



UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**PROPIEDADES FÍSICAS, MECÁNICAS, Y
BIOENSAYO CON *Sitophilus oryzae* DE
PELÍCULAS COMESTIBLES DE ALMIDÓN
CON PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y
OMEGA-3**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por la bachiller
Sabrina Coromoto Ortiz Urquía
como requisito parcial para optar
por el título de Licenciado en
Biología.

Tutor: Dra. María Soledad Tapia

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL 2010

ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la **Br. SABRINA COROMOTO ORTIZ URQUÍA C.I. 16522472**, titulado “**PROPIEDADES FÍSICAS, MECÁNICAS Y BIOENSAYO CON *Sitophilus oryzae* DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE ALMIDÓN CON PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS Y OMEGA-3**”, para optar por el título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los seis días del mes de mayo de dos mil diez.


Dra. María Soledad Tapia (**Tutor**).


Lic. Mighay Lovera. (**Jurado**).


M.Sc. Carmen Rodríguez. (**Jurado**).



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 13/05/2010, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Ortíz U. Sabrina C.**, titular de la cédula de identidad No. 16.522.472; titulado: **“PROPIEDADES FÍSICAS, MECÁNICAS Y BIOENSAYO CON *Sitophilus oryzae* DE PELÍCULAS COMESTIBLES DE ALMIDÓN CON PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS Y ÁCIDOS GRASOS OMEGA TRES.”**; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los trece días del mes de mayo del año dos mil diez.


Dra. **Guillermina Alonso**
Presidenta del Consejo de la Escuela de Biología



GA/br.-

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Películas y coberturas comestibles	10
2.2. Almidón	16
2.3. Plátano	18
2.4. Batata	19
2.5. Yuca	20
2.6. Ácidos grasos omega-3	21
2.7. Probióticos	23
2.7.1 Bifidobacterias	26
2.8. Prebióticos	27
2.8.1. Inulina	28
2.9. Simbióticos	29
2.10. El gorgojo de arroz (<i>Sitophilus oryzae</i>)	30
2.10.1. Aspectos fisiológicos de los insectos	31
2.10.1.1. Digestión del almidón en insectos	32
2.11. Bioensayo con el gorgojo de arroz	33
III. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo general	35
3.2. Objetivos específicos	35
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Formación de películas comestibles	37
4.2. Preparación de las películas comestibles	38

4.2.1. Preparación de la solución formadora de película (SFP)	38
4.3. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones	39
4.4. Extracción y purificación del almidón	39
4.5. Procedimiento básico para la preparación de la solución formadora de película	41
4.6. Preparación de las formulaciones con ácidos grasos omega-3	42
4.7. Preparación de las formulaciones con prebióticos.	42
4.8. Preparación de las formulaciones con ingredientes probióticos.	42
4.8.1. Obtención del cultivo de <i>Bifidobacterium sp</i>	42
4.8.2. Activación de la cepa <i>Bifidobacterium lactis Bb 12</i>	43
4.9. Preparación de formulaciones “simbióticas”.	43
4.10. Obtención de las películas en placas.	44
4.11. Caracterización de las películas	44
4.12. Determinación del grosor	44
4.13. Determinación de la permeabilidad al vapor de agua	44
4.14. Solubilidad en agua y capacidad de retención de agua	45
4.15. Prueba de punción	46
4.16. Microscopia electrónica de barrido (MEB)	47
4.17. Bioensayos con el gorgojo de arroz (<i>Sitophilus oryzae</i>)	47
4.17.1. Recolección y cultivo de gorgojos	48
4.17.2. Diseño experimental para el ensayo con el gorgojo de arroz	48
4.17.3. Determinación de la supervivencia	49
4.17.4. Determinación de la variación de peso	49

4.18. Recuento de bifidobacterias en películas y en gorgojos	49
4. 19. Análisis estadístico	50
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones	51
5.2. Determinación de la película base mediante investigación de la supervivencia y variación de peso de gorgojos	51
5.3. Incorporación de lípidos en películas comestibles	56
5.4. Caracterización de películas comestibles	57
5.4.1. Determinación del grosor	57
5.4.2. Permeabilidad del vapor de agua en películas comestibles	59
5.4.3. Capacidad de retención de agua y solubilidad	61
5.4.4. Determinación de la fuerza de punción	63
5.4.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	65
5.5 Bioensayo del gorgojo de arroz	68
5.5.1. Supervivencia a dietas a base de películas de almidón de plátano con la adición de prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3	68
5.5.2. Variación de peso del gorgojo de arroz con dietas a base de películas de almidón de plátano con la adición de prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3	71
5.6. Recuento de bifidobacterias en películas y gorgojos	74
5.6.1. Bifidobacterias viables en películas comestibles	74
5.6.2. Bifidobacterias viables en películas el gorgojo de arroz	75
VI. CONCLUSIONES	77
VII. REFERENCIAS	79

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	Pág.
Tabla 1. Descripción y definiciones comunes de probióticos a lo largo de los años según compilación de Vasiljevic y col. (2008)	25
Tabla 2. Formulaciones con almidón, glicerol, ácidos grasos omega 3, inulina y bifidobacterias viables investigadas para la obtención de películas comestibles	38
Tabla 3. Formulaciones preliminares de las películas comestibles a base de almidón de yuca, almidón de plátano y almidón de batata para ser sometidas al bioensayo del gorgojo del arroz.	39
Tabla 4. Composición proximal de los almidones de plátano, yuca y batata.	41
Tabla 5 Formulaciones seleccionadas para la elaboración de películas	51
Tabla 6. Algunos parámetros físicos de películas comestibles a base de almidón de plátano con adición de ácidos grasos omega-3, pre y probióticos en su formulación.	57
Tabla 7. Determinación de la fuerza de punción en películas comestibles	64
Tabla 8. Células viables de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 en películas de almidón de plátano (P), glicerol, ácidos grasos omega-3, inulina (I) y bifidobacterias (B) y gorgojos de arroz alimentados con esas películas comestibles	74

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
Figura 1. <i>Bifidobacterium lactis Bb12</i>	27
Figura 2. Gorgojo de arroz	31
Figura 3. Supervivencia de gorgojos de arroz alimentados con películas formuladas con almidón de plátano, almidón de yuca y almidón de batata	52
Figura 4. Variación de peso de gorgojos de arroz alimentados con películas formuladas con almidón de plátano, almidón de yuca y almidón de batata	55
Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de una sección de película comestible de almidón de plátano (5%), glicerol (2%), ácidos grasos omega-3 (0,125%) y <i>Bifidobacterium lactis Bb12</i> (1%).	68
Figura 6. Supervivencia de gorgojos de arroz alimentados con películas de almidón de plátano con ingredientes prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3	69
Figura 7. Variación de peso de gorgojos de arroz alimentados con películas formuladas con almidón de plátano con ingredientes prebióticos, probióticos ácidos grasos omega-3	73

RESUMEN

En la actualidad, el uso de películas y coberturas comestibles no sólo se limita al hecho de brindar protección a los alimentos como barrera al intercambio de agua y gases, sino que se perfila como vehículo de diversos ingredientes funcionales de carácter bioactivo. El uso de modelos biológicos como el gorgojo de arroz constituye una manera fácil, rápida y económica para la evaluación *in vivo* de diversos componentes de la dieta y hacer inferencias de carácter nutricional. Es por ello, que se evaluó la viabilidad de películas comestibles elaboradas con almidones de yuca, batata y plátano con un bioensayo sencillo que utiliza el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). De los tres almidones estudiados, el de plátano fue el que mantuvo la supervivencia más elevada y además fue el único que produjo un incremento de peso, por lo cual se seleccionó como el polímero definitivo para la incorporación de ácidos grasos omega-3 (Ω -3), inulina y bifidobacterias; por ser el más adecuado para satisfacer las demandas nutricionales del mantenimiento de los insectos.

En relación a las propiedades físicas y mecánicas evaluadas, la adición de Ω -3 produjo un aumento en el grosor, la capacidad de retención de agua y flexibilidad de las películas comestibles de almidón de plátano; mientras que la incorporación de inulina y bifidobacterias influyó disminuyendo la capacidad de retención de agua; pero incrementando la permeabilidad al vapor de agua, grosor, solubilidad en agua y fuerza de punción. Por último, se puede mencionar que los resultados de esta investigación indican que las películas de almidón de plátano sirven como un medio de transferencia de bifidobacterias para el gorgojo de arroz, pues se encontraron bifidobacterias viables en el insecto.

I. INTRODUCCIÓN

Aunque el concepto de alimentos funcionales fue introducido hace mucho tiempo por Hipócrates y su lema: “dejad que el alimento sea tu medicina”, sólo recientemente, una gran cantidad de evidencias científicas comenzaron a apoyar la hipótesis de que la dieta puede jugar un papel importante en la modulación de funciones fisiológicas en el organismo. Entre los compuestos nutricionales reconocidos hasta el momento, ciertamente, los componentes de los alimentos fermentados y prebióticos toman el centro de atención debido a su larga tradición de uso seguro (Vasiljevic y col., 2008).

El aumento en la expectativa de vida de los individuos y el deseo de mejorar la calidad y propiedades de los alimentos son factores que intervienen en la investigación y el desarrollo de alimentos funcionales. Es por ello que la adición de vitaminas, minerales y otros compuestos benéficos en los alimentos son objeto de estudio con el fin de lograr, no sólo un alimento atractivo al consumidor a nivel sensorial, sino también nutritivo y que adicionalmente confiera beneficios potenciales para la salud, contribuyendo a la reducción del riesgo de ciertas enfermedades (Tapia y Carmona, 2008).

Encontrar el vehículo adecuado para la incorporación o transferencia de compuestos funcionales y bioactivos es un paso de suma importancia en la elaboración del producto final. Es por ello que se han investigado muchas alternativas como son el uso de películas y coberturas comestibles, impregnación a vacío, enriquecimiento directo, etc. (Alzamora y col., 2005; Tapia y Carmona, 2008).

Así mismo, es de vital importancia corroborar la asimilación de los compuestos funcionales que formarán parte del alimento, ya que de ello depende el efecto que pueden causar en el organismo del consumidor, lo que lleva a la búsqueda de nuevas formas de evaluar estas relaciones, los mecanismos de transferencia que ocurren y sus potencialidades (Curtis y col, 2008). Una de las herramientas más importantes para evaluar la eficacia de utilización de los nutrientes son los “biomarcadores” (Carmona y col, 1999).

En las últimas décadas del siglo XX se ha enfatizado el desarrollo de diferentes modelos animales para estudiar problemas biológicos. En el campo nutricional destaca el uso de ratas, ratones y pollos (Pellet, 1973, Millán y col. 1984). En un esfuerzo por encontrar reemplazo a los animales utilizados tradicionalmente, se encuentra el uso de insectos como el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*), el cual constituye una nueva alternativa. El empleo de este bioensayo tiene como ventajas la corta duración y el menor costo de los experimentos, debido a la poca cantidad de alimento requerida y las pequeñas poblaciones con las que se trabaja (entre 30 y 40 individuos) (Carmona y col., 1998).

En el presente trabajo se ha planteado una alternativa para la incorporación de compuestos funcionales en películas comestibles de almidón. Estas películas son evaluadas mediante el estudio tradicional de sus propiedades mecánicas y se incorpora además, la realización de un bioensayo utilizando como modelo animal el gorgojo de arroz, a fin de estudiar el impacto nutricional, tanto de las películas comestibles como de los compuestos funcionales incorporados: aceite omega-3, inulina (prebiótico) y bifidobacterias (probiótico). Esto implica además, dar

continuidad al trabajo realizados por Rojas (2008) en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) y de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, del Instituto de Biología Experimental (IBE).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Películas y coberturas comestibles

La utilización de películas se remonta a muchos años atrás. Las cubiertas de cera sobre frutas han sido usadas en China desde el siglo XII para mejorar la calidad de las frutas y su preservación (Gontard y col., 1996). En el siglo XIX la sacarosa fue inicialmente aplicada como una cubierta comestible protectora sobre nueces, almendras y avellanas para prevenir la oxidación y rancidez durante su almacenamiento (Debeaufort y col., 1998).

Numerosos trabajos se han realizado desde los años 1930 en el campo de coberturas. En un principio, frutas y vegetales como manzanas, peras, mangos, durazno, guayaba, tomates, papas, zanahorias y algunas otras, se convirtieron en el principal objeto de estudio. Fueron cubiertas con soluciones cuyos componentes principales era la cera (especialmente carnaúba) y la parafina, adicionando compuestos como el ácido oleico y emulsificantes. Como principales beneficios se obtuvo la disminución de la pérdida de agua, un incremento en el tiempo de vida útil, una apariencia más atractiva, reducción de la tasa de respiración y retención de la vitamina C. Más tarde, alrededor de los años 1950, se desarrollaron coberturas a base de polisacáridos, principalmente para nueces, frutas y almendras (Krochta y col., 1994). Hacia finales del año 1960 y principio de 1970, se comenzó el uso de polímeros sintéticos y derivados de polímeros naturales para coberturas comestibles en frutas y vegetales. Entre los polímeros utilizados se encuentran: lecitina hidrolizada, látex orgánico, copolímeros, etc. (Krochta y col, 1994)

Las películas generalmente son definidas como delgadas capas de materiales de poliméricos que pueden ser consumidas y que proveen una barrera al transporte de masa a través de alimentos frescos o manufacturados (Martín-Polo y col., 1992; Han, 2005). Se habla de películas, cuando el material polimérico se vierte y deja solidificar en una delgada capa y se estudia separado del sistema que va a recubrir. De esa manera, se pueden investigar sus propiedades de manera aislada, las cuales se podrían extrapolar al caso cuando se encuentren recubriendo una matriz alimentaria.

En lo que respecta a las coberturas, Carrasco y colaboradores (2002) las definen como capas delgadas de un material biopolímero (proteína o polisacárido como una solución hidocoloide, o como una emulsión con lípidos), que son aplicadas sobre la superficie de un alimento en adición o reemplazo de la corteza natural, comportandose principalmente como barreras que reducen la difusión de gases (O₂, CO₂, vapor de agua), permitiendo de esta forma extender la vida útil del alimento.

Para la formación de cubiertas y películas se necesita un componente capaz de formar una matriz estructural con suficiente cohesión (Debeaufort y col., 1998).

En el campo de formación de películas utilizando carbohidratos como base, se encuentran gelano, alginato, almidón de maíz, almidón de papa, maltodextrina, y metilcelulosa (Lee y col., 2004; Rhim, 2004; García y col., 2000; Rojas 2007; Díaz- Sobac y col., 2001; Turhan y col., 2001), sólo por mencionar algunos.

Los estudios que se han realizado utilizando almidón como base para fabricar películas comestibles, incluyen diversas fuentes como maíz, ñame, papa, mapuey, okenia y plátano, gluten de trigo y proteína de soya (García y col., 2000; Mali y col., 2004; Rojas, 2007; Segovia, 2010; Romero-Bastidas, 2005), entre otras.

Las películas y coberturas pueden transportar compuestos activos, como emulsificantes, antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes y colorantes a fin de mejorar la calidad de los alimentos, aunque estos aditivos interfieren en las propiedades físicas y mecánicas de las películas (Kester y Fennema, 1986; Baldwin y col., 1995; 1997; Guilbert y col., 1996; Howard y González, 2001; Han 2002, 2003). Los emulsificantes son esenciales para la formación de muchas películas y coberturas a base de polisacáridos y proteínas que contienen partículas de lípidos (Krochta, 2002). Los agentes antioxidantes y antimicrobianos pueden ser incorporados en la solución formadora de película para desarrollar coberturas o empaques activos (Han, 2002, 2003). Estos proveen una función adicional al sistema al proteger los productos alimenticios de la oxidación y deterioro microbiano, mejorando la calidad y seguridad del producto.

Se pueden añadir plastificantes u otros aditivos para modificar las propiedades físicas y/o funcionales de las películas y/o coberturas. El mecanismo de formación del biopolímero incluye fuerzas intermoleculares como enlaces covalentes y/o interacciones electrostáticas, hidrofóbicas e iónicas (Han, 2005).

Los plastificantes son elementos indispensables en la formulación de películas y coberturas. Son moléculas de bajo peso molecular incorporados a los materiales que forman la película. Estos son capaces de ubicarse entre las moléculas poliméricas e interferir en la interacción polímero-polímero, incrementando la flexibilidad (Guillbert Gontard., 1996). La mayoría son muy hidrofílicos e higroscópicos, así que pueden reaccionar con moléculas de agua y formar un gran complejo hidrodinámico plastificante-agua. Los plastificantes mejoran la flexibilidad y manejabilidad al incrementar el volumen libre y el espacio intermolecular. Sin embargo, su uso presenta algunas desventajas, ya que afectan la habilidad del sistema para atraer el agua y generalmente aumentan la permeabilidad al oxígeno (McHugh y Krochta, 1994; Sothornvit y Krochta, 2000).

Otro de los componentes que se encuentran presente de manera frecuente en la formulación de películas comestibles son los lípidos. Debido a su relativa baja polaridad, la principal función de las coberturas de lípidos es bloquear el transporte de humedad (Kester y Fennema, 1986). Los ácidos grasos y alcoholes como formadores de película carecen de integridad estructural en su forma libre. Como resultado, estos requieren de una matriz estructural tal como un polisacárido o una proteína. La permeabilidad al vapor de agua de las películas con lípidos es mayor a medida que se incrementa su polaridad, el número de insaturaciones y ramificaciones o cuando el agua es absorbida en la porción polar de la película (Baldwin y col., 1995).

En cuanto a los lípidos utilizados para la elaboración de películas están: el ácido esteárico, ácido palmítico, aceite de girasol, aceite de canola (Yang y Paulson, 2000; García y col., 2000; Melián, 2006), por mencionar algunos.

