

USOS TERAPÉUTICOS DE UN POLVO DE INSECTOS

La presente invención se refiere a un polvo de insectos y a su uso, particularmente en acuicultura.

La acuicultura es actualmente uno de los sectores más dinámicos de la industria alimenticia. La acuicultura se refiere particularmente a las producciones de peces (piscicultura), mariscos (conquiculturas) o crustáceos (astacicultura y peneicultura).

La fuerte demanda de pescado ha resultado en un aumento significativo en el precio de los alimentos para peces, mariscos y crustáceos.

Uno de los productos más utilizados en la acuicultura es la harina de pescado. Es una harina muy rica en proteínas animales (rica en aminoácidos tipo lisina y metionina) fáciles de digerir. El aumento de la demanda acompañado de una oferta limitada ha dado como resultado un aumento significativo en su precio, creando un riesgo para el crecimiento sostenible de la acuicultura. Por lo tanto, existe una fuerte demanda de fuentes alternativas de proteínas de alta calidad y, cuando sea posible, renovables, para la alimentación acuícola.

Los polvos de insectos o la harina de insectos ofrecen fuentes de proteína naturales alternativas, así como la posibilidad de producción en masa con una huella ecológica mínima. Particularmente, algunos coleópteros tales como *Tenebrio molitor* tienen la ventaja de ser adecuados para la producción en masa intensiva.

Además, el cultivo de peces, mariscos de concha o crustáceos, debido a la agrupación de un gran número de individuos en estanques de reproducción, suele estar sujeto a epidemias de origen bacteriano, como por ejemplo *Vibrio parahaemolyticus* que ha diezmado más del 70 % de la población de camarones de cultivo en ciertas regiones.

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria que afecta principalmente a los mariscos de concha (particularmente las ostras y mejillones), a los crustáceos (particularmente los camarones) y a los peces. Esta bacteria se transmite al ser humano, particularmente durante la ingesta de los mariscos de concha, crustáceos o peces infectados y causa enteritis o gastroenteritis.

Por lo tanto, existe una necesidad de un medio eficaz de prevenir el riesgo de infecciones y/o de combatir eficazmente las epidemias bacterianas.

A este efecto, los inventores han demostrado que la administración de polvo de insectos puede prevenir y curar infecciones bacterianas.

Además, la presente invención se refiere a un polvo de insectos para uso como medicamento.

Por "polvo de insectos" se entiende una composición, en forma de partículas, preparada únicamente a partir de insectos y posiblemente agua.

El contenido de humedad residual del polvo de insectos está comprendido entre 2 % y 15 %, preferiblemente entre 5 % y 10 %, más preferiblemente entre 4 % y 8 %. El contenido de humedad puede determinarse, por ejemplo, de acuerdo con el método resultante del reglamento CE 152/2009 del 27-01-2009 (103 °C/4 h).

Cabe señalar que, en el contexto de la presente solicitud, y salvo que se indique lo contrario, los intervalos de valores indicados son inclusivos.

A lo largo de la solicitud, cuando no se especifica una fecha para un reglamento, norma o directiva, se considera que es el reglamento, norma o directiva vigente en la fecha de presentación.

5 Cuando el polvo de insectos se muele a un tamaño de partícula aceptable para el consumo humano o animal, puede denominarse “harina de insectos”. Por “tamaño de partícula aceptable para la nutrición humana o animal”, se prefiere un tamaño de partícula de entre 100 μm y 1.5 mm, preferiblemente entre 300 μm y 1 mm, más preferiblemente entre 500 μm y 800 μm .

10 Por “insectos”, se entiende particularmente los coleópteros, los dípteros, los lepidópteros, los ertópteros, los himenópteros, los dictiópteros incluyendo, pero sin limitarse a blatópteros. Incluyendo isópteros y los mantópteros, los fasmópteros, los hemípteros, los heterópteros, los efemerópteros y los mecópteros, preferiblemente los coleópteros o mezclas de los mismos.

15 Preferiblemente, los coleópteros preferidos de acuerdo con la invención pertenecen a las familias Tenebrionidae, Melolonthidae, Dermestidae, Coccinellidae, Cerambycidae, Carabidae, Buprestidae, Cetoniidae, Dryophthoridae, o mezclas de las mismas.

Más preferiblemente, se trata de los siguientes coleópteros: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, *Zophobas morio*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum* y *Rhynchophorus ferrugineus*; o sus mezclas.

20 Ventajosamente, el polvo de insectos se obtiene a partir del estado larvario de las especies de insectos mencionados anteriormente.

El polvo de insectos de acuerdo con la invención se puede administrar a seres humanos o animales para tratamiento preventivo y/o curativo.

25 Este polvo de insectos en particular permite combatir eficazmente las infecciones bacterianas causadas por bacterias del género *Vibrio species*, particularmente las infecciones bacterianas causadas por *Vibrio parahaemolyticus*.

30 De hecho, cuando los camarones blancos infectados con *Vibrio parahaemolyticus* fueron alimentados con polvo de insectos en lugar de con harina de pescado, la tasa de mortalidad de los camarones blancos fue limitada. Esto probablemente se debe a un fortalecimiento de las defensas inmunitarias de los camarones blancos, debido a una estimulación de su sistema inmunológico y/o un mejor desarrollo de sus células de hepatocitos (consulte el Ejemplo 4 a continuación).

Más particularmente, la invención se refiere a un polvo de insectos para el uso en el tratamiento de la vibriosis.

35 Por “vibriosis”, se entiende cualquier infección bacteriana causada por bacterias del género *Vibrio spp*, que pertenece a la familia *Vibrionaceae*, bacterias que viven en el agua. Como se indica anteriormente, estas bacterias tienen una patogenicidad contra los humanos (que puede crear infecciones graves) y/o contra los animales, incluso los animales acuáticos pueden contaminar a los humanos a través de su alimentación.

Preferiblemente, las bacterias son *Vibrio aestuarianus* responsable de la enfermedad de las

ostras, *Vibrio parahaemolyticus* responsable de las enteritis y las gastroenteritis o *Vibrio splendidus* responsable de la enfermedad infecciosa de la ostra hueca. Preferiblemente, el polvo de insectos se destina al uso en el tratamiento de la vibriosis causada por *Vibrio parahaemolyticus*.

5 Más particularmente, el polvo de insectos se puede utilizar en el tratamiento de la vibriosis en los moluscos y los crustáceos.

Por “moluscos”, se entiende un animal invertebrado de cuerpo blando, compuesto de una cabeza, un pie y una masa visceral. En las siete clases de moluscos hay tres ramas principales: gastrópodos, bivalvos y cefalópodos.

10 Los gastrópodos incluyen caracoles, babosas y también lapas. Los bivalvos incluyen mejillones, ostra y almejas. Los cefalópodos incluyen pulpos, calamares o sepias.

Los moluscos a los que se hace referencia en esta invención pueden ser animales terrestres o acuáticos, preferiblemente acuáticos. Por “acuático”, se entiende animales de aguas dulces o animales marinos, preferiblemente marinos.

15 Preferiblemente, los moluscos a los que se hace referencia en esta invención pertenecen a los bivalvos que comprenden particularmente los *Palaeotaxodonta*, los *Cryptodonta*, los *Pteriomorphia*, los *Palaeoheterodonta*, los *Heterodonta* y los *Anomalodesmata*.

Preferiblemente, los moluscos se seleccionan de los *Mytilida* (mejillones) y los *Ostreida* (ostras). Los *Ostreida* incluyen particularmente *Ostrea*, *Crassostrea* (ostras huecas), los *Ostreola* (ostras planas) o también los *Saccostrea*.

20 Particularmente, las especies objetivo de moluscos son: *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Tapes rhomboides* (almeja rosada), *Venerupis decussata* (almeja gris europea), *Venerupis philippinarum* (almeja gris japonesa), *Venerupis aurea* (almeja dorada), *Corbicula fluminea* (almeja asiática), *Ostrea edulis* (ostra plana europea), *Crassostrea angulata* (ostra portuguesa), *Crassostrea gigas* ostra japonesa), *Ostreola conchaphila* (ostra olímpica), *Crassostrea virginica* (ostra americana u ostra de 25 Virginia).

Por “crustáceos” se entienden los animales cuyo cuerpo está recubierto con un exoesqueleto quitinoproteico llamado exocutícula que a menudo está impregnado con carbonato de calcio. Este grupo incluye animales de diferentes tamaños pertenecientes a las clases más bajas como los *Branchiopoda*, los *Cephalocarida*, los *Malacostraca*, los *Maxillopoda*, los *Ostracoda*, los *Remipedia*.

