



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Evaluar por medio de un método químico-enzimático el efecto del consumo de
carbohidratos simples y complejos sobre el contenido de glucosa, trehalosa y
glucógeno en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*)**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por el bachiller
Dennis Alexander Lugo González
como requisito parcial para optar por
el título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. Ana Gómez

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL 2009

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Centro de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela; bajo la dirección de la Doctora Ana Gómez.

El presente Trabajo Especial de Grado presentado por el bachiller

Dennis Alexander Lugo González

Ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología y titulado:

Evaluar por medio de un método químico-enzimático el efecto del consumo de carbohidratos simples y complejos sobre el contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*).

Fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección de la Dra. Ana Gómez, siendo aprobado en discusión pública por los siguientes miembros del jurado, designados por el Consejo de Escuela, quienes consideraron que cumplió con los requerimientos exigidos por el reglamento universitario.

Caracas, a los 28 días del mes de abril del año 2009.


Dra. Ana Gómez
(Tutor)


Dra. Meris Casotto
(Jurado)


Dra. Anna María Cioccia
(Jurado)

RESUMEN

En el presente trabajo, se estudió el efecto del consumo de carbohidratos complejos de diferente biodisponibilidad (almidón de maíz y almidón de papa) y de un carbohidrato simple (glucosa), sobre el contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*), mediante la utilización de un método químico-enzimático. Además se analizó cómo son afectadas las principales rutas metabólicas en la presencia de estos carbohidratos, a través de la composición corporal. El método-químico enzimático, permite cuantificar los niveles de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz. Para la aplicación del método es necesario deshidratar y desgrasar a los insectos, con lo cual se asegura la inactivación de las enzimas presentes en el homogeneizado. Se determinó que cantidades de glucosa mayores a 0,11 mg, obtenidas por hidrólisis de trehalasa (0,1 U), deben ser diluidas para no subestimar el contenido de trehalosa y se requiere un mínimo 30 insectos. La ingesta de carbohidratos complejos (almidón de maíz y almidón de papa), que difieren en su contenido de almidón resistente total, ocasionaron un aumento en el peso y en las reservas corporales (glucógeno y grasas), con relación al control positivo (arveja). La ganancia fue mayor en insectos alimentados con almidón de maíz ($15,04 \pm 0,88$ %; $0,233 \pm 0,032$ % grasa y glucógeno, respectivamente). Indicando que el mayor contenido de almidón resistente total (almidón de papa), afecta la biodisponibilidad del almidón. El suministro de un carbohidrato simple (glucosa 5 %), disminuyó el peso de los insectos un 5 % (respecto al control positivo), a pesar del acentuado decrecimiento en el contenido de grasa ($8,83 \pm 1,63$ %). Por otra parte, los resultados obtenidos para los insectos sometidos a ayuno y ayuno con suministro de agua, sugirieron que un incremento del agua corporal, parece favorecer al mejor aprovechamiento de las reservas del individuo. El contenido de glucosa y glucógeno en los insectos se vio influenciado por los diferentes carbohidratos suministrados. Sin embargo, no se altera el nivel de trehalosa en la hemolinfa del insecto. Esto podría indicar, que el mantenimiento de este disacárido es fundamental para el organismo. Los carbohidratos simples y complejos, promovieron la pérdida de las proteínas corporales con respecto al control positivo. Los análisis estadísticos de correlaciones simples y de componentes principales, señalaron que el contenido de agua corporal presenta una correlación negativa con el contenido de grasa corporal. Por otro lado, se obtuvo que las variables de glucosa, de glucógeno y de grasa presentaron correlaciones positivas entre ellas, siendo mayor para las dietas de almidón. Las variables de supervivencia, variación de peso corporal y contenido de trehalosa, presentaron una correlación positiva y las dietas de carbohidratos no influyen directamente sobre la variable trehalosa.

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, Virginia Lugo, mujer emprendedora y luchadora, que me ha enseñado y apoyado; me ha dado la fuerza y el valor, me lo ha dado todo sin importar los costos, el esfuerzo y es la que mas amo sobre todas las cosas.

A mi hermano, Alexis Lugo, quien me ha protegido y ha sido la felicidad de la casa.

A mi otra familia, Nancy Maldonado, Maria Elena Bafonni², Zoramith Roldan, Ana Prada y Omaira Falcon, que siempre han estado ahí y siempre lo estarán.

A mis hermanas, Tania D`Amelio, Miriam Che, Olga Figuera y Alejandra Zamora, mis compañeras inseparables que me han brindado infinita felicidad, me han apoyado, escuchado y comprendido incondicionalmente, gracias por ser parte de mi vida.

A mis panas, Hector, Alejandro, William, Arneld, Alberto, Diego, Jennifer, Wilmer, Jacklin, Cheo, Anibal, Andrecho, Jamileth, Leonardo, Cristiam, Yurbis, Patricia, Jomaira, Rosangela, Jesnareth, Indira, Edgar, Leo, Juan Manuel, Diamaris, Vero, Verónica, Jesús, Caballito, Johanna, Orlando, Carolina, Vanesa, Samantha, Milagros, Claudia, Mayre, Roxana, Ariane, Miguel, entre otros que ahora no recuerdo; por estar ahí, compartir conmigo y hacerme mejor los momentos, por su amistad ahora y siempre.

A todos los profesores de la Escuela de Biología de la Universidad Central de Venezuela, Dr. Juan Carlos Navarro, Dr. Matias Reyes, Dra. Concepción Hernández, Dr. Blas Dorta, Dra. Palmira Guevara, entre muchos otros, los cuales influyeron en mi aprendizaje profesional y de vida.

A mi tutora, Ana Gómez, por sus enseñanzas, por su apoyo, cariño, paciencia, amistad y por su confianza en mí.

A mis profesores del Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, Dr. Alexander Laurentin y Dra. Meris Casotto, los cuales me apoyaron, me brindaron su amistad, me aconsejaron y enseñaron.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, Lic Mighay Lovera, Lic Gabriel Marín, Moisés Gamero, que sin dudarlo siempre me brindaron apoyo y me ayudaron en los momentos mas críticos de este trabajo.

Al Dr. Andrés Carmona y la Dra. Anna Maria Cioccia, por su cariño y apoyo, quienes con sus consejos lograron mejorar este trabajo.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, por educarme y formarme profesionalmente como investigador.

A Dios, por su protección y por todas las personas maravillosas que me han rodeado en el transcurso de mi vida...

A todos, de todo corazón MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	5
2.1 Consideraciones iniciales sobre los insectos.....	5
2.2 <i>Sitophilus oryzae</i>	6
2.3 El tubo digestivo de insectos.....	7
2.4 Enzimas digestivas.....	9
2.4.1 Digestión de proteínas.....	10
2.4.2 Composición de los carbohidratos de la dieta y su digestión.....	10
2.4.2.1 Digestión de carbohidratos.....	11
2.4.2.2 Carbohidratos: glucosa, trehalosa y glucógeno.....	13
2.4.2.3 Consecuencia del desbalance de nutrientes.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1 Cultivo del gorgojo de arroz (<i>Sitophilus oryzae</i>).....	17
4.2 Dietas.....	17
4.3 Diseño experimental.....	18
4.4 Determinación del porcentaje de supervivencia y variación de peso.....	19
4.5 Composición corporal.....	19
4.5.1 Determinación del contenido de agua.....	19
4.5.2 Determinación del contenido de grasa.....	20
4.5.3 Determinación del contenido de carbohidratos.....	20
4.5.3.1 Determinación del contenido de glucosa.....	21
4.5.3.2 Determinación del contenido de trehalosa.....	21
4.5.3.3 Determinación del contenido de glucógeno.....	22
4.5.3.3.1 Método de antrona-ácido sulfúrico.....	22
4.5.4 Determinación de la especificidad y sensibilidad del método químico-enzimático.....	22
4.5.4.1 Especificidad.....	22
4.5.4.2 Sensibilidad.....	23
4.5.5 Determinación del contenido de cutícula, nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular.....	24
4.5.5.1 Extracción de proteínas.....	24
4.5.5.2 Digestión de muestras.....	24
4.5.5.2.1 Determinación del contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler.....	25
4.5.6 Determinación del parámetro “Otros”.....	25
4.6 Determinación de la concentración de proteínas solubles.....	26
4.7 Análisis estadístico.....	26
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
5.1 Estandarización del método químico-enzimático para la determinación de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz.....	27
5.1.1 Efectos de la deshidratación y del desgrase sobre el contenido de carbohidratos.....	27