Las películas y coberturas comestibles incrementan la calidad de los alimentos, protegiéndolos del deterioro físico, químico y bacteriológico (Kester y Fennema, 1986). Su aplicación puede mejorar la resistencia física, reducir el agrupamiento de las partículas y mejorar las características visuales y táctiles de la superficie de los productos (Cuq y col., 1995; Cisneros-Zevallos y col., 1997, citado por Han, 2005). También pueden proteger los alimentos de la migración de la humedad, el crecimiento microbiológico en la superficie, oxidación de nutrientes, etc. (Kester y Fennema, 1986), lo cual resulta en una prolongación de la vida útil del alimento. Principalmente, las películas y coberturas funcionan como barreras en contra de aceites, gases o vapores y además, como se mencionó anteriormente sirven de vehículo para el transporte sustancias activas, como antioxidantes, antimicrobianos, colores y sabores (Han, 2005).

Kester y Fennema (1986) mencionan cuáles deben ser las propiedades funcionales potenciales de los revestimientos y películas comestibles, destacándose entre ellas: retardar la migración de humedad, retardar el transporte de gases (O_2 , CO_2 y etileno) y componentes volátiles que contribuyen con el flavor, retardar el transporte de solutos, mejorar las propiedades mecánicas y de manejo del alimento; además de darle una mayor integridad a la estructura del alimento y servir de vehículo de aditivos en los alimentos.

Las propiedades mecánicas de las películas y por ende, de las coberturas comestibles, dependen en gran medida del tipo de material empleado en su elaboración y especialmente de su grado de cohesión, es decir, de la habilidad del polímero para formar puentes moleculares numerosos y estables entre cadenas poliméricas, los cuales impiden su separación (Guilbert y Biquet, 1996). Las propiedades de las coberturas dependen en gran medida de la composición y estructura de los ingredientes. Por lo tanto, la elección de las sustancias a emplear y/o aditivos activos a añadir están totalmente relacionadas con la función para la cual se desea utilizar la cobertura comestible, la naturaleza del alimento y el método de aplicación (Debeaufort y col., 1998). El grado de cohesión gobierna las propiedades de barrera y las propiedades mecánicas de las coberturas. Una alta capacidad de adhesión asegura una durabilidad larga del recubrimiento en la superficie del alimento a ser recubierto.

Debido a que las películas y coberturas comestibles aparte de poder ser una especie de empaque, también son un componente del alimento, por lo que deben poseer buena dureza mecánica y capacidad de adhesión. Una película o cubierta comestible con unas buenas propiedades de barrera podrían resultar ineficientes si sus propiedades mecánicas no permiten mantener la integridad de la película durante su manipulación, empaclado y proceso de transporte.

Las propiedades mecánicas y de barrera en películas y coberturas comestibles generalmente son evaluadas a través de pruebas de grosor, permeabilidad del vapor de agua, solubilidad en agua, capacidad de retención de agua, microscopía electrónica de barrido, prueba de punción, fuerza de tensión, porcentaje de

elongación y biodegradación entre otras (Tapia y col., 2008; Romero-Bastidas y col., 2005; Pareta y Edrisinghe, 2006; Yang y Paulson, 2000).

2.2. Almidón

El almidón es fuente de energía para muchos organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Ya que está presente en muchas de las plantas comestibles, este polisacárido también es importante en la dieta humana (Tovar y col., 1999). Uno de los materiales poliméricos más utilizados para la elaboración de coberturas y películas comestibles es el almidón. El almidón se almacena como gránulos discretos semi-cristalinos en las plantas superiores (Li y col., 2004). Consiste de dos componentes principales: la amilosa, una molécula compuesta de unidades de glucosa enlazadas por α 1 \rightarrow 4 esencialmente lineal con pocas ramificaciones (Slattery y col., 2000; Thitipraphunkul y col., 2003), representando entre 15-65% y la amilopectina, formada por unidades de α 1 \rightarrow 4 glucopiranososa con ramificaciones de α 1 \rightarrow 6 a intervalos aproximados de 20 unidades de anhidroglucosa. La proporción de amilosa y amilopectina depende del origen del almidón y la posición exacta de la amilosa dentro del gránulo no está dilucidada (Li y col., 2004; Mali y col., 2006; Marques y col., 2006; Buleón y col., 1998). La preponderancia de amilosa en los almidones permite la formación de geles fuertes y la estructura ramificada de la amilopectina generalmente le imparte al gel diferentes propiedades mecánicas (Mali y col., 2006)

Tanto los almidones nativos como los almidones modificados por métodos químicos, físicos o enzimáticos tienen un número enorme de aplicaciones en los alimentos, entre las cuales se incluyen las siguientes: adhesivo, ligante,

enturbiantes, formador de películas, estabilizante de espumas, agente anti-envejecimiento del pan, gelificante, glaseante, humectante, estabilizante, texturizante y espesante (García y col, 2000; Laurentin y Edwards, 2000; Romero-Bastidas y col, 2005).

Las coberturas y películas a base de almidón pueden ser utilizadas en distintos productos alimenticios debido a que son incoloras, inoloras, no tóxicas, sin sabor y biodegradables (Pareta y col, 2005). También poseen una baja permeabilidad al oxígeno, lo cual disminuye la tasa de oxidación en los productos (Forsell y col, 2002). Otra ventaja de la utilización del almidón como base para la elaboración de coberturas y películas es que son económicas y de fácil obtención, además que pueden ser modificados químicamente. Igualmente, durante la elaboración de películas y coberturas con almidones generalmente se adiciona glicerol como agente plastificante. Los plastificantes disminuyen las interacciones entre las cadenas de polímeros adyacentes incrementando la flexibilidad de la película, pero esto causa cambios significativos en las propiedades de barrera de la película (García, 2000; Laohakunjit y col, 2004).

Las coberturas y películas a base de almidón son hidrofílicas (Forsell y col, 2002). Esta característica las hace idóneas para ser utilizadas en productos vegetales frescos, ya que permite el movimiento del vapor de agua, evitando así la condensación de la misma, que podría ser fuente potencial para el crecimiento de microorganismos (García y col, 1998).

2.3. Plátano

El plátano tiene su origen en Asia meridional, siendo conocida en el Mediterráneo desde el año 650, crece extensamente en las zonas tropicales húmedas y es un alimento común para mucha gente en países en vías de desarrollo, así como fruta popular en todo el mundo. Los distintos cultivares del plátano se consumen en la etapa verde o mitad-madura como vehículo almidonado, cocinado o maduro como fruta (Englberg y col., 2006). El banano pertenece al género *Musa* de la familia *Musaceae* y la mayor parte de las variedades existentes (diploide, triploide, tetraploide) descienden de dos antepasados, *M. acuminata* y *M. balbisiana* (Salunke, 1984).

El banano es una planta herbácea perenne gigante, con rizoma corto y tallo aparente, que resulta de la unión de las vainas foliares, cónico y de 3,5-7,5 m de altura, terminando en una corona de hojas muy grandes y dispuestas en forma de espiral, de 2-4 m de largo y hasta de medio metro de ancho. Los plátanos son polimórficos, pudiendo contener de 5-20 manos, cada una con 2-20 frutos; siendo de color amarillo verdoso, amarillo, amarillo-rojizo o rojo. Las cimas se insertan en formas de espiral sobre el tallo floral, esta se compone de una espata y filas de flores simples o dobles en sus axilas, las primeras filas flores de la planta es hermafrodita, se le llama manos y son las responsable del desarrollo de los racimos, la primera parte de las manos, contiene las flores con un ovario en la posición inferior y estambres no funcionales reducidos denominados estaminodios (Bakry y col., 2008). El plátano representa uno de los principales productos alimenticios tropicales a nivel mundial. El cultivo de las musáceas comestibles en América Latina representa una importancia especial y esto se debe a que no sólo

forman parte de la dieta de los habitantes, por su alto contenido de carbohidratos, sino también por los beneficios económicos derivados de esta actividad que genera fuentes de trabajo (Vuylsteke y Col., 1999).

2.4. Batata

El sitio exacto de origen de este tubérculo es incierto, sin embargo, existen evidencias arqueológicas y genéticas que han permitido inferir que es de origen americano, de un lugar ubicado entre México y Perú (Ramón-Avalos y col., 2008; González, 1992). Su nombre común varía dependiendo del país donde es cultivada; en este sentido Montaldo (1992) y Pérez (2007) señalan que es conocido como camote (Perú, Ecuador), moniato (Cuba), batata (Venezuela, Argentina y Puerto Rico) y “sweet potato” (Estados Unidos). Su nombre científico es *Ipomoea batatas* y su clasificación botánica según Amayo y col. (2008) es la siguiente:

Reino: **Viridiplantae**

División: **Magnoliophita**

Subdivisión: **Angiospermae**

Clase: **Magnoliópsida**

Orden: **Solanales**

Familia: **Convolvulácea**

Genero: **Ipomoea**

Especie: ***Ipomoea batatas* (L) Lam.**

Cabe mencionar que la mayoría de los autores señalan simplemente que la batata es una raíz, si bien es cierto cabe hacer la observación que esta es un órgano de la

planta que ha experimentado modificaciones, tales como acortamiento, engrosamiento y que se caracteriza por contener grandes cantidades de material nutritivo y, por lo tanto, es más adecuado, desde el punto de vista botánico llamarlo tubérculo y como se origina de las modificaciones antes mencionada es un tubérculos de origen radical (Lindorf y col., 1999)

2.5. Yuca

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un importante cultivo que crece en las regiones tropicales. Ocupa el cuarto lugar después del arroz, el trigo y el maíz como fuente de carbohidratos complejos (Moorthy y Mathew, 1998). La yuca ha sido el principal recurso alimenticio, no sólo de la Amazonia, sino de los diversos grupos étnicos de los llanos venezolanos y colombianos desde el segundo milenio antes de Cristo (Moltado y col., 1996). De hecho, a la llegada de los conquistadores españoles a estas tierras, ya los aborígenes preparaban numerosos platillos y bebidas a base de esta raíz (González y Pérez, 2003).

El almidón es el principal componente de la yuca, comprende aproximadamente del 73,7 al 84,9% del peso seco de la raíz. (Rickard y col., 1991). Se extrae fácilmente de sus raíces debido a que contienen bajos niveles de proteínas y grasas. El almidón de yuca es de color blanco puro (Ceballos y col., 2007), contiene entre 16 a 17% de amilosa y 83-84% de amilopectina (Gregorová y col., 2006), 40 % de cristalinidad, buena claridad de pasta, baja temperatura de gelatinización y buena estabilidad del gel, siendo una importante fuente de almidón en algunas partes del mundo, como lo es en Brasil, con una elevada producción de este rubro (Mali y col, 2006).

2.6. Ácidos grasos omega-3

Los ácidos grasos que son sintetizados por el cuerpo humano, se conocen como ácidos grasos no esenciales, debido a que no deben incorporarse en la dieta diaria. Debido a que el organismo no puede producir todo tipo de ácidos grasos, se requiere que algunos provengan de la dieta diaria. Estos son los llamados ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6 (Moyad, 2005).

Estos son una serie de compuestos vitales para el organismo como son el ácido araquidónico o AA y los ácidos eicosapentaenoico o EPA y docosahexanoico o DHA. El AA da origen a prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, asociados a procesos inflamatorios, alérgicos, formación de trombos y vasoconstricción. Mientras que el EPA es precursor a su vez de prostanoides y leucotrienos de efecto opuesto a los derivados del AA.

Las fuentes de ácidos grasos omega-3 pueden ser vegetales (lino, soja, canola y semillas de frutos secos como las nueces) o animales (especialmente pescados de agua fría como el atún, salmón o bacalao). En los primeros, encontramos omega-3 principalmente bajo forma de ALA mientras que los aceites de pescado son ricos en EPA y DHA. Esto diferencia a las fuentes de omega-3 disponibles: en el organismo la conversión de ALA a EPA y DHA no es el único proceso metabólico en el que participa este precursor y en consecuencia no todo el aporte dietario de ALA redundará en los ácidos grasos de cadenas más largas. Por esta razón, aquellos alimentos que aporten directamente EPA y DHA ofrecerán una ventaja frente a los que sólo aporte ALA como fuente de omega-3 ya que estarán aportando AGE con disponibilidad inmediata. Esto explica que, a la hora de

suministrar EPA y DHA en la dieta, se recurra a aceites de pescados y organismos marinos frente a vegetales que pueden estar aportando omega-3 pero en forma de ALA (Acuña, 2007). Estos ácidos han sido considerados como una molestia en alimentos ya que tiende a deteriorarlos por oxidarse fácilmente. Sin embargo, se le atribuyen muchos beneficios a su consumo. Las primeras claves sobre la importancia de los omega-3 fueron aportadas por los trabajos realizados sobre poblaciones esquimales y japoneses (Simopoulos, 2002) en las que la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares y autoinmunes se asociaba con una ingesta alta de alimentos de origen marino ricos en ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Estudios posteriores revelaron los efectos beneficiosos de los ácidos grasos esenciales en enfermedades coronarias, hipertensión, artritis y enfermedades autoinmunes, diabetes, cáncer y asma. Las propiedades inmunomoduladoras y anticancerígenas de los omega-3 se asociarían a una serie de mecanismos: inhibición de la síntesis de derivados del AA (prostaglandinas y tromboxanos, mediadores de la inflamación), inhibición de la liberación de citoquinas y mediadores, efecto antioxidante a nivel de membranas celulares que, sumado a la mejora de la fluidez de las membranas celulares, evitaría la oxidación y liberación de enzimas precursoras de ciertos cánceres (Larsson et al., 2004).

Una buena ingesta de omega-3 ($\Omega-3$) ejerce un papel importante en el embarazo, y es esencial para el propio desarrollo de las funciones de los ojos y el cerebro de los infantes. Además, se ha demostrado la disminución de enfermedades coronarias y otras enfermedades cardiovasculares, incluyendo muertes repentinas por ataques al corazón (Lee, 2005). La tendencia al consumo de alimentos que contengan $\Omega-3$ se encuentra estática o en decadencia, aunque hay una gran

cantidad de personas que se beneficiarían del consumo de $\Omega-3$ en su dieta (Lee, 2005). Sin embargo, existe en el mercado una serie de productos como leche y aceites vegetales con ácidos grasos $\Omega-3$. En consecuencia, sería beneficioso aumentar el número de alimentos funcionales que contengan cantidades fisiológicamente considerables de $\Omega-3$ (Lee, 2005).

El potencial comercial de los alimentos funcionales que contienen $\Omega-3$ aparentemente se considera muy alto en relación con otros compuestos bioactivos alimenticios (Lee, 2005). Investigaciones anteriores han demostrado que existe una gran oportunidad para incorporar $\Omega-3$ en varios sistemas alimenticios (Lee, 2005).

2.7. Probióticos

Existe evidencia cada vez más creciente de que los alimentos funcionales tienen efectos beneficiosos en el organismo, que van más allá de los nutricionales habituales, con efectos positivos sobre el estado de bienestar y la salud o la reducción del riesgo de enfermedad (Tojo y col., 2003). Dentro de los alimentos funcionales han adquirido un papel relevante los probióticos y prebióticos como ingredientes que ejercen funciones importantes en la prevención y tratamiento de enfermedades, regulación del metabolismo y calidad de vida de niños y adolescentes. Los probióticos son definidos según la FAO (2001), como microorganismos vivos, que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedador. Los componentes activos más comunes de los probióticos son las bacterias ácido lácticas, incluyendo bifidobacterias, lactobacilos y enterococos (Holzapfel y Schillinger, 2002). El concepto de

prebiótico ha cambiado a lo largo del tiempo, como se describe en la siguiente

Tabla 1.

Tabla 1. Descripción y definiciones comunes de probióticos a lo largo de los años según compilación de Vasiljevic y col. (2008)

Año	Descripción	Fuente
1953	Los prebióticos son comunes en vegetales, como las vitaminas, sustancias aromáticas, y otras conectadas a procesos vitales.	Kollath*
1954	Prebióticos son lo opuesto a antibiótico.	Vergin*
1955	Efectos deletereos de los antibióticos pueden ser prevenidos con prebióticos.	Kolb*
1965	Una sustancia secretada por un microorganismo que estimula el crecimiento de otros.	Lilly y Stillwell*
1971	Extracto que estimula el crecimiento microbiano.	Sperti*
1973	Compuesto que crea resistencia a infecciones en el hospedador, pero no inhibe el crecimiento de microorganismos in Vitro	Fujii y Cook*
1974	Organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiológico intestinal.	Parker*
1992	Suplemento alimenticio de microorganismos vivos que beneficia a su hospedador mejorando su balance microbiológico.	Fuller*
1996	Cultivo viable de microorganismos vivos, que aplicados a animales o hombres tienen un efecto benéfico en el hospedador, mejorando las propiedades de la microflora intestinal	Hevenaar y Huisint'veld*
1996	Microorganismos vivos cuya ingestión en cierto número, brindan beneficios a la salud, más allá de la nutrición básica.	Salminen*
1999	Preparación de células microbianas o componentes de células microbiana que tienen efecto benéfico en la salud del hospedador	Schaafsma*
2001	Una preparación o producto que contiene microorganismos viables en número suficiente que modifica la microflora y brinda beneficios a la salud del hospedador	Salmine, Ouwehand, Benno y Lee*
2002	Microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedador	FAO

*citado por Vasiljevic y col. 2008

Entre los beneficios producidos por los probióticos que señalan Holzapfel y Schillinger (2002), se tienen: disponibilidad de vitaminas y minerales, producción de enzimas importantes digestivas, estimulación del sistema inmune, disminución del colesterol, mantenimiento de la mucosa, resistencia a la colonización y adherencia. Hasta hace muy poco no existían reportes en la literatura relativos a la adición de probióticos con el objeto de diseñar películas y coberturas comestibles funcionales. Tapia (2007) demostró la factibilidad de utilizar coberturas comestibles sobre frutas frescas cortadas, realizadas a base de gelano y alginato como vehículo y soporte de probióticos viables.

