts of waste from the fruit and vegetable industry are wasted that can be used to breed these edible insects, thus applying the principles of bioeconomy and circular economy. The main objective to be addressed in this study is the development of an efficient extraction methodology that allows the isolation of peptides and/or bioactive proteins from *Tenebrio molitor* larvae fed with control feed, for their subsequent use in various products with potential commercial interest both in the field of animal and plant health. To do this, two extraction methods were tested, with and without ultrasound, performing a lipid removal before or after extraction, at two proportions of insect biomass:solvent each (1:3 and 1:5) and carrying out one or two consecutive extractions. Subsequently, the efficacy of the extractions has been evaluated taking into account various factors: the amount of extract obtained, its total protein content, its antimicrobial and antioxidant activity and the amount of peptides detected and identified. After the results obtained in the different tests, it has been determined that the most suitable extraction method to obtain the highest yield of the extracts is an extraction method based on a previous step of lipid elimination, followed by an extraction using direct sonication, since that, the solid residue obtained thanks to it was greater. In addition, as expected, when two extractions are carried out, more grams of solid residue are obtained. These results are supported by the protein concentration obtained by Bradford, the percentage of DPPH inhibition and the number of isolated peptides. However, no peptide with biological activity has been found.

Keywords: bioactivity, circular economy, insects, peptides, *Tenebrio molitor*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contextualización y legislación

Actualmente, la industria alimentaria está mostrando un gran interés por incluir los insectos comestibles en la dieta humana. Si bien es cierto que la entomofagia es una práctica habitual en Asia, África y América Latina, en los últimos años, los insectos comestibles han ganado especial atención en los países occidentales. Esto se debe al reconocido valor nutricional que poseen (van Huis & Oonincx, 2017). Numerosas investigaciones han demostrado que los insectos presentan un alto contenido en macronutrientes, proteínas, lípidos, ciertos alcaloides y compuestos fenólicos (van Huis et al., 2013; Navarro del Hierro et al., 2020). El sector agrícola se enfrenta al desafío de alimentar una población en continuo crecimiento y para satisfacer la gran demanda global se necesitan fuentes de alimentos diferentes de las tradicionales. Por este motivo, se ha generado un interés en los insectos comestibles cada vez mayor ya que la cría de estos es más respetuosa con el medioambiente que la producción de carne tradicional. (Grau et al., 2017; van Huis & Oonincx, 2017; Bordiean et al., 2020; Keil et al., 2022). Así, esta sería una alternativa más sostenible a los lípidos y proteínas de origen animal tanto para la dieta humana como para la alimentación animal (Choi et al., 2017; Navarro del Hierro et al., 2020). La cría de insectos emite menos gases de efecto invernadero y requiere menores cantidades de alimento por unidad de proteína producida si se compara con el ganado (van Huis et al., 2013; Choi et al., 2017).

Sin embargo, los insectos poseen unas características organolépticas que los hacen poco atractivos como alimento en la cultura occidental. Por ello, la comunidad científica está investigando sobre métodos de extracción de proteínas para agregarlos a diversos alimentos como productos cárnicos o lácteos, con el fin de aumentar su aceptación (van Huis et al., 2013). La mayoría de los productos comercializados son extractos específicos de insectos para su incorporación a productos alimentarios, especialmente aquellos declarados como fuentes de proteínas. Además, cabe destacar la importancia de explorar la presencia de compuestos diferentes de proteínas de interés para el consumo humano como pueden ser los lípidos, o los compuestos fenólicos (Navarro del Hierro et al., 2020). Recientes investigaciones han descrito compuestos bioactivos con actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antiproliferativas o antioxidantes, aunque la información al respecto todavía es escasa y se precisan más estudios. A modo de ejemplo, Zielińska, Karaś y Jakubczyk (2017) describieron un efecto antioxidante y antiinflamatorio de péptidos

obtenidos de *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria* y *Gryllobates sigillatus*. Los compuestos fenólicos parecen tener un papel importante en el efecto antioxidante de los extractos de insectos (Navarro del Hierro et al., 2020). Por otra parte, estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* en ratones que fueron alimentados a base de dietas ricas en grasas, también han demostrado un efecto antiadipogénico tras la exposición de los adipocitos a un extracto de *Tenebrio molitor* y *Allomyrina dichotoma* (Yoon et al., 2015; Seo et al., 2017).

Tras el gran interés generado, en 2014 la Comisión Europea solicitó a la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) la evaluación de los riesgos microbiológicos, químicos y ambientales derivados de la producción y consumo de insectos como alimento tanto para humanos como para animales, de acuerdo con el artículo 29 del Reglamento (CE) 178/2002 (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022). Para esta evaluación, se propuso un listado de aquellas especies de insectos que se consideran con un alto potencial para su empleo como alimento humano y animal en la Unión Europea en la que se incluyen: *Acheta domesticus*, *Achroia grisella*, *Alphitobius diaperinus*, *Bombyx mori*, *Galleria mellonella*, *Gryllobates sigillatus*, *Hermetia illucens*, *Locusta migratoria migratorioides*, *Musca domestica*, *Schistocerca americana*, *Tenebrio molitor* y *Zophobas atratus*. Así, la EFSA elaboró un informe de evaluación de riesgos asociados a la producción y consumo de estos insectos para la alimentación humana que publicó en 2015 y en el que se determinó la necesidad de seguir investigando en este ámbito (EFSA Scientific Committee, 2015). Asimismo, en 2018, los insectos han sido incluidos en la definición de nuevo alimento de acuerdo al Reglamento (UE) 2015/2283, en la categoría de "alimentos que consisten en animales o sus partes, aislados de ellos o producidos a partir de ellos". En este sentido, para comercializar nuevos insectos se debe presentar una solicitud a la Comisión Europea y una vez que se incluyan en la lista de la Unión Europea podrán ser comercializados. Este hecho, permitió la introducción segura y regulada de insectos comestibles en el mercado europeo. Los insectos que actualmente pueden estar en el mercado europeo por estar acogidos a las medidas transitorias establecidas en el Reglamento (UE) 2015/2283, relativo a lo que se conoce como nuevos alimentos, mientras se llega a una determinación sobre su inclusión o no en la lista de la Unión Europea (Reglamento de Ejecución (UE) 2017/2470) son: *Acheta domesticus*, *Alphitobius diaperinus*, *Apis mellifera*, *Gryllobates sigillatus*, *Hermetia illucens*, *Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria* y *Tenebrio molitor*. En 2021, se publicó en el Diario Oficial de la Unión Europea la primera autorización que permite la comercialización en Europa de un insecto comestible, la larva de *Tenebrio molitor*. Así, ya son tres los insectos

comestibles autorizados bajo el Reglamento (UE) 2015/2283 ya que también se han incluido recientemente *Locusta migratoria* y *Acheta domesticus* (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2022).

1.2. Expectativas de futuro

Hoy en día se desperdician grandes cantidades de alimentos procedentes de la industria hortofrutícola en los procesos industriales. En este sentido, estos podrían emplearse como alimento para la cría de insectos, ya que se ha visto que pueden bioconvertir biomasa vegetal en proteínas o en otros compuestos de interés. Por este motivo, los insectos comestibles están generando un gran interés entre la comunidad científica. Así, novedosas líneas de investigación proponen optimizar la gestión de los cultivos para garantizar la sostenibilidad de los procesos a la vez que se cumplen con las demandas de producción. De esta forma, se pueden obtener nuevos productos de residuo cero aplicando los principios de bioeconomía y economía circular. En el ámbito de la investigación agroindustrial se están desarrollando innovadoras metodologías cuyo objetivo principal es proporcionar soluciones al sector agrícola mediante el empleo de estrategias biotecnológicas de insectos a partir de la valorización de residuos pertenecientes a la industria hortofrutícola (Grau et al., 2017).

Asimismo, según investigaciones recientes a partir de la biomasa de insectos se espera obtener compuestos bioactivos a base de lípidos, proteínas y/o péptidos de interés agronómico que podrían incluirse en alimentos para humanos y animales o para su uso en la agricultura ecológica (Grau et al., 2017; Colla et al., 2017). Así, el empleo de insectos permite aumentar el valor añadido de los subproductos. Por una parte, los nuevos productos se podrían adicionar en piensos para animales o en alimentos adecuados para la dieta humana ricos en proteínas y, por otra parte, como insumos agrícolas para mejorar el rendimiento de los cultivos gracias a los compuestos bioactivos con potencial bioestimulante, antiestresante y/o inductor de defensas, para ser incluidos en una formulación final que pueda ser comercializada. Así, se podrían obtener productos que puedan utilizarse en el campo minimizando el impacto medioambiental de la agricultura tradicional, y avanzar hacia procesos agrarios más sostenibles maximizando la utilización de los recursos disponibles. El desarrollo de estos productos es una alternativa de gran interés que está evolucionando con el propósito de abordar el desafío del incremento de la producción como consecuencia del aumento poblacional (Colla et al., 2017).

No obstante, también existen riesgos derivados de la alimentación con insectos comestibles. La seguridad microbiológica se ve influenciada por la carga microbiana que posee el producto original del que se alimentan los insectos por lo que, si estos contienen patógenos, podrían ser transmitidos a los insectos y posteriormente al consumidor de los mismos. Por este motivo, es necesario realizar un análisis riguroso en relación con este ámbito. Además, es de especial importancia detectar la presencia de diversos compuestos tóxicos cuando se empleen alimentos secundarios industriales para la cría de los insectos ya que estos podrían acumularse derivados de la utilización de pesticidas en los cultivos. De igual modo, se han realizado diversos estudios atendiendo a los alérgenos que pudieran poner en peligro al consumidor (Grau et al., 2017).

1.3. Caracterización de Tenebrio molitor

Tenebrio molitor es un insecto perteneciente a la familia *Tenebrionidae* y al orden *Coleoptera*. La larva de *T. molitor* es conocida comúnmente como gusano amarillo de la harina. Presenta hábitos alimenticios de carácter omnívoro (Gkinali et al., 2022).

En cuanto a su ciclo biológico (Figura 1), se trata de un insecto holometábolo, es decir, presenta metamorfosis completa pasando por cuatro estadios a lo largo de su vida: huevo, larva, pupa e imago o adulto. Su ciclo de vida se completa alrededor de 60 días pudiendo alargarse uno o dos años si las condiciones ambientales en las que se encuentra no son favorables. Los huevos son de color blanco brillante y morfológicamente arriñonados. La eclosión de los mismos ocurre a las dos semanas a una temperatura de 25 °C. Este hecho se ve directamente influenciado por la temperatura por lo que podría variar entre 4 (a 15 °C) y 34 días (a 26-30 °C). Por su parte, las larvas presentan forma cilíndrica pudiendo alcanzar 2,5 cm de largo. También son inicialmente de color blanco que se va tornando a marrón según se acerca el momento de la metamorfosis. Las larvas se comienzan a curvar adquiriendo una forma característica de “C” antes de convertirse en pupas. Estas no pueden comer ya que no poseen aparato digestivo. Tras 7 días aproximadamente se convierten en adultos de color marrón oscuro con un esclerotizado caparazón y una vida útil de entre 37 y 96 días. Las hembras adultas ponen alrededor de 40 huevos al día mientras que su fecundidad oscila entre 250 y 1000 huevos a lo largo de su vida (Gkinali et al., 2022).

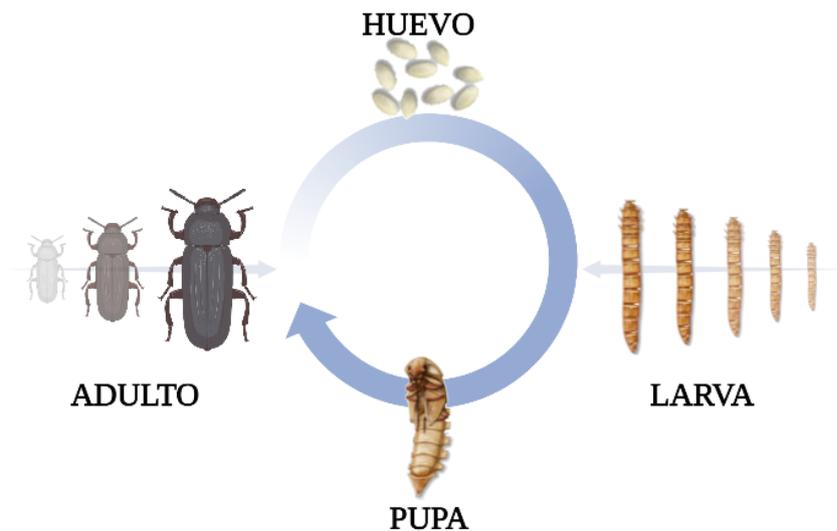


Figura 1. Ciclo de vida de Tenebrio molitor. Modificado de Gkinali et al., (2022).

El cultivo de *Tenebrio molitor* para su empleo en procesos industriales está en continuo crecimiento ya que se ha reconocido que poseen un perfil nutricional de gran interés. Además, los requerimientos para su cría son menores en comparación con la producción ganadera convencional y se sabe que su tasa de crecimiento se ve influenciada por las condiciones ambientales como la humedad y la temperatura, siendo el óptimo el 70 % y 25 °C respectivamente. Se ha visto también que tanto la rentabilidad y sostenibilidad del proceso de cría como sus enriquecimientos nutricionales dependen de los alimentos que se incluyen en su dieta (Gkinali et al., 2022).

En 2018, la empresa biotecnológica SAS EAP Group presentó una solicitud a la Comisión Europea de conformidad con el artículo 10 del Reglamento (UE) 2015/2283 para comercializar las larvas de *Tenebrio molitor* como nuevo alimento. Así, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se encargó de la realización del dictamen científico sobre el mismo. Para ello, se consideró como nuevo alimento a la larva de *T. molitor* secada térmicamente, ya sea como insecto seco entero o en polvo. Tras la realización del Panel de Nutrición, Nuevos Alimentos y Alérgenos Alimentarios de la EFSA se determinó que sus componentes principales son proteínas, grasas y fibra en forma de quitina y, además, se observó que los niveles de contaminantes en el nuevo alimento dependen de los niveles de dichas sustancias en el alimento de los insectos. Así, se determinó que su uso es seguro atendiendo a los niveles de consumo propuestos. Además, se destacó que podría causar relaciones alérgicas en personas con alergia a los ácaros y a los crustáceos. Así, la EFSA (2020) determinó esta especie como nuevo alimento de conformidad con el Reglamento (UE) 2015/2283 (EFSA Scientific Committee, 2020).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo del presente estudio es la puesta a punto de una metodología de extracción eficaz que permita el aislamiento de péptidos y/o proteínas bioactivas a partir de larvas de *Tenebrio molitor* para su posterior utilización en diversos productos con potencial interés comercial en el campo de la sanidad animal y vegetal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se aplicarán dos métodos de extracción diferentes empleando larvas de *Tenebrio molitor*. Así, se probarán dos métodos de extracción, con y sin ultrasonidos, realizando una eliminación de lípidos antes o después de la extracción, a dos proporciones de biomasa de insecto:disolvente cada uno (1:3 y 1:5) y llevando a cabo una o dos extracciones consecutivas tal y como se indica en la Tabla 1. Posteriormente, se evaluará la eficacia de las extracciones valorando diversos factores como la cantidad de extracto obtenido y su contenido total de proteínas, su actividad antimicrobiana y antioxidante y la cantidad de péptidos detectados e identificados.