5.1.2 Especificidad y sensibilidad del método químico-enzimático.....	30
5.2 Efectos de las dietas a base de carbohidratos simples y complejos sobre la supervivencia y la variación de peso corporal en el gorgojo de arroz adulto.....	34
5.2.1 Supervivencia.....	34
5.2.2 Variación de Peso.....	37
5.3 Variación de la composición corporal del gorgojo adulto alimentado con carbohidratos con diferentes biodisponibilidad.....	41
5.3.1 Contenido de agua corporal.....	42
5.3.2 Contenido de grasa corporal.....	44
5.3.3 Contenido de carbohidratos.....	46
5.3.3.1 Contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz alimentado con carbohidratos simples y complejos.....	48
5.3.4 Contenido de nitrógeno proteico y de proteínas solubles.....	51
5.3.5 Contenido de cutícula y nitrógeno cuticular.....	53
5.3.6 Contenidos de “otros”.....	53
5.4 Análisis de Componentes Principales.....	59
6 Consideraciones finales.....	65
7 CONCLUSIONES	67
8 REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de nutrientes por cada 100 g de cada una de las dietas.....	18
Tabla 2. Peso promedio y composición corporal de gorgojos alimentados con carbohidratos con diferente biodisponibilidad.....	55
Tabla 3. Resumen de los coeficientes de correlación simple producto de las correlaciones simples entre los diferentes parámetros medidos en el ensayo con el <i>Sitophilus oryzae</i>	56
Tabla 4. Carbohidratos de la composición corporal (glucosa, trehalosa y glucógeno) del gorgojos alimentados con carbohidratos con diferente biodisponibilidad.....	57
Tabla 5. Valores de proteínas solubles presentes en el gorgojo de arroz y estimadas por el método de Lowry.....	58
Tabla 6. Valores de los autovalores y porcentaje de varianza de los componentes principales.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Número de especies descritas.....	6
Figura 2. Gorgojo de arroz, <i>Sitophilus oryzae</i>	7
Figura 3. Diagrama general del tubo digestivo de insectos.....	9
Figura 4. Interconversión de glucógeno, trehalosa y glucosa.....	14
Figura 5. Efecto de la deshidratación y del desgrase en la cuantificación del contenido de carbohidratos (glucosa, trehalosa y glucógeno).....	29
Figura 6. Número de insectos requeridos para la cuantificación de carbohidratos....	32
Figura 7. Proporcionalidad entre la cantidad de trehalosa hidrolizada y de glucosa producida.....	33
Figura 8. Supervivencia de los insectos, mantenidos en las diferentes condiciones control: ayuno (Ay), arveja (Ar) y agar al 4 % (Ag).....	35
Figura 9. Supervivencia del gorgojo de arroz durante 8 días de los controles, ayuno (Ay), arveja (Ar), agar al 4 % (Ag), comparada con las poblaciones que fueron alimentadas con glucosa al 5 % (Glu), almidón de maíz (AM) y almidón de papa (AP).....	37
Figura 10. Variación de peso del gorgojo de arroz durante 8 días de los controles, ayuno (Ay) arveja (Ar) y agar al 4 % (Ag).....	39
Figura 11. Variación de peso del gorgojo de arroz durante 8 días de los controles, ayuno (Ay), arveja (Ar) y agar al 4 % (Ag) comparada con las poblaciones de fueron alimentada con glucosa al 5 % (Glu), almidón de maíz (AM) y almidón de papa (AP).....	40
Figura 12. Biplot de la ubicación de las muestras (7 dietas con cuatro réplicas cada una) según sus coordenadas en los dos componentes principales y los autovectores de la variables.....	64

1 INTRODUCCIÓN

La nutrición es un conjunto de procesos, que envuelve la ingestión, la digestión, la absorción, el metabolismo y la excreción de los nutrientes, con la finalidad de producir energía y mantener las funciones del organismo. Todos los animales son heterotróficos, teniendo la necesidad de ingerir sustancias orgánicas preformadas para la obtención de energía (Thompson y Simpson, 2003). Estas sustancias orgánicas, son denominadas nutrientes. En general, los animales necesitan de los mismos nutrientes básicos (proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales) los cuales forman parte de los alimentos (Klowden, 2007).

Los requerimientos nutricionales, cambian de acuerdo con la necesidad orgánica del individuo y ésta varía con la demanda energética que será diferente según: el sexo, la edad y el estado fisiológico. La carencia de algún o algunos nutrientes, ocasionan un desequilibrio metabólico que conlleva a enfermedades crónicas (WHO/FAO, 2003). Siendo así, el alimento debe satisfacer ciertos parámetros, no sólo de cantidad, sino también de calidad, la cual está determinada por la biodisponibilidad de los nutrientes. Bajo el termino “biodisponibilidad” se intenta incluir el resultado de una secuencia compleja de eventos metabólicos (digestibilidad, solubilización, absorción, acumulación y liberación tisular, transformaciones enzimáticas, secreción y excreción) difíciles de medir y dependientes de la dieta (Carmona y Liuzzi, 1998).

Diferentes estudios han sido desarrollados para comprender los procesos que se presentan bajo el término de biodisponibilidad, enfocados principalmente en la determinación del valor nutritivo de los diversos alimentos, en la composición química y concentración del nutriente y de su utilización digestiva y metabólica.

Durante la época de los 70 y los 80 hubo un gran avance en los estudios relacionados a la composición química de los alimentos, fueron desarrollados métodos precisos y confiables, siendo posible la identificación de vitaminas y sus isómeros por HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia), así como otros componentes que no habían sido considerados importantes, al mismo tiempo que se fueron esclareciendo las relaciones entre alimentación, salud y enfermedad (Giuntini y col., 2006). En cuanto a la determinación del valor nutritivo de los diferentes alimentos, fueron implementadas diversas técnicas, entre otras, se encuentran los estudios realizados de digestibilidad *in vivo*, donde ha sido utilizado como modelo biológico aves, peces y mamíferos (Jonson y col., 1998), estos ensayos encarecen la investigación y en varios casos la torna inviable; otra alternativa fueron los métodos enzimáticos de digestión *in vitro*, donde se trata de reproducir el proceso digestivo (Talma, 1995; Carmona, 1998). Estos métodos han sido empleados no sólo con alimentos utilizados en la nutrición humana, sino también buscando optimizar los sistemas de producción animal (Fernandes y col., 2001; Portugal, 1994).

Diferentes modelos biológicos (aves, peces, mamíferos e insectos) son utilizados para estudios nutricionales. Los bioensayos con insectos, han sido utilizados con éxito, debido a la similitud de los procesos biológicos que estos presentan con los vertebrados. Sin embargo, algunos procesos metabólicos distintivos son encontrados en insectos (Klowden, 2007), por ejemplo, la síntesis de trehalosa en los cuerpos grasos a partir de glucosa y/o glucógeno (Thompson y Simpson, 2003). Otra diferencia importante, es que estos animales no poseen la capacidad para la esteroidogénesis y la fuente de colesterol es completamente dependiente de la dieta (Law y col., 1989).