30 Aún más preferiblemente, las especies de crustáceos a los que se hace referencia en la invención pertenecen a los decápodos.

Por “decápodos”, se denominan los crustáceos que poseen 5 pares de patas. Las especies de decápodos están reagrupados en dos clases secundarias: los *Dendrobranchiata* y los *Pleocyemata*.

35 De los *Dendrobranchiata*, se pueden citar, por su nombre vernáculo, las gambas que pertenecen a la superfamilia *Penaeoidea Rafinesque*.

De los *Pleocyemata*, se pueden citar, por su nombre común, las galateas que pertenecen al infraorden *Anomourea*, los cangrejos que pertenecen a la subsección *Heterotremata* o los infraordenes *Brachyura* o *Paguroidea*, los camarones que pertenecen a la infraorden *Caridea*, cangrejos y langostas

que pertenecen a la infraorden *Astacidea* o también langostas que pertenecen a la infraorden *Chelata*.

Preferiblemente, los crustáceos a los que se hace referencia son camarones. Los camarones pueden ser de especies marinas o de agua dulce. Ventajosamente, se trata de especies de camarones adecuados para la camaronicultura o la cría en agua dulce.

5 Ventajosamente, las especies de camarones a los que se hace referencia en la invención, pertenecen a la familia *Penaeidae* y particularmente al género *Penaeus*.

Preferiblemente, las especies de camarones objetivo a los que se hace referencia en la presente invención son las siguientes: camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*), camarón carnosos (*Penaeus chinensis*),
10 camarón imperial o camarón japonés (*Penaeus japonicus*), camarón blanco de las Indias (*Penaeus indicus*), camarón banana (*Penaeus merguensis*), camarón akiami (*Metapenaeus spp*) y el camarón gigante de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*), aún más preferiblemente *Litopenaeus vannamei*.

Los langostinos tienen varios estadios de desarrollo, tres estadios larvarios, es decir Nauplius, Zoés, Mysis, y luego se metamorfosean en post-larvas. El polvo de insectos es particularmente adecuado
15 a los estadios post-larvales y/o adultos.

Por lo tanto, la invención se refiere particularmente a un polvo de insectos para usarse en el tratamiento de vibriosis en bivalvos y decápodos.

Se refiere igualmente a un polvo de insectos para usarse en el tratamiento de la enteritis de los camarones.

20 Particularmente, el polvo de insectos puede usarse en el tratamiento del síndrome de mortalidad precoz de los camarones/síndrome de necrosis hepatopancreática aguda en los camarones.

El síndrome de mortalidad precoz de los camarones/síndrome de necrosis hepatopancreática aguda (llamado «EMS/AHPNS») es responsable de una tasa de mortalidad en los camarones infectados con *Vibrio parahaemolyticus* que rebasa los 70 %.

25 Cuando se infecta, el camarón aparece debilitado y desorientado. A veces presenta heridas negras en su cutícula. Algunas cepas bacterianas muy virulentas pueden diezmar hasta el 80 % de los camarones de granja como los camarones tigre gigantes (*Penaeus monodon*) y los camarones de patiblanco (*Penaeus vannamei*).

Ventajosamente, el polvo de insectos utilizado de acuerdo con la invención contiene al menos 67
30 % en peso de proteínas y al menos 0.1 % en peso de quitina, cuyos porcentajes están proporcionados con respecto al peso total del polvo de insectos.

Por “proteínas”, se denomina la cantidad de proteína cruda. La cuantificación de la proteína cruda es bien conocida por el técnico en la materia. A modo de ejemplo, se puede citar el método Dumas o el método Kjeldahl. Preferiblemente, se utiliza el método Dumas, que corresponde a la norma NF EN
35 ISO 16634-1 (2008).

Los ejemplos de un tal polvo se describen en los Ejemplos 1-3 a continuación.

Preferiblemente, el polvo de insectos comprende 68 % en peso de proteína cruda, más preferiblemente 70 % en peso de proteína cruda, más preferiblemente 71% en peso de proteína cruda,

los porcentajes en peso se proporcionan con respecto al peso total del polvo de insectos.

De acuerdo con la invención, por "quitina" significa cualquier tipo de derivado de la quitina, es decir, de un derivado de polisacáridos que comprende unidades N-acetil-glucosamina y unidades D-glucosaminas, particularmente copolímeros de quitina-polipéptidos (a veces denominados como "compuesto de quitina-polipéptidos"). Estos copolímeros también pueden estar asociados con pigmentos, a menudo de tipo melanina.

La quitina es el segundo polímero más sintetizado en el mundo después de la celulosa. En efecto, la quitina se sintetiza por muchas especies del mundo vivo: constituye en parte del exoesqueleto de los crustáceos y de los insectos y la pared lateral que rodea y protege a los hongos. Más particularmente, en los insectos, la quitina constituye de esta manera de 3 % a 60 % de su exoesqueleto.

La determinación de contenido de quitina se realiza por extracción de la misma. Un tal método puede ser el método AOAC 991.43.

De acuerdo con una primera modalidad, el polvo de insectos utilizado de acuerdo con la invención contiene al menos 67 % en peso de proteínas y al menos 5 % en peso de quitina, cuyos porcentajes están proporcionados con respecto al peso total del polvo de insectos.

Preferiblemente, este polvo de insectos comprende entre 5 % y 16 % en peso de quitina, más preferiblemente entre 8 % y 14 % de quitina, los porcentajes en peso se proporcionaron con respecto al peso total del polvo de insectos.

Ventajosamente, este polvo de insectos tiene un contenido de cenizas menor o igual a 4 % en peso con relación al peso del polvo de insectos y aún más ventajosamente menor o igual a 3.5 %.

Las cenizas constituyen el residuo que resulta de la combustión de la composición de acuerdo con la invención.

El método de determinación del contenido de cenizas es bien conocido por el técnico en la materia. De preferencia, las cenizas se han determinado de acuerdo con el método establecido en el reglamento CE 152/2009 del 27-01-2009.

El contenido de grasa de este polvo de insectos está preferiblemente entre 5 % y 20 % en peso con respecto al peso total de polvo de insectos, más preferiblemente entre 9 % y 17 %.

Los métodos de determinación del contenido de materia grasa son bien conocidos por el técnico en la materia. A modo de ejemplo y de manera preferida, la determinación de este contenido se llevará a cabo de acuerdo con el método del reglamento CE 152/2009.

Ventajosamente, las proteínas de este polvo de insectos tienen una digestibilidad mayor o igual al 85 % en peso con respecto al peso total de proteína cruda.

La digestibilidad es una digestibilidad pepsica medida por el método descrito en la Directiva 72/199/CE.

Preferiblemente, la digestibilidad es mayor o igual a 86 %, más preferiblemente, mayor o igual a 88 %.

Ventajosamente, este polvo de insectos usado de acuerdo con la invención comprende entre 35 % y 65 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas, y al menos 50 % de las

proteínas solubles tienen un tamaño menor o igual a 12,400 g/mol.

Por "peso total de proteínas" se entiende el peso de proteína cruda presente en el polvo de insectos de acuerdo con la invención.

5 Por "proteínas solubles" se entiende, de la proteína cruda, aquellas que son solubles en una solución acuosa cuyo pH está entre 6 y 8, ventajosamente entre 7.2 y 7.6.

Preferiblemente, la solución acuosa es una solución tampón cuyo pH está entre 6 y 8, ventajosamente entre 7.2 y 7.6. Preferiblemente, la solución tampón es una solución tampón de fosfato NaCl, cuyo pH es igual a 7.4 +/- 0.2.

10 Ventajosamente, este polvo de insectos comprende entre 38 % y 60 % en peso, preferiblemente entre 43 % y 55 % en peso de proteínas solubles con respecto al peso total de proteínas.

Preferiblemente, al menos 60 %, preferiblemente al menos 70 % de las proteínas solubles tienen un tamaño menor o igual a 12,400 g/mol.

Más particularmente, las proteínas solubles tienen un tamaño de entre 6,500 y 12,400 g/mol.

15 Ventajosamente, menos del 10 %, preferiblemente menos del 8 %, más preferiblemente menos del 6 % de proteínas solubles tienen un tamaño mayor o igual a 29,000 g/mol.

Este polvo de insectos se puede preparar de acuerdo con un método que comprende las siguientes etapas:

- i) sacrificio de los insectos,
- ii) prensado de los insectos para obtener una torta de prensa, y
- 20 iii) molienda de la torta de prensa.

El sacrificio de los insectos se puede llevar a cabo mediante escaldado o blanqueamiento, como se describe más detalladamente a continuación en el Ejemplo 1 a continuación.