Tabla 1 .Pruebas de extracción realizadas con los insectos.

Pruebas	Especie	Estadio	Alimentación	Método	Proporción Peso:Volumen	Nº extracciones
Extracto 1	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	Control	EXT 1	1:3	1
Extracto 2				EXT 1	1:3	2
Extracto 3				EXT 1	1:5	1
Extracto 4				EXT 1	1:5	2
Extracto 5				EXT 2	1:3	1
Extracto 6				EXT 2	1:3	2
Extracto 7				EXT 2	1:5	1
Extracto 8				EXT 2	1:5	2

3.1. Materias primas

Las larvas de *Tenebrio molitor* utilizadas para optimizar el proceso de extracción fueron proporcionadas congeladas por un centro tecnológico que se encargó de la cría de insectos usando como alimento un pienso comercial estándar para este tipo de procesos y del que se conoce su composición.

3.2. Procedimientos de extracción

3.2.1. Procedimiento de extracción 1

El proceso de extracción 1 está basado en lo descrito por Navarro del Hierro et al., (2021) y consiste en someter a la muestra a un paso inicial de eliminación de grasa seguido de una extracción empleando sonicación directa. El protocolo empleado se describe en detalle a continuación.

Extracción de lípidos

Se pesan 10 g de larvas de insectos enteros en tubos Falcon™ de 50 ml previamente tarados, se añaden 50 ml de hexano y se homogeniza empleando un Ultraturrax durante 5 minutos. El homogenizado se centrifuga a 4500 rpm y 20 °C durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante por decantación y se extrae de nuevo el residuo sólido con el mismo volumen de hexano. Para ello, se homogeniza empleando un vórtex y se repite el mismo procedimiento. Se descarta el nuevo sobrenadante y el precipitado final se seca para eliminar los restos de hexano empleando un TurboVap® que utiliza corrientes de nitrógeno para evaporar los líquidos.

Extracción de muestra

El residuo sólido se extrae con etanol:H₂O 70:30 en una proporción 1:3 (p/v) o 1:5 (p/v) en un tubo Falcon™ de 50 ml empleando sonicación directa con una sonda de ultrasonidos al 60 % de amplitud durante 15 minutos manteniendo la temperatura de la mezcla por debajo de 70 °C durante el proceso. Para ello, se sumerge el tubo en un baño de agua con hielo. El extracto obtenido se centrifuga a 3400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se trasvasa a un matraz de vidrio de fondo redondo y se evapora a sequedad en el rotavapor. Se trasvasa resuspendido en metanol a un vial de vidrio de 20 ml previamente tarado y se evapora en el SpeedVac™. Finalmente, se pesa el residuo seco sólido obtenido de cada extracto para calcular el rendimiento de la extracción. Para las extracciones en dos

pasos, el residuo sólido se vuelve a extraer con el mismo volumen de disolvente de extracción, se centrifuga de la misma manera y los dos sobrenadantes se combinan antes de la evaporación final del disolvente.

Preparación de disoluciones para evaluación de los extractos

Una vez obtenidos los extractos secos, se prepara a partir de ellos 10 ml de una disolución de 10 mg/ml (se pesan 100 mg de extracto aproximadamente y se resuspenden en 10 ml de H₂O milliQ. Así, se obtienen los extractos 1, 2, 3 y 4 y sus respectivas disoluciones con las que se trabajará posteriormente. De cada disolución de 10 mg/ml preparada a partir de cada uno de los extractos, se separan tres alícuotas: una alícuota de 5 ml para la realización de los ensayos de actividad antibacteriana, una segunda alícuota de 1 ml para la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Bradford y una última alícuota también de 1 ml se pasa a un vial de HPLC para inyectar en el HPLC-DAD-TOF. Para la realización de los ensayos de actividad antioxidante (DPPH) se prepararán disoluciones de diferentes concentraciones a partir de los extractos.

3.2.2. Procedimiento de extracción 2

El proceso de extracción 2 se fundamenta en lo descrito por Mohtar et al., (2014) y se basa en realizar primero la extracción de la muestra con una mezcla de IPA (alcohol isopropílico) y H₂O acidificada, y seguidamente, someter el extracto obtenido a un proceso de eliminación de los componentes grasos mediante extracciones líquido-líquido con disolventes apolares. El protocolo se describe en detalle a continuación.

Preparación del disolvente de extracción IPA:H₂O:TFA 90:9:1

Se preparan 500 ml empleando alcohol isopropílico (IPA), agua desionizada y ácido trifluoroacético (TFA): 450 ml IPA + 45 ml H₂O + 1 ml TFA. El disolvente de extracción se conserva en nevera a 4 °C.

Extracción de muestra

Se pesan 10 g de insectos enteros en tubos Falcon™ de 50 ml anteriormente tarados y se añaden 30 ml (proporción 1:3) o 50 ml (proporción 1:5) del disolvente de extracción previamente enfriado en nevera (4 °C). La mezcla se homogeniza con Ultraturax durante 5 minutos. Se centrifuga a 12.000 rpm y 4 °C durante 40 minutos. El sobrenadante se separa a un matraz de vidrio de fondo redondo y se evapora a sequedad empleando el rotavapor. Para

las extracciones en dos pasos, el residuo sólido se vuelve a extraer con el mismo volumen de disolvente, se centrifuga de la misma manera y los dos sobrenadantes se combinan antes de la evaporación final del disolvente.

Extracción de lípidos

En este caso la extracción de lípidos se realiza después de la extracción de la muestra. El extracto sólido tras la evaporación se disuelve en 10 ml de 0,1%TFA (pH 2) y se extrae primero con 5 ml de acetato de etilo y posteriormente con 5 ml de hexano agitando en el orbital a 200 rpm durante 5 minutos y se centrifuga para separar las fases adecuadamente, descartando las fases orgánicas. La fase acuosa obtenida después de los lavados se trasvasa a un vial de vidrio de 20 ml previamente tarado y los restos de disolventes orgánicos y el agua se eliminan al evaporar en el SpeedVac™ hasta obtener un residuo sólido seco. Si es necesario se puede emplear también una corriente de nitrógeno para alcanzar la sequedad de los extractos. Por último, se pesa el residuo sólido obtenido de cada muestra con el fin de calcular el rendimiento en peso de la extracción.

Preparación de disoluciones para evaluación de los extractos

En este caso, a partir de los extractos sólidos también se preparan 10 ml de una disolución de 10 mg/ml pesando aproximadamente 100 mg de extracto que son resuspendidos en 10 ml de H₂O milliQ. De esta forma, se obtuvieron los extractos 5, 6, 7 y 8 y sus respectivas disoluciones. Asimismo, de cada disolución de 10 mg/ml preparada a partir de cada uno de los extractos se separan tres alícuotas de la misma forma que las preparadas para la extracción 1: una alícuota de 5 ml para la realización de los ensayos de actividad antibacteriana, una segunda alícuota de 1 ml para la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, y una última alícuota también de 1 ml se pasa a un vial de HPLC para inyectar en el HPLC-DAD-TOF. Análogamente, para la realización de los ensayos de actividad antioxidante (DPPH) se prepararán disoluciones de diferentes concentraciones directamente a partir de los extractos.

3.3. Ensayos realizados

3.3.1. Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos

La extracción sólido-líquido es la técnica más utilizada para la obtención de compuestos bioactivos de matrices naturales como organismos marinos, plantas aromáticas y

medicinales, o frutas y vegetales. Consiste en la transferencia de uno o varios componentes de una fase sólida a una fase líquida que puede ser un disolvente o una mezcla de disolventes. Cuando tiene lugar en una única etapa, esta consiste en mezclar durante un tiempo el disolvente y el sólido para que se produzca un transporte de materia entre ambos. El sentido de la transferencia es siempre desde el sólido hacia el líquido. Transcurrido el tiempo establecido para que se alcance el equilibrio entre ambas fases, se procede a la separación de la fase sólida o residuo (impregnada de disolvente) de la disolución (disolvente más solutos extraídos), lo que constituye el extracto.

El uso de ultrasonidos durante el proceso permite mejorar la eficacia de la extracción y ayuda a acortar tanto el tiempo de extracción como el volumen de disolvente utilizado. Esto hace que la extracción asistida por ultrasonidos sea un método limpio, sencillo, rápido y más ecológico en comparación con otros métodos convencionales. Los ultrasonidos producen un efecto de cavitación, que consiste en generar pequeñas burbujas vacías que implosionan en el sólido produciendo la rotura de las membranas celulares, facilitando así la extracción del material intracelular. Existen dos formas de irradiar la muestra con ultrasonidos, la sonicación directa (donde se usa una sonda que se sumerge directamente en la muestra) y la sonicación indirecta (en la que el contacto de los ultrasonidos se hace a través de las paredes del recipiente al introducirlo en un baño de ultrasonidos). Se ha demostrado que la extracción por contacto directo es mucho más eficaz (hasta 100 veces más) que el uso de baño de ultrasonidos y si además se refrigera la muestra durante el proceso se preserva la integridad de los compuestos a extraer y de sus propiedades bioactivas (Syahir et al., 2020).

Así, para la extracción del residuo sólido se probaron dos extracciones sólido-líquido, en el procedimiento 1 (EXT 1), se empleó como disolvente etanol:H₂O 70:30 en dos proporciones (1:3 p/v y 1:5 p/v), aplicando sonicación directa y en el segundo procedimiento (EXT 2), se utilizó como disolvente de extracción una mezcla de IPA:H₂O:TFA 90:9:1 en las mismas proporciones, pero en este caso no se aplica sonicación directa. Seguidamente, se centrifugaron los extractos, se separó el sobrenadante de cada uno de ellos y se evaporó en un matraz de fondo redondo empleando un rotavapor. Los extractos obtenidos se trasvasaron a viales de vidrio tarados previamente y se llevaron a sequedad en el SpeedVac™ o TurboVap® según las necesidades. Finalmente, se pesaron los viales para obtener el peso de cada extracto. Así, se pudo comparar la cantidad de residuo sólido extraído y se determinó el rendimiento en peso de la extracción.

3.3.2. Método de Bradford (Coomassie)

Para la determinación de proteínas en cada extracto, se utiliza el Kit de ensayo de proteínas Pierce Coomassie Plus™ de Thermo Scientific™ que está basado en el descrito por Bradford en 1976, el cual sirve para la cuantificación de proteínas totales. Es un método colorimétrico que se fundamenta en la unión del Coomassie azul brillante G-250 a las proteínas que pudieran estar presentes en la muestra sujeto de estudio en un medio ácido, de tal forma que se produce un cambio colorimétrico de marrón a azul en relación a la cantidad de proteínas presentes en la muestra. Se detecta midiendo la absorbancia a 595 nm mediante un espectrofotómetro. Las concentraciones de proteínas se estiman mediante las absorbancias de referencia obtenidas para una serie de diluciones de proteínas estándar preparadas con una concentración conocida de seroalbúmina bovina (BSA) que se analizan junto con las muestras a estudiar. El ensayo se puede realizar en tubo o en microplaca (Thermo Fisher Scientific 2016).

En este estudio, los ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos por triplicado para cada muestra y estándar. Brevemente, se toman 5 µl de cada una de las muestras en cada pocillo y se añaden 250 µl de reactivo Coomasie. Se mezcla durante 30 segundos empleando un agitador automático de placas y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se lee la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de placas FLUOstar OPTIMA (Bmg). Una vez restada la absorbancia del blanco a las muestras y estándares, se representa la absorbancia frente a la concentración de cada estándar. Así, se obtiene una recta de calibrado que se empleará para estimar la concentración de proteína en las muestras en µg/ml. El Kit permite realizar dos rangos de calibración en función del rango de concentración de las muestras que se pretenden medir: el rango de 100-1500 µg/ml para el que muestras y estándares se preparan según lo descrito anteriormente y un rango de menor concentración de 1-25 µg/ml para el que se aplica el mismo protocolo, pero, en este caso, la cantidad de muestra y estándar que se toma por cada pocillo es de 150 µl y se tratan con 150 µl de reactivo Coomasie.

3.3.3. Capacidad antioxidante DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos se lleva a cabo empleando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de la casa comercial Dojindo Laboratories© basado en el ensayo de DPPH mejorado por Shimamura (Shimamura et al.,

2014). Este método se basa en la determinación de la actividad antioxidante total empleando el DPPH cuyo compuesto se trata de un radical conocido capaz de eliminar otros radicales. De esta forma, es posible utilizar la reducción de la velocidad de una reacción química tras la adición de DPPH como indicador de la naturaleza radical de esa reacción. El DPPH en disolución es un catión radical estable, que presenta una coloración violeta intensa en solución y se torna incoloro o amarillo pálido al ser neutralizado por los compuestos antioxidantes presentes en la muestra. Estos compuestos antioxidantes lo reducen transfiriendo un electrón con lo que la disolución sufre un cambio colorimétrico a amarillo. Este compuesto presenta su máximo de absorbancia a 517 nm, por lo que es posible conocer la capacidad antioxidante de un determinado compuesto midiendo la absorbancia a dicha longitud de onda (Dojindo Molecular Technologies, 2020).

Para la realización de los ensayos, inicialmente se preparó una disolución de 40 mg/ml en agua calidad LC-MS de cada extracto a la que seguidamente se le hicieron diluciones para obtener diferentes concentraciones (1,25; 2,5; 5; 10 y 20 y mg/ml). Se tomaron 20 µl de cada disolución de los extractos y se transvasaron a un pocillo de una placa de 96 con fondo plano. Seguidamente, se añadieron 80 µl de tampón de ensayo y 100 µl de una disolución de DPPH en etanol recién preparada. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 25 °C protegida de la luz. Se realizaron dos réplicas de cada muestra, así como los controles correspondientes. Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando un espectofotómetro de placas. Los resultados del ensayo se expresan como porcentaje de inhibición de la actividad antioxidante del DPPH.