En el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental, han sido implementado los bioensayos con *Tribolium castaneum* y

Sitophilus oryzae. Estos modelos biológicos, tienen como ventaja la corta duración y el menor costo de los experimentos, la pequeña cantidad de alimento requerida para cada ensayo y se trabaja con “pequeñas poblaciones” lo cual disminuye la variabilidad de los parámetros estudiados y facilita los análisis estadísticos. No obstante, los resultados deben ser analizados dentro de los límites que imponen las diferencias cualitativas existentes entre las especies (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). El bioensayo con el gorgojo de arroz ha permitido identificar diferentes biomarcadores, útiles para estudiar la toxicidad y/o el valor nutritivo de diferentes dietas (Carmona y col., 1993; Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 2001); entre ellos destacan el monitoreo de la supervivencia y la determinación de la composición corporal, estimándose la contribución al total del agua, grasa, proteínas y “otros”. Bajo el renglón “otros” se engloban: carbohidratos, esqueletos carbonados de las proteínas, cutícula y cenizas (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). Dependiendo de la composición y calidad nutricional de la dieta, se producen cambios en la disponibilidad de sustratos y coenzimas que afectan la actividad de las principales rutas metabólicas. Estas variaciones pueden monitorearse midiendo los cambios de composición corporal en relación a la composición inicial.

Debido a la importancia de los carbohidratos en el metabolismo, en el presente trabajo se propuso desarrollar un método químico-enzimático, que permitió determinar el contenido de carbohidratos como parte de la composición corporal, así como evaluar mediante este método los efectos del consumo de carbohidratos simples y complejos (con diferente biodisponibilidad) sobre el contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*) L. (Coleóptera: Curculionidae). Además, se pretendió analizar cómo son afectadas las principales rutas metabólicas en la presencia de estos carbohidratos, a través del análisis de la composición corporal. El bioensayo propuesto para

este estudio ha sido ampliamente empleado en estudios nutricionales por nuestro laboratorio.

2 ANTECEDENTES

2.1 Consideraciones iniciales sobre los insectos

El número de especies de insectos es aproximadamente de un millón, lo que corresponde a un 70 % del total de las especies animales descritas hasta el momento (Figura 1); siendo que el 50 % de estas especies biológicas se encuentran en el orden de los coleópteros (Ruppert y Barnes, 1994). La enorme diversidad y habilidad de los insectos de ocupar variados nichos ecológicos resulta, entre otros factores, de la capacidad que tienen estos organismos de alimentarse de variadas dietas. Es indiscutible la importancia económica de los insectos, aunque algunos son benéficos otros han causado grandes daños a la agricultura y a la salud.

El tubo digestivo de estos animales, ha sido de particular interés en la búsqueda de nuevas formas de control. Ya que este representa la mayor superficie de contacto con el medio ambiente (Terra y Ferreira, 1994; 2005). Siendo así, los estudios se han enfocado principalmente en la caracterización cinética y molecular de las enzimas digestivas de estos animales, su distribución y los mecanismos de secreción. Así como, de las estructuras intestinales; con el objetivo de atacar algunas de las estructuras del tubo digestivo o desorganizar algunas de sus funciones, como por ejemplo, producción de inhibidores en el proceso digestivo (Jouaning y col., 1998; Franco y col., 2002). Estos estudios han revelado, que las enzimas que intervienen en los procesos de digestión son análogas a las encontradas en mamíferos; sin embargo, en los insectos existe una gran variedad de isoenzimas de las diferentes enzimas digestivas, tal es el caso por ejemplo, de las proteinasas serínicas, que están involucradas en los procesos de digestión proteolítica en lepidópteros (Mulhia-Almazán y col., 2008), esto sugiere una adaptación de los insectos para los inhibidores de proteinasas encontrados en las plantas (Brioschi y col., 2007).

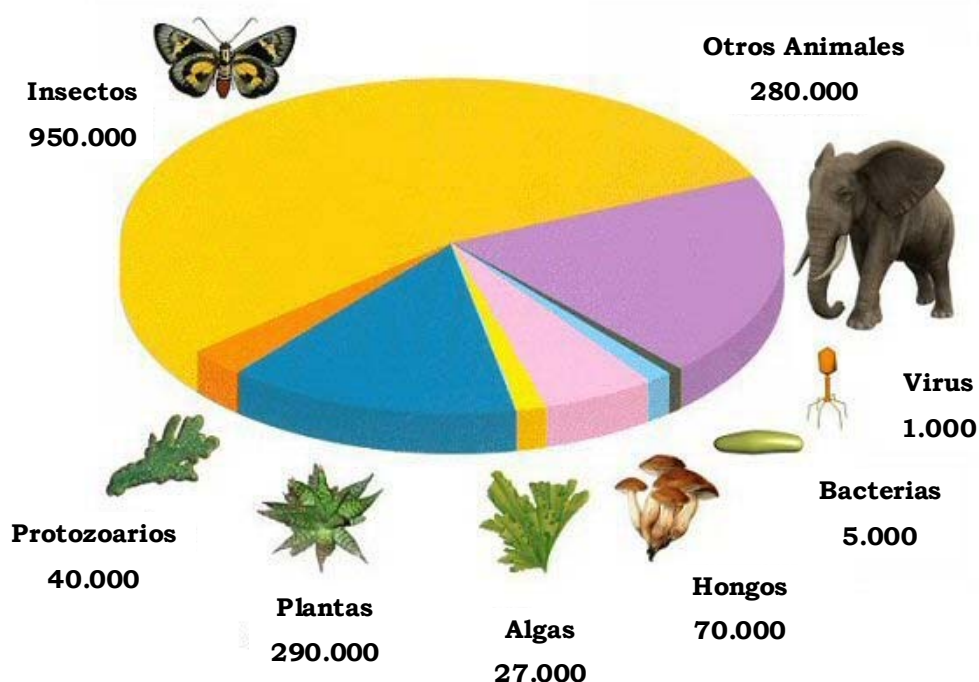


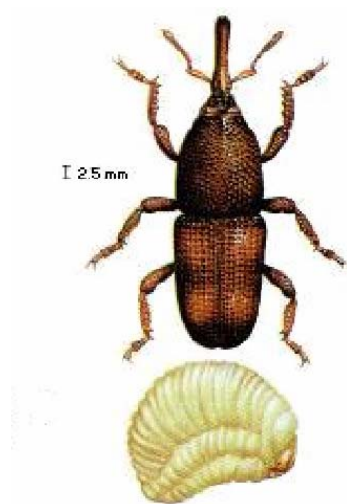
Figura 1. Número de especies descritas. Modificado de Crisci, 1997.

2.2 *Sitophilus oryzae*

En nuestro estudio, fue utilizado como modelo biológico el insecto *Sitophilus oryzae*, que es conocido comúnmente como gorgojo de arroz. Este insecto, presenta una cabeza proyectada en forma de trompa y antenas acodadas en forma de maza. El protórax está densamente cubierto de depresiones circulares, posee alas y vuela con gran facilidad. El adulto mide entre 2,5 mm y 3,5 mm. Su color varía de café a negro y los élitros presentan cuatro manchas de color amarillento (Figura 2) (Cubillos, 1983).

En cuanto a su biología, se conoce que las hembras horadan el grano y depositan en cada diminuta perforación un huevecillo que posteriormente es cubierto con una secreción. Cada hembra, deposita de 300 a 400 huevos que tardan entre 4 y 6 semanas en transformarse en adulto. La larva, carente de patas, se alimenta, se transforma en pupa y

finalmente en adulto, dentro del grano, mostrando una holometábolia completa. El adulto vive aproximadamente de 4 a 5 meses (Cubillos, 1983).