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, que además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El uso de probióticos constituye un intento deliberado de modificar la relación con nuestro medio ambiente microbiano inmediato, de forma que beneficie la salud humana. En los últimos años, se han estudiado varias bacterias no patógenas que sobreviven a la digestión ácida y biliar. Entre los agentes que se usan comúnmente están las bifidobacterias y los lactobacilos. Las bifidobacterias son de especial interés, ya que constituyen las bacterias más numerosas en la flora de los bebés lactantes y posiblemente tienen una función en la protección contra patógenos intestinales. Estos agentes probióticos se proponen ahora como un enfoque práctico en el manejo de varias condiciones gastrointestinales y sistémicas incluyendo la intolerancia a la lactosa, enfermedades diarreicas, alergias y prevención de cáncer, entre otros,

(Klaenhammer, 2000). Una población viable de bifidobacterias de 5 ciclos log UFC/g en el producto final ha sido señalada como el mínimo terapéutico para obtener los beneficios mencionados (Naidu y col., 1999).

2.7.1 Bifidobacterias

Las bifidobacterias (**Figura 1**) o bífidos constituyen una parte importante de la flora natural de los animales de sangre caliente (Mitsouka, 1984). Estas bacterias pertenecen a la familia Actinomyceteceae y se caracterizan por ser bacilos Gram-positivos, inmóviles, no esporulados, anaerobios estrictos, catalasa negativo, cuyos extremos por lo general muestran protuberancias y pueden o no tener una o más ramificaciones (Salminen, 1993). Las bifidobacterias generalmente son mucho más resistentes a pH bajos que otras bacterias. Debido a estas y muchas otras cualidades, no es sorpresa que las bifidobacterias se hayan propuesto para el uso como agentes del biocontrol en alimentos sin fermentar, incluyendo productos de la fruta y vegetales con un mínimo proceso y refrigeración (Holzapfel y col., 1998; Breidt, 1997).

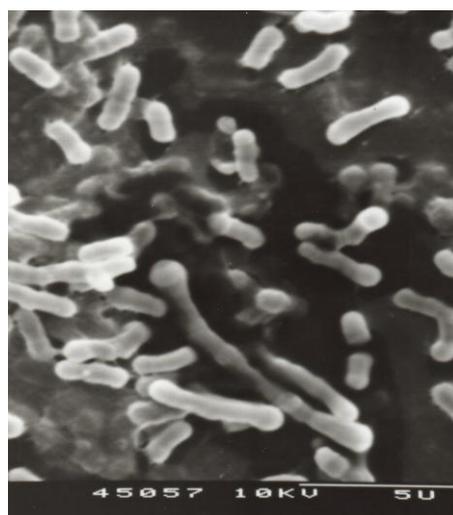


Figura 1. *Bifidobacterium lactis Bb12* (Maguiña, 2001)

Bifidobacterium sp. posee ciertas características peculiares necesarias para su óptimo crecimiento, las cuales restringen a ciertos medios con diferentes componentes y que han sido modificados ligeramente para la enumeración de las bifidobacterias. Los medios de cultivo para bifidobacterias se caracterizan por contener sustancias que disminuyen el potencial redox (por ejemplo, cisteína, ácido ascórbico ó sulfito de sodio), antibióticos, una fuente de carbono, agentes selectivos que inhiban el crecimiento de otras bacterias, y frecuentemente se fortifican con sangre de caballo o sangre de oveja. Las condiciones de incubación son generalmente en anaerobiosis a 37-41°C, por un tiempo mayor a 48 horas (Charteries y col, 1997).

2.8. Prebióticos

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles, fundamentalmente carbohidratos, y en menor medida proteínas, cuya fermentación bacteriana en el colon favorece el crecimiento selectivo y /o actividad de un número limitado de bacterias. La inulina y la oligofructosa tienen un efecto prebiótico, estimulando selectivamente el crecimiento de bifidobacterias en la flora colónica (Tojo, 2003).

Para que un sustrato sea considerado prebiótico debe cumplir con las siguientes condiciones: no debe ser hidrolizado ni absorbido en el estómago ni en el intestino delgado, es decir, no ser hidrolizado por la amilasa salival, el ácido clorhídrico del estómago o la amilasa pancreática; debe estimular el crecimiento de las bacterias comensales en forma selectiva y debe alterar la microflora hacia una composición más saludable e inducir efectos benéficos en el huésped, tanto a nivel luminal como sistémico (Gibson y col., 1995; Bengmarck, 1998; Martí del Moral, 2002).

El consumo de prebióticos reduce el riesgo de contraer determinadas enfermedades, incluyendo: supresión de diarreas asociadas a infecciones intestinales, reducción del riesgo de osteoporosis; pues la inulina favorece la fijación del calcio, aumentando la masa ósea; reducción del riesgo de obesidad y de contraer diabetes tipo 2; disminución de la frecuencia de cáncer de colon. La ingestión de prebióticos es causa de la formación de ácidos orgánicos de cadena corta en el colon, debido a la fermentación de los mismos y esto ocasiona el descenso del pH en la luz intestinal lo que aumenta la ionización de elementos como el calcio y el magnesio, facilitando su absorción por difusión pasiva. Otro efecto de los prebióticos (oligofructanos derivados de la inulina), es la reducción de los niveles de triglicéridos, colesterol y lipoproteínas en suero. La hipotrigliceremia es debida al descenso en plasma de lipoproteínas VLDL, debido a su vez a que los oligofructosidos inhiben la capacidad de esterificación del palmitato hacia triacilgliceroles (Marquina y Santos, 2001).

2.8.1. Inulina

La inulina y los fructooligosacáridos están ampliamente difundidos en el reino vegetal y son usados por la industria alimentaria por sus propiedades tecnológicas y nutricionales (como sustituyentes de grasas o de azúcar, y como fibra dietética) (Martí del Moral y col., 2002). La principal fuente industrial de estos compuestos es la achicoria, cuya raíz es procesada en muchos países del mundo. Tanto la inulina como los fructooligosacáridos son procesados en la industria alimentaria y transformados en fructanos (fructooligosacáridos, FOS) de cadena corta con un grado de polimerización entre 2 y 10 (usualmente 5) como resultado de la hidrólisis enzimática parcial por la inulinasa (Santos y col., 2005). La inulina tiene

la característica y la ventaja adicional de que al ser mezclada y batida con agua da lugar a la formación de una masa con características visuales, gustativas y táctiles similares a las de los triglicéridos, pero con un rendimiento energético por gramo mucho menor (5,0 –7,5 kJ/g ó 1,2 –1,8 kcal/g para el prebiótico versus 38 kJ/g ó 9 kcal/g para los triglicéridos); como resultado, esta mezcla de inulina y agua está siendo utilizada en la preparación de alimentos con bajo contenido de energía y de grasa (Brunser, 2005).

2.9. Simbióticos

Otra manera en la que pueden ser suministrados los prebióticos y probióticos es un producto con la combinación de ambos, lo cual se refiere a veces como efecto simbiótico (Holzapfel y col., 2002). La implantación de los prebióticos en el tracto intestinal puede ofrecer ventajas en la supervivencia de los probióticos, ya que su sustrato específico está disponible desde el momento de la ingestión (Tojo y col., 2003). Aún está poco estudiada esta combinación, que podría aumentar la supervivencia de las bacterias en su fase de tránsito intestinal y, por tanto, aumentaría su potencialidad para desarrollar su función en el colon. Se ha descrito un efecto sinérgico entre ambos, es decir, los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud (Roberfroid, 2001). La composición de la flora intestinal puede ser modificada por la ingesta de alimentos suplementados con prebióticos, probióticos o ambos (simbióticos) (Cagigas, 2002).

2.10. El gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*)

El gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) es un insecto de gran interés en el contexto de este trabajo por su utilización en un bioensayo para predecir posibles propiedades nutricionales de los compuestos que le son suministrados en la dieta. Pertenece al orden Coleoptera y a la familia Curculionidae. En su aspecto externo (**Figura 2**) presenta, la cabeza proyectada en forma de trompa y antenas acodadas en forma de maza. Un protórax densamente cubierto de depresiones circulares: presenta alas y vuela con gran facilidad. El adulto mide de 2,5 a 3,5 mm y el color varía de café a negro. Los élitros (primer par de alas) presentan cuatro manchas de color amarillento que son características de la especie. Este insecto se alimenta de cereales, tanto en el campo como en los almacenes. El adulto y las larvas se alimentan vorazmente de los granos como trigo, maíz, arroz, sorgo, cebada, avena, centeno. Ocasionalmente se han encontrado en productos molidos, aunque difícilmente se multiplica en este medio. Se encuentra distribuido en todo el mundo, especialmente en las zonas cálidas, húmedas, tropicales y subtropicales (Velásquez y Trivelli, 1983). A continuación su clasificación taxonómica.

Phylum **Artropoda.**

Clase **Insecta.**

Orden **Coleóptera.**

Familia **Curculionidae.**

Género **Sitophilus**

Especie ***Sitophilus oryzae***



Figura 2. Gorgojo de arroz (FAO, 1983)

Son buenos voladores y pueden infestar el grano desde el campo. La trompa del macho es más corta y rugosa, mientras que la de la hembra es ligeramente más larga, delgada y con menos rugosidades. Los adultos y larvas se alimentan vorazmente de los granos de trigo, maíz, arroz, sorgo, cebada, avena y centeno. Han sido encontrados en algunos granos de leguminosas (como garbanzos), maní, tamarindo y productos industriales de consistencia dura como fideos y galletas (FAO, 1983).

Las hembras horadan los granos y depositan en cada diminuta perforación un huevecillo, que posteriormente es cubierto con una secreción, y su presencia es inadvertida. Las larvas son carentes de patas, se alimentan, transforman en pupas y finalmente en adultos, dentro del grano. Viven de 4 a 5 meses. La temperatura óptima para el desarrollo es de 26 a 30° C y la humedad relativa de 70%. En estas condiciones su ciclo biológico puede durar de 26 a 30 días (FAO, 1983).

2.10.1. Aspectos fisiológicos de los insectos

Los requerimientos nutricionales de los insectos son similares a los de los vertebrados (Vonk y col, 1984). No obstante, una notable excepción es que los insectos no tienen capacidad para la esterogénesis, por lo que son completamente dependientes de la dieta como fuente de colesterol, el cual es usado para la síntesis de membranas celulares y para la síntesis de la hormona esteroidea (20-hidroecdisoma) (Law y col, 1989).

2.10.1.1. Digestión del almidón en insectos

Cuando el almidón es introducido en la boca de los insectos, ocurre un procesamiento mandibular (molienda y masticación) que puede aumentar la susceptibilidad de los gránulos a la acción de las enzimas. Seguido de la acción mandibular, los gránulos pasan a la región del buche y el proventrículo, en donde no se ha establecido bien si lo que sufre el gránulo es un proceso de filtrado o una abrasión que aumenta la susceptibilidad a la digestión de los gránulos remanentes. En el buche, las enzimas laminares presentes inician el desdoblamiento de los gránulos dañados mecánicamente, así como también de los gránulos intactos. Este proceso puede ser facilitado por lipasas y/o detergentes del fluido laminar que pueden remover y absorber cualquier material lipídico de la superficie del gránulo, capaz de interferir con la degradación del mismo. Seguidamente, en el intestino medio, el proceso enzimático continúa, hasta que la degradación del gránulo es completa, o cuando los gránulos parcialmente digeridos pasan a la región del intestino posterior, donde posiblemente la acción de las enzimas cesa (Baker y col, 1992).

2.11. Bioensayo con el gorgojo de arroz

Aunque entre grupos de la escala zoológica pueden existir diferencias cuantitativas en sus requerimientos nutricionales, los nutrientes básicos son los mismos y las reacciones metabólicas esenciales que permiten su utilización se han conservado. La similitud de los procesos biológicos entre las especies ha hecho posible la implementación de sistemas modelo. Para estudios nutricionales, las ratas y ratones de laboratorio han tomado preeminencia. Menos frecuentes son los trabajos que utilizan microorganismos, insectos o peces (Carmona y col., 1998).

Para ser asimiladas, las biomoléculas complejas de la dieta (proteínas, carbohidratos y lípidos), deben ser hidrolizadas a sus bloques estructurales constituyentes. En consecuencia, los procesos digestivos de los animales se basan en la existencia de sistemas enzimáticos que catalizan reacciones similares. Desde el punto de vista nutricional los requerimientos de los insectos y animales superiores, incluyendo a los humanos, son semejantes. Igualmente, la digestión de los alimentos se realiza extracelularmente en el tracto digestivo, hacia donde se secretan proteasas, amilasas y lipasas (Carmona y col., 1998).

El uso de insectos en bioensayos nutricionales tiene como ventajas la corta duración y el menor costo de los experimentos (Carmona y col., 1998). El gorgojo de arroz ha sido utilizado para evaluar la presencia de factores tóxicos en alimentos y el valor nutritivo de la dieta. Combinando las ventajas de un ensayo *in vivo*, con aquellas de un ensayo *in vitro*, lo que permite el desarrollo de bioensayos rápidos, sencillos y económicos donde se realizan determinaciones simultáneas que podrán conducir a resultados extrapolables a los humanos (Carmona y col., 2001).

En estudios previos realizados por Rojas (2008), fueron evaluadas la toxicidad de películas comestibles y la transferencia de bífidos a los insectos haciendo uso del gorgojo de arroz como modelo biológico, permitiendo hacer una evaluación *in vitro* rápida, segura y económica. En esa investigación se estudiaron películas a base de almidón de papa, alginato y gelano a las cuales se les adicionaron bifidobacterias activas. Se determinó que el almidón de papa resultó una fuente apta para mantener al microorganismo vivo, mostrando datos que reflejan

supervivencia y variación de peso comparables con el control positivo (arvejas verdes peladas). Resultados similares fueron observados al adicionar a dichas películas inulina, oligofructosa y/o bifidobacterias. Por el contrario, aquellas películas formuladas a base de gelano y alginato, mostraron efectos deletéreos, es decir, resultaron ser tóxicas y ocasionando la muerte de la población en pocos días.

Rojas (2008) concluyó en su investigación, que parece existir una transferencia de microorganismos desde las películas hacia los gorgojos, encontrándose la aparición de bífidobacterias al cabo de cinco días de mantener a los insectos con estas dietas. En aquellos casos donde se añadieron solo las bifidobacterias la tasa de mortalidad fue mayor a la encontrada en aquellos casos donde se añadió el microorganismo más oligofructosa o inulina (elemento prebiótico). Esto permite especular que al incluir el microorganismo y un sustrato o alimento, conlleva la disminución de la mortalidad de la bacteria, debido a que la misma se beneficia del alimento y los utiliza para subsistir, en el caso contrario la mortalidad aumenta por agotamiento de las reservas alimenticias (Rojas, 2008).

En este trabajo se plantea formular películas comestibles a base de almidón, realizarle los ensayos característicos descritos en la literatura, e incluir el bioensayo del gorgojo de arroz como una nueva determinación de las propiedades de una película comestible que permita hacer una evaluación *in vitro* rápida, que eventualmente permitiría extrapolar sus resultados nutricionales a humanos.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar películas comestibles a base de un almidón seleccionado como matriz polimérica, extraído de fuentes autóctonas e incorporando ingredientes prebióticos (inulina), probióticos (bifidobacterias) y ácidos grasos omega-3; evaluando sus propiedades mecánicas y físicas e incorporando el bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) para evaluación de propiedades nutricionales.

3.2. Objetivos específicos

- ⊕ Realizar ensayos preliminares consistentes en la formulación de películas comestibles a base de almidón de yuca, almidón de plátano y almidón de batata, para seleccionar una de ellas que resulte apta para el desarrollo adecuado del gorgojo de arroz.
- ⊕ Extraer en el laboratorio el almidón de la materia prima seleccionada (yuca, plátano o batata), el cual constituirá la matriz polimérica para la formulación de las películas comestibles, a las que se les añadirá prebióticos (inulina), probióticos (bifidobacterias) y ácidos grasos omega-3.
- ⊕ Determinar la concentración adecuada de ácidos grasos omega-3 para la formulación de las películas comestibles.
- ⊕ Evaluar algunas propiedades físicas y mecánicas de las películas desarrolladas: permeabilidad al vapor de agua, grosor, solubilidad en agua, retención de agua, y resistencia a la punción.

- ⊕ Realizar micrografías por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) a algunas de las películas obtenidas.
- ⊕ Aplicar el bioensayo del gorgojo del arroz como modelo biológico suministrándoles dietas a base de películas comestibles del almidón seleccionado, enriquecidas con ingredientes prebióticos, probióticos y omega-3.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Formación de películas comestibles

Para la formación y formulación de la matriz polimérica de las películas comestibles se requirió la preparación de una solución formadora de película investigando tres tipos distintos de matriz polimérica, y otros ingredientes, para ser utilizados en la formulación básica, los cuales se presentan a continuación:

- **Matriz polimérica:** Almidón de plátano (*Musa paradisiaca*), almidón de yuca (*Manihot esculenta*) y almidón de batata (*Ipomea batata*) (en polvo, extraído experimentalmente en el Laboratorio de Cereales, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA)).
- **Plastificante:** Glicerol grado comestible.
- **Agente dispersante:** Agua destilada.
- **Ingrediente prebiótico:** Inulina (Raftiline Gr., ORAFTI, Bélgica; Cenco-Zotti, Caracas).
- **Ácidos grasos Omega-3:** Ácidos grasos de pescado (Now Foods. IL, USA)
- **Ingrediente probiótico:** *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Laboratorios Christian Hansen, Dinamarca).