3.3.4. Capacidad antimicrobiana

Se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos. Para ello, se prepararon 24 horas antes de realizar los ensayos en medio de cultivo TBS (por sus siglas en inglés *Tryptic Soy Broth* o Caldo Triptona de Soja; de la casa comercial Liofilchem™) las suspensiones de cuatro microorganismos de referencia con una concentración ajustada a 0,5 de la escala de *McFarland*, dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y una levadura (*Candida albicans*). El ensayo consistió en la siembra por extensión en superficie de un volumen de la suspensión de cada una de las cepas mencionadas en placas Petri Mueller Hinton (previamente preparadas) en condiciones de asepsia. Se realizaron siembras en césped utilizando hisopos estériles

sumergidos en el respectivo inóculo y seguidamente, se depositaron en cada placa tres discos Kirby Baer (9 mm de diámetro) separados de forma equidistante para evitar la interacción entre los posibles halos de inhibición. De cada extracto se depositaron 40 μ l sobre cada disco de ensayo. Como control negativo se dispensaron 40 μ l de TBS estéril en otro disco para antibiograma y como controles positivos se emplearon discos comerciales para antibiograma con una determinada concentración de antibiótico: gentamicina 30 μ g y ciprofloxacino 5 μ g. Para finalizar, se incubaron las placas en estufa durante 24 horas a 37° C y se registraron los diámetros resultantes de la inhibición.

3.3.5. HPLC-DADtriple TOF

La cromatografía de líquidos de alta presión consiste en inyectar la muestra en una fase móvil y hacerla pasar a través de una columna cromatográfica por acción de una bomba que puede ser binaria o cuaternaria. La columna contiene una fase estacionaria inmisible con la fase móvil que se mantiene fija en su interior. Los distintos componentes de la muestra interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria en función de características como su polaridad, su carga o su tamaño, de tal forma que unos tardan más que otros en abandonar la columna y por lo tanto, llegan al detector separadamente. Los compuestos eluidos de la columna se pueden detectar empleando diferentes detectores según la naturaleza de los mismos (Fekete & Molnár, 2019).

Para la detección e identificación de los péptidos presentes en los extractos se ha utilizado un equipo compuesto por un HPLC Agilent 1290 y dos detectores conectados en línea. El primer detector es un Agilent 1260 Infinity (*Diode Array Detector*, DAD) que permite detectar los compuestos a su máximo de absorción de luz UV y además se puede obtener su espectro de absorción ya que permite adquirir a un rango de longitudes de onda simultáneamente. Al ser un detector no destructivo, el flujo que sale del detector DAD se dirige a la fuente de ionización dual de un espectrómetro de masas Sciex QTOF 5600 donde los compuestos presentes en la muestra son ionizados mediante ionización por electrospray y finalmente, son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) en el TOF (tiempo de vuelo). Así, llegan al detector y producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El resultado obtenido se denomina cromatograma y de cada pico obtenido se puede obtener el espectro de masas. Además, para poder determinar la secuencia de los péptidos presentes en los extractos se inyectaron en modo *full scan* con IDA (*Information Dependent Acquisition*), que permite

obtener espectros de fragmentación para cada uno de los péptidos detectados. A partir de los espectros de MS de alta resolución y de fragmentación obtenidos y con ayuda del *software* de Sciex Protein Pilot™ se pudo establecer la secuencia de aminoácidos de cada péptido y una vez determinada su secuencia se comparó con la base de datos de secuencias de proteínas UniProt que contiene más de 500.000 secuencias conocidas de proteínas, lo que permitió determinar si el péptido detectado estaba contenido en la secuencia de alguna de ellas y así identificar su proteína de origen.

Las condiciones cromatográficas se optimizaron para conseguir la mejor separación posible de los péptidos presentes en los extractos. Para ello, se probaron diferentes columnas cromatográficas, fases móviles y gradientes. Las condiciones cromatográficas y de masas del método de análisis finalmente utilizado se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la separación de los péptidos.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS		
Equipo	Agilent 1290 infinity + Autosampler 1200	
Flujo	0,2 ml/min	
Columna	Waters CORTECS UPLC T3 1,6 µm 2,1 x 150 mm	
Temperatura de columna	35 °C	
Temperatura del inyector	Temperatura ambiente	
Volumen de inyección	10 µl	
GRADIENTE		
FASE MÓVIL A	H ₂ O + 0,1 % FA	
FASE MÓVIL B	AcN + 0,1 % FA	
Tiempo	% A	% B
0	95	5
2	95	5
45	5	95
55	5	95
56	95	5
60	95	5
CONDICIONES ESPECTRÓMETRO DE MASAS		
Equipo Masas	TripleTOF5600 ⁺	
Fuente	Sciex DuoSpray™ Ion source for TripleTOF® systems	
Modo Ionización	ESI (+)	
Modo adquisición	DDA (IDA con <i>Switch Criteria</i>)	
TOF MS	Entre 100-2000	
Gas 1	50	

Gas 2	70
Curtain Gas	25
DP	80
CE	10
Temperatura	550 °C
Ion Spray Voltage	5500
Polaridad	Positive
Switch Criteria	Masas entre 100 y 1250 Con cargas entre 1 y 5 Con intensidad mayor a 100 cuentas por segundo (cps) Tolerancia de masas 50 mDa Número máximo de candidatos 50 Excluir iones anteriores durante 15 segundos después de 3 eventos Sustracción de fondo dinámico

4. RESULTADOS

4.1. Ensayos realizados

4.1.1. Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos

Para determinar el rendimiento en peso de los residuos sólidos obtenidos en cada extracto, estos se evaporaron en viales previamente tarados y se pesaron los residuos sólidos obtenidos tal y como se muestra en la Tabla 3. Así, y considerando solamente la cantidad de extracto obtenido, los resultados reflejan que el método de extracción 1 (EXT 1) permite obtener una mayor cantidad de extracto que el método de extracción 2 (EXT 2), que la proporción peso:volumen 1:5 es más eficaz, y que como se esperaba, realizar dos extracciones consecutivas aumenta el rendimiento de la extracción. Teniendo en cuenta estos resultados, el mejor método de extracción sería el 1, con proporción peso:volumen 1:5 y realizando dos extracciones. Este corresponde al extracto 4.

Tabla 3. Residuos sólidos obtenidos para cada extracto seco.

Pruebas	Muestra	Alimentación	Método	Proporción Peso:Volumen	Nº extracciones	Residuo sólido obtenido
Extracto 1	<i>Tenebrio molitor</i>	Control	EXT 1	1:3	1	0,62 g
Extracto 2				1:3	2	1,06 g
Extracto 3				1:5	1	1,07 g
Extracto 4				1:5	2	1,27 g
Extracto 5			EXT 2	1:3	1	0,47 g
Extracto 6				1:3	2	0,65 g
Extracto 7				1:5	1	0,51 g
Extracto 8				1:5	2	0,91 g

4.1.2. Método de Bradford (Coomassie)

Los resultados de concentración de proteína obtenidos para cada extracto mediante el método de Bradford se muestran en la Tabla 4. Para la medida se realizaron disoluciones de 10 mg/ml pesando aproximadamente 100 mg de cada extracto y disolviéndolos en 10 ml de agua. La recta de calibrado de 8 niveles (25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/ml) se realizó con estándares de BSA preparados siguiendo el protocolo del Kit de Thermo Fisher Scientific (2016). Se mide la absorbancia a 595 nm de las tres réplicas de cada muestra y estándar empleando un espectrofotómetro de placas. Gracias a la recta de calibrado se halla la concentración de proteína correspondiente a la absorbancia obtenida para cada réplica de muestra y el resultado final se calcula como la media aritmética de las tres concentraciones obtenidas. Dicha concentración así obtenida está en µg/ml de proteína en la disolución, por lo que, para expresarla en porcentaje en peso de extracto es necesario tener en cuenta el peso inicial de extracto disuelto en los 10 ml según la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de proteína (\%)} = \frac{\text{Media} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) \times \frac{10 \text{ ml}}{1000 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \right)}}{\text{Peso extracto (mg)}} \times 100$$

Tal y como se puede consultar en la Tabla 4, los resultados en este ensayo son en general mejores en los extractos obtenidos mediante el procedimiento 1 (extractos 1, 2, 3 y 4),

alcanzando valores de concentración de proteína similares todos ellos de entre el 3 y 4 %. En cambio, la concentración de proteína en los extractos obtenidos mediante el método de extracción 2 (extractos 5, 6, 7 y 8), es más baja a excepción del extracto 5. Sin embargo, si lo comparamos con la concentración de proteína obtenida en el extracto 6 este valor disminuye cuando se espera que, al realizar dos extracciones, aumente o al menos se mantenga. Por ello, se desestima el valor obtenido para el extracto 5 y se determina que se obtienen mejores resultados de concentración de proteína mediante el procedimiento de extracción 1.

Tabla 4. Concentración de proteína en los extractos medida mediante el método de Bradford. mediante un espectrofotómetro de placas.

Extracto	Peso (mg) del extracto para diluciones	Bradford (100-1500 µg/ml)	Resultados (µg/ml)			Media (µg/ml)	Desviación estándar (DE)	Concentración de proteína (%)
Extracto 1	108,14	X1	403,51	452,91	382,91	413,11	35,97	3,82
Extracto 2	126,35	X2	541,63	395,00	338,58	425,07	104,81	3,36
Extracto 3	102,56	X3	348,29	445,83	401,48	398,53	48,83	3,88
Extracto 4	119,17	X4	412,47	407,31	375,03	398,27	20,29	3,34
Extracto 5	114,64	X5	568,48	514,92	579,22	554,20	34,44	4,83
Extracto 6	119,07	X6	205,25	208,67	212,60	208,84	3,67	1,75
Extracto 7	123,69	X7	290,40	232,94	257,26	260,20	28,84	2,10
Extracto 8	101,58	X8	238,53	219,36	215,67	224,52	12,27	2,21

4.1.3. Capacidad antioxidante DPPH

Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje de inhibición de DPPH (Tabla 5), que se calcula a partir de los datos de absorbancia obtenidos para las distintas concentraciones de extracto ensayadas en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Proporción de inhibición de las muestras (\%)} = (A_{cs} - A_s) / A_{cs} \times 100$$

siendo,

A_{cs} = Absorbancia Blanco 1 (disolvente de muestra + disolución DPPH en etanol) – Blanco 2 (disolvente de muestra + etanol).

A_s = Absorbancia de las muestras – Blanco 2 o blanco de muestra (en el caso de que las muestras presenten mucha coloración).

De esta forma, se realiza la media aritmética de las absorbancias obtenidas para las dos réplicas de cada concentración ensayada (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/ml), a la que se le aplica la ecuación anterior. Así, se obtiene el porcentaje de inhibición de DPPH a cada concentración. Para una mejor visualización de los datos, estos resultados se representan gráficamente (Figuras 2-9) de tal manera que, en el eje de las “x” se representa la concentración de los extractos en mg/ml y en el eje de las “y” el porcentaje de inhibición obtenido para cada concentración. Como se puede observar, para los extractos obtenidos mediante el método de extracción 1, es decir, los extractos 1 (Figura 2), 2 (Figura 3), 3 (Figura 4) y 4 (Figura 5) se obtienen porcentajes de inhibición de DPPH máximos alrededor del 70 %.

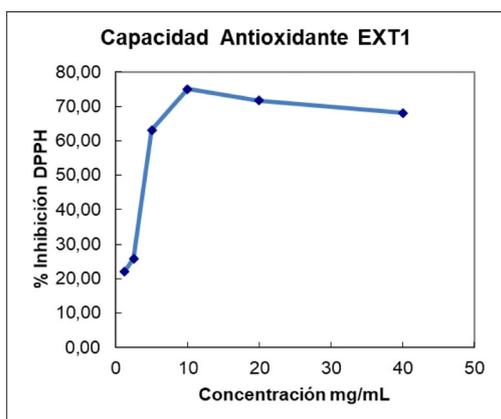


Figura 2. Capacidad antioxidante del extracto 1.

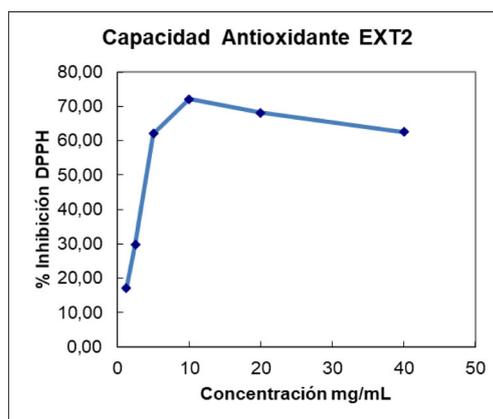


Figura 3. Capacidad antioxidante del extracto 2.

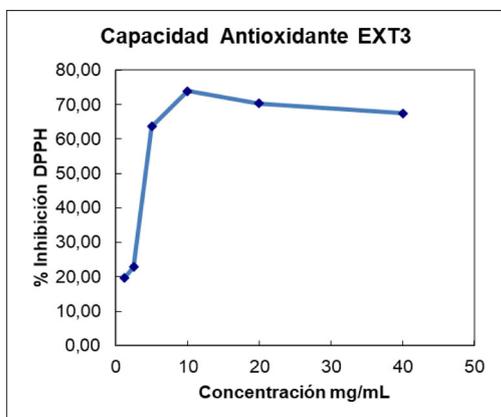


Figura 4. Capacidad antioxidante del extracto 3.

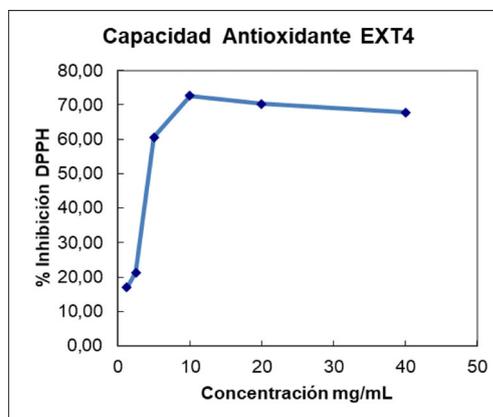


Figura 5. Capacidad antioxidante del extracto 4.