Phylum Artropoda

Clase Insecta

Subclase Pterygota

Infraclass Neoptera

Superorden Neuropteroides

Orden Coleoptera

Genero Sitophilus

Especie *Sitophilus oryzae*

Figura 2. Gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*. Tomado de http://www.disinfestazione.it/sapere/insetti/insetti_derrate/punteruo.htm

2.3 El tubo digestivo de insectos

El tubo digestivo de los insectos está formado por células epiteliales, desde la boca hasta el ano. Puede ser dividido en tres regiones (basadas en los orígenes embrionarios y sus funciones fisiológicas) (Klowden, 2007); el intestino anterior o estomodeo, el intestino medio o mesenterón y el intestino posterior o proctodeo (Figura 3).

En la primera porción del intestino anterior se encuentra la faringe, recubierta por músculos dilatadores provenientes del clipeo. Estos músculos son los responsables del funcionamiento de la bomba faríngea. Seguido a esta estructura se encuentra el esófago, en el cual los alimentos son mezclados con la saliva para ser homogeneizados. El buche es una

dilatación que se produce a lo largo del esófago o lateralmente en la forma de tubos ciegos o divertículos, su función principal en la mayoría de los insectos es la de almacenamiento de los alimentos molidos y en varios insectos sirve como sitio de digestión (Terra y Ferreira, 2003). Esta región del tubo digestivo, es formada por células columnares, células regenerativas y células que se cree que tienen funciones endocrinas. El estomodeo finaliza con el proventrículo el cual esta provisto de espinas esclerosadas (Klowden, 2007). El mesenterón o intestino medio, puede estar compuesto solamente por el ventrículo o estar formado por ciegos gástricos de tamaño y números variados, ubicados al principio del mesenterón, cuya función es incrementar la superficie de absorción. En esta región, en la mayoría de los insectos, existe una estructura quitino-proteica que reviste el alimento y es denominada membrana peritrófica. Esta separa el contenido luminal en dos compartimientos, el espacio endoperitrófico y el ectoperitrófico. Varias funciones han sido atribuidas a esta estructura: protección mecánica para las células del intestino medio, barrera fisiológica para microorganismos, prevención de la excreción de enzimas digestivas y aumento de la eficiencia digestiva (Terra y Ferreira, 1994, 2003, 2005). Los túbulos de Malpighi, que es un órgano excretor, marca la división entre el mesenterón y el proctodeo, en donde ocurre la absorción de agua y sales. El proctodeo se inicia en la válvula pilórica y termina en el ano. La primera porción se denomina piloro, ahí se abren los túbulos de Malpighi. Atrás del piloro esta el íleon y por último el recto (Klowden, 2007).

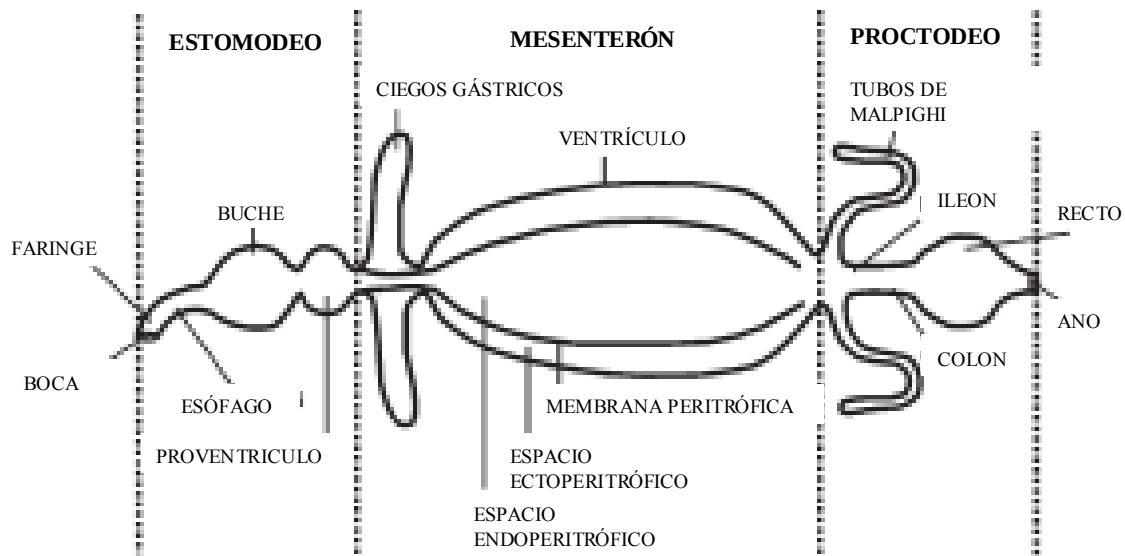


Figura 3. Diagrama general del tubo digestivo de insectos. Tomado de Ferreira y Terra, 1994.

2.4 Enzimas digestivas

En el intestino medio de los insectos, ocurre la secreción de enzimas digestivas y la absorción de nutrientes (Terra y Ferreira, 2003). La secreción enzimática está ligada al retículo endoplasmático y a los cuerpos de Golgi en las células epiteliales; mientras que, la absorción, depende de la permeabilidad de la membrana plasmática y de la concentración del compuesto presente en el lumen intestinal. La membrana plasmática de las células del intestino medio de los insectos, presentan un dominio apical y otro basal. En el dominio apical (que es generalmente modificado en microvellocidades) se diferencia la membrana microvilar en donde se encuentran integradas varias enzimas digestivas, tales como: aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidasas, α -glucosidasas, las cuales varían entre las diferentes taxas de insectos (Ferreira y col., 2007). En el dominio basal, se encuentra la

membrana perimicrovilar, se cree que esta membrana, participa en la absorción de nutrientes, especialmente de aminoácidos (Terra y Cristofolletti, 1996).

2.4.1 Digestión de proteínas

La digestión de proteínas, es efectuada por peptidasas, estas enzimas son clasificadas en endopeptidasas y exopeptidasas (Devlin, 1992). Las endopeptidasas son importantes para la ruptura inicial de polipéptidos grandes, ya que hidrolizan los enlaces peptídicos en el interior de la secuencia primaria de la proteína; obteniéndose pequeños fragmentos. En esta clase de enzimas se destacan: la quimotripsina, la tripsina, la elastasa, entre otras, las cuales actúan de manera similar a las enzimas digestivas sintetizadas por el páncreas (Devlin, 1992). Los fragmentos obtenidos por la acción de las endopeptidasas, son sustratos para las exopeptidasas (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidasas) que actúan removiendo los aminoácidos terminales; el producto final de su acción enzimática son aminoácidos libres, di y tri péptidos, los cuales son absorbidos por las células epiteliales.

2.4.2 Composición de los carbohidratos de la dieta y su digestión

La composición de los carbohidratos de la dieta pueden variar, pero en general incluye mono-, di- y polisacáridos. Entre los polisacáridos se encuentra el almidón, que es el principal carbohidrato de reserva de las plantas. Los organismos, adquirieron la capacidad de producir enzimas que degradan el almidón con subsecuente liberación de glucosa, la cual es usada en el metabolismo energético. A nivel molecular el almidón está formado por dos homopolímeros, amilosa y amilopectina. La amilosa es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$, que establece largas cadenas lineares aproximadamente de 200 a 2500 unidades, con pesos moleculares hasta de un millón y el porcentaje de ramificaciones es menor del 1 %

(Kennedy y col., 1987). La amilopectina, constituye alrededor del 75 % de los almidones más comunes, se diferencia de la amilosa por tener ramificaciones que le dan una forma molecular parecida a un árbol, las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces glucosídicos α (1 $\rightarrow$ 6), localizados entre cada 15 ó 25 unidades lineales de glucosa. Estos compuestos a su vez se encuentran empaquetados en estructuras denominadas gránulos, los cuales presentan diferencias morfológicas dependiendo de la fuente botánica (Galliard y col., 1987). La ubicación de los gránulos en la planta puede ser variable, se encuentran en tallos, hojas y frutos, pero las principales fuentes de extracción de almidón son las semillas, raíces y tubérculos (Ettinger, 2001). La digestibilidad de los almidones se ve afectada por las proporciones de amilosa y amilopectina, la cual varía normalmente de 1:3 y 1:4 (Bjork y col., 1994). Se ha demostrado, que al menos 10 % del almidón escapa a los procesos de digestión. Este almidón resistente se define, como la suma de almidón y productos de su degradación que no han sido absorbidos en el intestino delgado de sujetos sanos (Asp, 1992; Engliyst y col, 1990). Estos pasan al colón donde son fermentados, aunque una pequeña proporción escapa a esa degradación y se eliminan por las heces. El contenido de almidón resistente total, varía dependiendo del origen del almidón, por ejemplo, el almidón de maíz (0,38 amilosa/amilopectina) es más biodisponible que el almidón de papa (0,33 amilosa/amilopectina) (Galeno, 2003; García, 2003).