Asimismo, las etapas de prensado y de molienda se describen más detalladamente en este ejemplo.

25 Finalmente, el proceso de preparación de acuerdo con la invención puede comprender además una etapa de secado de la torta de prensa.

La etapa de secado se lleva a cabo ventajosamente después de la etapa de prensado y antes de la etapa de molienda y también se describe más detalladamente en el Ejemplo 1 a continuación.

30 De acuerdo con una segunda modalidad, el polvo de insectos usado de acuerdo con la invención comprende al menos 71% en peso de proteínas y comprende entre 0.1 % y 2 % en peso de quitina, los porcentajes se proporcionan en peso con respecto al peso total del polvo de insectos.

Preferiblemente, este polvo de insectos tiene un contenido de proteína mayor o igual a 72 % en peso, más preferiblemente mayor o igual a 74 % en peso, aún más preferiblemente mayor o igual a 75 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

35 Más particularmente, este polvo tiene un contenido de quitina de entre 0.5 % y 3 % en peso, más preferiblemente entre 0.8 % y 2 % en peso, más preferiblemente entre 0.8 % y 1.7 % en peso con respecto al peso seco total del polvo.

Preferiblemente, este polvo comprende entre 5 % y 20 % en peso, preferiblemente entre 7 % y 17

% en peso de lípidos con respecto al peso seco total del polvo.

Más particularmente, este polvo comprende entre 1 % y 10 % en peso, preferiblemente entre 2 % y 6 % en peso de cenizas con respecto al peso seco total del polvo.

Ventajosamente, las proteínas de este polvo de insectos tienen una digestibilidad mayor o igual al 85 % en peso con respecto al peso total de proteínas crudas.

Preferiblemente, la digestibilidad es mayor o igual a 88 %, más preferiblemente, mayor o igual a 92 %.

Este polvo de insectos se puede preparar de acuerdo con un método que comprende las siguientes etapas:

- 10 - sacrificio de los insectos,
- la separación de las cutículas de la parte blanda de los insectos;
- la separación de la parte blanda de los insectos en una fracción oleosa, una fracción sólida y una fracción acuosa,
- el secado de la fracción sólida para obtener una fracción sólida seca;
- 15 - la molienda de la fracción sólida seca para obtener un polvo de insectos.

El sacrificio de los insectos se puede llevar a cabo mediante escaldado o blanqueamiento, como se describe más detalladamente a continuación en el Ejemplo 1 a continuación.

La cutícula es la capa externa (o exoesqueleto) secretada por la epidermis de los insectos. Por lo general, es formada de tres capas : la epicutícula, la exocutícula y la endocutícula.

20 Por "parte blanda", se entiende la carne (que incluye los músculos y las vísceras) y el jugo (incluidos particularmente los líquidos biológicos, el agua y la hemolinfa) de los insectos. En particular, la parte blanda no consiste en el jugo de los insectos.

La separación de las cutículas de la parte blanda de los insectos se puede llevar a cabo utilizando un filtro prensa o un separador de banda.

25 Por separador de banda se entiende un dispositivo que comprende una banda de sujeción (o banda de presión) y un tambor perforado.

Ventajosamente, en la presente solicitud, el polvo de insectos se obtiene a partir de una especie de insectos perteneciente al orden de coleópteros, preferiblemente de la especie *Tenebrio molitor*, y cualquier modalidad de la invención. El polvo de insectos es, por lo tanto, un polvo de coleópteros y más particularmente, un polvo de *Tenebrio molitor*.

Por lo tanto, la invención se refiere más particularmente a un polvo de coleópteros y en particular a un polvo de *Tenebrio molitor*, para usarse:

- como medicamento,
- en el tratamiento de la vibriosis, particularmente en bivalvos y decápodos,
- 35 - en el tratamiento de la enteritis del camarón, y/o
- en el tratamiento del síndrome de mortalidad precoz de los camarones/síndrome de necrosis hepatopancreática aguda de los camarones.

La invención se refiere además al régimen alimenticio para moluscos y/o crustáceos que

comprende al menos 5 % en peso de polvo de insectos.

Por “régimen alimenticio” se entiende un conjunto de ingredientes (o constituyentes) de alimentos en proporciones dadas, destinados a ser consumidos por los moluscos y/o crustáceos.

El polvo de insectos se puede utilizar de acuerdo con la invención como alternativa a la harina de pescado administrada generalmente en el régimen alimenticio de los moluscos y los crustáceos. Puede reemplazar parcial o completamente la harina de pescado. Preferiblemente, el polvo de insectos reemplaza la harina de pescado al 50 % o más, en peso de harina de pescado, aún más preferiblemente al 75 % o más, en peso de harina de pescado.

La sustitución de la harina de pescado con polvo de insectos permite ventajosamente mejorar el sistema inmunológico de los moluscos y/o crustáceos, particularmente debido a la alta digestibilidad de las proteínas y lípidos del polvo de insectos. Además, aumenta la densidad, así como la longitud de las vellosidades intestinales, especialmente en el camarón blanco, mientras aumenta el tamaño de las células de hepatocitos. Además, esta sustitución de la harina de pescado con polvo de insectos presenta una rica alternativa en proteínas y lípidos, de bajo costo y que puede prevenir y/o curar ciertas enfermedades como la vibriosis de los camarones.

El régimen alimenticio administrado a los moluscos o a los crustáceos, contiene ventajosamente al menos 10 % en peso del polvo de insectos, preferiblemente al menos 15 % en peso del polvo de insectos, aún más preferiblemente al menos 25 % en peso del polvo de insectos.

De acuerdo con una modalidad ventajosa de la invención, el régimen alimenticio administrado a moluscos o crustáceos, comprende 20 % en peso de polvo de insectos.

Preferiblemente, el polvo de insectos reemplaza completamente la harina de pescado generalmente administrada a los moluscos y crustáceos. Además, el régimen alimenticio administrado a los mariscos o crustáceos comprende ventajosamente 25 % en peso de polvo de insectos.

Este régimen está especialmente adaptado a los camarones, a los otros componentes del régimen, así como a sus proporciones, y se define en el manual (« *Nutrient requirements of fish and shrimp* ») publicado por National Research Council (NRC) en 2011.

Ventajosamente, el régimen de acuerdo con la invención comprende un polvo de insectos que comprende al menos 71 % en peso de proteínas y que comprende entre 0.1 % y 2 % en peso de quitina, los porcentajes se proporcionan con respecto al peso total del polvo de insectos.

Preferiblemente, el polvo de insectos es un polvo de coleópteros, más preferiblemente de *Tenebrio molitor*.

La invención se refiere además al uso de un polvo de insectos que comprende al menos 67 % en peso de proteínas y que comprende al menos 0.1 % en peso de quitina, los porcentajes se proporcionan con respecto al peso total del polvo de Insectos, como suplemento dietético en nutrición humana o animal.

El polvo de insectos utilizado como suplemento dietético en la nutrición humana o animal puede comprender al menos 67 % en peso de proteínas y al menos 5 % en peso de quitina, los porcentajes se proporcionan con respecto al peso total del polvo de insectos. Se trata del polvo de insectos de la primera

modalidad descrita anteriormente, que incluye todas las características ventajosas, particulares y preferidas y su método de producción.

Alternativamente, el polvo de insectos utilizado como suplemento dietético en la nutrición humana o animal puede comprender al menos 71 % en peso de proteína y que comprende al menos 0.1 % y 2 % en peso de quitina, los porcentajes se proporcionan con respecto al peso total del polvo de insectos. Se trata del polvo de insectos de la segunda modalidad descrita anteriormente, que incluye todas las características ventajosas, particulares y preferidas y su método de producción.

Ventajosamente, el polvo de insectos es un polvo de coleópteros, preferiblemente *Tenebrio molitor*.

La invención se refiere ventajosamente al uso de un polvo de insectos, especialmente como se describe anteriormente, como un suplemento dietético en la nutrición de moluscos y/o crustáceos.

La invención finalmente proporciona un suplemento dietético que comprende un polvo de insectos como se describe anteriormente.

Ventajosamente el polvo de insectos se utiliza como un suplemento dietético en la nutrición de camarones, en particular camarones cultivados.