Por otra parte, para los extractos obtenidos con el método de extracción 2, los resultados fluctúan más. La inhibición máxima se encuentra entre el 80 – 90 %. Así, para el extracto 5 (Figura 6) se obtiene un porcentaje de inhibición máximo alrededor del 80% de inhibición. Este resultado es similar al obtenido para el extracto 6 (Figura 7), aplicando dos extracciones. Sin embargo, cuando se realiza el mismo procedimiento a una proporción 1:5, tal y como vemos en las Figuras 8 y 9 correspondiente a los extractos 7 y 8 respectivamente, ambos resultados alcanzan valores máximos de inhibición de DPPH alrededor del 90%, sin verse diferencias cuando se realizan dos extracciones.

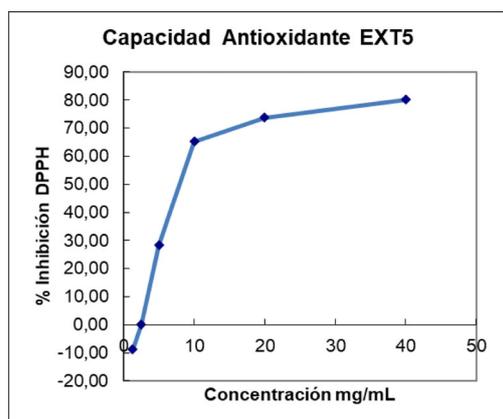


Figura 6. Capacidad antioxidante del extracto 5.

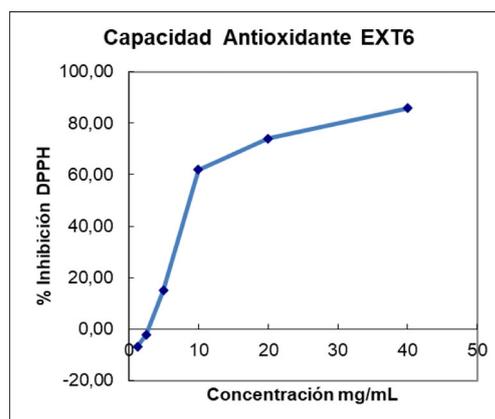


Figura 7. Capacidad antioxidante del extracto 6.

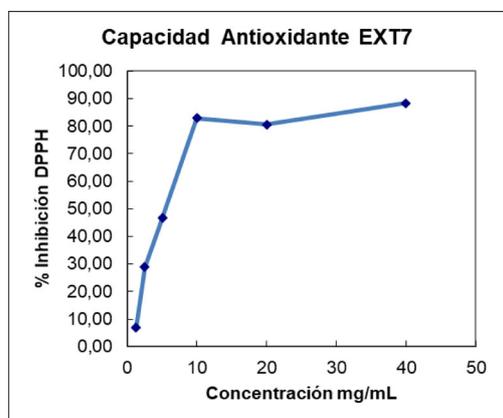


Figura 8. Capacidad antioxidante del extracto 7.

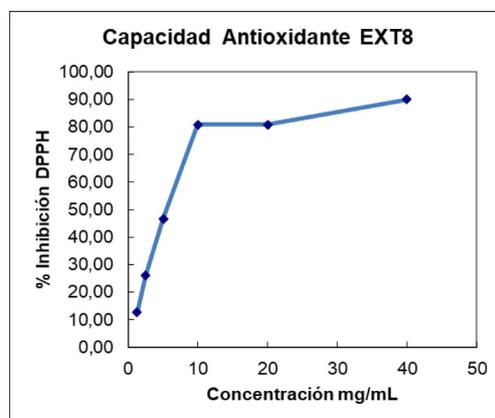


Figura 9. Capacidad antioxidante del extracto 8.

Para llevar a cabo una mejor comparación de la capacidad antioxidante de los extractos, en la Tabla 5 se muestran los valores de inhibición obtenidos para una concentración de 5 mg/ml. Esta es una concentración óptima de ensayo, ya que a partir de 20 mg/ml se encontraron dificultades para disolver completamente el extracto sólido en agua. Los datos demuestran claramente, que el método de extracción 1 (extractos 1, 2, 3 y 4) proporciona extractos con mayor capacidad antioxidante que el método de extracción 2, sin que se

aprecien diferencias en cuanto a proporciones peso/volumen o número de extracciones. En cambio, con el método de extracción 2 (extractos 5, 6, 7 y 8), a una proporción 1:5 se consiguen extractos con mayor actividad antioxidante que a una proporción 1:3, y el llevar a cabo dos extracciones proporciona extractos con menor o igual porcentaje de inhibición de DPPH.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de DPPH de los extractos en agua a una concentración de 5 mg/ml.

Pruebas	Método	Proporción Peso:Volumen	Nº extracciones	% Inhibición DPPH [5 mg/mL]
Extracto 1	EXT1	1:3	1	63,16
Extracto 2	EXT1	1:3	2	62,06
Extracto 3	EXT1	1:5	1	63,64
Extracto 4	EXT1	1:5	2	60,64
Extracto 5	EXT2	1:3	1	28,32
Extracto 6	EXT2	1:3	2	15,07
Extracto 7	EXT2	1:5	1	46,54
Extracto 8	EXT2	1:5	2	46,65

4.1.4. Capacidad antimicrobiana

Los extractos resultaron negativos para todos los microorganismos ensayados no mostrando capacidad antimicrobiana ya que estos crecieron extendidos por toda la placa sin presentar halos de inhibición para ninguno de los ocho extractos. A modo de ejemplo, en la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos para el extracto 2 en los cultivos de *Escherichia coli* (Figura 10a), *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 10b), *Staphylococcus aureus* (Figura 10c) y *Candida albicans* (Figura 10d). Los resultados para los 8 extractos fueron igual que los mostrados en la Figura 10. Por su parte, para el control positivo tanto con ciprofloxacino como con gentamicina (Figura 11) se obtuvieron los resultados esperados e inhibió el crecimiento de todos los microorganismos: *Escherichia coli* (Figura 11a), *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 11b), *Staphylococcus aureus* (Figura 11c) y *Candida albicans* (Figura 11d).

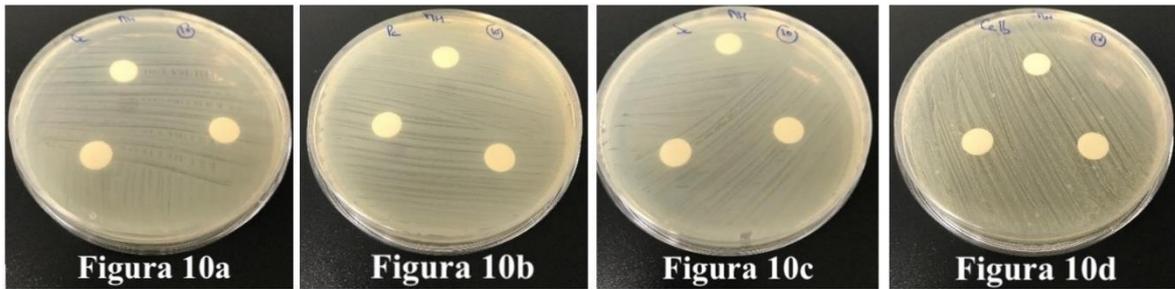


Figura 10. Antibiogramas realizados a partir del extracto 2. Siembras de izquierda a derecha de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

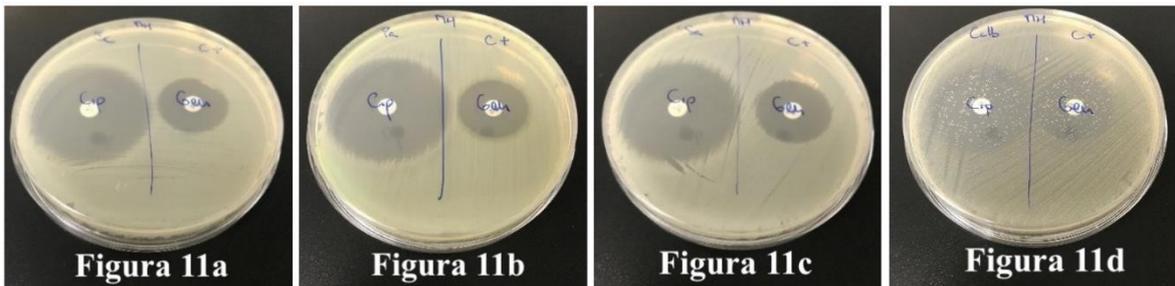


Figura 11. Antibiograma de los controles positivos con Ciprofloxacino y Gentamicina. Siembras de izquierda a derecha: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

4.1.5. HPLC-DAD-triple TOF

El *software* de Sciex Protein Pilot™ específico para análisis de datos de proteómica se utilizó para el procesamiento de los datos de masas obtenidos para los extractos. Este *software* realiza un análisis de los espectros de fragmentación de cada péptido detectado y teniendo en cuenta las diferencias de masa entre los fragmentos observados determina mediante un algoritmo la secuencia de aminoácidos del péptido y por lo tanto su estructura primaria. Una vez establecida su estructura primaria se compara con la base de datos de secuencias de proteínas UniProt identificando proteínas de secuencia conocida que contienen dicho péptido y la especie que contiene dicha proteína. Antes de realizar el procesamiento de los datos, es necesario configurar el método de procesamiento teniendo en cuenta las muestras que se están analizando y su tratamiento antes del análisis. Así, en este caso se realizó el procesamiento indicando en los parámetros de procesamiento que los péptidos a identificar son únicamente de la especie sujeto de estudio, *Tenebrio molitor*. Además, se pretende encontrar péptidos libres por lo que no se realizó digestión de las muestras con enzimas antes de su análisis ni otro tratamiento previo. Tras el procesamiento de datos se obtienen los resultados para cada extracto, los cuales se han resumido en la Tabla 6. Los péptidos y proteínas incluidos en dicha tabla se han seleccionado en base a dos parámetros que proporciona ProteinPilot™ para los resultados obtenidos con el algoritmo de búsqueda, el parámetro “*confidence*” y el parámetro “*coverage*”. El

parámetro “*confidence*” hace referencia a la confianza con la que se establece la secuencia encontrada para el péptido y es una medida de la concordancia de los datos de fragmentación teóricos esperados para un péptido con esa secuencia con los que se observan experimentalmente en los análisis de los extractos en este caso. Los péptidos que se incluyen en la Tabla 6 han sido identificados con al menos un 99% de “*confidence*”. El parámetro “*coverage*” está relacionado con la identificación de la proteína que contiene ese péptido en su secuencia, cuanto mayor porcentaje de *coverage*, más fiabilidad de que esa proteína se encuentre en el extracto ya que mide el porcentaje de la secuencia de la proteína que se consigue detectar en las muestras. Un *coverage* del 100% indicaría que se detectan péptidos que coinciden en toda la secuencia de aminoácidos de dicha proteína. En el caso de los extractos de *Tenebrio molitor* ensayados se detectan péptidos fundamentalmente pertenecientes a dos proteínas del insecto: una proteína inductora de la encapsulación en etapas tempranas del insecto y una proteína estructural de la cutícula post-ecdisial (PCP9.2).

Como se puede observar en la Tabla 6, es el extracto 4 donde se han encontrado un mayor número de péptidos. El listado de los péptidos con su secuencia se puede consultar en el Anexo.

Tabla 6. Número de péptidos detectados mediante análisis por HPLC-TOF y posterior procesado de datos mediante Protein Pilot y software de secuenciación “*de novo*” a partir de MS/MS.

Pruebas	Método	Proporción Peso:Volumen	Nº extracciones	Nº péptidos detectados
Extracto 1	EXT1	1:3	1	30
Extracto 2	EXT1	1:3	2	17
Extracto 3	EXT1	1:5	1	30
Extracto 4	EXT1	1:5	2	31
Extracto 5	EXT2	1:3	1	28
Extracto 6	EXT2	1:3	2	24
Extracto 7	EXT2	1:5	1	5
Extracto 8	EXT2	1:5	2	22

5. DISCUSIÓN

Todos los ensayos que se han realizado son importantes para seleccionar el mejor método de extracción de péptidos en insectos, y en concreto en *Tenebrio molitor*, ya que es el organismo empleado en los experimentos. Hay que tener en cuenta que el trabajo realizado presenta un alto carácter innovador y los estudios en esta misma dirección todavía son escasos, aunque muy prometedores. Según la bibliografía consultada, la extracción de lípidos de las muestras es de gran importancia ya que su alto contenido en los insectos puede dificultar la obtención de los péptidos (Navarro del Hierro et al., 2021). Sin embargo, el momento del desgrasado durante el proceso difiere según los diferentes estudios publicados hasta la actualidad. En sus experimentos, Choi et al., 2017 y Navarro del Hierro et al., 2021, realizaron la extracción de lípidos antes de la producción de los extractos mientras que en otras investigaciones similares el desgrasado se realiza posteriormente (Gundappa et al., 2012; Mohtar et al., 2014). En el presente estudio, se han realizado ambas estrategias tal y como se describen anteriormente. Estos corresponden a los procedimientos de extracción 1 y 2 respectivamente. En este trabajo, se determinó una mayor cantidad de residuo sólido cuando se sigue el primer procedimiento y que dicha cantidad aumenta si se realizan dos extracciones. Asimismo, la concentración de proteína medida mediante el método de Bradford también es mayor en dicho procedimiento. Estimar la cantidad de proteína extraída mediante el método de Bradford es una forma de predecir en que medida la extracción ha funcionado, ya que nos indica la eficacia de cada método de extracción empleado para extraer la fracción peptídica.

Se ha visto que el efecto del proceso de desgrasado de las muestras con hexano seguido de una extracción asistida por ultrasonidos presenta resultados significativos en la obtención de péptidos bioactivos a partir de los extractos, si se compara con la capacidad antioxidante de los extractos no desgrasados (Choi et al., 2017). Del mismo modo, el solvente de extracción empleado también influye *per se* en la capacidad antioxidante de los extractos. Asimismo, el rendimiento de extracción aumenta junto con la polaridad del solvente, siendo el metanol el que garantizó el máximo rendimiento de extracción con respecto al etanol y al acetato de etilo, independientemente del proceso de desgrasado. Sin embargo, cabe destacar que los resultados obtenidos cuando se emplea etanol al 70%, precedido de un paso previo de desengrasado son muy similares. Así, el etanol sería una buena alternativa al metanol ya que es un disolvente más ecológico y sostenible (Navarro del Hierro et al., 2021). La eliminación

de los lípidos de las muestras es un paso importante ya que favorece la actividad antioxidante y así se hace constar en la investigación de Navarro del Hierro et al., 2021, alcanzando un 45 % de inhibición de DPPH en muestras extraídas con etanol acuoso al 70 % previamente desgrasadas con hexano; un porcentaje menor al obtenido en este trabajo alcanzando alrededor de un 60 % de inhibición de DPPH a una concentración de 5 mg/ml. Apoyándonos en los resultados obtenidos y en la bibliografía revisada (Navarro del Hierro et al., 2021) la concentración de extracto más conveniente a tener en cuenta es 5 mg/ml. Además, en los ensayos experimentales se encontraron dificultades para disolver el extracto sólido en las diluciones preparadas a partir de 20 mg/ml siendo cada vez más turbias conforme aumenta la concentración.