2.4.2.1 Digestión de carbohidratos

La digestión del almidón, ocurre en varias etapas. Inicialmente, el almidón es triturado en la boca del insecto, lo cual aumenta la disponibilidad del almidón a la acción de las diferentes enzimas. Este triturado pasa al buche o proventrículo, en donde se inicia la hidrólisis del almidón contenido en los gránulos desintegrados mecánicamente, así como también de los gránulos intactos, por acción de las endosacaridasas, α -amilasas presentes en

la saliva, que tienen especificidad por los enlaces glucosídicos α (1 $\rightarrow$ 4). Los productos de la digestión por α -amilasas son principalmente la maltosa, la maltotriosa y las dextrinas límite, que generalmente contienen ocho glucosas unidas con uno o más enlaces glucosídicos α (1 $\rightarrow$ 6). La hidrólisis de los disacáridos, trisacáridos y dextrinas límite a monosacáridos, es realizada en el intestino medio, por acción de las oligosacaridasas, que son exoenzimas, que remueven residuos glucosídicos desde el extremo no reductor de la molécula. El almidón que no es digerido por estas enzimas (almidón resistente) pasa a la región del intestino posterior (Baker y col, 1992).

La absorción de los monosacáridos ocurre por difusión a través de las membranas que conforman el mesodermo, pero existen evidencias de un transportador activo de glucosa (Terra y Ferreira, 2003). En el proceso de difusión, se requiere de un gradiente de concentración, que promueva el movimiento de azúcares desde las células que conforman el mesodermo hasta la hemolinfa. Este gradiente, está determinado por la concentración de glucosa y de trehalosa en la hemolinfa del insecto (Terra y Ferrereira, 2003). La trehalosa es sintetizada en los cuerpos grasos, a partir de glucosa, glucosa 1-fosfato o glucosa 6-fosfato, que son obtenidas por la dieta o por la hidrólisis del glucógeno (Thompson y Simpson, 2003). Este disacárido, es hidrolizado por una enzima específica llamada trehalasa. Esta enzima, circula por el lumen del mesodermo o puede encontrarse anclada a la superficie de las células que lo conforman, haciendo disponible la glucosa desde la trehalosa de la hemolinfa (Terra y Ferrereira, 2003).

En los mamíferos, la trehalasa ha sido poco estudiada. Ella se encuentra ligada a la membrana microvilar de los enterocitos y sólo es importante cuando grandes cantidades de trehalosa son ingeridas (Van Beers y col., 1995). La trehalasa también está presente en las

microvellocidades de las células epiteliales de los túbulos renales, en donde no está esclarecida su función (Sacktor y col., 1968).

2.4.2.2 **Carbohidratos: glucosa, trehalosa y glucógeno**

La reserva más importante de carbohidratos en insecto es la trehalosa y el glucógeno, que son sintetizados cuando la ingesta de carbohidratos es mayor a la requerida. Ambos compuestos están regulados por medio de hormonas hipertrehalosémicas (HrTH), que son excretadas por el cuerpo cardíaco. El glucógeno, es almacenado en los músculos del vuelo, en los cuerpos grasos y alrededor del tracto digestivo. La movilización de las reservas de glucógeno para producir glucosa en la hemolinfa, se produce cuando hay bajas concentraciones de glucosa o por inanición del insecto, lo cual estimula la excreción de las hormonas HrTH. Estas hormonas, activan a la enzima fosforilasa quinasa, y esta a su vez, activa la glucógeno fosforilasa, para generar glucosa 1-fosfato. Este compuesto, puede ser utilizado inmediatamente como fuente de energía o puede dirigirse hacia la síntesis de trehalosa (Figura 4) (Klowden, 2007). En la síntesis de trehalosa, la cantidad de fructosa 2,6-bisfosfato en las células del cuerpo graso disminuye, en presencia de hormonas (HrTH). Este compuesto activa a la fosfofructoquinasa-1 e inhibe a la fructosa 1,6-bifosfatasa. Siendo así, a bajas concentraciones de fructosa 2,6-bisfosfato, menor cantidad de glucosa será utilizada por la vía glucolítica, aumentando la síntesis de trehalosa (Becker y col., 1996). Este disacárido, es encontrado en todos los órganos de los insectos y es el principal azúcar circulante de la hemolinfa; hallándose en forma soluble y/o ligado a las membranas (Wigglesworth, 1972; Vonk y Wester, 1984; Bounias y col., 1993). Entre las funciones que han sido atribuidas a este azúcar no reductor, se encuentran: reserva y transporte de glucosa utilizada como fuente de energía, señalización en algunas células, participación en la

síntesis de componentes celulares o protección de membranas y proteínas en situación de estrés (Elbein y col., 2003; Klowden, 2007).