Otras características y ventajas de la invención se harán evidentes en los ejemplos que siguen, proporcionados a modo de ilustración, con referencia a:

- la figura 1 es un diagrama que ilustra el peso final de camarones blancos alimentados con diferentes regímenes alimenticios, que comprenden o no polvo de insectos en lugar de harina de pescado;

- la figura 2 es un diagrama que ilustra el aumento de peso de camarones blancos alimentados con diferentes regímenes alimenticios, que comprenden o no polvo de insectos en lugar de harina de pescado;

- la figura 3 es un diagrama que ilustra la actividad de la fenol-oxidasa en función de la reducción bacteriana de patógenos en los camarones blancos infectados con *Vibrio parahaemolyticus* y alimentados con diferentes regímenes alimenticios, que comprenden o no polvo de insectos en lugar de harina de pescado; y

- la figura 4 es un diagrama que ilustra la tasa de supervivencia de los camarones infectados con *Vibrio parahaemolyticus* en función del régimen alimenticio administrado, que comprende o no el polvo de insectos en lugar de harina de pescado.

Ejemplo 1: Método de preparación de un polvo de insectos

La composición de acuerdo con la invención se prepara a partir de larvas de *Tenebrio molitor*. Al recibir las larvas, se pueden almacenar a 4 °C durante 0 días a 15 días en sus tanques de reproducción antes del sacrificio sin mayor degradación. El peso de las larvas con relación a la edad de las larvas utilizadas es variable y, por lo tanto, su composición puede variar, como se ilustra en la Tabla 1 a continuación:

Biomasa (Insectos)	mg	23	35	58	80	108	154
Materia seca	%*	34	34	34.2	37.9	39.6	39.5
Cenizas	%*	1.59	1.52	1.6	1.75	1.67	1.43
Proteínas crudas	%*	22.6	22.2	22	23.2	23.1	23.2
Lípidos	%*	6.62	6.88	7.98	10.3	10.9	11.7

* Los % se expresan en peso seco con relación al peso húmedo de las larvas.

Tabla 1: Composición bioquímica de las larvas de *Tenebrio molitor* de acuerdo con su peso.

• **Etapa 1; Blanqueamiento de los insectos**

Las larvas vivas (+4°C a +25°C) se transportan en una capa de espesor comprendida entre 2 cm y 10 cm, en una cinta transportadora perforada (1 mm) a una cámara de blanqueo. Los insectos se blanquean de esta manera con vapor (boquillas o lecho de vapor) a 98 °C o con agua a 100 °C (boquillas de pulverización) o en modo mixto (agua + vapor). El tiempo de permanencia en el cuarto de blanqueo está comprendido entre 1 minuto a 15 minutos, idealmente 5 minutos.

La temperatura de las larvas a la salida del blanqueamiento está comprendida entre 75 °C y 98 °C.

• **Etapa 2: Prensado**

Las larvas, una vez blanqueadas, se transportan a la tolva de alimentación de una prensa de un solo tornillo continuo. Las larvas durante el paso por la prensa se mantienen a una temperatura mayor a 70 °C para aumentar los rendimientos de desaceitado. El principio de desaceitado es presurizar el material dentro de una jaula cilíndrica mediante una disposición de tornillos y anillos dispuestos en el eje central. La jaula está forrada al interior con barras divididas en secciones y separadas por espacios de diferentes espesores de acuerdo con el área de trabajo. Los intersticios formados de esta manera permiten el flujo de una fracción de aceite y limitan el paso de la materia llamada "seca", la fracción proteica, que se denominará "torta de prensa", que participa de esta manera en la presurización.

Los rendimientos de prensado obtenidos se comprenden entre 48 % y 55%.

$$R_{\text{torta}} = (\text{masa}_{\text{torta}} / \text{masa}_{\text{jugo}} + \text{masa}_{\text{torta}})$$

La torta de prensa obtenida contiene de 35 % a 40 % de materias secas, de 67 % a 75 % de proteínas y de 13 % a 17 % de materias grasas, cuyos porcentajes en peso se proporcionan con respecto al peso seco de la torta de prensa.

• **Etapa 3; Secado**

La torta de prensa se coloca después en una bandeja de capa fina (aproximadamente 2 cm) y se seca en aire ventilado/se agita a 90 °C durante 5 horas para obtener una torta de prensa con un contenido de materia seca mayor a 92 %.

Esta etapa permite prevenir cualquier contaminación que haya ocurrido desde el sacrificio.

Elaw (actividad del agua) a la salida del secado es de 0.35. Los resultados microbiológicos

muestran ausencia de *Salmonella* spp (método: IRIS *Salmonella* BKR 23/07-10/11) y valores de enterobacterias menores a 10 UFC/g (método: NF ISO 2128-2, diciembre de 2004, 30 °C y 37 °C).

- **Etapas 4; Molienda**

La torta de prensa seca, que comprende en mayor parte proteínas, finalmente se muele con la ayuda de un molino de martillo continuo (6 móviles reversibles - espesor 8 mm). El molino se alimenta por una tolva con tapa de control de velocidad de flujo (180 kg/hora). La rejilla perforada utilizada para controlar el tamaño de grano en la salida es de 0.8 mm. La velocidad de rotación del motor es de 3000 rpm (motorización eléctrica, consumo de energía 4kW (5.5 CV)).

Ejemplo 2: Caracterización del polvo de insectos obtenido en el Ejemplo 1

Se ha caracterizado el polvo de insectos preparado en el Ejemplo 1.

1. Análisis

1.1 Determinación del contenido de humedad

El contenido de humedad se determina de acuerdo con el método del reglamento CE 152/2009 del 27-01-2009 (103°C/4 h).

1.2 Determinación de la cantidad de proteína cruda

Las proteínas crudas se determinan de acuerdo con el método, conocido como Dumas, y corresponden a la norma NF EN ISO 16634-1 (2008).

1.3 Determinación de la cantidad de quitina

La fibra dietética de la harina de insectos se compone principalmente de quitina, por lo que esta última se determinó de acuerdo con el método AOAC 991.43. Los valores obtenidos de esta manera están, por lo tanto, ligeramente sobreestimados.

1.4 Determinación de la cantidad de materia grasa

La materia grasa se ha determinado de acuerdo con el método del reglamento CE 152/2009.

1.5 Determinación de la cantidad de cenizas

Las cenizas crudas se han determinado de acuerdo con el método establecido en el reglamento CE 152/2009 del 27-01-2009.

1.6 Determinación de la cantidad de fósforo

El fósforo se dosifica por ICP ("plasma acoplado inducido") con calibración interna.

1.7 Determinación de la energía

El valor energético se obtiene con los coeficientes del reglamento UE 1169/201.

1.8 Determinación de cantidades de aminoácidos y ácidos grasos

Esta determinación se llevó a cabo por cromatografía en fase gaseosa después de hidrólisis y derivatización de aminoácidos y ácidos grasos respectivamente.

1.9 Determinación de la digestibilidad pepsica

La digestibilidad pepsica se mide de acuerdo con el método descrito en la directiva 72/199/CE.

2. Resultados

El polvo de insectos se detalla en la Tabla 2 a continuación.

5

10

15

20

25

30

35

Macronutrientes	Unidad	Composición	Ácido graso	Unidad	Composición
Humedad	%*	5.32	C12:0	%*	0.03
Proteína	%*	67.09	C14:0	%*	0.22
Quitina	%*	8.0	C15:0	%*	0.01
Materia grasa	%*	13.6	C16:0	%*	1.33
Ceniza	%*	3.21	C16:1	%*	0.05
Fósforo total	%*	0.75	C16:1n-7	%*	0.16
Energía	MJ/kg	23.74	C17:0	%*	0.02
			C17:1	%*	0.01
Aminoácidos	Unidad	Composición	C18:0	%*	0.35
Arginina	%*	2.56	C18:1n-9	%*	3.03
Histidina	%*	1.39	C18:1n-7	%*	0.04
Isoleucina	%*	2.11	C18:2n-6	%*	2.96
Leucina	%*	3.99	C18:2tn-6	%*	0.02
Lisina	%*	3.32	C18:3n-3	%*	0.14
Treonina	%*	1.87	C20:0	%*	0.02
Valina	%*	2.91	C20:1n-9	%*	0.01
Metionina	%*	1.43	C20:2n-6	%*	0.01
Cisteína	%*	0.63	C22:0	%*	0.01
Fenilalanina	%*	1.98	* Los porcentajes en peso se expresan con respecto al peso total de la composición del polvo.		
Tirosina	%*	2.68			
Taurina	%*	0.42			
Ácido aspártico + asparagina	%*	4.51			
Ácido glutámico + glutamina	%*	6.36			
Alanina	%*	3.83			
Glicina	%*	2.54			
Prolina	%*	3.18			
Serina	%*	2.94			

Tabla 2: Composición del polvo de insectos

Además, se obtiene una digestibilidad pepsica de 90+/-2%.