La Tabla 2 presenta las diferentes formulaciones que fueron investigadas en este trabajo.

Tabla 2. Formulaciones con almidón, glicerol, ácidos grasos omega 3, inulina y bifidobacterias viables investigadas para la obtención de películas comestibles

Formulación	Ingredientes
1	Almidón + glicerol (Película base)
2	Película base + omega-3
3	Película base + omega-3 + inulina
4	Película base + omega-3 + bifidobacterias
5	Película base + omega-3 + inulina + bifidobacterias

4.2. Preparación de las películas comestibles

4.2.1. Preparación de la solución formadora de película (SFP)

Inicialmente, para cumplir con el primer objetivo planteado, se necesitó determinar cuál de los polímeros disponibles sería el más adecuado para ser usado con el gorgojo de arroz; que pudiera ser consumido y asimilado por los insectos y no les causara ningún efecto tóxico. Se investigaron los siguientes almidones: a) Almidón de yuca, b) Almidón de plátano y c) Almidón de batata, suministrados por el Laboratorio de Granos, Raíces y Tubérculos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

4.3. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones

Para la formulación de las películas comestibles a ser evaluadas en este trabajo se procedió a realizar el estudio de distintas concentraciones de cada uno de los componentes a fin de elegir el tratamiento más adecuado en función de los objetivos propuestos. Para esto se eligió la formulación adecuada basada en ciertos aspectos cualitativos: 1) facilidad de ser despegada de la capsula sin romperse, 2) flexibilidad y 3) manejabilidad, así como mejor apariencia y consistencia. En la Tabla 1 se muestran las diferentes formulaciones realizadas. Las formulaciones seleccionadas fueron suministradas al gorgojo del arroz (descripción en apartado 4.17) y sobre la base de si resultaban o no tóxicas al insecto, se seleccionó la fuente de almidón para proceder a su extracción).

Tabla 3. Formulaciones preliminares de las películas comestibles a base de almidón de yuca, almidón de plátano y almidón de batata para ser sometidas al bioensayo del gorgojo del arroz.

Fuente de Almidón	Concentración de Almidón (%p/p)	Concentración de Glicerol (%p/p)
Yuca (<i>Manihot esculenta</i>)	4	1
	5	1,5
	6	2
Plátano (<i>Musa paradisiaca</i>)	4	1
	5	1,5
	6	2
Batata (<i>Ipomea batata</i>)	4	1
	5	1,5
	6	2

4.4. Extracción y purificación del almidón

Una vez seleccionado el almidón a utilizar a través del bioensayo se procedió a su extracción, a fin de obtener la cantidad necesaria para la realizar los experimentos restantes. Para la obtención del almidón fue utilizada la metodología descrita por

Pérez y col., (1993). Los plátanos verdes con grado de madurez 1, según la escala de Von Loesecke (1950), utilizados para la obtención de almidón fueron adquiridos en el mercado de Quinta Crespo, Caracas, Venezuela. Se lavaron, pelaron y trocearon, la parte comestible se sumergió en una solución de ácido cítrico al 0.1% v/v para evitar su oxidación y fue congelada. Posteriormente, se procedió descongelar la pulpa y licuarla, con una licuadora (Oster, Caracas, Venezuela). La mezcla obtenida se separó con ayuda de mallas de muselinas, y luego fue centrifugada en centrífuga DAMON/IEC-División Modelo CRV-5000 a 4000 r.p.m por espacio de 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Esta operación se realizó 4 veces. El almidón obtenido por este procedimiento se colocó en un deshidratador de bandeja (MITCHELL modelo 645159, USA) por 18 horas a 45°C, se molió y tamizó (serie de tamices ASMT).

A continuación se presenta la composición proximal de los almidones empleados en este estudio.

Tabla 4. Composición proximal de los almidones de plátano, yuca y batata.

	Plátano % (Silva, 2000)	Batata % (López, 2006)	Yuca % (González y Pérez, 2003)
Humedad	9,85 ± 0,02	9,91 ± 0,073	10,21 ± 0,01
Ceniza	0,02 ± 0,01	0,17 ± 0,0006	0,11 ± 0,01
Proteína	0,69 ± 0,01	0,14 ± 0,001	ND
Fibra cruda	0,26 ± 0,01	0,45 ± 0,027	0,28 ± 0,01
Grasas	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,005	0,12 ± 0,04
Azúcares reductores	ND	0,13 ± 0,0057	0,02 ± 0,01
Azúcares no reductores	1,8 x 10 ⁻⁴ ± 0,0001	ND	ND

Los valores están expresados en base seca, excepto la humedad.
ND: no detectado por el método

4.5. Procedimiento básico para la preparación de la solución formadora de película

Para la preparación de la solución formadora de película (SFP) básica a partir de almidón, este se mezcló con agua destilada y se calentó lentamente hasta ebullición (98 °C) con agitación constante. Luego se adicionó el glicerol. Las mezclas se dispersaron con un homogeneizador (Ultra-Turrax, T 25 basic, Ika® Werke, USA.) a 18.000 r.p.m durante tres minutos (según modificación del método de Romero-Bastidas, 2005).

4.6. Preparación de las formulaciones con ácidos grasos omega-3

Para la obtención de las formulaciones que contienen omega-3, a la SFP básica seleccionada se adicionaron ácidos grasos, al 0,05 0,125 y 0,25% (p/p), las concentraciones más bajas fueron escogidas en concordancia con estudios previos de Rojas-Graü y col. (2007).

4.7. Preparación de las formulaciones con prebióticos.

Para la obtención de las formulaciones con el ingrediente prebiótico, a la SFP básica seleccionada se adicionó inulina al 1% (p/v), como lo describe Melián (2006), y se dispersó con un homogeneizador (Ultra-Turrax, T 25 basic, Ika® Werke, EE.UU.) a 18.000 r.p.m durante tres minutos.

4.8. Preparación de las formulaciones con ingredientes probióticos.

Para la obtención a partir de la SFP básica seleccionada, de las diferentes formulaciones con ingredientes probióticos, se adicionaron a las mismas, bifidobacterias activas al 1% (p/v) (Tapia y col., 2007), con una agitación suave, evitando la incorporación de aire.

4.8.1. Obtención del cultivo de *Bifidobacterium sp*

Previo a la adición de los microorganismos a las diferentes formulaciones de las películas, es necesario un proceso de activación y crecimiento de los bífidos. Este proceso les permite salir del período de latencia en que se encuentran, puesto que el producto comercial son bacterias liofilizadas (Christian Hansen, Dinamarca) que se mantienen congeladas.

4.8.2. Activación de la cepa *Bifidobacterium lactis Bb 12*

Para esta fase se prepararon 100 mL de caldo MRS (Man, Rugosa, Sharpe) (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, R.U.), en esterilidad y se le agregó 1 g de bifidobacterias liofilizadas, adicionando HCl-cisteína al 10 %. La preparación se incubó a 35-37 °C por 24 horas, en jarra Oxoid (HP11), con sobres de anaerobiosis (Oxoid, Unipath Ltd, RU).

4.8.3. Crecimiento de la cepa de *Bifidobacterium lactis Bb 12*.

Pasadas las 24 horas se prepararon 900 mL de caldo MRS estéril, al cual se le adicionó HCl-cisteína al 10 % y una solución de antibióticos (sulfato de polimixina B, sulfato de kanamicina, propionato de sodio, cloruro de litio, ácido nalidíxico, acetato de yodo y 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.). Los 100 mL de la preparación que contenían las bifidobacterias fueron agregados a estos 900 mL de caldo MRS, para luego incubar por 24 horas a 35-37 °C. Finalizado este tiempo, este caldo con bifidobacterias activas en crecimiento, fue centrifugado a 6000 r.p.m por 15 min a 5°. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue cosechado para incorporarlo asépticamente a las SFP correspondientes.

4.9. Preparación de formulaciones “simbióticas”.

Para la obtención de formulaciones con ingredientes potencialmente simbióticos, se adicionó inulina u oligofructosa al 1 % (p/v) a la SFP básica seleccionada, se dispersó con un homogeneizador (Ultra-Turrax, T 25 basic, Ika® Werke, EE.UU), a 18.000 r.p.m durante tres minutos. A la solución resultante se le adicionó 1 % (p/v) de biomasa de bifidobacterias, obtenidas por centrifugación de un cultivo en

crecimiento activo, de la manera descrita con anterioridad. La incorporación se realizó asépticamente, con una agitación suave, evitando la incorporación de aire.

4.10. Obtención de las películas en placas.

La SFP obtenidas fueron vertidas en placas de petri de 5cm de diámetro y secadas a 45 °C, en estufa por 24 horas. Las SFP con probióticos y las SFP “simbióticas” fueron secadas en incubadora refrigerada a 25 °C, por 48 horas.

4.11. Caracterización de las películas

4.12. Determinación del grosor

El grosor de las películas se midió por triplicado con un micrómetro digital (Electronic Digital Micrometer Symmetry Especialidades, S.A) con una escala de calibración de 0-25 mm y de 0,001 mm de precisión. Para ello se tomaron 5 medidas en diferentes posiciones seleccionadas al azar en cada película y se obtuvo un promedio de ellas.

4.13. Determinación de la permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó gravimétricamente a 25°C, utilizando una modificación del método E96-93 de la ASTM (Tapia y col., 2007). Se tomaron cápsulas de metilmetacrilato de 3 cm de diámetro interno, 4,5cm de diámetro externo y 2cm de profundidad y se llenaron con 5 mL de agua destilada. Asimismo se cortaron dos películas en forma circular de cada formulación y se colocaron sobre las cápsulas. Luego se sellaron las cápsulas con una tapa que se ajustó a presión mediante una goma tipo O-ring, dejando un espacio de 1 cm aproximadamente entre película y agua, y se pesaron. Estas tapas

son huecas de manera de dejar un área de la película expuesta para el intercambio de vapor de agua. El sistema formado por las cápsulas, el agua y las películas se colocó en desecadores sellados herméticamente, que contenían en el fondo una solución saturada de $MgCl_2$ (esta solución saturada genera una humedad relativa de 33 %). El peso de las cápsulas fue registrado cada hora durante cuatro horas. Estos puntos fueron utilizados para graficar la variación de peso de la cápsula en función del tiempo. La pendiente de esta curva es la tasa de pérdida de agua, la cual se estimó mediante un análisis de regresión lineal, realizado con el programa Microsoft® Office Excel 2003.

La velocidad de transmisión del vapor de agua (VTVA) a través de las películas y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) fueron obtenidas según la descripción de Kaya y Kaya (2000) y Chinnan y Park (1995), respectivamente, usando las siguientes fórmulas:

$$VTVA = \text{pendiente}/\text{área expuesta de la película (g/cm}^2 \cdot \text{seg)}$$

$$PVA = L \times VTVA (pi-pa)$$

Donde p_a es la presión externa de la cápsula y es igual a 1,046 kPa; p_i es la presión interna de la cápsula y es igual a 3,17 kPa (Tapia y col, 2007); y L es el grosor promedio de la película en mm. La PVA se expresó como $g/m \cdot s \cdot Pa$.

4.14. Solubilidad en agua y capacidad de retención de agua

La solubilidad en agua (SA) y la capacidad de retención de agua (RA) de las películas fue determinada de acuerdo al método de Gontard y col., (1992) y Rhim (2004). Se escogieron al azar seis muestras de cada tipo de película; tres de ellas

se secaron a 105 °C por 24 horas para obtener la materia seca inicial. Las otras tres muestras se colocaron individualmente en vasos de precipitado de 50 mL con 30 mL de agua destilada; los vasos de precipitado fueron sellados con parafilm y colocados en una estufa de secado a 25 °C por 24 h, agitando ocasionalmente. Las películas fueron retiradas cuidadosamente y lavadas suavemente con agua destilada y colocadas en una mufla a 105 °C por 24 horas para determinar finalmente la materia seca remanente (no solubilizada).

La siguiente fórmula se utilizó para determinar SA:

$$SA = (S_o - S) / S_o = \text{g sólidos solubles} / \text{g sólidos totales}$$

donde S_o es la materia seca inicial y S es la materia seca final (no solubilizada). La capacidad de retención de agua se determinará de acuerdo a Lee y col. (2004) y Rhim (2004). Para ello, muestras de películas pre-pesadas (por triplicado) fueron sumergidas en agua a 25 °C por 10 minutos, secadas suavemente con papel absorbente por 1 min de manera de remover el agua superficial y así determinar el peso final de las muestras hinchadas. La RA fue expresada como la fracción de agua ganada (g) vs los sólidos totales en la película (g).

4.15. Prueba de punción

La resistencia de la película a la punción y deformación, fue determinada con un texturómetro (Stable Micro Systems TA-XT2i, Surrey, UK). Se cortaron tres discos de 4 cm de diámetro de cada tipo de película. Cada muestra fue montada sobre cápsulas de metilmetacrilato. Se utilizó una sonda cilíndrica y lisa (0,8cm),

se movió perpendicularmente a una velocidad de 1mm/s hasta romper la película. La curva de la fuerza de deformación, fue procesada con el software del equipo para determinar la fuerza de deformación y ruptura (Yang y Paulson, 2000).

4.16. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

El estudio morfológico de la superficie y la distribución de las sustancias, fueron evaluadas con un microscopio electrónico de barrido. Las muestras fueron llevadas al Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Mitsuo Ogura" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para su preparación. Las muestras se cortaron con un bisturí y fueron sometidas a secado en punto crítico en un desecador en punto crítico para SEM (HITACHI HCP2, 1976), las secciones obtenidas fueron montadas en soportes de aluminio con cinta adhesiva y sometidas a recubrimiento metálico con oro. Una vez preparada la muestra, fue llevada al Centro de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los Materiales para su análisis en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi, S-2400, 1992).

4.17. Bioensayos con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*)

El uso de este ensayo está documentado como una herramienta poderosa para evaluar efectos nutricionales (Carmona y col., 2001). Inicialmente los insectos son cultivados y luego sometidos a experimentación según lo discutido por Carmona y col (1993) y Carmona y Gómez-Sotillo (1998), como se describe a continuación.

4.17.1. Recolección y cultivo de gorgojos

Se emplearon gorgojos de arroz, *Sitophilus oryzae*, los cuales fueron cultivados en arvejas (*Pisum sativum*) peladas, contenidos en envases cerrados, cubiertos con una malla de poros finos, mantenidos a temperatura y humedad ambiental y al resguardo de la luz. En cada experimento se utilizaron cohortes de individuos de la misma edad, para ello, se infestaron lotes de 160g de arvejas con 100 individuos adultos, luego de 15 días se eliminaron los padres y se esperó la emergencia de la generación F1, que ocurrió aproximadamente en un mes.

4.17.2. Diseño experimental para el ensayo con el gorgojo de arroz

Se tomaron grupos de 30 individuos adultos provenientes de la F1. Estos se mantuvieron en un frasco de vidrio con 2 g de alimento (en este caso películas comestibles cortadas en trozos pequeños) por cada frasco. El tiempo de duración de la alimentación con las distintas dietas fue de quince días. Se mantuvo un grupo en ayuno como control negativo y uno con arvejas como control positivo. Cada dieta se ensayó por triplicado. Durante estos quince días se midió la supervivencia y la variación de peso como una manera de evaluar la toxicidad de estos ingredientes. Al finalizar los quince días, se sacrificaron por congelación los insectos que sobrevivieron.

4.17.3. Determinación de la supervivencia

Grupos de 30 individuos fueron alimentados con las diferentes películas, y se llevó un registro interdiario del número de sobrevivientes. Al final de los quince días se promediaron los resultados de las diferentes réplicas y se aplicó la siguiente fórmula:

$\% \text{ de Supervivencia} = (n^\circ \text{ de sobrevivientes} / n^\circ \text{ total de individuos}) \times 100$

4. 17.4. Determinación de la variación de peso

Se llevó un registro interdiario de los pesos totales de los individuos de las diferentes réplicas. Este peso registrado se dividió entre la cantidad de individuos sobrevivientes y se promedió los valores de las diferentes réplicas de una dieta para obtener variación promedio de peso por individuo. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Var de Peso} = \text{peso promedio (del día - inicial)} \times 100 / \text{peso promedio inicial}$$

4. 18. Recuento de bifidobacterias en películas y en gorgojos

A muestras de películas con bifidobacterias y de insectos alimentados con este tipo de películas, se le realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-11} utilizando agua peptonada. Dada la condición anaeróbica de estos microorganismos, tanto los gorgojos como las películas se homogeneizaron manualmente, evitando la incorporación de aire. Se sembró 1 mL en tubos de cara plana Miller Pricket. A todos se les adicionó agar MRS, 0,05 % HCL-cisteína y la solución de antibióticos descrita anteriormente, empleando una sobrecapa del mismo medio, de acuerdo a Payne y col. (1999) y Arroyo y col. (1995). Tanto las placas como los tubos fueron incubados en anaerobiosis a 37 °C por 24 horas. La siembra y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se realizaron cada dos días durante el período de experimentación. Se tomó un frasco con gorgojos y películas por día para cada dieta ensayada. Los resultados se expresaron como Log_{10} UFC/g.