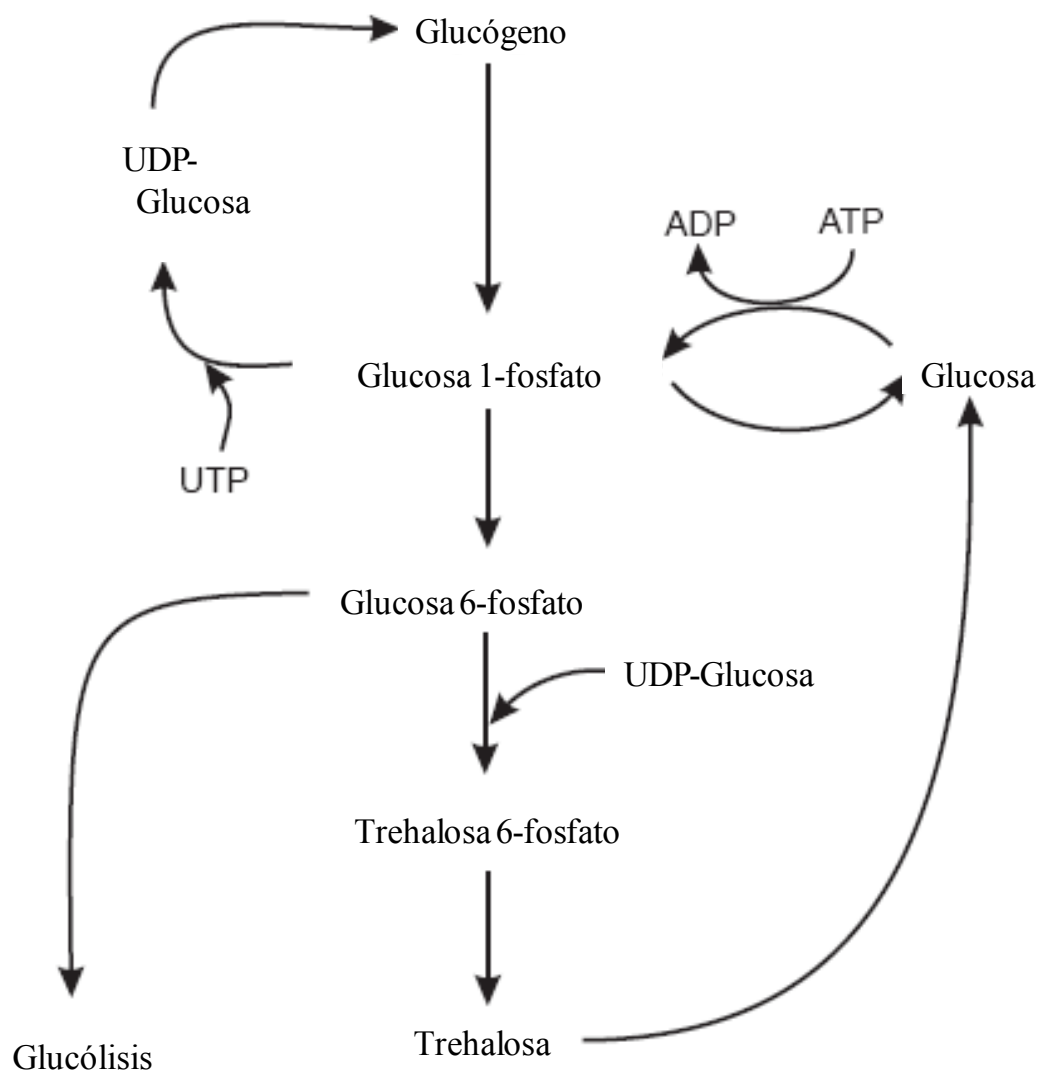


Figura 4. Interconversión de glucógeno, trehalosa y glucosa. Tomado de Klowden, 2007.

2.4.2.3 Consecuencia del desbalance de nutrientes.

Los estudios nutricionales han demostrado que la carencia o el exceso de algún nutriente, ocasionan desequilibrios metabólicos que generan enfermedades crónicas. Alteraciones en la dieta de los individuos, provocada por malos hábitos de alimentación, dietas con altos niveles de calorías o comprendidas únicamente por carbohidratos y/o escaso ejercicio físico, pueden generar síndrome metabólico en humanos (Leonetti y col., 2002). La edad de los candidatos a padecer de este síndrome, ha ido bajando de forma dramática. Si antes se hablaba de pacientes que bordeaban los 50 años, ahora el grupo de riesgo está situado en torno a los 35 años (IDF, 2006).

El síndrome metabólico, es causado por cambios crónicos en el metabolismo que conllevan a la obesidad, diabetes tipo 2, resistencia a la captación de glucosa mediada por insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, aumento de triglicéridos en las VLDL, disminución del colesterol de las HDL e hipertensión arterial, entre otros (IDF, 2006). Aunque estas enfermedades han sido reportadas en mamíferos, Schilder y colaboradores (2006) señalaron que *Libellula pulchella*, pudo manifestar síntomas típicos de síndrome metabólico. Este hecho, fue demostrado infectando a individuos de *L. pulchella* con un parásito intestinal. Lo cual conllevó a inhibir la ruta de oxidación de los ácidos grasos, trayendo como consecuencia un aumento de las grasas al nivel del tórax y un incremento de carbohidratos. Además generó atrofia de los músculos del vuelo. En el mismo año, Warbrick-Smith y colaboradores, reportaron que orugas de *Plutella xylostella*, alimentadas con dietas que contenían una proporción de 12:40 de proteína/carbohidratos presentaron obesidad.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del consumo de carbohidratos simples y complejos (con diferente biodisponibilidad) sobre la distribución de carbohidratos en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*), por medio del método químico-enzimático. Analizar como son afectadas las principales rutas metabólicas en la presencia de estos carbohidratos, a través de la composición corporal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si los procesos de deshidratación y/o extracción de grasas afectan la cuantificación de los carbohidratos glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz.
- Evaluar la especificidad y sensibilidad del método químico-enzimático.
- Evaluar el efecto de dietas a base de carbohidratos simples y complejos (glucosa, almidón de maíz y almidón de papa) sobre el contenido de los carbohidratos glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz.
- Determinar la composición corporal de los gorgojos de arroz alimentados con las diferentes dietas ensayadas, así como, la supervivencia y la variación de peso.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*)

Los insectos fueron cultivados en arvejas verdes (*Pisum sativum*), peladas y partidas, de origen comercial (mercado local), en envases tapados con una malla, protegidos de la luz y mantenidos a temperatura ambiente. Para el mantenimiento de los insectos se infectaron lotes de aproximadamente 300 g de arveja con 200 individuos adultos (padres), luego de un mes se retiraron los padres del cultivo y se esperó la eclosión de la generación F1 (aproximadamente 2 semanas). Los ensayos fueron realizados con la generación F1, para asegurar que las poblaciones fueran homogéneas.

4.2 Dietas

Las diferentes dietas fueron suministradas a los insectos en forma de semillas artificiales, lo cual permitió que el insecto perforara y succionara el alimento.

4.2.1 Almidón de maíz: Se suspendieron 10 g de almidón de maíz (Maizina Americana, Alfonzo Rivas, cruda) en agua destilada (aproximadamente 4 mL) hasta obtener una mezcla homogénea y espesa. Esta mezcla fue vertida dentro de una jeringa de 2 mL y sobre un papel parafinado se colocaron gotas de aproximadamente 1 cm de diámetro. Las semillas formadas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 12 horas.

4.2.2 Almidón de papa (Potatis mjöl, Lyckeby Starkelsen, cruda): Se procedió igual que en la dieta 4.2.1

4.2.3 Agar al 4 %: El agar se esparció en placas de microtitulación, se esperó su solidificación a temperatura ambiente y se sacaron de sus moldes.

4.2.4 Glucosa al 5 %: A 20 mL de una solución de agar al 6 %, en estado líquido, se le agregó 10 mL de una solución de glucosa al 15 %, teniendo como resultado una solución de agar al 4 % que contenía glucosa al 5 % y luego se procedió igual a la sección 4.2.3

En la siguiente tabla, se presenta la composición (en porcentaje) de los macronutrientes (carbohidratos, grasas y proteínas) que aportan cada una de las dietas ensayadas. En base a esto, se calculó el valor energético para 20 g de dieta, expresado en kcal. También fue determinado el contenido de humedad, como fue descrito por la AOAC (1984).

Tabla 1. Composición de nutrientes por cada 100 g de cada una de las dietas.

Nutriente	Arveja*	Agar (4 %)	Glucosa (5 %)	Almidón de maíz cruda**	Almidón de papa**
kcal.	356	-	20	360	320
Humedad (%)***	10,97 ± 0,13 ^a	95,65 ± 0,06 ^b	90,91 ± 0,05 ^c	16,43 ± 1,95 ^d	26,17 ± 1,83 ^e
Carbohidratos (%)	58,8	-	5	90	80
Grasa (%)	1,75	-	-	-	0,5
Proteínas (%)	26,2	-	-	-	0,5

*según Rojas, 2007. **datos basados en la información nutricional según el fabricante. ***se determinó mediante la modificación del método establecido por la AOAC (1984). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

4.3 Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados con poblaciones de 60 individuos adultos de la generación F1. Cada población fue alimentada con 2 g de las diferentes dietas, contenidas en viales de vidrio tapados. Paralelamente se montaron los controles, como descritos a continuación:

- Control cero: determinación de la composición corporal en el tiempo cero (día en que se comenzó el experimento).
- Control positivo: los insectos fueron mantenidos en arvejas verdes, peladas y partidas, que fue el alimento utilizado para cultivar a los gorgojos (sección 4.1).
- Control negativo: los insectos fueron sometidos en condición de ayuno (sin alimento y sin agua).