Ejemplo 3: Método alternativo de preparación de un polvo de insectos

Se introducen 200 g de larvas de *T. molitor* en un vaso de precipitados, se colocan en un baño de agua a 100 °C y contienen 200 mL de agua hervida previamente. Después de 5 minutos, el vaso de precipitados se retira del baño de agua, las larvas se drenan y luego se mezclan con un volumen de agua

de 200 mL. El líquido obtenido de esta manera se pasa a través de una prensa del tipo de doble tornillo. La torta de prensa obtenida de esta manera se seca durante 24 horas en un horno a 70 °C, después se muele a 250 µm. De esta manera se obtiene un polvo de insectos.

5 **Ejemplo 4: Efectos del polvo de insectos obtenido en el Ejemplo 1 en camarones blancos, en particular en su resistencia a la bacteria patógena *vibrio parahaemolyticus***

Se realizaron tres experimentos para evaluar la palatabilidad de los polvos de insectos en camarones (experimento 1), la digestibilidad de las proteínas, los lípidos y la energía de los polvos de insectos en camarones (experimento 2) y la efectividad del polvo de insectos en el crecimiento e
10 inmunidad de los camarones blancos (experimento 3).

1. Material y método de experimentos realizados

La harina de pescado utilizada para todos estos experimentos es una harina de pescado de Tailandia ("Fish meal") y tiene un contenido de proteína cruda de 56 %, expresada con respecto al peso total de la harina de pescado.

15 Asimismo, el polvo de insectos utilizado es idéntico para todos estos experimentos y corresponde al polvo de insectos obtenido en el Ejemplo 1.

Estadísticas

Estos experimentos se diseñaron completamente aleatoriamente (CMCA). Todos los datos se
20 analizaron por ANOVA (análisis de varianza). La prueba de rango múltiple de Duncan se utilizó para determinar las diferencias entre los promedios de los diferentes regímenes alimenticios. La notación alfabética se usó para marcar las diferencias en el nivel significativo de una alfa 0.05. Todas las investigaciones de los experimentos 2 y 3 se realizaron en el Laboratorio de Alimentación y Nutrición de Animales Acuáticos, Departamento de Acuicultura, Facultad de Pesca, Universidad de Kasetsart,
25 Bangkok, Tailandia.

Experimento 1: Prueba de palatabilidad de los polvos de insectos en camarones blancos con relación a un régimen alimenticio usual constituido de 15 % de harina de pescado.

a. Los diferentes regímenes alimenticios del experimento.

30 La capacidad de ser apetecible de los polvos de insectos en camarones blancos se ha evaluado de forma completamente aleatoria utilizando los siguientes 5 regímenes alimenticios, cada uno repetido cuatro veces:

- Régimen alimenticio 1 (R1): Control, 30 % de harina de pescado (denominada de aquí en adelante FM);

35 - Régimen alimenticio 2 (R2): Control negativo 15 % de FM; 0 % de polvo de insectos (denominada de aquí en adelante INSM);

- Régimen alimenticio 3 (R3): Control negativo 10 % de FM; 5 % de INSM;

- Régimen alimenticio 4 (R4): Control negativo 5 % de FM; 10 % de INSM;

- Régimen alimenticio 5 (R5): Control negativo 0 % de FM; 15 % de INSM;

Se utilizaron cuatro réplicas de cada régimen alimenticio para evaluar la palatabilidad.

b. Formulaciones y producción de regímenes alimenticios

Los regímenes alimenticios se han formulado con ingredientes útiles para satisfacer las necesidades nutricionales conocidas del camarón blanco, incluido el manual de referencia del Consejo Nacional de Investigación (NCR) publicado en 2011.

El polvo de insectos utilizado en los regímenes alimenticios experimentales es el que se obtiene de acuerdo con el Ejemplo 1.

La capacidad de ser apetecible de los polvos de insectos en el camarón blanco se ha evaluado en cinco regímenes alimenticios detallados anteriormente, cuya composición se muestra en la tabla 3 a continuación.

Las composiciones aproximadas de los alimentos de prueba, tales como humedad, proteínas, lípidos, fibras y cenizas se analizaron de acuerdo con la descripción de AOAC (2000), que es el método de referencia internacional.

Ingredientes de la fórmula	R1 INSM 0 % - FM 30 %	R2 INSM 0 % - FM 15 %	R3 INSM 5 % - FM 10 %	R4 INSM 10 % - FM 5 %	R5 INSM 15 % - FM 0 %
Harina de pescado	30.0	15.0	10.0	5.0	0.0
Soya	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Gluten de trigo	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Polvo de hígado de calamar	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
Harina de trigo	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
Granos quebrados de arroz	2.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Concentrado de proteína de soya	0.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Polvo de insectos	0.0	0.0	5.0	10.0	15.0
Gluten de maíz	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Aceite de atún	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Aceite de soya	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Lecitina de soya	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Fosfato monocálcico	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Aglutinante	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Premezcla de vitaminas	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6

	R1	R2	R3	R4	R5
Ingredientes de la fórmula	INSM 0 % - FM 30 %	INSM 0 % - FM 15 %	INSM 5 % - FM 10 %	INSM 10 % - FM 5 %	INSM 15 % - FM 0 %
Suma	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Composición química por (AOAC, 2000)					
Humedad (%)	7.38	7.14	7.09	7.25	7.18
Proteínas (%)	37.38	36.88	37.06	37.84	38.81
Lípidos (%)	7.18	6.50	6.97	7.23	7.60
Fibra (%)	2.69	2.95	3.09	3.33	3.68
Ceniza (%)	10.39	8.02	7.70	6.58	5.96
Energía (Kcal/Kg)	4560.14	4467.36	4477.59	4487.82	4498.05

Tabla 3: Composiciones de regímenes alimenticios de los camarones blancos que comprenden polvo de insectos en lugar de harina de pescado.

c. Protocolo para la alimentación de camarones blancos

Los camarones blancos se alimentaron con gránulos que contenían 36 % de proteína cruda y 7 % de lípidos crudos, a una cantidad de aproximadamente 5 % del peso corporal promedio de los camarones/día (es decir, 1.5-2% del peso corporal / comida) colocando los alimentos en una bandeja y aplicando 3 comidas al día.

Durante 10 días y solo durante la comida de 13:00, se ha registrado el tiempo requerido para que los camarones ingieran inicialmente el alimento, la cantidad de camarones que llega a los alimentos dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación del alimento sobre la bandeja y el consumo de alimentos para una comida.

Se utilizaron cuatro réplicas de cada régimen alimenticio para evaluar la capacidad de atracción.

El alimento crudo se recogió una hora después de que se depositó en la bandeja y se secó por sublimación a -40°C ("lío-filizado") y se pesó después para determinar el consumo total de alimentos.

En un estudio de 10 días, se calculó la ración de alimento de cada bandeja en cada régimen para determinar la palatabilidad, centrándose en el tiempo requerido para ingerir los alimentos, la cantidad de alimentos consumidos y la cantidad de camarones que consumen los alimentos

Experimento 2: Estudio de la digestibilidad de las proteínas, los lípidos y la energía de los polvos de insectos en los camarones blancos

La digestibilidad *in vivo* de las proteínas, los lípidos y la energía del polvo de insectos en camarones blancos se han determinado por un método indirecto. Trescientos camarones con un peso promedio de 5 g a 8 g se distribuyeron al azar en cada uno de los veinte acuarios. Diez repeticiones con diez camarones, cada uno alimentado con un régimen alimenticio de referencia que consiste en 25 % de harina de pescado y 5 % de harina de calamar, 63.7 % de harina de trigo, gluten y aislado de soya y lecitina de soya, 3 % de una mezcla de aceite de atún y aceite de soya, 3.3 % de premezcla de vitamina y 1 % de óxido de cromo como marcador de digestibilidad.

Se proporcionó otro régimen alimenticio a los otros 200 camarones (20 repeticiones de 10 camarones), que consiste en 30 % de polvo de insectos más 1 % de óxido crómico como marcador, 63.7 % de harina de trigo y gluten y aislado de soya y lecitina de soya, 3 % de una mezcla de aceite de atún y aceite de soya, 3.3% de premezcla de vitamina y 1 % de óxido de cromo como marcador de digestibilidad.

El período de aclimatación fue de una semana. Después de este período, los camarones se alimentaron con regímenes alimenticios modificados en exceso (4 %) tres veces al día. Dos horas después de la comida, los acuarios se limpiaron y media hora antes de la siguiente comida, las heces se recogieron durante 1 a 2 semanas.

Las muestras de cada régimen alimenticio se recolectaron al final del experimento para tener suficiente material para el análisis. Se secaron en un horno de aire caliente a 65 °C. Las muestras de alimentos y de materia fecal se analizaron para detectar lípidos y proteínas (AOAC, 2000). Se determinó el óxido crómico (Scott, 1978). El coeficiente de digestibilidad aparente (ADC) se calculó de acuerdo con los descrito por Cho et al. (1985).

- Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA%) = $100 - (\text{indicador en el régimen alimenticio en \%} / \text{indicador en las materias fecales en \%})$
- Coeficiente de digestibilidad aparente de los nutrientes (CDA Nu %) = $100 - (\text{Indicador en el régimen alimenticio en \%} \times \text{de nutrientes en las materias fecales en \%} / \text{Indicador en las materias fecales en \%} \times \text{de nutrientes en el régimen alimenticio en \%})$

Experimento 3: Eficacia del polvo de insectos en el rendimiento de crecimiento e inmunidad del camarón blanco (*Litopenaeus vanammei*)

a. Diseño de los ensayos

El experimento fue diseñado completamente aleatoriamente (CMCA) de 5 regímenes alimenticios con 4 réplicas.

Los diferentes regímenes alimenticios se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Régimen alimenticio	Descripción	Nivel de harina de pescado en el régimen alimenticio	Polvo de insectos que reemplaza las proteínas de la harina de pescado
T1	INSM reemplaza 0 % de FM	25 %	0 %
T2	INSM reemplaza 25 % de FM	18.75 %	25 % (5.15 % INSM)
T3	INSM reemplaza 50 % de FM	12.5 %	50 % (10.30 % INSM)
T4	INSM reemplaza 75 % de FM	6.25%	75 % (15.40 % INSM)
T5	INSM reemplaza 100 % de FM	0 %	100 % (20.50 % INSM)

Tabla 4: Los diferentes regímenes alimenticios

El experimento se llevó a cabo en 20 acuarios de vidrio, cada uno con una capacidad de 100 litros, incluidos 70 litros de agua salada a 15 ppt (partes por trillón). Los camarones blancos juveniles (aproximadamente 3 g a 4 g) se almacenaron a una densidad de 40 camarones/m² (10 por acuario). El polvo de insectos se mezcló en el alimento mientras que el aceite de pescado se redujo gradualmente. Los alimentos preparados de esta manera se aplicaron a los camarones 3 veces al día en una cantidad de entre 3 % y 5 % del peso corporal promedio de los camarones durante 8 semanas. Cada 2-3 días los residuos de alimentos se extrajeron y el agua se renovó al 15-20%.

Los ingredientes de los diferentes regímenes alimenticios se molieron a 150-250 micrones, se mezclaron, luego se añadió agua al 25 % antes de pasar a través del picador Hobart. Los gránulos obtenidos de esta manera se secaron en un horno de aire caliente.

Las composiciones aproximadas de los regímenes alimenticios probados, tales como humedad, proteínas, lípidos, fibras, cenizas y energía se analizaron de acuerdo con la descripción de AOAC (2000).

Esta composición química, así como de los ingredientes, se resumen en la Tabla 5 a continuación.

Materia	T1 INSM reemplaza 0 % de FM	T2 INSM reemplaza 25 % de FM	T3 INSM reemplaza 50 % de FM	T4 INSM reemplaza 75 % de FM	T5 INSM reemplaza 100 % de FM
Harina de pescado	25	18.75	12.5	6.25	0
Soya	25	25	25	25	25
Gluten de trigo	10	10	10	10	10
Polvo de	5	5	5	5	5
Harina de trigo	26.7	26.6	26.65	26.15	25.55
Polvo de insectos	0	5.15	10.3	15.4	20.5
Aceite de atún	2	2	2	2	2
Aceite de soya	1	0.85	0.75	0.65	0.55
Lecitina de	2	2	2	2	2
Lisina	0	0.1	0.2	0.3	0.4
Metionina	0	0.05	0.1	0.15	0.2
Fosfato monocálcico	0	1.2	2.2	3.3	4.5
Piedra caliza/concha de ostra	0	0	0	0.5	1

	Polimetil	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
	Premezcla de vitaminas	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
	Suma	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
5	Composición química por (AOAC, 2000)					
	Humedad (%)	9.38	8.82	8.75	9.02	9.45
	Proteínas (%)	35.30	35.66	35.73	36.39	36.37
	Lípidos (%)	7.18	7.16	7.18	7.06	7.06
	Fibra (%)	2.86	2.86	2.85	2.79	2.78
10	Ceniza (%)	8.25	8.02	7.35	6.65	6.03
	Energía (Kcal/Kg)	4470.38	4434.08	4404.79	4362.88	4318.97

Tabla 5: Composición de los regímenes alimenticios experimentales

15 b. Parámetros

Los datos necesarios para este experimento se relacionan con el rendimiento del crecimiento del camarón en condiciones de prueba. Estos incluyen:

✓ Rendimiento de crecimiento.

- El peso vivo o peso promedio de los camarones, el aumento de peso.
- La tasa de crecimiento específica (TCS: $\{(Ln \text{ peso Semana } 8) - (Ln \text{ peso Semana } 0)\} \times 100 / \text{días del período de cultivo}$)
- La tasa de conversión de alimentos (TCA: consumo de alimentos / producción de camarón)
- La supervivencia (de acuerdo con el método usual del laboratorio de investigación) / Tasa de mortalidad

✓ Estado inmune.

El estado inmune se determina al final del estudio por el recuento total de hemocitos, la actividad de fenol-oxidasa, las proteínas de la hemolinfa.

✓ Morfología de las vellosidades intestinales y de hepatopáncreas.

Al final del estudio, se ha realizado una histopatología de las vellosidades intestinales y del hepatopáncreas.

✓ Prueba de resistencia a patógenos *Vibrio parahaemolyticus*.

La resistencia de los camarones blancos del Pacífico a *Vibrio parahaemolyticus* se ha estudiado para determinar la capacidad de los camarones a resistir contra las bacterias patógenas.

Después de alimentar a los camarones con un régimen alimenticio experimental durante 8 semanas, se tomaron muestras y se inyectaron treinta camarones de cada régimen alimenticio con patógenos, es decir, la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, 4.3×10^5 UFC (unidad formadora de colonias)/mL ($4.6 \log \text{UFC/mL}$) inyectados por vía intramuscular. La mortalidad se ha registrado durante 10 días. Se ha

determinado la capacidad de reducción bacteriana.

2. Resultados de los experimentos 1, 2 y 3

Resultados del experimento 1

La palatabilidad del polvo de los insectos en el régimen de control del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se estudió al centrarse en la hora de inicio del consumo de alimentos por los camarones, el número de camarones que consumen los alimentos en 15 minutos y la cantidad de comida consumida en la comida observada. Los resultados de la capacidad de atracción del polvo de insectos se muestran en la Tabla 6 a continuación. La capacidad de atracción, en términos de cantidad de alimentos que se consumen en el área observada, la hora de inicio del consumo de alimentos y la cantidad de alimentos que consumen los camarones no son significativamente diferentes entre los diferentes regímenes alimenticios ($p > 0.05$). El consumo diario de alimentos por comida de camarones alimentados con 30 % de harina de pescado (R1) parece ser estable, mientras que los grupos de camarones alimentados con 15 % de harina de pescado con y sin polvo de insectos de *Tenebrio molitor* (R2-R5) muestran una fuerte variación en el consumo de alimentos por comida. El tiempo requerido para que los camarones comiencen a consumir alimentos y la cantidad de alimentos que consumen camarones son bastante estables después de cinco días de estudio. Estos elementos pueden significar que la comida en polvo de insectos *Tenebrio molitor* no mostró un mayor atractivo en los regímenes alimenticios del camarón blanco. Además, también destaca que la disminución de la harina de pescado en los regímenes alimenticios de camarón blanco no tiene un efecto significativo en el consumo de alimentos de camarón.

	R1 INSM 0 % - FM 30 %	R2 INSM 0 % - FM 15 %	R3 INSM 5 % - FM 10 %	R4 INSM 10 % - FM 5 %	R5 INSM 15 % - FM 0 %	Valor P	Tabla 6: Capacidad de ser apetecible de la comida a base de polvo de
Atracción							
Consumo de alimentos (g/comida)	1.32	1.25	1.18	1.12	1.19	0.340	
Hora de inicio del consumo de alimentos (segundos)	31.35	30.18	27.35	31.13	28.78	0.685	
Número de camarones que consumen los alimentos en 15 minutos	5.40	5.28	4.85	4.38	4.80	0.307	

insectos en el régimen alimenticio del camarón blanco con una tasa de inclusión del 15 % en harina de pescado

Resultados del experimento 2

La digestibilidad *in vivo* del polvo de insectos *Tenebrio molitor* en camarones blancos se determinó mediante el método indirecto de acuerdo con Cho et al. (1985). La digestibilidad aparente de los nutrientes se muestra en la tabla 7 a continuación. Los resultados indican que el polvo de insectos *Tenebrio molitor* tienen un contenido alto de proteínas, lípidos y una digestibilidad de energía de 96 % a 97 %.