4. 19. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con análisis de varianza (ANOVA) de una vía, utilizando el paquete estadístico Statistica versión 9.0 para determinar los efectos significativos de los ácidos grasos omega-3, inulina y bifidobacterias, tanto en el bioensayo, como en espesor, PVA, SA, RA y fuerza de punción de las películas, para así comparar las formulaciones seleccionadas. Se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey (HSD) a un nivel de significancia de 0,05 para determinar las diferencias entre los tratamientos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ensayos preliminares para la selección de las formulaciones

De las formulaciones preliminares de películas comestibles señaladas en la Tabla 1 se seleccionó de cada almidón (yuca, plátano y batata) un tratamiento de manera cualitativa que reuniese los siguientes criterios de selección: 1) facilidad de ser despegada de la cápsula sin romperse, 2) flexibilidad y 3) manejabilidad. En la tabla se muestran las formulaciones seleccionadas:

Tabla 5 Formulaciones seleccionadas para la elaboración de películas

	Concentración de Almidón (%p/p)	Concentración de Glicerol (%p/p)	Cantidad de SFP en la capsula (mL)
Yuca	5	1	12
Plátano	5	2	8
Batata	5	1	8

5.2. Selección de la película base mediante el estudio de la supervivencia y variación de peso de gorgojos

Para la selección del almidón a ser usado, se realizó un estudio para determinar cuál de las tres formulaciones de películas comestibles es apta para el desarrollo adecuado del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) a través de la determinación de supervivencia y variación de peso. Los resultados encontrados se presentan en las **Figuras 3 y 4.**

Para evaluar la toxicidad de las películas sobre los insectos se trabajó con dos grupos controles: uno alimentado con arvejas verdes peladas (control positivo) y el otro sometido a ayuno (control negativo). La existencia de estos grupos

controles está apoyada por el hecho de que ellos nos van a permitir asegurar que el ensayo se está llevando de una manera adecuada y que no existen variables externas que estén afectando el desarrollo del experimento (Rojas, 2008).

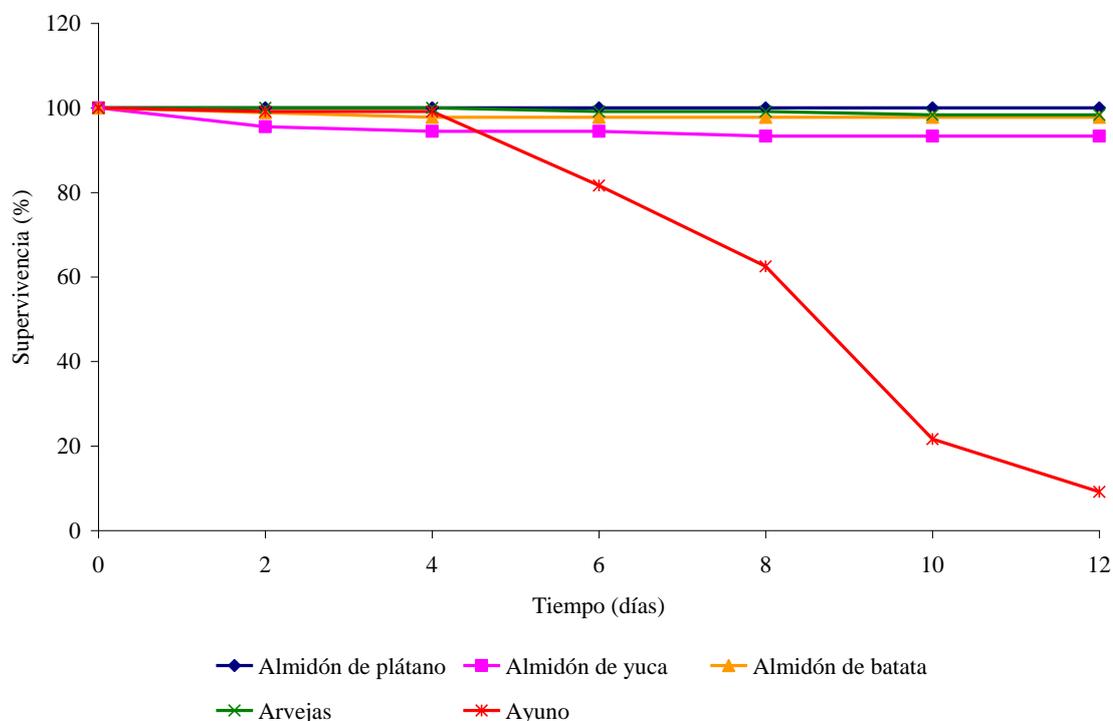


Figura 3. Supervivencia de gorgojos de arroz alimentados con películas formuladas con almidón de plátano, almidón de yuca y almidón de batata

Las arvejas verdes han sido utilizadas como un alimento de alto valor nutricional en los experimentos con el bioensayo ya que satisfacen adecuadamente todas las necesidades nutricionales de estos insectos (Carmona y col, 1993 y 1998). La **Figura 3** muestra la supervivencia de los insectos mantenidos con las diferentes dietas de almidón y los controles. Los individuos alimentados con arvejas presentaron un comportamiento característico (Carmona y col, 1998), donde la supervivencia fue cercana al 100 %. En contraste, el grupo sometido a ayuno presentó un porcentaje de mortalidad muy elevado, que se acentuó a partir del cuarto día, con una supervivencia sólo de 9 % al finalizar el bioensayo. Estos

resultados concuerdan con los estudios realizados en el área por Carmona y col. (1998) y López, (1999).

Las dietas suministradas con películas a base de almidón de plátano, yuca y batata no resultaron tóxicas, ya que se define como una dieta tóxica aquella cuya supervivencia se encuentra por debajo de los individuos mantenidos en ayuno. Al monitorear la supervivencia, todas las curvas presentaron un comportamiento que se asemeja al control positivo, considerado como una dieta nutricionalmente satisfactoria. Sin embargo, la dieta a base de almidón de yuca presentó una mortalidad de 7 %, ligeramente superior al resto de los almidones o al grupo control (100%), habiendo además diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre la película de almidón de yuca y el resto de las dietas.

Es posible que la película de almidón de yuca disminuya la supervivencia del gorgojo de arroz debido a la carencia proteica que presenta esta dieta. Según estudios realizados por González y Pérez (2003) sobre la composición proximal del almidón de yuca empleado, no fueron detectadas proteínas crudas. En cambio, tanto en el almidón de plátano como en el de batata, la proteína si forma parte de su composición, siendo los valores de proteínas 0,69 y 0,14 % (**Tabla 4**) (Silva, 2000; López, 2006) respectivamente. Entonces se tiene una tendencia clara, a medida que aumenta el porcentaje de proteína en el almidón empleado para la elaboración de las películas, aumenta la tasa supervivencia. Esto se debe a que la cantidad proteína para el gorgojo se encuentra entre 0,5 y 0,7% (López, 1999). Los insectos consumen y utilizan una amplia variedad de proteínas para sus requerimientos nutricionales. De los 20 aminoácidos que comúnmente forman

parte de la mayoría de las proteínas 10 de ellos no son sintetizados por los insectos, por lo cual son aminoácidos esenciales (Resh y Cardé, 2003). De esta manera, se evidencia como la ingesta de proteína en la dieta es importante para el desarrollo adecuado del gorgojo de arroz y aún diferencias en pequeñas cantidades pueden ejercer un efecto importante en el desarrollo del individuo.

La **Figura 4** muestra la variación de peso de los insectos con las diferentes dietas. Se observó que los individuos mantenidos en ayuno que presentaron una pérdida de peso gradual, hasta alcanzar una pérdida del 93% al final del bioensayo, lo que resulta característico del grupo. Contrario a esto, se tiene a los individuos alimentados con arvejas, en los cuales se produjo un aumento de peso de 7,8 % con respecto al peso al inicio del experimento. En relación a las dietas suministradas a base de películas de almidón, el almidón de plátano fue la dieta que promovió ganancia de peso (incremento de 7,9 %), incluso por encima de los valores de aquellos individuos alimentados con arvejas (incremento de 7,8 %).

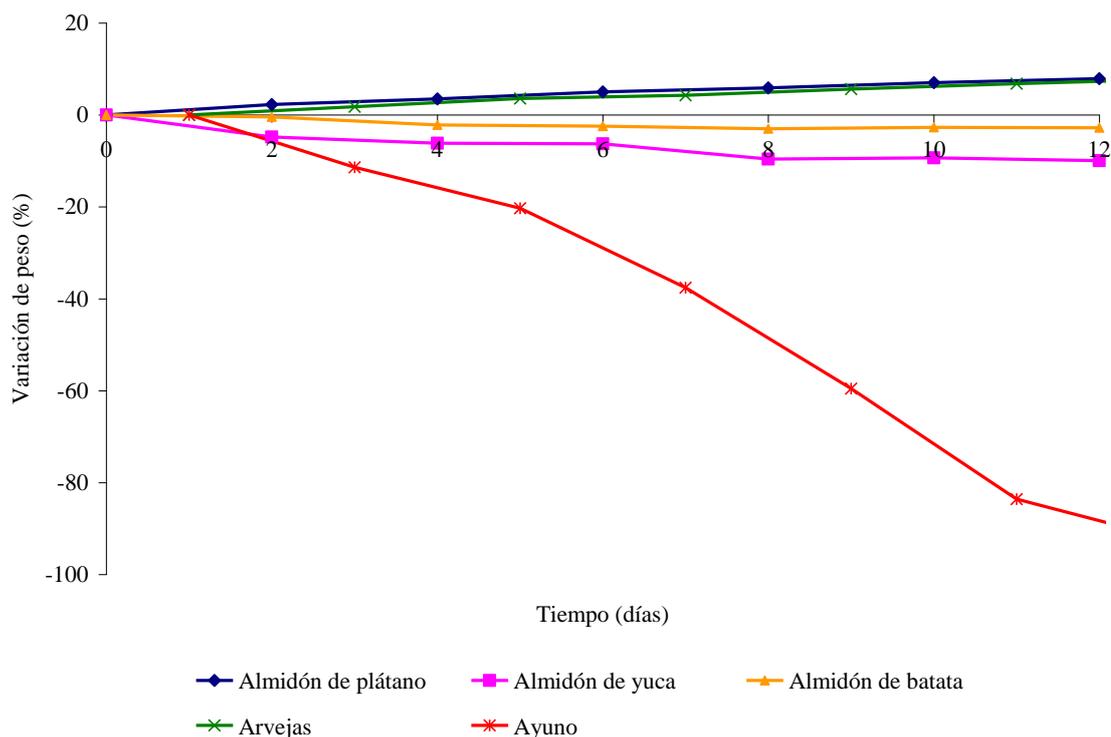


Figura 4. Variación de peso de gorgojos de arroz alimentados con películas formuladas con almidón de plátano, almidón de yuca y almidón de batata

Al igual que en la sección anterior, se hace notar como el aumento de la cantidad de proteína en el almidón influye en la variación de peso del insecto. Para las películas de almidón se puede ver una relación entre la cantidad de proteína y el aumento de peso, siendo en orden creciente de peso igual al contenido de proteína en el almidón: película de almidón de plátano > película de almidón de batata > película de almidón de yuca (proteína cruda no detectada). Resultados similares para este parámetro fueron reportados por Carmona y col. (1998) para dietas a base de almidón de maíz, en este estudio cuando al almidón se adicionaba 2% de caseína el incremento de peso resultaba superior que en la dieta de almidón sin en ausencia de caseína, una proteína de alta calidad nutricional.

Teniendo en consideración que el almidón de plátano fue el que mantuvo la supervivencia más elevada y además fue el único de los tres almidones estudiados que produjo un incremento de peso, se seleccionó como el polímero definitivo para la incorporación de ácidos grasos omega-3, inulina y bifidobacterias; por ser el más adecuado para satisfacer las demandas nutricionales del mantenimiento de los insectos.

5.3. Incorporación de lípidos en películas comestibles

Una vez determinado el carbohidrato ideal para la realizar el bioensayo con el gorgojo de arroz, se procedió a agregar a las películas comestibles de almidón de plátano, uno de los elementos fisiológicamente activos utilizados en este estudio, ácidos grasos omega-3. Ya que los lípidos se usan extensamente para mejorar la PVA de las coberturas comestibles (Greener y Fennema, 1989), en este trabajo se decidió incorporar ácidos grasos omega-3 de manera de obtener una mejora adicional de la PVA de las películas.

La incorporación de ácidos grasos esenciales no sólo presenta ventajas a nivel funcional en la matriz polimérica, su consumo a través de películas y/o coberturas puede producir beneficios a la salud. Como ejemplo de ello pueden mencionarse los ácidos grasos esenciales, de gran importancia, ya que al no ser sintetizados en el organismo deben incorporarse a través de la dieta. El omega-3 forma parte los ácidos grasos esenciales, se caracteriza por disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos (Piqué, 1986), ser económico y fácil de adquirir por lo cual fue seleccionado como uno de los compuestos para la formulación de las películas. De las tres concentraciones de ácidos grasos estudiadas en películas de almidón de

plátano, se seleccionó el tratamiento que contenía omega-3 al 0,125% por presentar ausencia de ácidos grasos al tacto y un aroma a pescado muy leve.

5.4. Caracterización de películas comestibles

5.4.1. Determinación del grosor

La determinación del grosor en películas comestibles es de gran importancia ya que puede afectar algunas propiedades de barrera como la permeabilidad del vapor de agua o a ciertos gases como oxígeno y dióxido de carbono. En la **Tabla 6** se muestran los valores obtenidos para este parámetro.

Tabla 6. Algunos parámetros físicos de películas comestibles a base de almidón de plátano con adición de ácidos grasos omega-3, pre y probióticos en su formulación.

Formulación de la solución formadora de película	Grosor (mm)	PVA (10⁻¹⁰.g/m.s.Pa)	SA	RA
Película base de almidón de plátano	0,155 ± 0,005 ^d	5,00 ± 0,07 ^d	0,18 ± 0,004 ^{cc}	1,65 ± 0,03 ^a
Película con Ω-3	0,161 ± 0,003 ^c	4,88 ± 0,03 ^d	0,16 ± 0,009 ^{cc}	0,84 ± 0,04 ^c
Película con Ω-3 e inulina	0,163 ± 0,004 ^c	6,25 ± 0,06 ^c	0,22 ± 0,008 ^{ab}	0,90 ± 0,02 ^c
Película con Ω-3 y bífidos	0,221 ± 0,004 ^b	13,0 ± 0,03 ^b	0,22 ± 0,015 ^b	1,08 ± 0,02 ^b
Película con Ω-3, bífidos e inulina	0,228 ± 0,004 ^a	14,7 ± 0,04 ^a	0,24 ± 0,013 ^a	1,02 ± 0,04 ^b

Los valores son la media ± desviación standard.

Letras diferentes en la misma columna expresan diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05)

Se pueden observar claramente tres tendencias al evaluar este parámetro, permitiendo dividir los resultados en tres grupos. El grupo 1 se encuentra formado por la película base de almidón de plátano; el grupo 2 por películas con ácidos grasos omega-3 y este combinado con inulina; y el grupo tres por aquellas

formulaciones que contienen bifidobacterias. La tendencia encontrada puede resumirse de manera sencilla y en orden creciente de grosor como: grupo 1 < grupo 2 < grupo 3.

Para el primer grupo, formado por la película base de almidón de plátano el valor promedio fue de $0,155 \pm 0,005$ mm. Este es ligeramente superior al reportado en trabajos previos por Romero-Bastidas y col. (2005), quienes obtuvieron un espesor de $0,113 \pm 0,006$ mm para películas a base del mismo almidón. Esta diferencia puede ser atribuida principalmente a la temperatura y tiempo de secado empleado por los autores para preparación de la película, siendo de 65 °C hasta alcanzar peso constante. Secar las muestras hasta no obtener variaciones de peso permite suponer que se ha extraído el agua casi en su totalidad, motivo por el cual se obtienen películas más delgadas. También es posible que la variedad de la materia prima pueda influir en las diferencias señaladas. Sin embargo, se desconoce la variedad de plátano empleada por Romero-Bastidas y col. (2005).

Existe una ligera, aunque significativa ($p \leq 0,05$) diferencia al comparar el grosor de la película base con la que contiene ácidos grasos omega-3. El mismo comportamiento fue encontrado en formulaciones a base de almidón de maíz a las que se incorporó aceite de girasol (García y col. 2000). Los ácidos grasos, al ser lípidos, tienen como principal función bloquear el transporte de humedad (Kester y Fennema, 1986), lo cual puede disminuir la eficiencia en la extracción de agua durante la etapa de secado, generando así una película más gruesa.

En estudios realizados por Rojas (2008) con películas elaboradas a base de almidón de papa fueron reportados valores de $0,16 \pm 0,02$ mm y $0,25 \pm 0,03$ mm para formulaciones con inulina e inulina y bifidobacterias respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos en este trabajo.

Las películas pertenecientes al grupo 3 presentaron un espesor mucho mayor al resto. Es claro al observar los componentes de las formulaciones que la causa principal para este resultado es la incorporación de bifidobacterias. La adición de bífidos probablemente induce un reordenamiento de las moléculas, con la consecuente interacción entre el agua y los demás componentes, que hacen que la película sea más gruesa (Rojas, 2008). Así mismo, la incorporación de estos microorganismos obliga a disminuir la temperatura de secado de las muestras, disminuyendo la eficiencia en la extracción de agua y generando películas más gruesas.

5.4.2. Permeabilidad del vapor de agua en películas comestibles

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es una de las propiedades más importantes y estudiadas en las películas comestibles puesto que una de las principales funciones de un empaque de alimentos es evitar o disminuir la transferencia de humedad entre el alimento y el medio circundante, por lo tanto en un empaque, es ideal que el valor PVA sea lo más bajo posible (Segovia, 2010).

Uno de los mayores problemas que presentan las coberturas y películas comestibles a base de almidón y glicerol es su alta permeabilidad al agua por la naturaleza hidrofílica de dichas moléculas (Romero-Bastidas y col, 2005). La

Tabla 6 muestra la PVA para obtenida en las diversas formulaciones planteadas en este estudio. Para la película base de almidón de plátano (Formulación 1) se obtuvo una permeabilidad de $5,00 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa, la cual resulta similar a los valores reportados por Romero-Bastidas y col. (2005) y Hernández (2006) con $1,3 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa y $1,45 \times 10^{-10}$ g/m.s.Pa respectivamente.