Por otro lado, para la extracción de péptidos, Mohtar et al., 2014 realizaron cuatro pruebas diferentes empleando diferentes alcoholes (metanol, etanol, isopropanol y butanol), agua y ácido trifluoroacético en proporción (90:9:1, v/v/v). *A posteriori*, se realizó la extracción de lípidos de las muestras con acetato de etilo y hexano y tras lograr los resultados se determinó que el empleo de isopropanol como solvente podría extraer una mayor cantidad de péptidos antimicrobianos. Teniendo en cuenta estos resultados, este fue el solvente elegido para la realización de nuestro procedimiento 2.

A partir de los extractos obtenidos, se realizaron ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. Algunas investigaciones, emplearon un método de difusión en placa de agar sembrado en césped con un microorganismo problema, empleando pocillos de agar donde inocular los extractos de insectos (Mohtar et al., 2014) o discos Kirby Baer impregnados con los extractos sujeto de estudio (Gundappa et al., 2012). Tras 24 horas de incubación, en ambos estudios se determinó la presencia de factores humorales de defensa tanto constitutivos como inducibles capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos problema (Gundappa et al., 2012; Mohtar et al., 2014). En el presente trabajo se siguió la técnica descrita en Gundappa et al., (2012) sin éxito obtenido. Es posible que los péptidos antimicrobianos se encuentren en una concentración demasiado baja en nuestros extractos para inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados, que los péptidos no se encuentren activos o incluso que se hayan perdido durante alguna etapa del proceso. Que un péptido antimicrobiano o AMP sea activo o no contra un microorganismo depende de su capacidad de unión al microorganismo (Yi et al., 2014). A pesar de los resultados obtenidos en este ensayo, cabe destacar los importantes hallazgos en diversos estudios sobre péptidos con

capacidad microbiana (Marshall & Arenas, 2003; Yi et al., 2014). Los péptidos antimicrobianos (AMP) son moléculas bioactivas cortas con efectos antimicrobianos de alto espectro frente a una gran diversidad de patógenos. Estos, se han identificado como los principales componentes de la respuesta inmune humoral de los insectos y se producen en todas las etapas de la vida de los mismos (Mohtar et al., 2014). Se sabe que algunos AMP están presentes de forma constitutiva y otros son inducidos en respuesta a microorganismos patógenos para los propios insectos. Los AMP son péptidos pequeños, generalmente de entre 30 y 50 aminoácidos y hasta entre 100 y 150 aminoácidos en casos excepcionales. Presentan alta estabilidad al calor, son resistentes a la acción de las proteasas y exhiben un amplio espectro de actividad frente a bacterias, hongos e incluso virus y células tumorales. Algunos AMP se han aislado a partir de la hemolinfa o los cuerpos grasos de los insectos, pero también se puede emplear el cuerpo entero como fuente alternativa y desafiante para el descubrimiento de nuevos péptidos de interés. Dichas características los hacen atractivos e interesantes para la comunidad científica. Sin embargo, a día de hoy se han purificado un número limitado de péptidos antimicrobianos de algunas especies de coleópteros (Gundappa et al., 2012; Mohtar et al., 2014; Yi et al., 2014).

En último lugar, se lleva a cabo la determinación de los péptidos obtenidos. Para ello, se realiza el análisis de los extractos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa con detección por espectrometría de masas de alta resolución (TOF MS). Se han encontrado numerosos péptidos en todos los extractos y sus secuencias se pueden consultar detalladamente en el Anexo. El mayor número de péptidos encontrados fue en el extracto 4 con 31 péptidos en total. Además, una vez obtenidas las secuencias de los péptidos presentes y para explorar otras posibles actividades que pudieran tener, se buscaron sus secuencias en bases de datos de péptidos bioactivos como APD3 *Antimicrobial Peptide Database* (University of Nebraska Medical Center), DBAASP v3.0 *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* o BIOPEP-UWM *Database of Bioactive Peptides*, aunque desafortunadamente ninguno de ellos se encontró en dichas bases de datos.

6. CONCLUSIONES

Tras los ensayos realizados, se ha determinado que el método de extracción más adecuado para obtener el mayor rendimiento de los extractos es el método de extracción 1, ya que, el residuo sólido obtenido gracias al mismo es en general mayor. Además, como era de esperar cuando se realizan dos extracciones se obtienen más gramos de residuo sólido. Estos resultados se ven apoyados por la concentración proteica obtenida mediante Bradford y el porcentaje de inhibición de DPPH. Asimismo, el mayor número de péptidos se ha obtenido en el extracto 4. Por ende, el método de extracción de elección es el procedimiento 1, con proporción peso:volumen 1:5 y realizando dos extracciones.

Esta línea de investigación puede considerarse un paso preliminar para potenciar el desarrollo de extractos de insectos eficaces como nuevos ingredientes bioactivos en diferentes productos alimentarios que aporten un beneficio tanto para la salud humana como animal, así como una aproximación hacia la agricultura sostenible. En este sentido, en la naturaleza existe una amplia diversidad de especies de insectos comestibles que pueden explorarse y una gran cantidad de factores variables y de condiciones de procesamiento que aún pueden estudiarse con mayor profundidad en el emergente campo de los extractos naturales obtenidos a partir de este tipo de insectos.

Conclusiones

Tralas probas realizadas, determinouse que o método de extracción máis axeitado para obter o maior rendemento dos extractos é o método de extracción 1, xa que o residuo sólido obtido grazas a el é en xeral maior. Ademais, como era de esperar, cando se realizan dúas extraccións obtéñense máis gramos de residuo sólido. Estes resultados están apoiados pola concentración de proteínas obtida mediante Bradford e a porcentaxe de inhibición de DPPH. Así mesmo, o maior número de péptidos obtívose no extracto 4. Polo tanto, o método de extracción de elección é o procedemento 1, cunha relación peso:volumen de 1:5 e realizando dúas extraccións.

Esta liña de investigación pódese considerar un paso previo para promover o desenvolvemento de extractos de insectos eficaces como novos ingredientes bioactivos en diferentes produtos alimenticios que aporten beneficios tanto para a saúde humana como para a animal, así como un achegamento á agricultura sostible. Neste sentido, na natureza

existe unha gran diversidade de especies de insectos comestibles que se poden explorar e un gran número de factores variables e condicións de procesamento que aínda se poden estudar con maior profundidade no campo emerxente dos extractos naturais obtidos deste tipo de insectos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2022). *Situación de los insectos en alimentación humana*. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/INSECTOS_ALIMENTACION_.pdf
- Bordiean, A., Krzyzaniak, M., Stolarski, M.J., Czachorowski, S., & Peni, D. (2020). Will yellow mealworm become a source of safe proteins for Europe? *Agriculture*, 10(6), 233. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060233>
- Choi, B. D., Wong, N., & Auh, J. H. (2017). Defatting and sonication enhances protein extraction from edible insects. *Korean Journal For Food Science Of Animal Resources*, 37(6), 955–961. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.6.955>
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Roupheal, Y. (2017). Biostimulant action of protein hydrolysates: Unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2202. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>
- Dojindo Molecular Technologies. (2020). *DPPH Antioxidant Assay Kit: Technical manual*. <https://www.dojindo.co.jp/manual/d678e.pdf>.
- EFSA Scientific Committee. (2015). Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal*, 13(10), 4257. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4257>
- EFSA Scientific Committee. (2020). Safety of dried yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 19(1), e06343. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>
- Fekete, S., & Molnár, I. (Eds.). (2019). *Software-assisted method development in high performance liquid chromatography*. World Scientific.
- Gkinali, A. A., Matsakidou, A., Vasileiou, E., & Paraskevopoulou, A. (2022). Potentiality of *Tenebrio molitor* larva-based ingredients for the food industry: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 495–507. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.024>

- Grau, T., Vilcinskas, A., & Joop, G. (2017). Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Zeitschrift fur Naturforschung. C*, 72(9-10), 337–349. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0033>
- Gundappa, S., Jayappa, J., & Chandrashekara. K. (2012). Bioprospecting for antimicrobial peptides from insects: *In vitro* antimicrobial activity of acidified methanol extract of dung beetles. *Journal of Entomological Research*. 36(1), 41–44.
- Keil, C., Grebenteuch, S., Kröncke, N., Kulow, F., Pfeif, S., Kanzler, C., Rohn, S., Boeck, G., Benning, R., & Haase, H. (2022). Systematic studies on the antioxidant capacity and volatile compound profile of yellow mealworm larvae (*T. molitor* L.) under different drying regimes. *Insects*, 13(2), 166. <https://doi.org/10.3390/insects13020166>
- Marshall, S. H., & Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(3), 96–109. <https://doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-1>
- Mohtar, J. A., Yusof, F., & Ali, N. M. H. (2014). Screening of novel acidified solvents for maximal antimicrobial peptide extraction from *Zophobas morio fabricius*. *Advances in Environmental Biology*, 8(3), 803-809.
- Navarro Del Hierro, J., Gutiérrez-Docio, A., Otero, P., Reglero, G., & Martin, D. (2020). Characterization, antioxidant activity, and inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Food Chemistry*, 309, 125742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125742>
- Navarro Del Hierro, J., Cantero-Bahillo, E., Fornari, T., & Martin, D. (2021). Effect of defatting and extraction solvent on the antioxidant and pancreatic lipase inhibitory activities of extracts from *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor*. *Insects*, 12(9), 789. <https://doi.org/10.3390/insects12090789>
- Seo, M., Goo, T. W., Chung, M. Y., Baek, M., Hwang, J. S., Kim, M., & Yun, E. Y. (2017). *Tenebrio molitor* larvae inhibit adipogenesis through AMPK and MAPKs signaling in 3T3-L1 adipocytes and obesity in high-fat diet-induced obese mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 518. <https://doi.org/10.3390/ijms18030518>
- Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Matsui, T., Sugimoto, N., Akiyama, H., & Ukeda, H. (2014). Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives – Inter-laboratory evaluation study –. *Analytical sciences*, 30(7), 717–721. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.717>
- Syahir, A., Sulaiman, S., Mel, M., Othman, M., & Sulaiman, S. Z. (2020). An Overview: Analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process. *IOP Conference*

Series: Materials Science and Engineering, 778, 012165. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/778/1/012165>

- Thermo Fisher Scientific. (2016). *User guide: Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit* (Pub. No. MAN0011203 Rev B.0). https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011203_CoomassiePlus_Bradford_Asy_UG.pdf.
- van Huis A., Itterbeeck J. V., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., & Vantomme P. (2013). *Edible insects: Future prospects for food and feed security*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- van Huis, A., & Oonincx, D.G.A.B. (2017). The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 37(5), 43. <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0452-8>
- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., & Yu, X. Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5807–5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Yoon, Y. I., Chung, M. Y., Hwang, J. S., Han, M. S., Goo, T. W., & Yun, E. Y. (2015). *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae confer resistance to obesity in mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 7(3), 1978-1991. <https://doi.org/10.3390/nu7031978>
- Zielińska, E., Karaś, M., & Jakubczyk, A. (2017). Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 306-312. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13282>

7. ANEXOS

Listado de los péptidos encontrados y sus cromatogramas correspondientes.

EXTRACTO 1		
Referencia UniProt	Nombres	Secuencia
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DISVAGNIPTK
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DISVAGNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GVQTIGQLR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GYPTRQPVVVLQGTGGYLN NLQVPQVQLAY
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	IQINDNALYTPGTGEGPWSS VDSLSEEWRS
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	IQINDNALYTPGTGEGPWSS VDSLSEEWRSKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	ISVNDDGSILITSPTGR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NEIQQQQQIQFGGVQQQ
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NISVNDDGSILITSP
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NISVNDDGSILITSPTGR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NNVEAQIEQL

tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	SRPTGSGQGNLDISVAGPNI PTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	SSSLPLYR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VNDDGSILITSPTGR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGN
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNLDISVA GPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DISVAGPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	ISVNDDGSILITSPTGR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNLDISVA GPNIPTKR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AGGVVAH
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	DSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	PAGSGLEGQWIPDINEKLYD DGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGGVVAH

tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M4D9 Q7M4D9_TENMO	Cuticle structural protein PCP16.7, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		PTPVQGTVVADTVAVESA
tr A0A482D3R9 A0A482D3R9_TENMO	Tropomyosin OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1		LLAEDADNKSDVSR
TOTAL		30	
EXTRACTO 2			
Referencia UniProt	Nombres		Secuencias
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=emp-2 PE=2 SV=1		GRTQGDILDEILREY
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=emp-2 PE=2 SV=1		GYPTRQPVVVLQGTGGYLN NLQVPQVQLAY GLAGGVVAH
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=emp-2 PE=2 SV=1		NNVEQAIEQL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=emp-2 PE=2 SV=1		TQGDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=emp-2 PE=2 SV=1		VVISRPTGPSGQGNL
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		AAVPAGSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		GLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1		GSGLEGQWIPDINEK

tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGGVVAH
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	EEVDDPKLKEH
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	REEVDDPKLKEH
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	SGEFQLDHIKT
tr Q27014 Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDEVLEKV
tr Q27014 Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDSDEVLEKV
TOTAL		17
EXTRACTO 3		
Referencia UniProt	Nombres	Secuencias
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GRTQGDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GYPTRQPVVVLQGTGGYLN NLQVVPQVQLAY
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NVEQAIEQL

tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	SLNVNPLLGRILGASQR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	TQGDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GYPTRQPVVLQGTGGYLN NLQVPVQLAY
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	SLNVNPLLGRILGASQR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	TQGDILDEILR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	PAGSGLEGQWIPDINEKLYD DGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SAPYLHGGIVAAGPVAY
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	PAGSGLEGQWIPDINEKLYD DGSYKPHIYGF
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	NREEVDDPKL
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	SGEFQLDHIK

tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	SGEFLDHIKT
tr A0A0C5DMM7 A0A0C5DMM7_TENMO	Chemosensory protein CSP9 mRNA OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	NVDLDEILK
tr A0A0C5DMM7 A0A0C5DMM7_TENMO	Chemosensory protein CSP9 mRNA OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	VDLDEILK
tr Q9Y1W5 Q9Y1W5_TENMO	86 kDa early-staged encapsulation inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-6 PE=2 SV=1	LIANYKESQFWFGFPQRFML PKGSYGGVPYQFYVVVSKV VPYKYR
tr Q27014 Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDEVLEKV
tr Q27014 Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDSDEVLEKV
tr A0A1Y0AWP8 A0A1Y0AWP8_TENMO	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	ILCDVP
tr A0A141AZQ3 A0A141AZQ3_TENMO	Serine/threonine-protein kinase TOR OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=TOR PE=2 SV=1	TDEPLTIP
tr A0A515EIW9 A0A515EIW9_TENMO	Suppressors of cytokine signaling 7 OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=SOCS7 PE=2 SV=1	HRRPVIGP
tr X5J679 X5J679_TENMO	Apolipoprotein III OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ApoLp-III PE=2 SV=1	VQEIVDKL
TOTAL		30
EXTRACTO 4		
Referencia UniProt	Nombres	Secuencias
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NNVEQAIEQL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	QGDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	QGTGGYLNLLQVPQVQLA Y

tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	SLNVNPLLGRILGASQR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	TQGDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	TQGDILDEILREY
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	GYPTRQPVVVLQGTGGYLN NLQVPQVQLAY
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	TQGDILDEILR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR SGLAGGVVAHSPLAY
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	PAGSGLEGQWIPDINEKLYD DGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	LEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAPIDSAAVLQGPSGTVVR SGLAGGVVAHSPLAY

tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	NREEVDDPKLKEH
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	REEVDDPKLKEH
sp P80682 CUA2B_TENMO	Larval cuticle protein A2B OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	TVVADEYDPPH
sp P80682 CUA2B_TENMO	Larval cuticle protein A2B OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	VVADEYDPPH
sp P80682 CUA2B_TENMO	Larval cuticle protein A2B OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	VVADEYDPPH
tr Q9Y1W5 Q9Y1W5_TENMO	86 kDa early-staged encapsulation inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-6 PE=2 SV=1	NWEVPLETGYPSLVYPNG LQFPTRPN
tr Q27014 Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDSDEVLEKV
tr G3XGC4 G3XGC4_TENMO	93 kDa serpin OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	IMII
tr L7US91 L7US91_TENMO	Prophenoloxidase OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=PPO PE=2 SV=1	FGEDADERIDV
tr A0A1Y0AWP8 A0A1Y0AWP8_TENMO	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	VIFLJGIIVAN
tr A0A1Y0AWQ3 A0A1Y0AWQ3_TENMO	Sugar transporter 6 (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	LLFMLLIF
tr M1UZ81 M1UZ81_TENMO	Ultrathorax (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=Ubx PE=2 SV=1	LTRRRR
tr A0A0C5D664 A0A0C5D664_TENMO	Olfactory receptor OR18 mRNA (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	TLLVPL
	TOTAL	31
EXTRACTO 5		
Referencia UniProt	Nombres	Secuencias
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKP
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	DSAAVLQGPSGTVVR

tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GLAGGVVAH
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	PAGSGLEGQWIPDINEKLYD DGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SAAVLQGPSGTVV
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SAPYLHGGIVAAGPVAY
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGGVVAH
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DISVAGPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NISVNDDGSILITSPTGR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NNVEQAIEQL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	RVVISRPTGPSGGQGNLDISVA GPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VISRPTGPSGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNLDISVA GPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DISVAGPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNL

tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	LFDPHIED
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	LSGLEGELKGT
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SDLFDPIIEDY
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SVFSDLFDPIIEDY
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SVFSDLFDPIIEDYHGGFKK
tr Q9Y1W5 Q9Y1W5_TENMO	86 kDa early-staged encapsulation inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-6 PE=2 SV=1	NYKESQFWFGFPQRFMLPK GSYGGVPYQFYVVVSKVVP YKYR
tr O18508 O18508_TENMO	Cuticular protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=LPCP29 PE=4 SV=1	AAPVTHAVATHAV
tr L7UVJ1 L7UVJ1_TENMO	Prophenoloxidase OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=PPO PE=2 SV=1	FGEDADERIDV
tr Q7M4D9 Q7M4D9_TENMO	Cuticle structural protein PCP16.7, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GHVATPVGV
tr Q27013 Q27013_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	SDSDEVLEKV
TOTAL		28

EXTRACTO 6

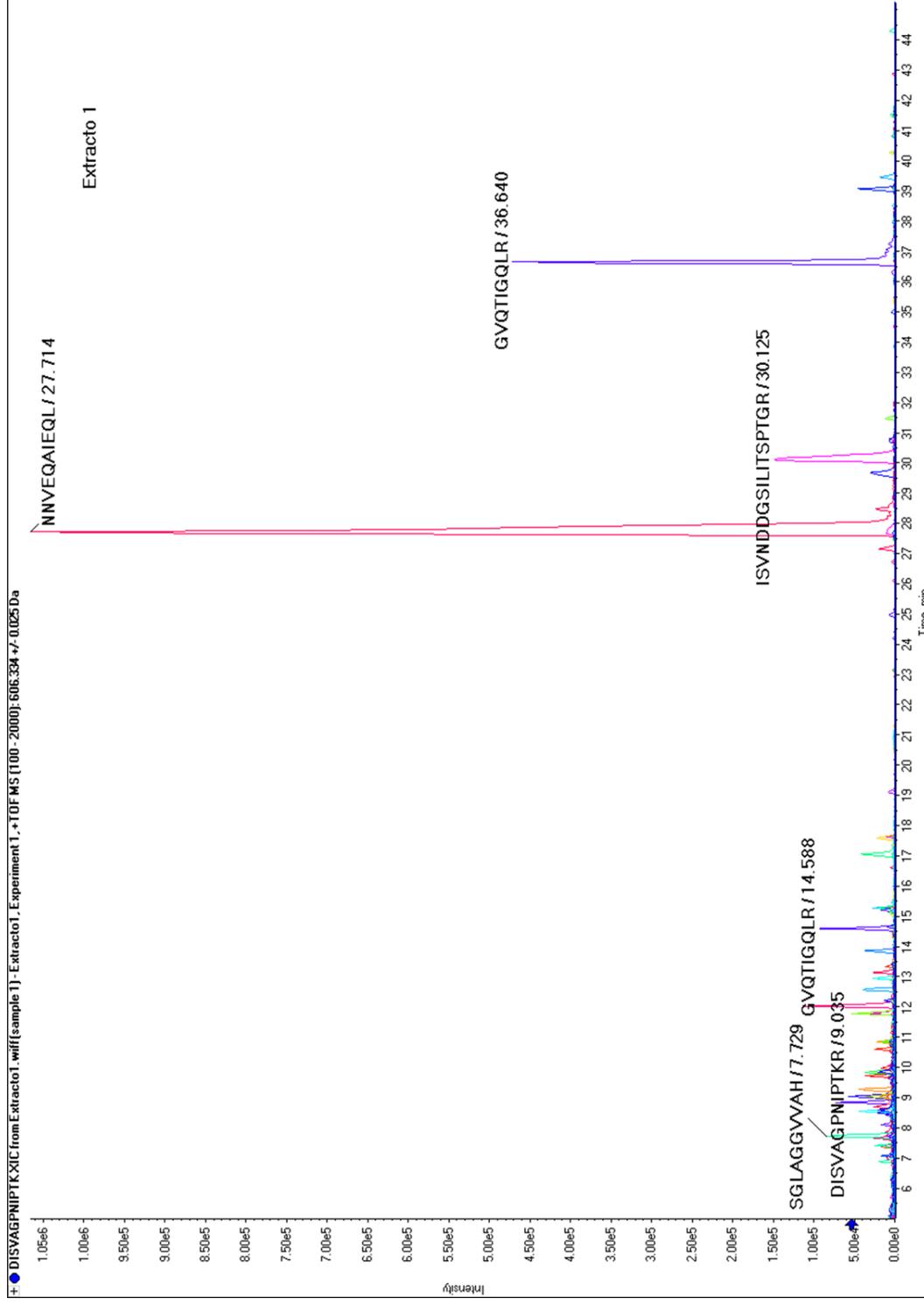
Referencia UniProt	Nombres	Secuencias
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK L
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKP
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPHIYGF

tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	DSAAVLQGPSGTVVR
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEKL
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	PDINEKLYDDGSYKP
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SAAVLQGPSGTVV
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGGVVAH
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	DISVAGNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NISVNDDGSILITSPTGR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VISRPTGPSGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNLD
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNLDSVA GPNIPTKR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQGNLDSVA GPNIPTKR
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	LSGLEGELKGT

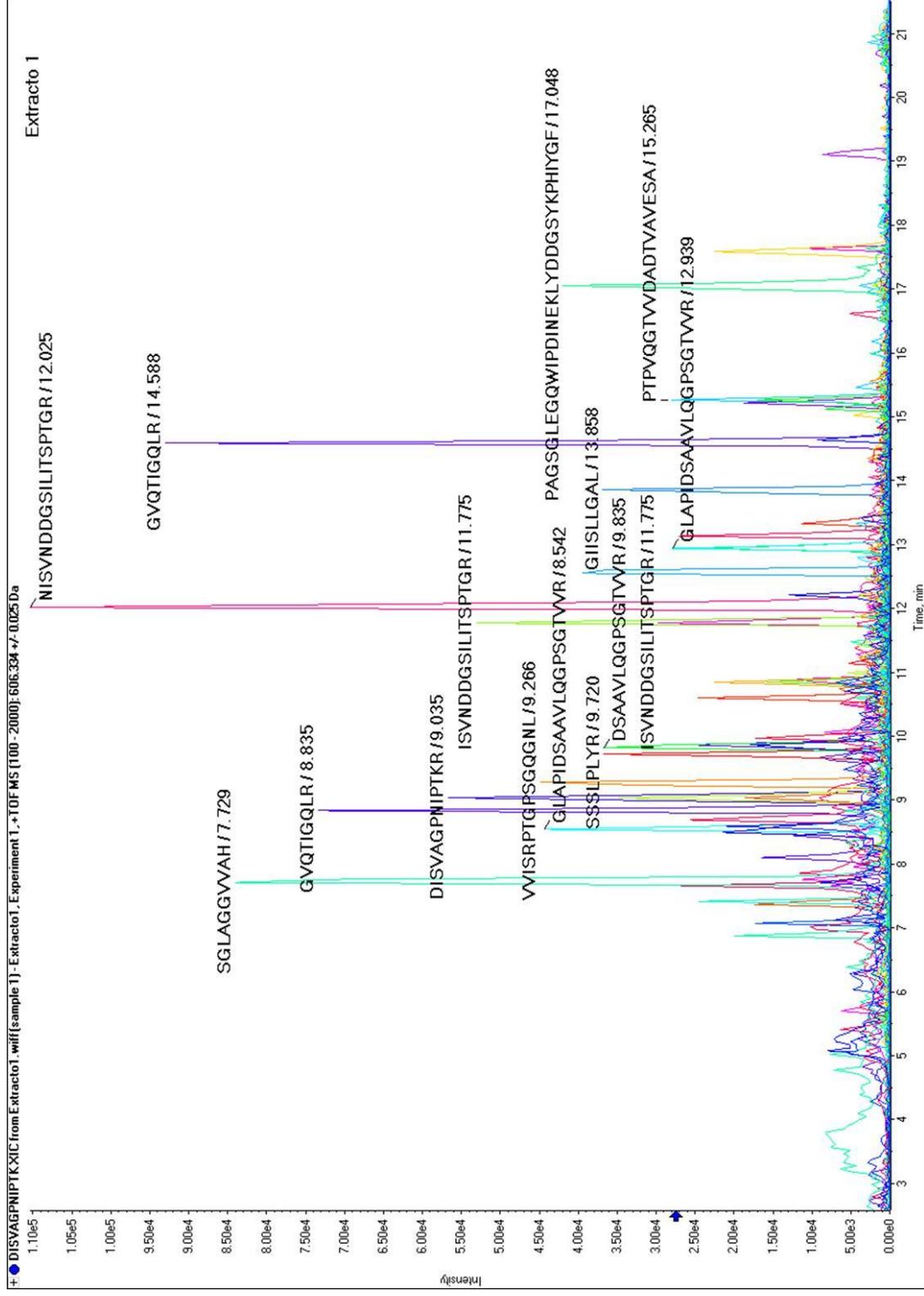
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4ARJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SDLFDPIIEDY
tr Q27011 Q27011_TENMO	12 kDa hemolymph protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=THP12 PE=1 SV=1	EEVDDPKLKEH
sp Q27270 TEN3_TENMO	Tenecin-3 OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GHQGGQPGGHLG
tr Q27014 Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDSDEVLEKV
tr O97047 O97047_TENMO	Prophenoloxidase OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ppo-5 PE=2 SV=1	FGEDADERIDV
tr O97047 O97047_TENMO	Prophenoloxidase OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ppo-5 PE=2 SV=1	FGEDADERIDV
TOTAL		24
EXTRACTO 7		
Referencia UniProt	Nombres	Secuencias
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGVVAH
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TENMO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGPSGGQNL
tr Q9Y1W5 Q9Y1W5_TENMO	86 kDa early-staged encapsulation inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-6 PE=2 SV=1	IANYKESQWFGFPQRFMLP KSGYGGVYQFYVVVSKVV PYKYR
tr Q9Y1W5 Q9Y1W5_TENMO	86 kDa early-staged encapsulation inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-6 PE=2 SV=1	SDQLIANYKESQWFGFPQR FMLPKSGYGGVYQFYVVV SKVVPLYKYR
tr O18508 O18508_TENMO	Cuticular protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=LPCP29 PE=4 SV=1	GILAGYHAPLVHSSYAYSAP VFRRAATLSTVVNAPGHAVS YHVY
TOTAL		5
EXTRACTO 8		
Referencia UniProt	Nombres	Secuencias
tr Q7M478 Q7M478_TENMO	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKP

tr Q7M478 Q7M478_TENM O	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPH
tr Q7M478 Q7M478_TENM O	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	AAVPAGSGLEGQWIPDINEK LYDDGSYKPHIYGF
tr Q7M478 Q7M478_TENM O	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	GSGLEGQWIPDINEK
tr Q7M478 Q7M478_TENM O	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGGVVAH
tr Q7M478 Q7M478_TENM O	Cuticle structural protein PCP9.2, post-ecdysial OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	SGLAGGVVAHSP
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TEN MO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	NISVNDDGSILITSPTR
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TEN MO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	RVVISRPTGSPGGQGNLDISVA GPNIPTRK
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TEN MO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGSPGGQGNL
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TEN MO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGSPGGQGNLD
tr Q9Y1W6 Q9Y1W6_TEN MO	56 kDa early-staged encapsulation-inducing protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=enp-2 PE=2 SV=1	VVISRPTGSPGGQGNL
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4A RJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SDLFDPIED
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4A RJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SDLFDPIEDY
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4A RJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	TLSGLEGELKGT
tr A0A0U4ARJ8 A0A0U4A RJ8_TENMO	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=ArgK PE=3 SV=1	SDLFDPIEDY
tr O18508 O18508_TENMO O	Cuticular protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=LPCP29 PE=4 SV=1	NAVQDAAGNKVGS
sp P80683 CUA3A_TENM O	Larval cuticle protein A3A OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=1 SV=1	VAKAVVAAPAIAKV