Digestibilidad aparente	Polvo de insectos
Digestibilidad de las proteínas (%)	97.47 + 1.66
Digestibilidad de los lípidos (%)	97.85 + 0.36
Digestibilidad energética (%)	96.05 + 1.20

Tabla 7: Digestibilidad aparente de los nutrientes en el polvo de insectos de acuerdo con el Ejemplo 1 (media $\pm$ DE)

Resultados del experimento 3

- Efectividad del polvo de insectos en el rendimiento de los camarones blancos.

Los efectos del polvo de insectos en el rendimiento del camarón blanco (*L. vannamei*) se ha estudiado durante 8 semanas. Los resultados del rendimiento del crecimiento del camarón se presentaron en la Tabla 8, así como las figuras 1 y 2. Los resultados mostraron que, a partir de la 8ª semana en adelante, el rendimiento del crecimiento de los camarones en términos de peso final, ganancia de peso, ganancia diaria promedio y tasa de crecimiento específica fue significativamente mayor al control ($p < 0.05$). Los camarones alimentados con polvo de insectos tuvieron una mejor tasa de crecimiento que el control (dicho control tenía 25 % de harina de pescado, sin suplemento de polvo de insectos). El consumo de alimentos durante las 8 semanas, por otro lado, no fue significativamente diferente ($p > 0.05$). La tasa de supervivencia durante 8 semanas de estudio tampoco fue significativamente diferente ($p > 0.05$). La tasa de conversión de alimento fue significativamente más baja a partir de la semana 8 para T2-T5 en comparación con el régimen de control ($p < 0.05$). El índice de eficiencia proteica no es significativamente diferente ($p > 0.05$).

Como resultado, el polvo de insectos puede promover la tasa de crecimiento de los camarones en un régimen alimenticio que reduce la harina de pescado a un reemplazo del 100 % (tasa de inclusión de la harina de pescado al 25 % en el régimen alimenticio de control). La razón es la digestibilidad grande de las proteínas y lípidos del polvo de insectos.

	Rendimientos de crecimiento	Períodos	T1 INSM reemplaza 0 % de FM	T2 INSM reemplaza 25 % de FM	T3 INSM reemplaza 50 % de FM	T4 INSM reemplaza 75 % de FM	T5 INSM reemplaza 100 % de FM	Valor P
5	Producción (g/acuario)	0 semanas	24.03 ^a	22.48 ^a	24.00 ^a	24.95 ^a	21.87 ^a	0.094
		2 semanas	32.33 ^a	32.48 ^a	33.73 ^a	32.18 ^a	32.12 ^a	0.910
		4 semanas	53.28 ^a	55.10 ^a	54.75 ^a	59.62 ^a	56.13 ^a	0.493
		6 semanas	62.75 ^a	65.52 ^a	68.82 ^a	72.30 ^a	63.20 ^a	0.340
		8 semanas	63.77 ^b	72.22 ^{ab}	79.00 ^a	78.55 ^a	71.62 ^{ab}	0.025
10	Número de camarones (por acuario)	0 semanas	10	10	10	10	10	/
		2 semanas	10	10	10	10	10	/
		4 semanas	10	10	10	10	10	/
		6 semanas	10	10	10	10	10	/
		8 semanas	10	10	10	10	10	/
15	Peso final (g / individuo)	0 semanas	1.60 ^a	1.50 ^a	1.60 ^a	1.66 ^a	1.46 ^a	0.098
		2 semanas	2.21 ^a	2.22 ^a	2.29 ^a	2.17 ^a	2.17 ^a	0.831
		4 semanas	3.76 ^a	3.86 ^a	3.85 ^a	4.11 ^a	3.93 ^a	0.662
		6 semanas	4.88 ^a	5.08 ^a	5.29 ^a	5.42 ^a	4.97 ^a	0.537
		8 semanas	5.54 ^b	6.43 ^a	6.87 ^a	6.65 ^a	6.23 ^{ab}	0.030
20	Aumento de peso (g / individuo)	2 semanas	0.60 ^a	0.72 ^a	0.69 ^a	0.51 ^a	0.71 ^a	0.213
		4 semanas	2.16 ^a	2.36 ^a	2.25 ^a	2.45 ^a	2.47 ^a	0.592
		6 semanas	3.28 ^a	3.58 ^a	3.69 ^a	3.76 ^a	3.51 ^a	0.665
		8 semanas	3.94 ^b	4.93 ^a	5.27 ^a	4.99 ^a	4.77 ^a	0.021
		8 semanas	3.94 ^b	4.93 ^a	5.27 ^a	4.99 ^a	4.77 ^a	0.021
25	Aumento de peso diario (g/individuo/d)	2 semanas	0.04 ^a	0.05 ^a	0.05 ^a	0.04 ^a	0.05 ^a	0.019
		4 semanas	0.08 ^a	0.08 ^a	0.08 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.628
		6 semanas	0.08 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.08 ^a	0.672
		8 semanas	0.07 ^b	0.09 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.007
		8 semanas	0.07 ^b	0.09 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.09 ^a	0.007
30	Tasa de crecimiento específico (%/d)	2 semanas	2.29 ^a	2.81 ^a	2.56 ^a	1.88 ^a	2.82 ^a	0.087
		4 semanas	3.05 ^a	3.38 ^a	3.12 ^a	3.24 ^a	3.52 ^a	0.254
		6 semanas	2.66 ^a	2.89 ^a	2.84 ^a	2.81 ^a	2.91 ^a	0.577
		8 semanas	2.22 ^b	2.59 ^a	2.60 ^a	2.47 ^a	2.59 ^a	0.016
		8 semanas	2.22 ^b	2.59 ^a	2.60 ^a	2.47 ^a	2.59 ^a	0.016
35	Tasa de crecimiento específico (%/d)	2 semanas	2.29 ^a	2.81 ^a	2.56 ^a	1.88 ^a	2.82 ^a	0.087
		4 semanas	3.05 ^a	3.38 ^a	3.12 ^a	3.24 ^a	3.52 ^a	0.254
		6 semanas	2.66 ^a	2.89 ^a	2.84 ^a	2.81 ^a	2.91 ^a	0.577
		8 semanas	2.22 ^b	2.59 ^a	2.60 ^a	2.47 ^a	2.59 ^a	0.016
		8 semanas	2.22 ^b	2.59 ^a	2.60 ^a	2.47 ^a	2.59 ^a	0.016

	Rendimientos de crecimiento	Períodos	T1 INSM reemplaza 0 % de FM	T2 INSM reemplaza 25 % de FM	T3 INSM reemplaza 50 % de FM	T4 INSM reemplaza 75 % de FM	T5 INSM reemplaza 100 % de FM	Valor P
5	Consumo de alimentos (g/individuo)	2 semanas	0.53 ^a	0.50 ^a	0.53 ^a	0.55 ^a	0.48 ^a	0.097
		4 semanas	1.67 ^a	1.63 ^a	1.72 ^a	1.65 ^a	1.60 ^a	0.695
		6 semanas	4.04 ^a	4.04 ^a	4.07 ^a	4.15 ^a	4.14 ^a	0.977
10		8 semanas	6.17 ^a	6.40 ^a	6.26 ^a	6.46 ^a	6.27 ^a	0.975
	Consumo de alimentos diario (g/individuo/d)	2 semanas	0.04 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.03 ^a	0.068
		4 semanas	0.06 ^a	0.06 ^a	0.06 ^a	0.06 ^a	0.06 ^a	0.605
15		6 semanas	0.10 ^a	0.10 ^a	0.10 ^a	0.10 ^a	0.10 ^a	0.946
		8 semanas	0.11 ^a	0.11 ^a	0.11 ^a	0.12 ^a	0.11 ^a	0.985
20	Tasa de conversión de alimento	2 semanas	0.90 ^a	0.80 ^a	0.84 ^a	1.21 ^a	0.69 ^a	0.119
		4 semanas	0.78 ^a	0.71 ^a	0.78 ^a	0.68 ^a	0.66 ^a	0.270
		6 semanas	1.24 ^a	1.16 ^a	1.11 ^a	1.13 ^a	1.20 ^a	0.683
		8 semanas	1.59 ^a	1.32 ^b	1.20 ^b	1.30 ^b	1.32 ^b	0.052
25	Tasa de supervivencia (%)	2 semanas	97.78 ^a	97.78 ^a	97.78 ^a	98.89 ^a	98.89 ^a	0.924
		4 semanas	94.44 ^a	95.56 ^a	94.44 ^a	96.67 ^a	95.56 ^a	0.909
		6 semanas	85.56 ^a	86.67 ^a	86.67 ^a	88.89 ^a	84.44 ^a	0.719
30		8 semanas	76.67 ^a	75.56 ^a	76.67 ^a	78.89 ^a	76.67 ^a	0.896
	Relación de eficiencia proteica	10 semanas	1.80 ^a	2.13 ^a	2.33 ^a	2.12 ^a	2.06 ^a	0.106

35 Nota: Las medias con los mismos exponentes dentro de las líneas no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

Tabla 8: Rendimiento de crecimiento de los camarones blancos alimentados con un régimen alimenticio que comprende polvos de insectos en lugar de harina de pescado y comparación con el control (sin polvos de insectos).