Al determinar la permeabilidad de la película con ácidos grasos omega-3 (Formulación 2) se tiene que a pesar de haber disminuido el valor promedio con respecto a la formulación sin ácidos grasos no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambas. Es posible que por tener un mayor espesor la película con omega-3 influyera directamente en este parámetro, ya que las películas hidrofílicas como aquellas elaboradas a base de almidón presentan efectos de grosor sobre la PVA. Como se muestra en la **Tabla 6**, a medida que aumenta el grosor de las películas también lo hace la permeabilidad. McHugh y col., (1993) en un estudio del efecto del grosor en la determinación de la PVA en películas hidrofílicas, determinaron que a mayor grosor de la película aumenta la resistencia a la transferencia de masa y en consecuencia la presión parcial de agua en equilibrio en la superficie interna de la película incrementa. De esta forma las películas hidrofílicas exhiben un incremento en la permeabilidad al vapor de agua a medida que aumenta su grosor, debido a la modificación de las condiciones de presión parcial de vapor de agua a que está expuesta la parte interior de las películas. Sin embargo, una película pobre como barrera al vapor de agua también tiene ventajas, ya que permite el movimiento del agua a través de la película, evitando de esta forma la condensación, que es una fuente potencial de deterioro microbiano (Tapia, 2007).

Las películas con bífidos en su composición presentaron un incremento en la permeabilidad en un orden de magnitud, para estas el grosor no es el único parámetro que influye en la permeabilidad al vapor de agua, sino también la adición de los microorganismos mencionados. A pesar de ser pocos los estudios que reportan la adición de bífidos en películas y coberturas tanto Tapia y col. (2007) como Rojas (2008) señalan que las películas y coberturas con bífidos resultan ser más permeables al agua que las películas correspondientes pero sin bífidos. Se infiere que la adición de biomasa de probióticos a las coberturas causa un incremento en el espaciamiento entre las cadenas de polímeros debido a la inclusión de células bacterianas entre las cadenas, promoviendo la difusividad a través de las coberturas, acelerando la transmisión de agua (Tapia y col., 2007).

También se puede señalar que la adición de inulina es otro de los factores que influyó en el aumento de la permeabilidad en algunas formulaciones, lo cual se hace notar al observar la **Tabla 6**. Las películas con el prebiótico presentan valores de permeabilidad más elevados que las correspondientes sin la adición del mismo. Por lo tanto, al incluir un compuesto hidrofílico como la inulina en la formulación de películas comestibles aumenta la permeabilidad al vapor de agua.

5.4.3. Capacidad de retención de agua y solubilidad

La solubilidad en películas comestibles es indicio de su integridad en un ambiente acuoso, una solubilidad elevada indica baja resistencia al agua (Romero-Bastidas y col., 2005).

La **Tabla 6** presenta los valores de de la capacidad de retención de agua (RA) (g de agua ganada / g de sólidos totales), y solubilidad en agua (SA) (g de sólidos

soluble g/ g de sólidos totales), de las formulaciones seleccionadas para películas comestibles en este estudio (**Tabla 6**). Romero-Bastidas y col. (2005) encontraron un valor de solubilidad de 0,23 para películas de 3% (p/v) de almidón de plátano y 1,5% (p/v) de glicerol, lo cual es comparable con los valores encontrados en el presente trabajo (0,18).

La concentración usada de ácidos grasos omega-3 (Ω -3) no tuvo un efecto significativo ($p < 0,05$) en SA. Igualmente Tapia (2007) al trabajar con películas comestibles a base de otros polímeros tales como gelano y alginato no encontró variaciones en la solubilidad con el uso de aceite de girasol al 0,025% y 0,050% (p/v).

En contraste, la adición de inulina y bifidobacterias incrementó de forma significativa la solubilidad de las películas, esto parece indicar que los pre y probióticos empleados hacen menos resistentes las películas al agua.

La capacidad de retención de agua (RA) es una de las propiedades de las películas comestibles más importantes que se estudia en aplicaciones farmacéuticas y de alimentos, y a diferencia de la permeabilidad al agua, está determinada por la estructura química del polímero. La RA define la resistencia o tolerancia del material al agua (Tapia, 2007), por lo tanto, un valor bajo de RA indica una alta tolerancia al agua.

Los valores de RA fueron (1,65 - 0,84 g agua ganada/g sólidos secos en la película) inferiores a los reportados por Tapia (2007) y Lee y col. (2004) en películas de gelano, quienes publicaron valores de alrededor de 2,3 y 6

respectivamente. Por otro lado, Segovia (2010) encontró para películas de almidón de Mapuey al 5% y 2% de glicerol un valor de RA de 1,04. Sobre la base de estos resultados, es posible inferir una adecuada tolerancia al agua de las formulaciones seleccionadas para películas comestibles en este estudio.

En el presente trabajo la incorporación de ácidos grasos omega-3 influyó de manera significativa ($p > 0,05$) en la RA, disminuyendo los valores hasta casi un 50% para uno de los tratamientos (**Formulación 2**), indicando que la adición de Ω -3 hace que las películas de almidón se plátano sean más estable en agua. La RA ha sido empleada como una medida de la extensión del entrecruzamiento en películas de proteína a base de colágeno (Lee y Lee, 2004), entonces, se puede inferir que la inclusión de Ω -3 promueve un mayor grado de entrecruzamiento en las películas comestibles estudiadas. Por su parte, los elementos probióticos incorporados también influyeron en este parámetro, disminuyendo los valores de RA en aquellas formulaciones en las que estaban presentes.

5.4.4. Determinación de la fuerza de punción

Aunque es muy importante determinar la fuerza necesaria para penetrar la película comestible, muy pocos estudios con almidón han reportado este parámetro. Los valores correspondientes de resistencia a la fuerza de punción en las películas comestibles estudiadas se muestran en la **Tabla 7**, oscilando entre 0,99 y 2,28N. Las tendencias encontradas permiten dividir los resultados en dos grupos, incluso a nivel de diferencias estadísticas. El primer grupo está formado por la película base (**Formulación 1**) y película con ácidos grasos omega-3 (**Formulación 2**), mientras que en el segundo grupo se encuentran las películas con pre y probióticos (**Formulaciones 3,4 y 5**).

Tabla 7. Determinación de la fuerza de punción en películas comestibles

Formulación	Fuerza de Punción (N)
Película base	1,25 ^b
Película con Ω-3	0,99 ^b
Película con Ω-3 e inulina	2,17 ^a
Película con Ω-3 y bífidos	2,28 ^a
Película con Ω-3, bífidos e inulina	2,24 ^a

Los valores son la media \pm desviación standard.

Letras diferentes en la misma columna expresan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Romero-Bastidas y col., (2005) reportaron una fuerza de punción de aproximadamente 4,1N para películas de almidón de plátano al 3% (p/v) con 1,5% (p/v) de glicerol. Este valor es superior al encontrado en el presente estudio. Sin embargo, dicho comportamiento puede explicarse por el uso de una concentración de glicerol más elevada (2%). Tanto Gontanrd y col. (1993) como Mali y col. (2004) al investigar películas de gluten y almidón de ñame respectivamente, señalan que al aumentar la concentración de glicerol disminuye la fuerza de punción de manera significativa. Los plastificantes se añaden a los polímeros para reducir la fragilidad de las películas, ya que funcionan como separadores entre las cadenas poliméricas, aumentando la flexibilidad del polímero (Lai & Padua, 1998).

Otro aspecto que influye en la determinación de este parámetro es el espesor de las películas. Mali y col., (2004) estudiaron las propiedades de barrera, mecánicas y ópticas de películas plastificadas de almidón de ñame. Para ello, los investigadores, evaluaron los efectos sobre estas propiedades en tres, concentraciones diferentes de almidón (3,30, 3,65 y 4,00 % p/p) y glicerol (1,30,

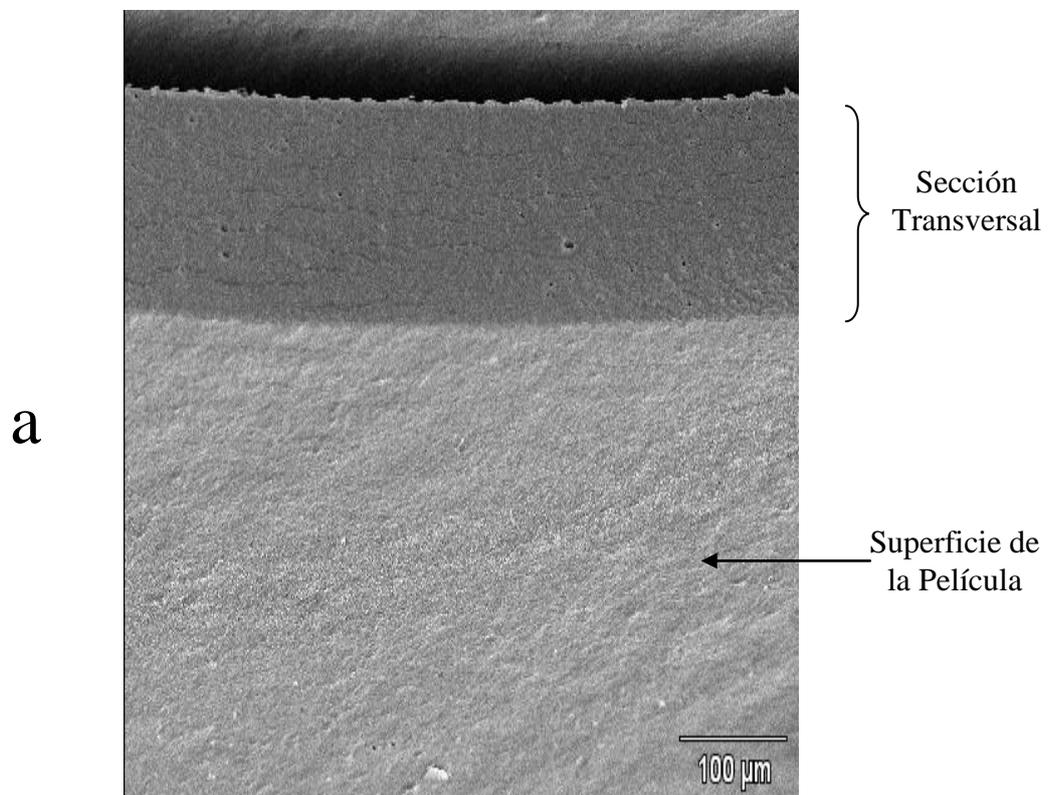
1,65 y 2,00 % p/p), obteniendo diversos espesores (0,07, 0,09 y 0,11 mm). A medida que el grosor de las películas aumentó, también lo hizo la resistencia a la fuerza de punción. Este mismo comportamiento se evidencia en el presente estudio.

En relación a la adición de ácidos grasos omega-3, se encontró que el lípido no causó ningún efecto en la resistencia a la fuerza de punción. Por lo tanto, se infiere, que para ocasionar una disminución significativa en la fuerza de punción deben utilizarse concentraciones más altas de ácidos grasos. Yang y Paulson (2000), necesitaron concentraciones de ácido palmítico superiores a 14,3% (base seca) para observar diferencias significativas en cuanto a la disminución de la fuerza de punción.

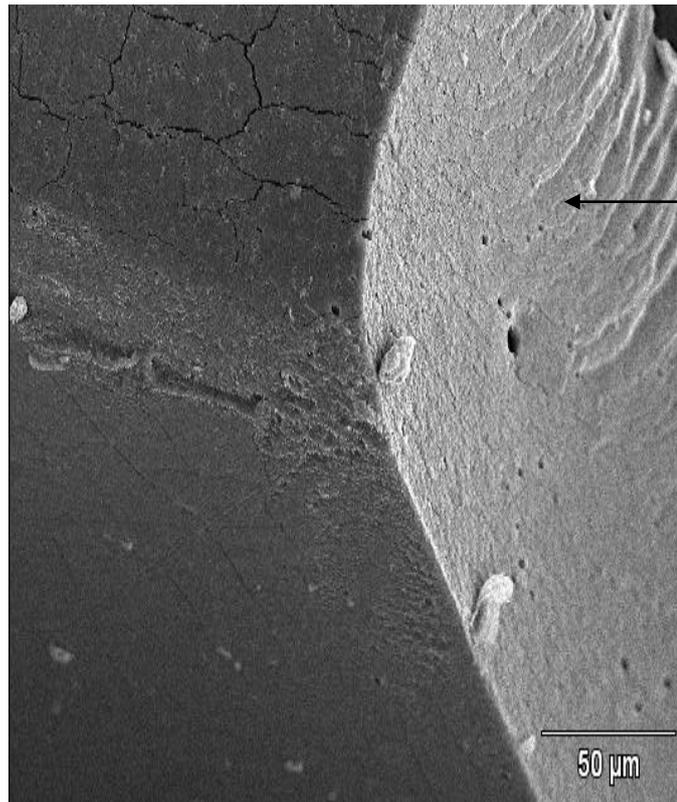
5.4.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Una de las películas desarrolladas (**Formulación 4**) fue examinada con MEB. La **Figura 5** presenta la morfología al microscopio electrónico de barrido de la muestra de película. La MEB permite caracterizar la topografía de una muestra utilizando los electrones secundarios producidos por la interacción inelástica de un haz de electrones primarios de alta energía con la muestra. Su gran profundidad de campo hace que pueda observarse en foco los componentes de la muestra contenida en dicha distancia (Urbina y col., 1997). A través de esta técnica se pudo observar la morfología de la muestra de película comestible de almidón de plátano a las cuales se había incorporado bifidobacterias activas.

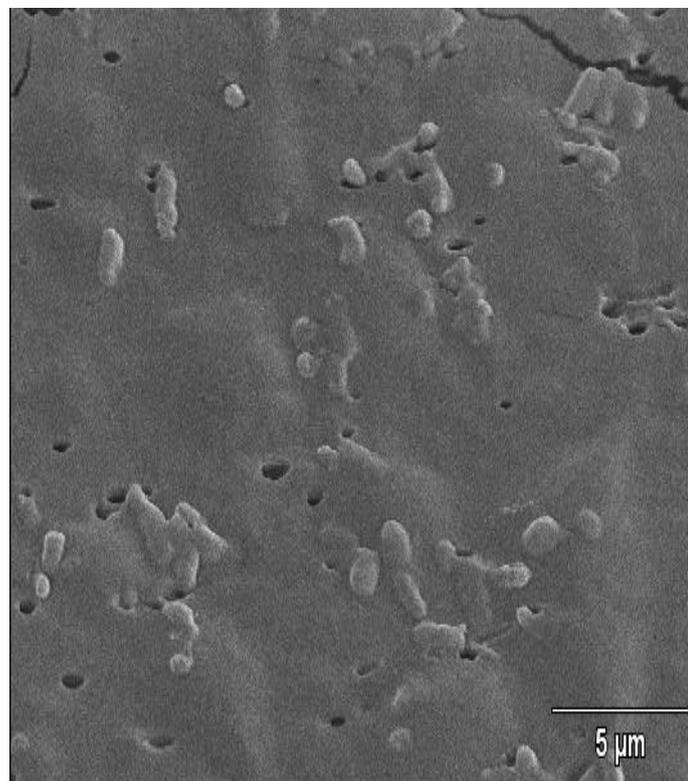
La micrografía obtenida permite observar una estructura uniforme (**Figura 5a**) tanto en la superficie, como en la sección transversal de la película, confirmando así la uniformidad tanto de la emulsión formadora de película (con Ω -3 y glicerol), como la de la solución formadora de película (**SFP**) con glicerol. Por su parte, en la **Figura 5(b)** se pueden ver expuestas la cara superficial y de fractura, mostrando en ambas la presencia de bifidobacterias activas, las cuales se encuentran presentes de forma homogénea en la muestra.



b



c



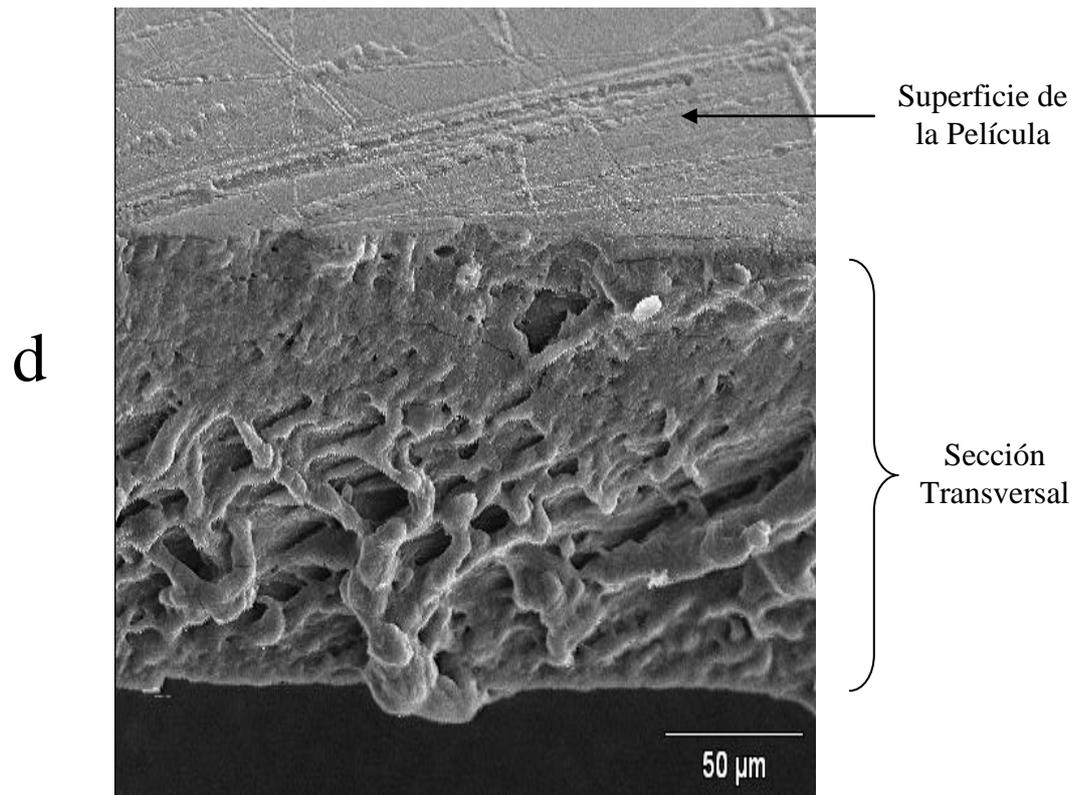


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de una sección de película comestible de almidón de plátano (5%), glicerol (2%), ácidos grasos omega-3 (0,125%) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (1%).