- d) Control para la dieta de glucosa: los insectos fueron mantenidos en agar al 4 %, ayuno con suministro de agua.

Los ensayos se realizaron con 8 réplicas de las cuales cuatro se utilizaron para determinar los carbohidratos y cuatro para la determinación de nitrógeno. A los 8 días se sacrificaron los insectos por congelación, 60 individuos fueron tomadas para determinar el contenido de carbohidratos, 30 para determinar el contenido de nitrógeno y 20 para proteínas totales.

4.4 Determinación del porcentaje de supervivencia y variación de peso

La determinación se realizó como fue descrito por Carmona y colaboradores (1998). Se registró el peso y la supervivencia de los individuos cada 48 horas durante 8 días (5 medidas). Los cadáveres de los insectos fueron eliminados del vial en cada registro. El porcentaje de supervivencia y variación de peso se determinó como sigue:

% de supervivencia = (número de insectos sobrevivientes/ número inicial de insectos) x 100

% de peso = (peso promedio de los individuos/ peso promedio inicial) x 100

4.5 Composición corporal

Para la determinación de la composición corporal fueron utilizados 30 individuos, pesados previamente y sacrificados por congelación.

4.5.1 Determinación del contenido de agua

El contenido de agua se determinó mediante la modificación del método establecido por la AOAC (1984), descrito por Carmona y colaboradores en 1993. Los cadáveres de 30 insectos, fueron deshidratados en la estufa a 100 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo la población fue pesada y colocada en la estufa nuevamente a la misma temperatura. Este procedimiento se repitió cada 15 minutos (dos veces), hasta obtener peso constante. El

contenido de agua se obtuvo por la diferencia del peso inicial de los 30 individuos menos el peso después de deshidratados.

4.5.2 Determinación del contenido de grasa

El contenido de grasa se determinó mediante la modificación del método establecido por la AOAC (1984), descrito por Carmona y colaboradores en 1993. Los cadáveres deshidratados (sección 4.5.1) se homogeneizaron (homogenizador Potter Elvehem) con 2 mL de éter de petróleo por aproximadamente 1 minuto (12 golpes). El homogeneizado obtenido se dejó sedimentar y el sobrenadante se colocó en un vidrio de reloj previamente tarado. El sedimento se lavó varias veces con 2 mL de éter de petróleo (dependiendo de la dieta) hasta obtener un sobrenadante translúcido. El éter de petróleo incluido en el vidrio de reloj se dejó evaporar a temperatura ambiente por 1 hora y el vidrio de reloj conteniendo la materia seca (grasa) fue pesado.

El contenido de grasa se estimó por diferencia entre el peso inicial y el peso final del vidrio de reloj.

El sedimento libre de grasa se secó a temperatura ambiente aproximadamente por 2 horas y fue utilizado en la determinación del contenido de carbohidratos (sección 4.5.3), nitrógeno proteico y cuticular (sección 4.5.5).

4.5.3 Determinación del contenido de carbohidratos

El sedimento obtenido después de desgrasada la muestra (sección 4.5.2) fue resuspendido en 500 μ L de solución amortiguadora citrato-fosfato, pH 6; 100 mmol/L. El material obtenido después de la resuspensión fue centrifugado en una microcentrífuga Eppendorf por 25 minutos a 16000 g. El sedimento fue usado en la determinación de glucógeno y el sobrenadante para la medición de glucosa y trehalosa.

El contenido de carbohidratos también fue determinado sin deshidratar ni desgrasar la muestra, para evaluar el efecto de estos pasos sobre el contenido de carbohidratos.

4.5.3.1 **Determinación del contenido de glucosa**

El contenido de glucosa fue determinado con el estuche glucosa enzimática (Industrias Qualitest, Caracas), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras (ver sección 4.5.3) fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 min. El contenido de glucosa se determinó por medio de una curva de calibración de glucosa ($Y = 2,71 \times 10^{-2} X + 0,0008$; $R = 0,999$; $n = 6$). Esta curva fue realizada a partir de una solución madre de glucosa, 1g/L.

4.5.3.2 **Determinación del contenido de trehalosa**

A 80 μ L de muestra (sección 4.5.3), se le agregó 20 μ L de trehalasa de riñón de puerco (Sigma, T8778) a una concentración de 0,5 U/mL. La reacción enzimática (100 μ L; 0,1 U/mL) fue incubada a 37 °C durante 12 horas. Después de este tiempo de incubación se procedió a cuantificar el producto de la reacción utilizando el estuche de glucosa enzimática (sección 4.5.3.1). El contenido de trehalosa en los insectos fue estimado por la diferencia de absorbancia de la muestra incubada con la enzima y la muestra sin incubar. El resultado de la diferencia de absorbancia fue analizado utilizando la curva de calibración para la determinación del contenido de glucosa, tomando en cuenta que 1 mol de glucosa es $\frac{1}{2}$ mol de trehalosa (sección. 4.5.3.1).

Se realizaron los controles respectivos para la enzima: como control positivo se colocó en un tubo la enzima (0,1 U) mas trehalosa comercial a una concentración de 1,25 g/L; y como control negativo se colocó el sobrenadante sin la enzima.

4.5.3.3 Determinación del contenido de glucógeno

El sedimento obtenido (sección 4.5.3), fue resuspendido en 1 mL de KOH al 30 %. Después de la resuspensión fue centrifugado durante 25 minutos a 16000 g en una microcentrifuga; el sobrenadante fue retirado y nuevamente centrifugado en las mismas condiciones antes descritas. Al sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación se le añadió 2 mL de solución de precipitación (etanol 95 % - NaCl 2 %; 7:1) y se llevó a -20 °C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a centrifugar (condiciones iguales a las descritas) durante 30 minutos, el pellet (translúcido-blanqueado) que contiene el glucógeno se resuspendió en 250 µL de agua. El contenido de glucógeno fue cuantificado utilizando el método de antrona-ácido sulfúrico (sección 4.5.3.3.1).

4.5.3.3.1 Método de antrona-ácido sulfúrico

A 100 µL de muestra (sección 4.5.3.3), se adicionó 1 mL del reactivo antrona-ácido sulfúrico (50 mg de antrona disueltos en 100 mL de ácido sulfúrico). Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 minutos. Cumplido el tiempo de incubación se dejó reposar las muestras hasta alcanzar la temperatura ambiente y se procedió a medir la absorbancia a 620 nm.

Para calcular los µg de glucógeno presentes en la muestra, se utilizó una curva de calibración ($Y = 1,84 \times 10^{-2} X + 0,0368$; $R = 0,998$; $n = 8$) elaborada a partir de una solución de 1 g/L de glucógeno.

4.5.4 Determinación de la especificidad y sensibilidad del método químico-enzimático

4.5.4.1 Especificidad

La cantidad de trehalosa presente en la muestra fue hidrolizada mediante la enzima trehalasa (trehalasa de riñón de puerco, Sigma, T8778). La cual presenta una especificidad estricta sobre su sustrato. El contenido de glucosa presente en la muestra y la que deriva de

la acción enzimática en la trehalosa se midió mediante el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (glucosa enzimática; Industrias Qualitest, Caracas). La diferencia entre el contenido de glucosa después de la acción enzimática y la determinada inicialmente, correspondió a la trehalosa. El método glucosa oxidasa-peroxidasa se basa en el acoplamiento de dos enzimas, la glucosa oxidasa y la peroxidasa. La glucosa oxidasa oxida a la glucosa y se produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este peróxido liberado reacciona con un cromógeno y produce un compuesto que absorbe entre 492 y 550 nm. Esta reacción es catalizada por la peroxidasa.