- Inmunidad de los camarones

La inmunidad de los camarones en condiciones normales se ha estudiado durante 8 semanas de experimento. Los resultados presentados en la Tabla 9 mostraron que no hubo diferencias significativas en comparación con el control ($p > 0.05$) en el número total de hemocitos, el contenido de proteínas de la hemolinfa y la actividad de la fenol-oxidasa. Por lo tanto, el polvo de insectos puede reemplazar la harina de pescado hasta 100 % (tasa de inclusión del 25 % de la harina de pescado en la fórmula del alimento) sin efecto adverso alguno sobre la inmunidad del camarón.

La condición de resistencia después de la inyección de *Vibrio parahaemolyticus* se estudió durante 6 horas. La inmunidad de los camarones en la Tabla 9 muestra una gran actividad ($p < 0.05$) de la fenol-oxidasa en el grupo de camarones alimentados con polvo de insectos que reemplaza de 50 % a 100 % de la harina de pescado (tasa de inclusión de harina de pescado en el régimen alimenticio de 10.3 % a 20.6 %). Más particularmente, en la figura 3, existe una correlación negativa entre la presencia bacteriana y la actividad de la fenol-oxidasa. Además, existe una fuerte y negativa correlación entre la disminución bacteriana y el aumento de la inclusión del polvo de insectos en el régimen alimenticio ($p < 0.05$).

Inmunidad	Condición	T1 INSM reemplaza 0 % de FM	T2 INSM reemplaza 25 % de FM	T3 INSM reemplaza 50 % de FM	T4 INSM reemplaza 75 % de FM	T5 INSM reemplaza 100 % de FM	Valor P
Número total de hemocitos ($\times 10^6$ células/mL)	Normal	1.01 ^a	1.24 ^a	1.16 ^a	1.28 ^a	1.31 ^a	0.160
	Inyección	0.89 ^a	1.16 ^a	1.03 ^a	1.16 ^a	1.10 ^a	0.299
Contenido proteico de la hemolinfa (g/dL)	Normal	4.54 ^a	5.71 ^a	4.93 ^a	6.24 ^a	6.01 ^a	0.674
	Inyección	5.83 ^a	6.21 ^a	4.99 ^a	3.53 ^a	4.06 ^a	0.066
Actividad de fenol-oxidasa (unidad/mg de proteína)	Normal	113.24 ^a	141.70 ^a	135.43 ^a	137.93 ^a	121.98 ^a	0.961
	Inyección	29.29 ^c	30.24 ^c	66.29 ^b	74.32 ^{ab}	104.64 ^a	0.002

5	Capacidad de reducción bacteriana (o remoción) (Log UFC / mL)	Inyección	4.33 ^a	4.25 ^{ab}	4.03 ^{bc}	3.82 ^{cd}	3.72 ^d	0.001
---	--	-----------	-------------------	--------------------	--------------------	--------------------	-------------------	-------

Nota: Las medias con los mismos exponentes dentro de las líneas no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

Tabla 9: Inmunidad de los camarones blancos alimentados con polvo de insectos *Tenebrio molitor* para reemplazar la harina de pescado y comparación con el control (sin polvo de insectos)

- La mortalidad de los camarones

La mortalidad de los camarones después de la exposición a *Vibrio parahaemolyticus*, 4.3×10^5 UFC/mL, se muestra en la Tabla 10, así como en la figura 4. Los camarones alimentados con regímenes alimenticios reducidos en harina de pescado (50-100%) y suplementados con polvo de insectos de *Tenebrio molitor* (reemplazando 50-100% de harina de pescado) tenían mortalidad significativamente menor ($P < 0.05$) que el régimen alimenticio de control con 25 % de harina de pescado (T1) y el grupo de camarones alimentados con regímenes alimenticios cuya harina de pescado se redujo y se complementó con polvo de insectos (25 % de harina de pescado reemplazada). Esto puede deberse a la alta digestibilidad de los lípidos y proteínas del polvo de insectos y la posible mayor calidad de los lípidos en comparación con el aceite de soya, lo que permite que los camarones obtengan más nutrientes.

25	Día(s) después de la inyección del patógeno	T1 INSM reemplaza 0 % de FM	T2 INSM reemplaza 25 % de FM	T3 INSM reemplaza 50 % de FM	T4 INSM reemplaza 75 % de FM	T5 INSM reemplaza 100 % de FM	Valor P
	Día 1	0.00	0.00	0.00	0.00 ^{ab}	0.00	*
	Día 2	10.00 ^a	3.33 ^{ab}	0.00 ^b	6.67 ^{ab}	0.00 ^b	0.029
	Día 3	23.33 ^a	13.33 ^{ab}	3.33 ^b	13.33 ^{ab}	3.33 ^b	0.008
	Día 4	30.00 ^a	23.33 ^{ab}	6.67 ^b	13.33 ^{ab}	10.00 ^b	0.048
30	Día 5	40.00 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^b	13.33 ^{ab}	13.33 ^{ab}	0.014
	Día 6	40.00 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^b	13.33 ^{ab}	13.33 ^{ab}	0.014
	Día 7	40.00 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^c	16.67 ^{bc}	13.33 ^{bc}	0.017
	Día 8	40.00 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^c	16.67 ^{bc}	13.33 ^{bc}	0.017
	Día 9	40.00 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^c	16.67 ^{bc}	13.33 ^{bc}	0.017
35	Día 10	43.33 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^c	16.67 ^{bc}	13.33 ^{bc}	0.005
	Tasa de mortalidad (%)	43.33 ^a	30.00 ^{ab}	10.00 ^c	16.67 ^{bc}	13.33 ^{bc}	0.005

Tasa de supervivencia (%)	56.67 ^c	70.00 ^{bc}	90.00 ^a	83.33 ^{ab}	86.67 ^{ab}	0.005
---------------------------	--------------------	---------------------	--------------------	---------------------	---------------------	-------

Nota: Las medias con los mismos exponentes dentro de las líneas no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

* sin análisis estadístico, el valor es el mismo.

Tabla 10: La tasa de mortalidad acumulada después de la inyección del patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en camarones blancos alimentados con regímenes alimenticios de harina de insectos en lugar de harina de pescado y comparación con el control (sin polvo de insectos).

- Histología del hepatopáncreas y de las vellosidades intestinales de los camarones.

La histología hepatopancreática de camarones alimentados con el régimen alimenticio de control y regímenes alimenticios con polvo de insectos mostró células B y células R más grandes. Estas células producen enzimas reguladoras de nutrientes. En los regímenes alimenticios T2-T5, las células B (secretoras) y R (de reserva) crecen más allá que en el régimen de control T1. Esto significa que las células de hepatocitos que han acumulado más nutrientes pueden ser reservas de glucógeno y/o lípidos debido a la alta digestibilidad de proteínas o lípidos del polvo de insectos. La densidad y la longitud de las vellosidades intestinales fueron altas en todos los regímenes alimenticios.

3. Conclusión

El polvo de insectos, en particular *Tenebrio molitor*, puede reemplazar hasta 100 % la harina de pescado, sin efecto negativo alguno en el rendimiento del crecimiento, la salud del camarón e histología del hepatopáncreas y vellosidades intestinales en camarones pequeños (1-5 g) con un perfil nutricional equivalente entre los regímenes alimenticios que comprenden harina de pescado y/o polvo de insectos. Cuando el polvo de insectos reemplaza entre 25 % y 100 % de harina de pescado en el régimen de control del camarón durante más de 6 semanas, el camarón puede tener mejor tasa de crecimiento y una alta digestibilidad. El grupo de camarones alimentado con polvo de insectos *Tenebrio molitor* como reemplazo de la harina de pescado al 50 % o 100 %, mostró una mejor resistencia contra el patógeno *Vibrio parahaemolyticus*.