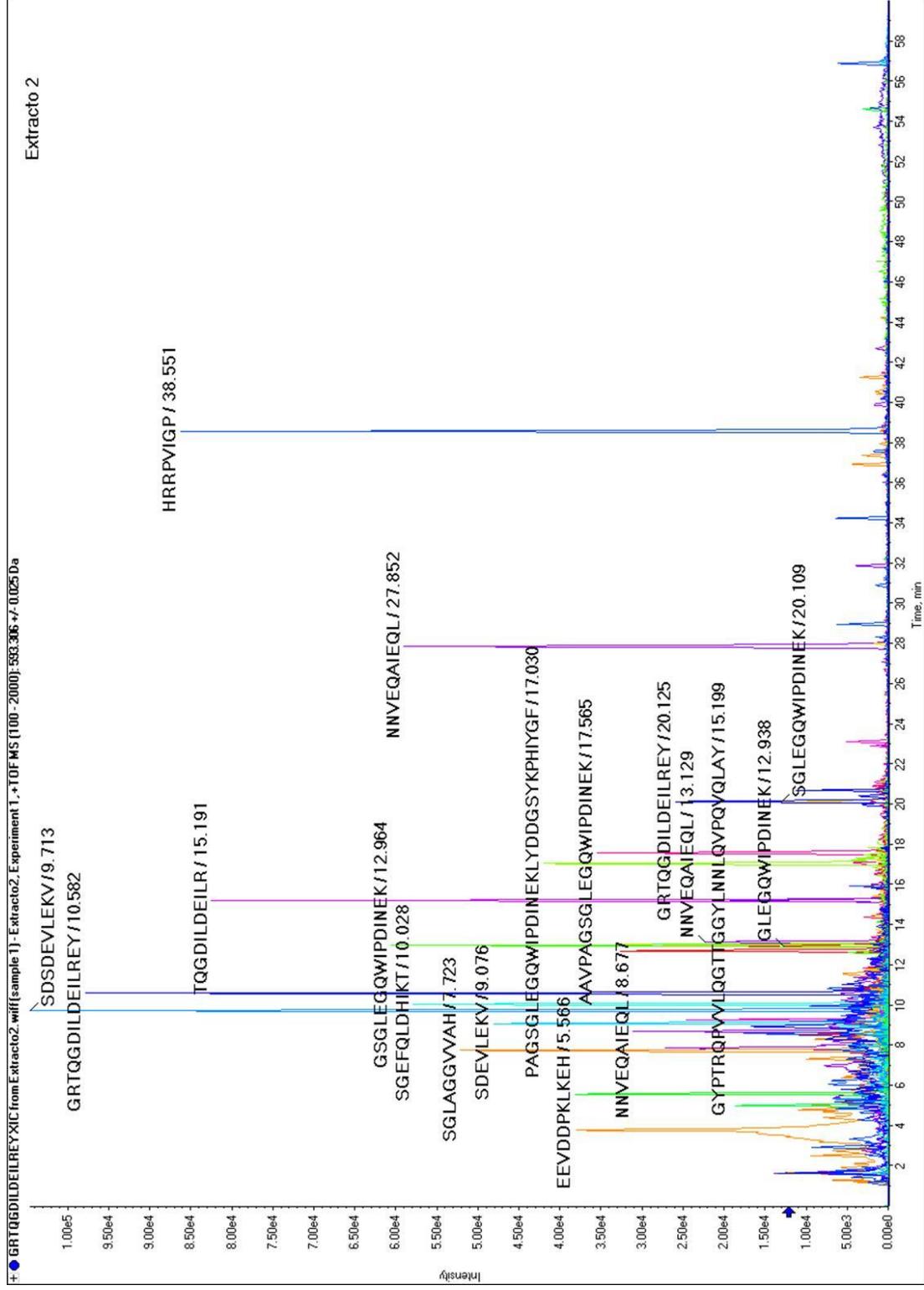
tr A0A1Y0AWN7 A0A1Y0AWN7_TENMO	Uniporter amino acid transporter 1 OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	GIISLLGAL
RRRRRtr A0A141AZQ3 A0A141AZQ3_TENMO	REVERSED Serine/threonine-protein kinase TOR OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=TOR PE=2 SV=1	LAELLLKI
tr L7US91 L7US91_TENMO	Prophenoloxidase OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=PPO PE=2 SV=1	FGEDADERIDV
tr Q27014Q27014_TENMO	28 kDa desiccation stress protein OS=Tenebrio molitor OX=7067 GN=dsp28 PE=4 SV=1	SDSDEVLEKV
tr A1XGA3 A1XGA3_TENMO; tr A1XGA2 A1XGA2_TENMO	Putative carboxypeptidase A-like OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1; Putative carboxypeptidase A-like OS=Tenebrio molitor OX=7067 PE=2 SV=1	ENREILGVK
TOTAL		22