La presencia de bifidobacterias activas puede ser observada de manera muy clara en la **Figura 5(c)**, lo que parecería explicar los resultados de grosor, PVA, SA y RA que fueron discutidos en secciones anteriores.

5.5 Bioensayo del gorgojo de arroz

5.5.1. Superviencia de dietas a base de películas de almidón de plátano con la adición de prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3

Una vez seleccionado el almidón de plátano como el más adecuado por las razones previamente señaladas, para llevar a cabo este estudio, se procedió a alimentar los gorgojos con las formulaciones planteadas (**Tabla 2**) y así poder evaluar el efecto de sus componentes (ácidos grasos omega-3, inulina y

bifidobacterias) a través de la utilización de los biomarcadores supervivencia y variación de peso, para estimar la toxicidad de la dieta (López, 1999).

La **Figura 6** muestra que la supervivencia de los insectos se mantuvo similar para los grupos evaluados hasta el cuarto día del ensayo, después del cual aquellos individuos mantenidos en ayuno (control negativo) comenzaron a morir gradualmente, hasta alcanzar una mortalidad de 91 % en el séptimo día. Por el contrario, los individuos alimentados con arvejas solo presentaron una mortalidad de 6 % al culminar en bioensayo. Resultados similares en la en los grupos control del bioensayo son reportados por Lovera (2008) y Rojas (2008).

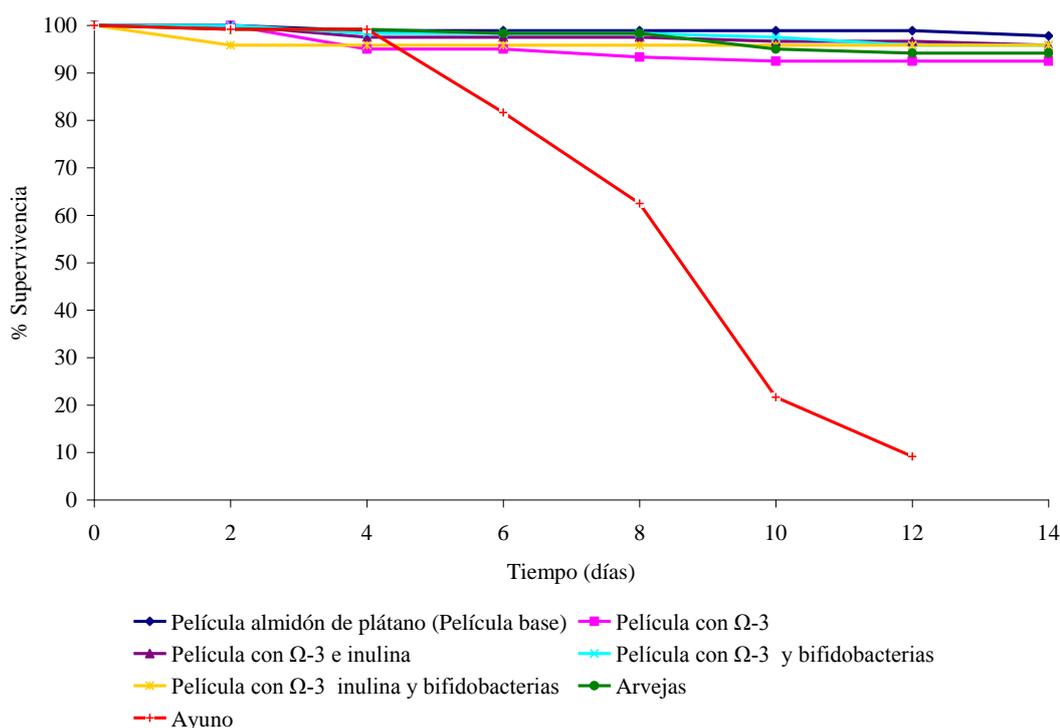


Figura 6. Supervivencia de gorgojos de arroz alimentados con películas de almidón de plátano con ingredientes prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3

En cuanto a las dietas proporcionadas a base de películas comestibles, aquella formulada sólo con almidón de plátano (película base) fue la que presentó el mayor porcentaje de supervivencia (97 %), valor que se encuentra incluso por

encima del control positivo (94 %), pero la diferencia no fue significativa. Los gorgojos alimentados con las formulaciones con ingredientes prebióticos y probióticos mostraron igualmente una alta tasa de supervivencia, motivo por el cual fueron consideradas como dietas nutricionalmente satisfactorias.

Aunque el resto de las dietas a base de películas mostraron un comportamiento similar, con una tasa de supervivencia de 96 % para las formulaciones 3, 4 y 5 (**Tabla 2**), existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la película base y aquella que contiene sólo omega-3 (**Formulación 2**), la cual ocasionó una mortalidad de 8% en la población. A pesar que este resultado no indique toxicidad por parte de la película, es interesante el hecho que desde el primer día del ensayo se observa una disminución de la supervivencia de los insectos, lo cual sugiere que los ácidos grasos utilizados para el enriquecimiento de las películas influyen de manera negativa, es decir, incrementando la mortalidad del gorgojo de arroz.

Los aceites de origen vegetal, son motivo de estudio, ya que su uso permite controlar a este insecto, que como es sabido, representa una plaga para granos y cereales (López, 2008) Numerosos trabajos han comprobado con éxito, que algunos aceites pueden controlar de manera efectiva el ataque del gorgojo de arroz. Se pueden mencionar los estudios realizados por Salas (1984) con aceites de maní, coco, oliva, ajonjolí, soya y ricino; todos ellos ocasionaron la mortalidad del 100 % de la población adulta de gorgojos de arroz en tan solo 3 horas después de impregnar los granos de maíz con los aceites mencionados. Shaaya y col. (1976) han afirmado que ácidos grasos de cadena larga causan una alta mortalidad y señalan que el contacto físico de los adultos con los aceites no es la causa de la

mortalidad observada; los aceites actúan como repelentes y los adultos de *S. oryzae* mueren al no alimentarse. Soon y col. (2003) también comprobaron que los aceites de canela, rábano picante y mostaza son muy eficaces contra este insecto, siendo los vapores emanados por el aceite, el factor tóxico más importante, ya que su acción se ejerce cuando penetran en el insecto a través de las vías respiratorias.

Los estudios realizados por Salas (1984) y Soon y col. (2003) permiten relacionar de alguna forma, la disminución de la supervivencia de los gorgojos alimentados con películas que contenían ácidos grasos omega-3. Por lo tanto, los ácidos grasos omega-3 pudieran estar ocasionando un efecto similar al encontrado por estos autores, es decir, es posible que este ácido graso tenga un efecto deletéreo en el gorgojo de arroz. Sin embargo, la toxicidad o no de los ácidos grasos no puede ser determinada en este estudio, en especial porque la cantidad utilizada fue muy baja en comparación con la dosis aplicada en los trabajos mencionados.

5.5.2. Variación de peso del gorgojo de arroz con dietas a base de películas de almidón de plátano con la adición de prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3

Al estudiar los grupos control en el biomarcador variación de peso (**Figura 4**) se pudo observar un comportamiento similar al expuesto en la sección anterior. Por una parte, el peso disminuyó de manera progresiva y acelerada desde el inicio del ensayo en los insectos mantenidos bajo ayuno. Sin embargo, los individuos alimentados con arvejas, presentaron aumento de peso de 3% con respecto al peso

inicial de los insectos. Este mismo comportamiento fue encontrado por Lovera (2008) y Rojas (2008) en estudios anteriores.

La población que fue alimentada con película base (**Formulación 1**) mostró un aumento de peso superior al del control positivo, aunque el análisis estadístico no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambas dietas. Por su parte, las dietas con bifidobacterias ocasionaron un incremento de peso de 3 %, mientras que aquella que contenía sólo ingredientes prebióticos y ácidos grasos no hubo aumento al finalizar el bioensayo, sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre las tres dietas descritas. Igualmente, Rojas (2008) al alimentar los insectos con películas de almidón de papa con pre y probióticos encontró un aumento de peso en los grupos alimentados con dichas dietas.

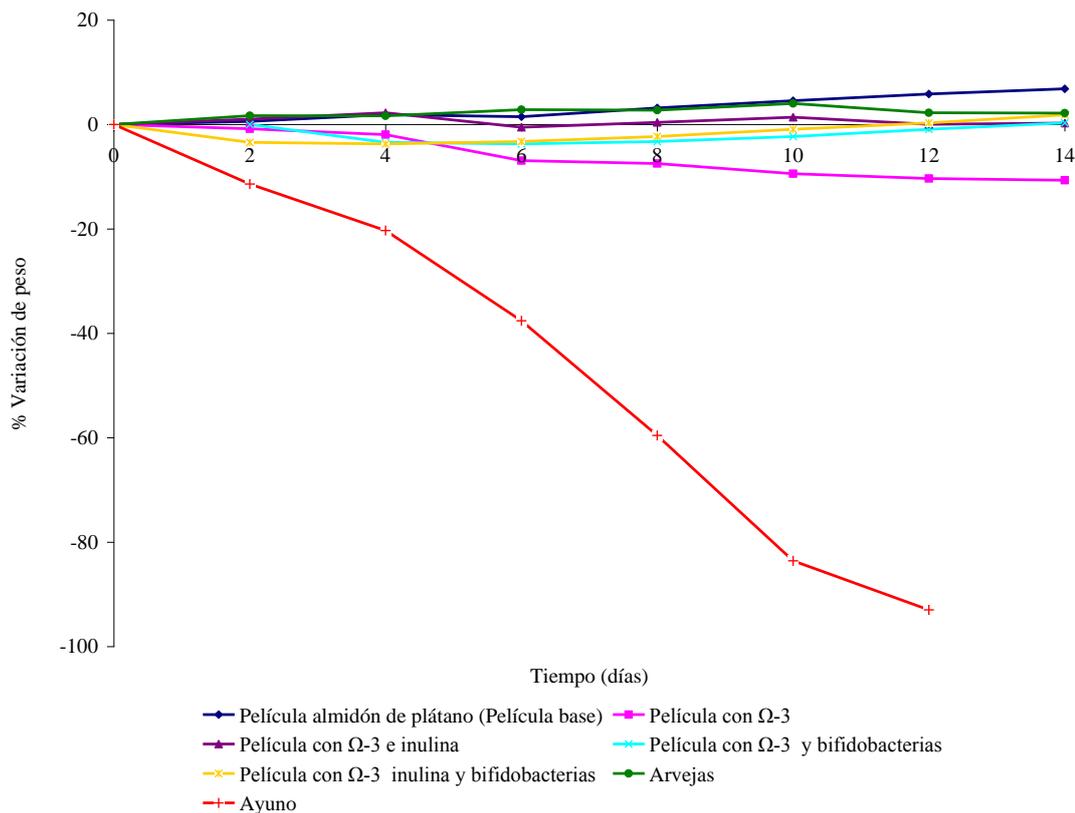


Figura 7. Variación de peso de gorgojos de arroz alimentados con películas formuladas con almidón de plátano con ingredientes prebióticos, probióticos ácidos grasos omega-3

En relación a la dieta cuya película contiene únicamente ácidos grasos omega-3 como ingrediente funcional, se encontró una disminución de 11% del peso de los individuos, lo que podría indicar que el consumo de esta película es menor que el resto y que además alguna manera la adición de pre y probióticos disminuye el efecto que ocasionan los ácidos grasos omega-3 en el gorgojo y confirma el efecto repelente de los ácidos grasos señalado por Shaaya y col. (1976).

Al tomar en cuenta los resultados obtenidos con el estudio de los biomarcadores supervivencia y variación de peso se puede señalar que las películas de almidón de plátano con ingredientes pre y probióticos permitió el crecimiento adecuado del gorgojo de arroz.

5.6. Recuento de bifidobacterias en películas y gorgojos

Como una forma aproximada de evaluar que los microorganismos administrados por la dieta eran incorporados por el insecto, se planteó la realización de un recuento en placas de bífidobacterias, a través de la siembra de gorgojos alimentados con estas dietas.

5.6.1. Bifidobacterias viables en películas comestibles

La **Tabla 8** muestra que las poblaciones de bífidos permanecieron viables y constantes durante el período de almacenamiento estudiado de 15 días. La sobrevivencia y mantenimiento de *B. lactis Bb-12* en las películas comestibles puede ser considerada como satisfactoria.

Tabla 8. Células viables de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 en películas de almidón y gorgojos de arroz alimentados con esas películas comestibles

Tiempo (días)	Log ₁₀ UFC/g			
	PB	PBI	GB	GBI
1	7,29	7,27	2,68	2,72
3	6,96	7,03	2,75	3,08
5	5,77	6,52	2,99	3,15
7	5,02	5,92	3,11	3,28
9	4,32	5,13	3,26	3,52
11	3,48	4,32	3,36	3,57
13	2,59	3,51	3,44	3,70
15	2,04	2,94	3,51	3,83

PB: película con ácidos grasos omega-3 y bifidobacterias.

PBI: película con ácidos grasos omega-3 bifidobacterias e inulina.

GB: gorgojos alimentados con películas con ácidos grasos omega-3 y bifidobacterias.

GBI: gorgojos alimentados con películas con ácidos grasos omega-3, bifidobacterias e inulina.

De acuerdo a estos resultados, se observa una disminución en el número de bifidobacterias viables de cinco ciclos logarítmicos durante el período de estudio.

Estos valores son comparables a los publicados por Rojas (2008) en películas de

almidón de papa, cuya reducción fue de aproximadamente un ciclo logarítmico cada dos días.

Al comparar las películas con y sin inulina se evidencia que la reducción de bifidobacterias viables en el tiempo, es un poco más lenta al incorporar el compuesto prebiótico en la película. De esta forma, se puede inferir que al incluir el microorganismo y su correspondiente sustrato de manera conjunta, se produce una disminución en la tasa mortalidad. Resultados similares fueron reportados por Rojas (2008) en películas de almidón de papa, al utilizar oligofructosa e inulina como elementos prebióticos. El autor indica que la bacteria se beneficia del alimento y los utiliza para subsistir; mientras que cuando sólo se adiciona el microorganismo, la tasa de mortalidad aumenta ocasionado por el agotamiento de las reservas alimenticias.

5.6.2. Bifidobacterias viables en películas el gorgojo de arroz

Los resultados indican una transferencia de bifidobacterias desde las películas hacia los gorgojos, sustentando así los estudios realizados en el área por Rojas (2008). En la **Tabla 8** se evidencia un aumento gradual del número de bifidobacterias viables en el gorgojo de arroz.

Al igual que en las películas comestibles, la adición de inulina en conjunto con bifidobacterias influyó en la viabilidad de los microorganismos. Este efecto que podría decirse “simbiótico” beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los alimentos en el sistema gastrointestinal (Cagigas, 2002).

Para conferir beneficios para la salud de los humanos, el recuento viable de bifidobacterias en el momento del consumo debe ser de 10^6 UFC/g (Samona y Robinson, 1991). La ingestión en números $\geq 10^6$ células por gramo ha sido recomendada para un alimento probiótico clásico como el yogurt (Kurman y Rasic 1991).

VI. CONCLUSIONES

1. Se formularon satisfactoriamente películas comestibles a base de almidón de plátano (5% p/v), yuca (5% p/v) y batata (5% p/v) con glicerol como plastificante.
2. La cantidad de proteína en los almidones de plátano, batata y yuca influyó significativamente en la supervivencia y variación de peso del gorgojo.
3. Tomando en cuenta los biomarcadores supervivencia y variación de peso como indicadores de la toxicidad de la dieta del gorgojo de arroz, fue seleccionado el almidón de plátano como el polímero más adecuado para la incorporación de los componentes funcionales: prebióticos, probióticos y ácidos grasos omega-3.
4. La adición de ácidos grasos omega-3, inulina y bifidobacterias influyó significativamente, aumentando el grosor de las películas.
5. La adición de ácidos grasos omega-3 al 0,125% no influyó de manera significativa en la permeabilidad al vapor de agua en películas de almidón de plátano. Sin embargo, la incorporación tanto de inulina como de bifidobacterias aumentaron la permeabilidad de las películas.
6. La incorporación de inulina y bifidobacterias aumentó la solubilidad de las películas. Por el contrario, la adición de ácidos grasos omega-3 no produjo diferencias significativas en la medición de este parámetro.
7. La adición de ácidos grasos omega-3 disminuyó la capacidad de retención de agua de las películas, mientras que la incorporación de bifidobacterias e inulina ocasionó su disminución.

- 8.** Los resultados de esta investigación indican el potencial de las películas de almidón de plátano de servir como vehículos para la incorporación de compuestos funcionales (ácidos grasos omega-3 e inulina) y bioactivos como los microorganismos benéficos, pues se logró incorporar bifidobacterias viables en concentraciones alrededor de 10^7 UFC/g.
- 9.** Las películas de almidón de plátano sirven como un medio de transferencia de bifidobacterias para el gorgojo de arroz, pues se encontraron bifidobacterias viables en el insecto.

VII. REFERENCIAS

- ✦ Acuña, P. 2007. Componentes esenciales ¿qué son los omega-3?. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina.
- ✦ Arroyo, L., Cotton, L.N., y Martin, J.H. 1995. AMC Agar: A composite medium for selective enumeration of *Bifidobacterium longum*. *Cultured Dairy Products J.* **30**: 12-15.
- ✦ Baldwin, E.A., Nispero-Carriedo, M.O. and Baker, R.A. 1995. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortSci.* **30**: 35-38,56.
- ✦ Baldwin, E.A., Nispero-Carriedo, M.O., Hagemaiyer, R.D. y Baker, R.A., 1997. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technol.* **51**: 56-64
- ✦ Bakry, F., Carreel, F., Jenny, C., Pierre, J. 2008. Genetic improvement. S.M. Jain., P.M Priyadarshan (Eds.), breeding plantation tree crops: tropical species. 2009. *Ethnobot. Res. Appl.* **7**: 199-216.
- ✦ Bengmark S. (1998). Probiotics and prebiotics in prevention and treatment of gastrointestinal diseases. *Gastroenterology International.* **11**: 4-7.
- ✦ Breidt, F. Fleming, H. 1997. Using Lactic Acid Bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* **51**: 44-48.
- ✦ Buleón, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 85-112.
- ✦ Cagigas, A. y Anesto, J. 2002 Prebióticos y probióticos: una relación beneficiosa. *Revista Alim. Nutr.* **16**: 63 – 68.

- ⊕ Carmona, A., Gómez – Sotillo, A. y Casotto, M. 1998. Toxicología nutricional: un enfoque “artropocéntrico”. *Mem. Inst. Biol. Exper.* **1**: 37 – 40.
- ⊕ Carmona, A., Gómez – Sotillo, A. y Seidl, D.S. 1993. Uso de pruebas bioquímicas para el estudio de problemas nutricionales en *Canavalia ensiformis*. En: Vargas, R., León, A. y Escobar, A. *Canavalia ensiformis* (L) (DC). Producción, procesamiento y utilización en alimentación animal. Editorial Futuro. San Cristobal. 141 – 152.
- ⊕ Carmona, A., López, Y., Gómez – Sotillo, A., Cassoto, M. 2001. Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *Mem. Inst. Biol. Exper.* **3**: 53–56.
- ⊕ Carrasco, E.U., Villarroel, M. Cevallos, L.C. 2002. Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad sensorial de pimentones verdes (*capsicum annum* L) durante el almacenamiento. *Arch Latinoam Nutr.* **52**:84-90.
- ⊕ Ceballos, H., Sánchez, T., Morante, N., Fregene, M., Dufour, D., Smith, A., Denyer, K., Pérez, J., Calle, F., Mestres, C. 2007. Discovery of an Amylose-free Starch Mutant in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Agric. Food Chem.* **18**: 7469–7476
- ⊕ Charteries, O.; P. M. Kelly; L. Morellu y K. Collins. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *Int. J. Food Microbiol.* **35**: 1-27.

- ⊕ Chinnan, M., y Park, H.J. (1995). Effect of plasticizer level and temperature on water vapor transmission of cellulose-based edible films. *J Food Process Eng.* **18**: 417-429.
- ⊕ Curtis, H. Barnes. S. N., Schnek, A., Massarini, A. 2008. Biología. Séptima Edición. Editorial Panamericana.
- ⊕ Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.A., Voilley, A. 1998. Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review. *Food Sci Nutr.* **38**: 299-313.
- ⊕ Díaz-Sobac, R., Beristain, C. y Vernon-Carter, E. 2001. Water Vapor Permeability of an Emulsion Coating of Maltodextrin and Surfactants. *J. Food Processing and Preservation.* **25**: 25-34.
- ⊕ Englberger, L., Wills, R. B. H., Blades, B., Dufficy, L., Daniells, J.W. And Coyne, T. 2006. Contenido del carotenoide y color de la carne de los cultivares seleccionados del plátano que crecen en Australia. *Food. Nutr. Bull.* **27**: 281-291.
- ⊕ F.A.O. 1993. Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. Santiago de Chile.
- ⊕ FAO/WHO. 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- ⊕ García, M.A., Martino, M.N y Zaritzky., N.E. 2000. Lipid addition to improve barrier properties of edible Storch-based Films and coatings. *J. Food Sci.* **(65)**:

- ✦ Gontard, N., Guilbert, S., Cuq, C.L. 1992. Edible wheat gluten film: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* **57**: 190-199.
- ✦ Gontard, N., Thibault, R., Cuq, B., Guilbert, S. 1996. Influence of Relative Humidity and Film Composition of Oxygen and Carbon Dioxide Permeabilities of Edible Films. *J. Agric. Food Chem.*, **44**: 1064-1069.
- ✦ González, I. 1992. Producción y uso potencial de batata (*Ipomoea batata*) en Venezuela. Seminario de grado. ICTA-UCV. Caracas, Venezuela.
- ✦ González, Z y Pérez, E. 2003 Evaluación fisicoquímica y funcional de almidones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) pregelatinizados y calentados con microondas. *ACV* **54**:.127-137.
- ✦ Greener, I. K. y Fennema, O. 1989. Barrier Properties and Surface Characteristics of Edible Bilayer Films. *J. Food Sci.* **54**: 1393-1399.
- ✦ Gregorová, E., Pabst, W., Boháček, I. 2006. Characterization of different starch types for their application in ceramic processing. *J.Ceram. Soc.* **26**: 1301-1309.
- ✦ Guilbert, S., Biquet, B. 1996. Food Packaging Technology. Edible films and coatings. G. Bureau, J.L. Multon (eds.), VCH Publishers, Inc, Primera edición, New York, U.S.A.
- ✦ Howard, L.R. y González, A.R. 2001. Food safety and produce operations what is the future? *Hort. Sci.* **36**: 33-39.
- ✦ Han, J.H. 2002. Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. CRC-Press. Boca Ratón, Florida.
- ✦ Han, J.H. 2003. Antimicrobial food packaging. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge. UK.

- ✦ Han, J.H. 2005. Innovations in food packaging. Págs. 239-262 en: Han, J.H., Gannadios, A (eds.), Edible films and coating. Elsevier Academic Press, Primera edición, Amsterdam, The Netherlands.
- ✦ Hernández, O. 2006. Películas y coberturas comestibles a base de diferentes almidones: digestibilidad in vitro de películas y caracterización física de coberturas sobre fresas (*Fragaria ananassa*). Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- ✦ Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., y Huis in'tVeld, J. H. J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85–101.
- ✦ Holzapfel, W.H., Schillinger, U., 2002. introduction to pre- and probiotics. *Food Res Int.* **32**: 109-116.
- ✦ Kaya, S. y Kaya A. 2000. Microwave drying effects on properties of whey protein isolate edible films. *J. Food Eng.* **43**: 91-96.
- ✦ Kester, J.J. y Fennema, O..1986. Edible Films and Coatings: a review. *Food Technol.* **40**: 47-59.
- ✦ Klaenhammer, T.R. 2000. Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow. *J. Nutr. Suppl.* **30**: 415S-416S.
- ✦ Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible coatings and films to improve food quality. CRC Press. Primera edición.
- ✦ Kurman, J. y Rasic, L. 1991. The health potentials of products containing bifidobacterias. In therapeutic properties of fermented milks. Ed. Elsevier Applied science, Londres, 117-157.
- ✦ Law, J. Y Wells, M. 1989 Insects as biochemical models. *J. Biochem.* **264**: 16352 – 16338.

- ⊕ Lee, K.Y., Shim, J., Lee, H.G. 2004. Mechanical properties of gellan and gelatin composite film. *Carbohydr. Polym.* **56**: 251-254.
- ⊕ Li, J.H., Vasanthan T., Hoover R., Rossnagel B.G. 2004. Starch from hull-less barley: IV. Morphological and structural changes in waxy, normal and high-amylose starch granules during heating. *Food Res. Int.* **37**: 417-428.
- ⊕ Lindorf, H.; Parisca, L.; Rodríguez, P. (1999). Botánica. Clasificación, estructura y reproducción. Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central De Venezuela. Caracas, Venezuela. 409-424.
- ⊕ López, Y. 1999. Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- ⊕ López .M 2008. Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismos bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado. Tesis doctoral. Universidad de Murcia.
- ⊕ Maguiña, G. 2001. Incorporación de *Bifidobacterium* sp como componente fisiológicamente activo en una matriz vegetal. Tesis de Maestría. Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.
- ⊕ Mali, S., Grossman, M.V.E., ; García M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N. 2006. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch. *J. Food Eng.* **75**: 453-460.
- ⊕ Marques, P.T , Pérégo C., Le Meins, J.F., Borsali, R., Soldi, V. 2006. Study of gelatinization process and viscoelastic properties of cassava

starch : Effect of sodium hydroxide and ethylene glycol diacrylate as cross-linking. *Carbohydr. Polym.* **66**: 396-407.

- ⊕ Martin-Polo, M., Mauguin, C., Volley, A..1992. Hydrophobic Films and Their Efficiency against Moisture Transfer. 1. Influence of the Film Preparation Technique. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 407-412.
- ⊕ Marti del Moral, A, Moreno-Aliaga, M.^a J. y Martínez Hernández , J. Alfredo 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutr Hosp.* **4**: 181 – 188.
- ⊕ McHugh, T.H., Krochta, J. 1994. Milk-Protein-Based Edible Film and Coatings. *Food Technol.* **48**: 97-103.
- ⊕ Melián, D. 2006. Desarrollo de una película comestible funcional a base de gelano incorporando componentes fisiológicamente activos. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- ⊕ Millán, N., Brito, O. y Hevia, P. 1984. Purine enzymes and uric acid excretion as indicator of protein quality in chicken fed soy – gelatin mixture. *Nutr. Rep. Int.* **80**: 1367 - 1376
- ⊕ Millán, G y Carmona, A. 2005. Estudios nutricionales con *Tribolium castaneum*. *Mem. Inst. Biol. Exper.* **4**: 53 – 56.
- ⊕ Montaldo, A. 1992. Cultivos de raíces y tubérculos tropicales. Instituto Internacional del Ciencias Agrícolas de la OEA. Serie Textos y Materiales De Enseñanza No 21. Segunda edición. San José.
- ⊕ Montaldo, A., Mantilla, J.E., Perdomo, D. y Madriz, P. 1996. El cultivo de yuca en Amazonas y sus posibilidades de transformación en La Yuca Frente al Hambre del Mundo Tropical. Facultad de Agronomía y Ciencias

Veterinarias, Rectorado Universidad Central de Venezuela, Confederación Nacional de Asociaciones de Productores Agropecuarios, Centro de Cooperación Tecnológica de las Universidades y el Sector Productivo y Fondo de Crédito Agropecuario, Maracay, Venezuela. 219-229.

- ⊕ Moorthy, S. N., & Mathew, G. N. (1998). Cassava fermentation and associated changes in physicochemical and functional properties. *Food Sci Nutr.* **38**: 73–121.
- ⊕ Moyad, M.A. 2005. An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acid for general health and prevention. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.***23**: 28-48.
- ⊕ Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Review of *Food Sci and Nutrition.* **38**: 13-126.
- ⊕ Payne, J. F., Morris, A. E. J., Beers, P. 1998. Note: Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk . *J Appl Microbiol.* **86**: 353-353.
- ⊕ Pellet, P. L. 1973. Methods of protein evaluation with rats. En: Proteins in human nutrition, Porter, J y Rolls, B. Academic Press, Londres. **1**: 225-244.
- ⊕ Pérez, E. 2007. Raíces y Tubérculos. En: Edel, A.; y Rosel, C. De Tales Harinas Tales Panes. Báez Ediciones. Córdoba, Argentina.
- ⊕ Piqué, G. G. 1986. Omega-3 the fish oil factors. Primera Edición.
- ⊕ Ramón-Avalos, S.; Arambula-Villa, G.; Rosas-Acevedo, J. 2008. El Uso de Yuca y Camote en la Industria Alimenticia, como Recurso Potencial

para la Obtención de Almidones y Alternativa de Desarrollo para la Agricultura Rural. México.

- ✦ Resh, V. y Cardé, R. 2003. Encyclopedia of insects. Academic Press. California, USA.
- ✦ Rhim, J.W. 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **37**: 323-330.
- ✦ Rickard, J. E., Asaoke, M., Blanshard, J. M. V. 1991. The physicochemical properties of cassava starch. *Trop. Sci.* **31**: 189-207.
- ✦ Roberfroid M.B. (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 1682S-1687S
- ✦ Rojas, C. 2008. Evaluación nutricional de películas comestibles con ingredientes pre y probióticos usando como modelo biológico el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- ✦ Rojas-Graü, M.A., Tapia, M.S., Rodríguez, F.J., Carmona, A., y Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan-based edible coatings as carriers of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apples. *Food Hydrocolloid.* **21**: 118-127.
- ✦ Romero-Bastidas, C., Bello-Pérez, L., García, M., Martino, M., Solorza-Feria, J & Zaritzky, N. 2005. Physicochemical and microestructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. *Carbohydr. Polym.* **60**: 235-244.

- ✦ Salas, J. 1984. Protección de semillas de maíz (*zea mays*) contra el ataque de *Sitophilus oryzae* a través del uso de aceites vegetales. *Agronomía Trop.* **(35)**: 13-18.
- ✦ Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. y Lee Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined?. *Trend. Food Sci. Technol.* **10**: 107-110.
- ✦ Salunke, D.K. 1984. Banana and Plantain, in: Postharvest Biotechnology of Fruit. Ed D.K Salunke, B.B Desai, C.C Press, Boca Raton. **1**: 43-57.
- ✦ Santos, A.; San Mauro, M. y Marquina Díaz, D. 2005. Prebiotics and their long-term influence on the microbial populations of the mouse bowel. *Food Microbiol.*
- ✦ Shaaya, E., G. Grossman y R. Ikan. 1976. The effect of straight chain fatty acids on growth of *Calandra oryzae*. *Israel J. Entom.* **(11)**: 81-91.
- ✦ Slattery, C.J., Kavakii I.H., Okiro, T.W. (2000) "Engineering starch for increasing quality" *Trends Plant Sci.* **7**: 291-298.
- ✦ Soon-II. K., ;Jung-Yeon, R., Do-Hyoung, K., Han-Seung, L ., Young-Joon, A. 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chilensis*. *J. Stored Prod Res.* **(39)**: 293-303
- ✦ Sothornvit, R., Krochta, J. M. 2000. Plasticizer effect on oxygen permeability of β -lactoglobulin films. *J. Food Eng.* **50**:149-155.
- ✦ Sriburi, P., Hill, S. E., & Mitchell, J. R. (1999). Effects of L-ascorbic acid on the conversion of cassava starch. *Food Hydrocolloids*, **13**: 177–183
- ✦ Tapia, M.S., Carmona, A. 2008. Uso de la impregnación a vacío y de películas comestibles en el desarrollo de un alimento funcional a base de

papaya (*Carica papaya* L.) c.v Maradol. *Mem. Inst. Biol. Exper.* **5**: 110:114.

- ✦ Tapia, M.S., Rojas-Graü, M.A., Rodríguez, F.J., Ramírez, J., Carmona, A. y Martín-Belloso, O. 2007. Alginate and gellan based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J. Food Sci.* **72**: 190-E196.
- ✦ Thitipraphunkul, K., Uttapap, D., Piyachomkwan, K., Takeda Y.A. 2003. Comparative study of edible canna (*Canna edulis*) starch from different cultivars. Part II. Molecular structure of amylose and amylopectin. *Carbohidr. Polim.* **53**: 317-324.
- ✦ Tojo Sierra, R., Leis Trabazo, R. 2003. Alimentos funcionales. Su papel en la nutrición preventiva y curativa. *Bol. Pediatr.* **43**: 376-395.
- ✦ Turhan, K.N. Sahbaz, A. Y Güner, A. 2001. A Spectrophotometric Study of Hydrogen Bonding in Methylcellulose-Based Edible Films Plasticized by Polyethylene Glycol. *J. Food Sci.* **66**: 59-62.
- ✦ Urbina, C., Rodríguez, P., Finol, H., Mérida, T. y Ogura, M. 1997. Introducción a la microscopía electrónica -Guía teórico-práctica- (Curso de pregrado licenciaturas en Biología y Química). Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Centro de Microscopía Electrónica, Caracas, Venezuela. 64 p. Disponible en: www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/prodrigu/archivos/Guia%20completa%20ME.pdf. Consultada: marzo 2010.
- ✦ Vasiljevic, T., Shah, N.P. 2008. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* **18**: 714-728.
- ✦ Velásquez C., Trivelli, H. 1983. distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Archivo de

documentos de la FAO, X5030/5. Santiago de Chile:
<http://www.fao.org/docrep/x5030s/x5030s01.htm> [Consulta: 28 de marzo de 2009].

- ⊕ Vonk, H. y Westerns, R. 1984. Comparative biochemistry and physiology of enzymative digestive. Academic. Nueva York. EE.UU. 509.
- ⊕ Vuylsteke, A., Hartman, B., Tenkovano, E. 1999. Perspectiva de los mejoradores con respecto a la biotecnología para el mejoramiento de *Musa*. Informusa. *La Revista Internacional sobre banano y plátano*. **8**: 1-15.
- ⊕ Von Loesecke, H.W. 1950. *Bananas*. Segunda Edición. New York: Interscience.
- ⊕ Yang, L., Paulson, A.T., 2000. Mechanical and water vapour barrier properties of edible gellan films. *Food Res Int.* **33**: 563-570.
- ⊕ Zhang, T., Oates, C. G. 1999. Relationship between α -amylase degradation and physico-chemical properties of sweet potato starches. *Food Chem.* **65**: 157–163.