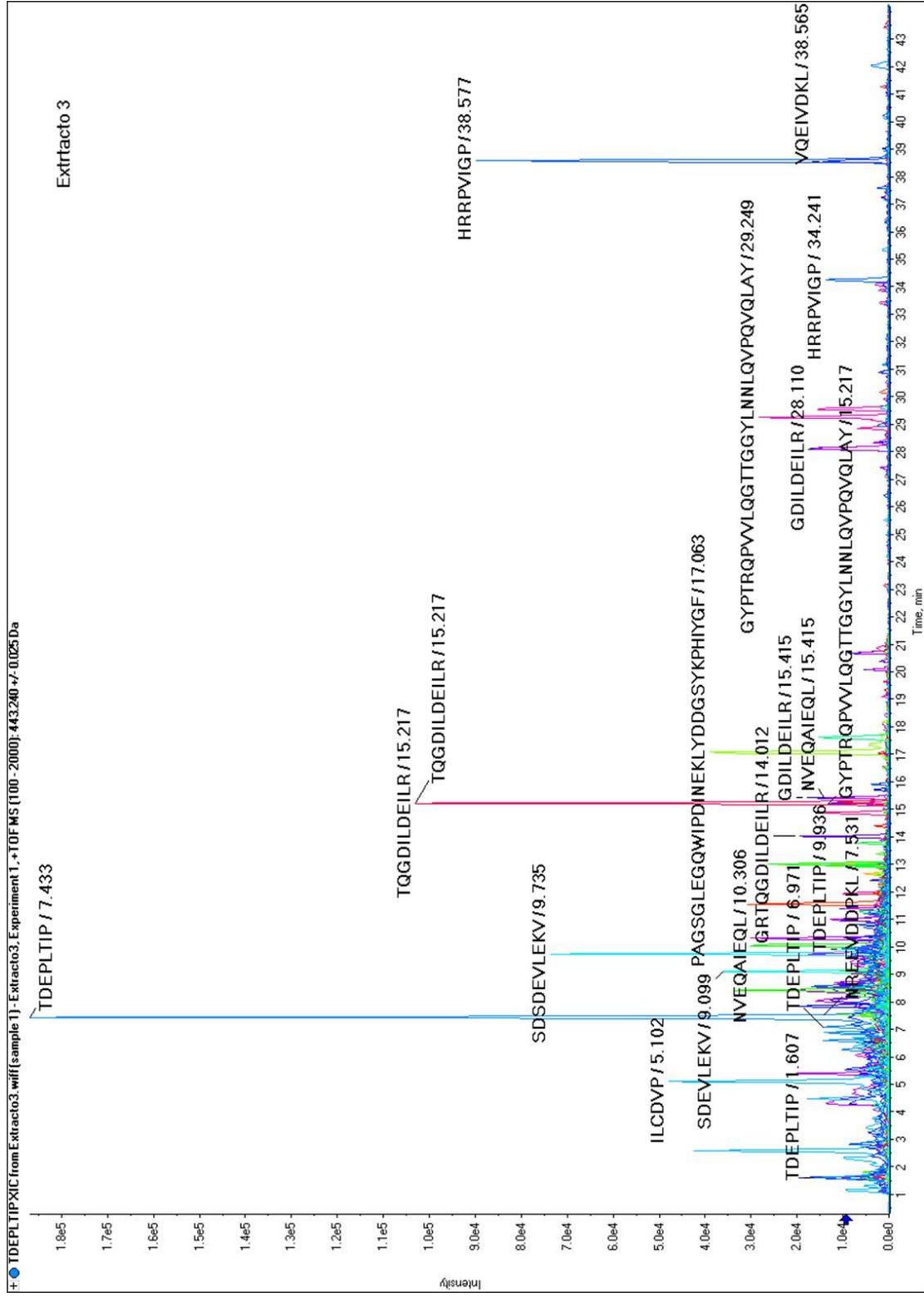


XICs del Extracto 1

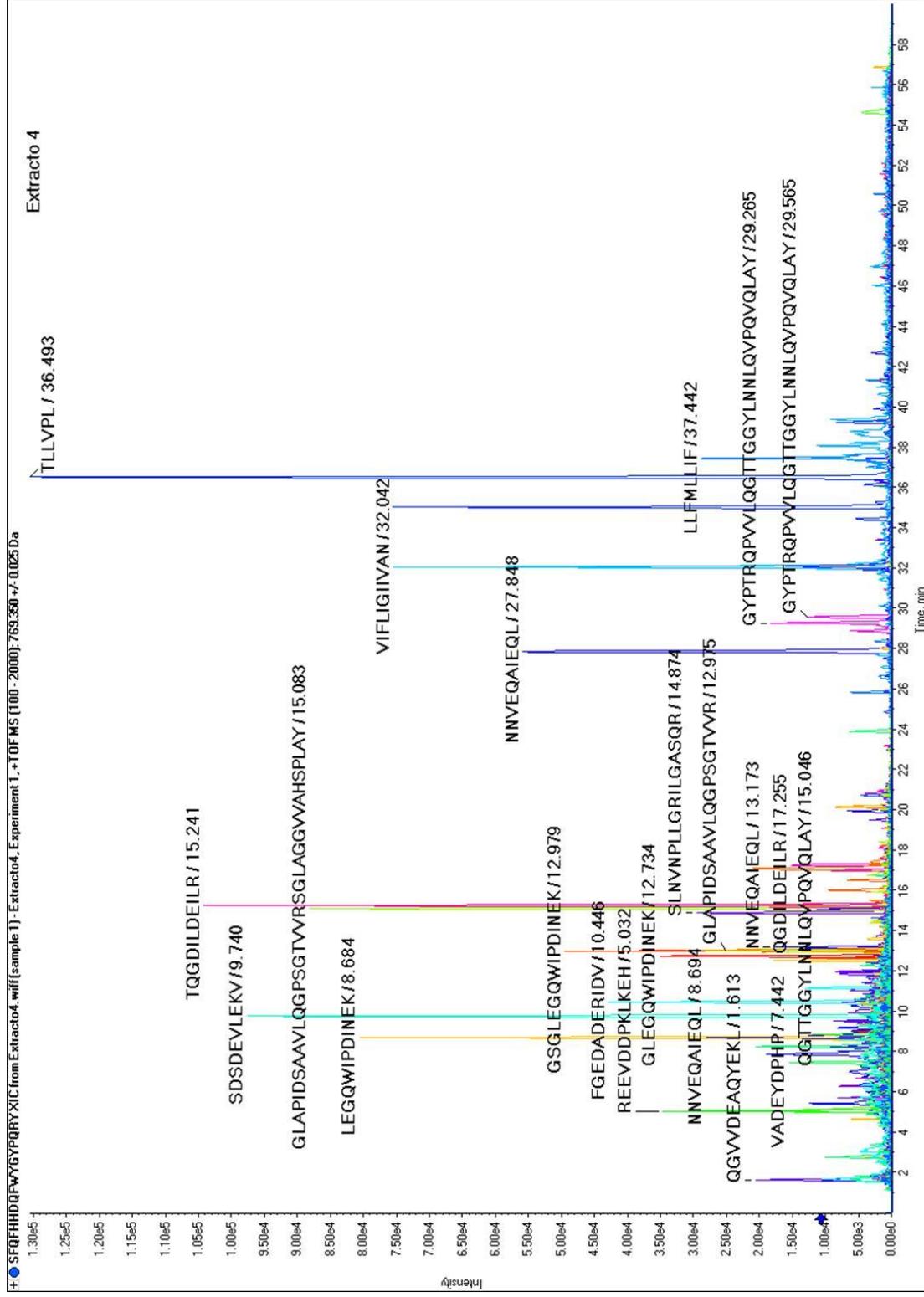


XIC ampliado del Extracto 1

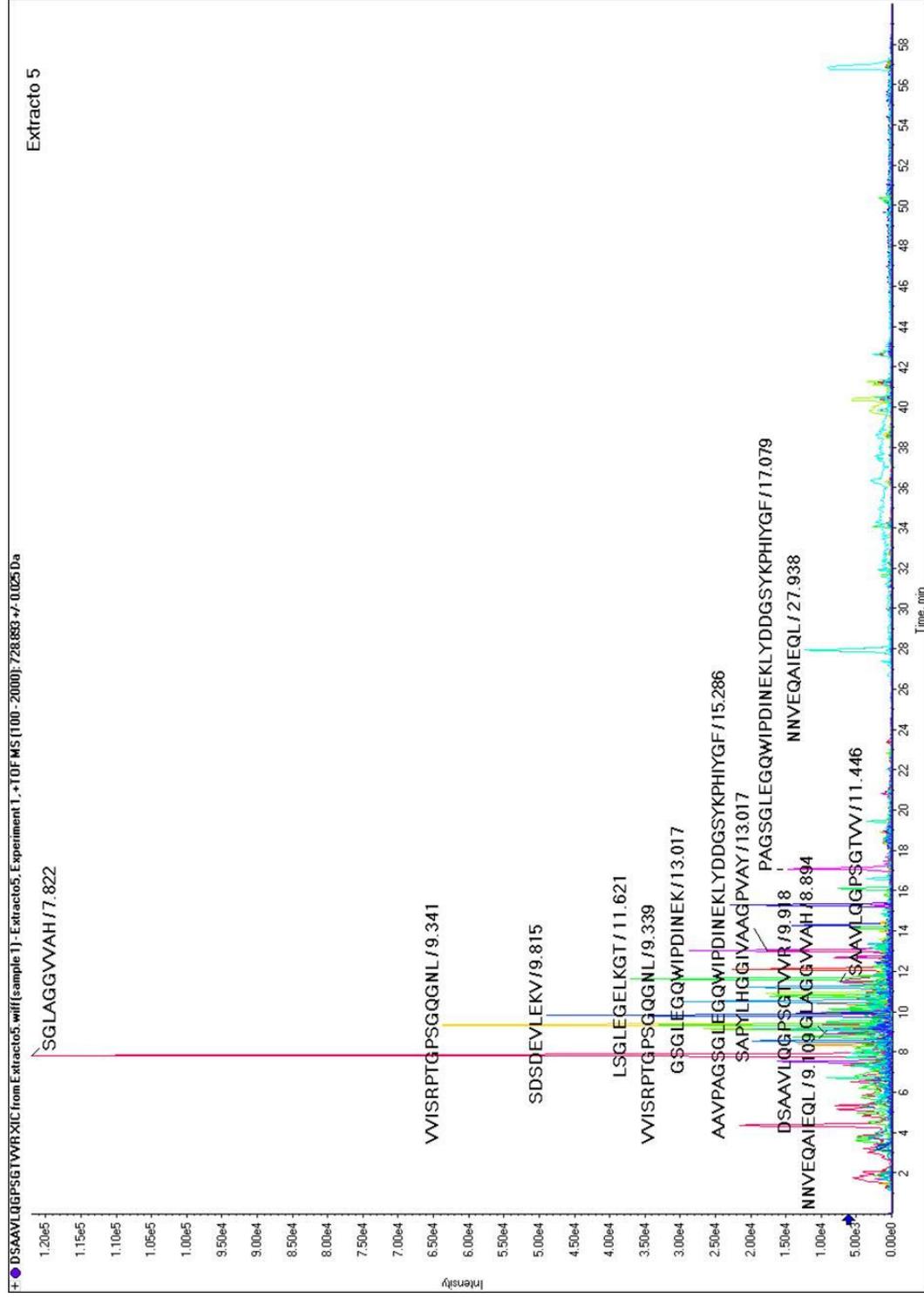




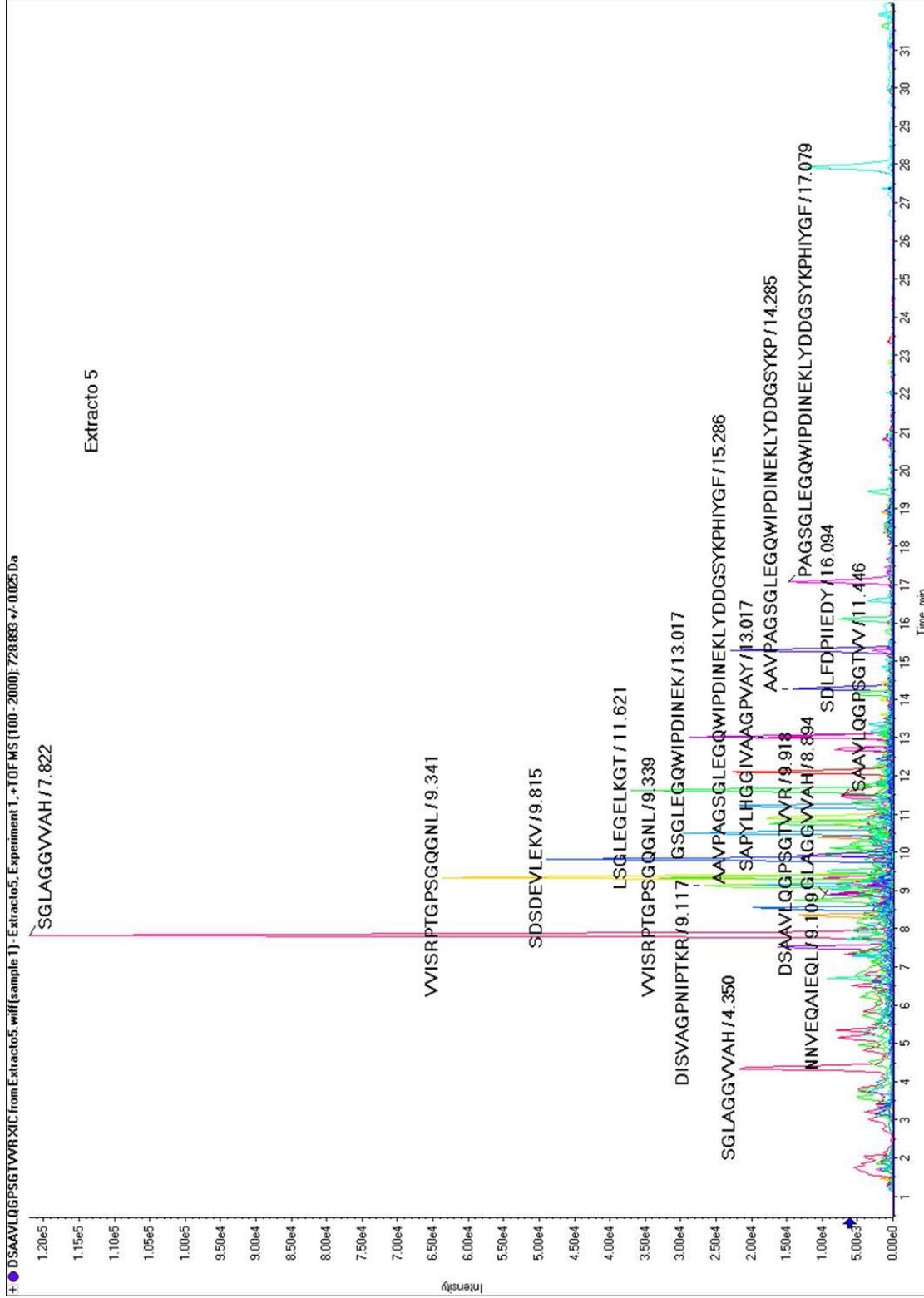
XIC del Extracto 3



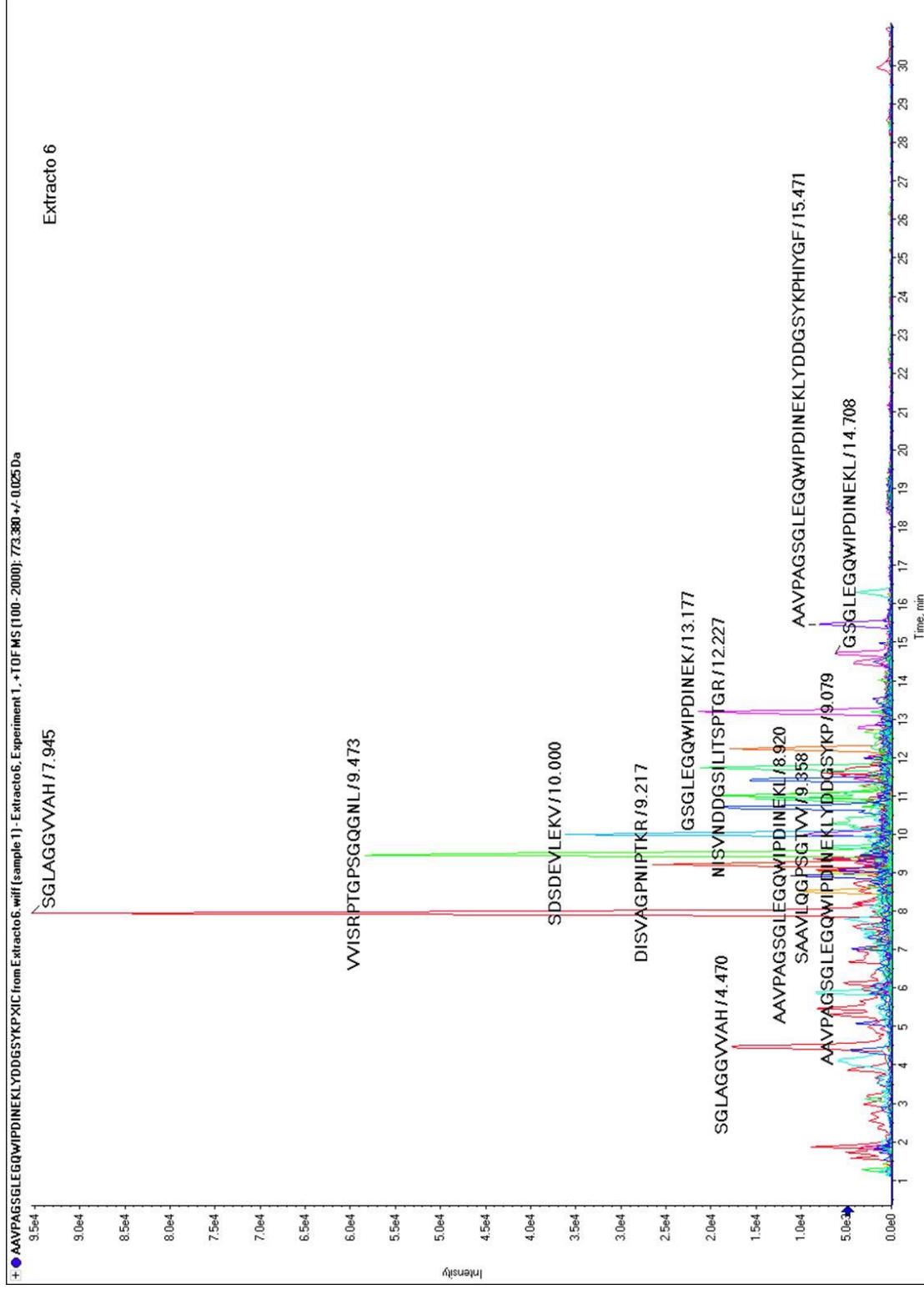
XIC del Extracto 4



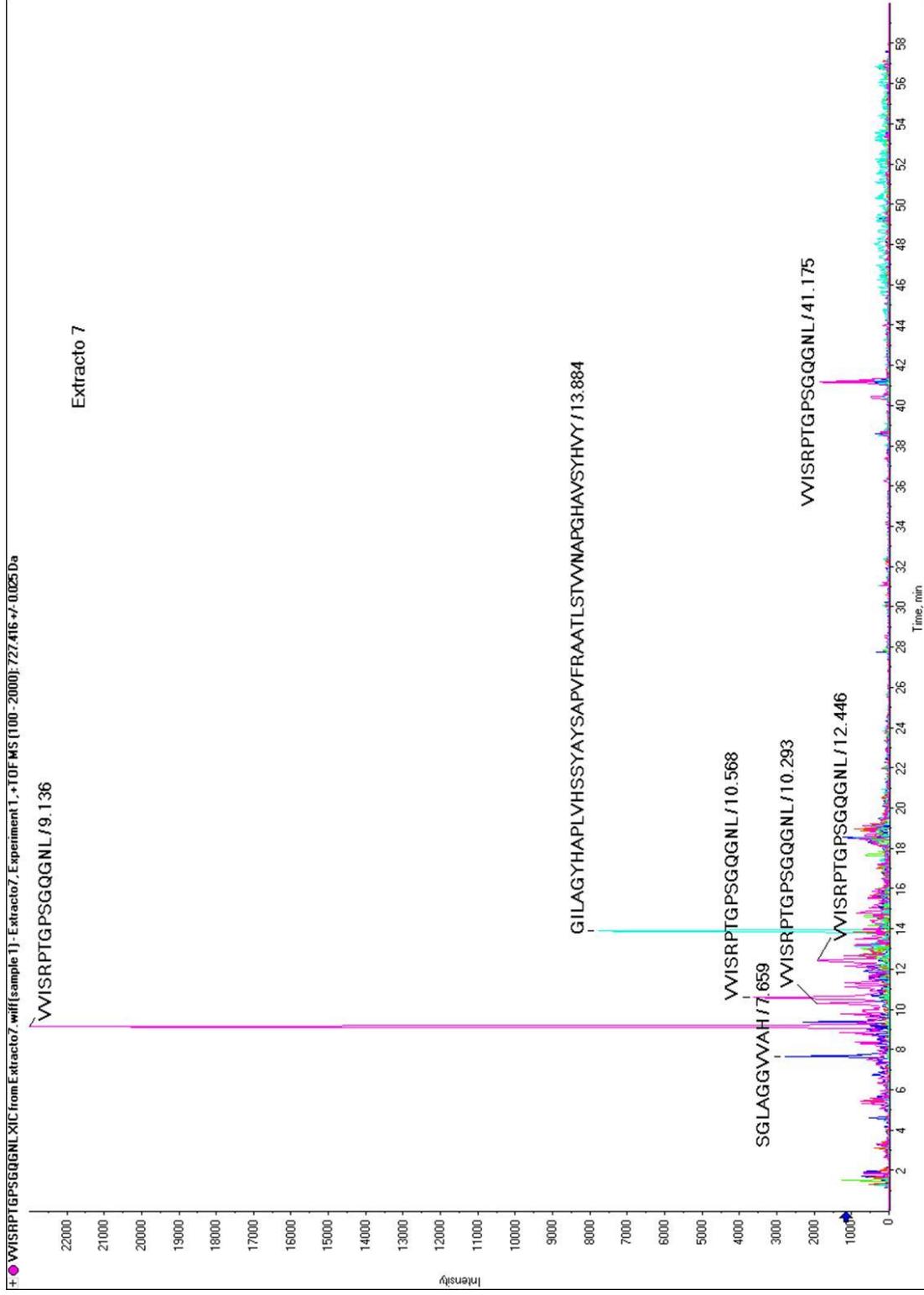
XIC del Extracto 5



XIC ampliado del Extracto 5



XIC del Extracto 6



XIC del Extracto 7