El uso de estas enzimas determina que tanto la glucosa como la trehalosa sean cuantificada de manera específica. Por otro lado, el glucógeno se determinó, mediante el método de antrona-ácido sulfúrico. Todos los carbohidratos reaccionan en medio ácido fuerte dando un derivado de furfural que condensa con la antrona (cromóforo) para dar color verde con un máximo de absorción a 620 nm. Para verificar que el glucógeno extraído, no hubiese trazas de glucosa o trehalosa, se tomó una alícuota y se le aplicó el procedimiento para la determinación del contenido de trehalosa (sección 4.5.3.2).

4.5.4.2 Sensibilidad

a) Determinación del intervalo óptimo para la concentración de trehalosa.

Para establecer cual fue la cantidad mínima y máxima de trehalosa que se puede determinar por el método químico-enzimático, en la condiciones de experimentación ensayadas, se realizó una curva con diferentes cantidades de trehalosa (1; 2,5; 5; 10; 100; 250; 500)(μg), manteniendo la enzima constante en una concentración de 0,1 U (trehalasa de riñón de puerco, Sigma, T8778).

b) Determinación del número de individuos para la cuantificación de carbohidratos:

Se realizó una curva de dosis-respuesta donde se varió el número de individuos (10, 30, 50, 72 y 100), después de estar sometidos a ayuno durante 8 días y se cuantificó la cantidad de glucosa, trehalosa y glucógeno.

4.5.5 Determinación del contenido de cutícula, nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular.

4.5.5.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas fue utilizado el sedimento obtenido en la sección 4.5.2 (párrafo final). El sedimento fue incubado en 2 mL de NaOH (0,5 mol/L) por 24 horas, a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente fue centrifugado a 16000 g por 15 minutos en tubos Eppendorf, para separar la proteína solubilizada (en el sobrenadante) de la cutícula (residuo insoluble en álcali). Al residuo se le repitió la extracción de proteínas, agregando 1 mL de NaOH (0,5 mol/L) en las condiciones antes descritas. Luego de la centrifugación, se combinaron los dos sobrenadantes (conteniendo el NP). El residuo obtenido fue resuspendido con agua destilada y filtrado al vacío por milipore. El papel de filtro conteniendo el residuo, se secó en la estufa a 100 °C por 30 minutos y se registró el peso del residuo (% cutícula). Tanto el sobrenadante (NP) como el papel de filtro con el residuo seco (NC) fueron utilizados para la mineralización de la materia orgánica (digestión) (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; modificado por Meris Casotto, comunicación personal).

4.5.5.2 Digestión de muestras

Se realizó mediante la modificación del método establecido por la AOAC (1984) (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). La determinación se realizó por separado al sobrenadante (NP) y al residuo cuticular (NC) (sección 4.5.5.1). La digestión fue realizada

en tubos grandes de digestión que contenían 1 mL de muestra, 2 mL de H₂SO₄ concentrado y una pizca de catalizador de cobre (sulfato de cobre: sulfato de potasio, 1:9) previamente pulverizado con un mortero. Los tubos conteniendo la mezcla fueron colocados en un digestor Kjeldhal a 350 °C (aumentando la temperatura gradualmente para evitar la dispersión de la muestra en el tubo) por 4 horas o hasta lograr la transparencia total de las muestras. Las muestras digeridas se dejaron enfriar para agregarles 5 mL de agua destilada. Se registró el volumen final de cada muestra para determinar el contenido de nitrógeno.

4.5.5.2.1 **Determinación del contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler**

Se empleó el método descrito por Cherry (1973) y modificado por Carmona y Gómez-Sotillo (1997). Para la determinación del contenido de nitrógeno, se tomaron alícuotas de 20 µL y 50 µL del NC y del NP respectivamente (muestras digeridas, sección 4.5.5.2). A estas alícuotas se les añadió 3 mL de agua destilada y 0,4 mL de KOH (4 mol/L). Después de agitadas las muestras por medio de un vórtex, se agregó 0,1 mL de reactivo de Nessler. Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech. Ultrospec 2000). Se determinó el contenido de nitrógeno, utilizando una curva de calibración de sulfato de amonio ($Y = 7,08 \times 10^{-2} X - 0,029$; $R = 0,992$; $n = 7$). Esta curva fue realizada a partir de una solución madre de sulfato de amonio, 47,19 mg/L, que contiene 10 mg/L de nitrógeno.

4.5.6 **Determinación del parámetro “Otros”**

En el renglón de otros se encuentran las cenizas y los elementos carbonados de las proteínas. Este parámetro se calculó, por diferencia, de la siguiente forma:

$$\text{Otros} = 100 \% - (\% \text{ agua} + \% \text{ grasa} + \% \text{ carbohidratos totales} + \% \text{ cutícula} + \% \text{ NP})$$

4.6 Determinación de la concentración de proteínas solubles

La determinación de la concentración de proteínas para los insectos mantenidos en las diferentes dietas, fue realizada mediante el método descrito por Lowry y colaboradores (1951). Para tal fin, 20 individuos fueron homogeneizados en 2 mL de agua destilada. El homogeneizado fue colocado en tubos Eppendorf y centrifugados en una microcentrífuga a 16000 g por 5 min. El pellet fue descartado y el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas. La muestra del sobrenadante utilizada en la determinación fue diluida 10 veces en agua destilada para un volumen final de 500 μ L. Luego se le añadió 2,5 mL de la solución cobre alcalino y agitó vigorosamente en vórtex, se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente fue añadido 0,25 mL el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:1 con agua destilada) mezclando nuevamente en vórtex y se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 580 nm. La concentración de proteína se calculó utilizando una curva de calibración de albúmina sérica bovina ($Y = 3,85 \times 10^{-3} X - 5,49 \times 10^{-3}$; $R = 0,994$; $n = 9$) obtenida a partir de una solución de 0,5 g/L.

4.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el programa Statistica v7.0.61.0 de Statsoft ®. A los resultados obtenidos se les aplicó el análisis de varianza (ANOVA de una vía); para verificar la homogeneidad de varianza se realizó una prueba *a priori* de Bartlett y para comparar los diferentes grupos se utilizó la prueba *a posteriori* de Duncan. Además, se realizaron correlaciones simples entre cada unas de las variables estudiadas y un análisis de componentes principales (ACP) con el programa past:Hammer versión 1.84 (Hammer y col., 2001).

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estandarización del método químico-enzimático para la determinación de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz

Entre los estudios nutricionales implementados en nuestro laboratorio con el bioensayo de insectos, se encuentran los análisis de composición corporal, en el cual se incluyen los componentes de: grasa, agua, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular y otros. Dentro de este último se encuentran los carbohidratos. Recientemente, en el laboratorio se desarrolló un método químico-enzimático que permite cuantificar el contenido de cada uno de los carbohidratos presentes en el insecto (glucosa, trehalosa y glucógeno). Sin embargo, no se había determinado si el contenido de carbohidratos es modificado por los procesos de deshidratación y/o extracción de grasas, los cuales forman parte del protocolo para medir composición corporal. Por otra parte, también nos propusimos a estudiar la especificidad y sensibilidad del método.

5.1.1 Efectos de la deshidratación y del desgrase sobre el contenido de carbohidratos

Para estudiar si los procesos de deshidratación y del desgrase modifican el contenido de carbohidratos, se tomaron 120 individuos de la población F1. Estos fueron divididos en dos grupos, cada uno conformado por 60 insectos, con un peso promedio de $1,73 \pm 0,04$ mg/individuo. Un grupo fue denominado CD, en el cual se determinó el contenido de carbohidratos después de deshidratar y desgrasar los insectos (sección 4.5.2). El otro grupo fue designado como SD, en este los insectos fueron homogenizados con 2 mL de solución amortiguadora citrato-fosfato, pH 6; 100 mmol/L. Estos ensayos se realizaron a 4 °C.

En la figura 5, se presenta el tenor de glucosa, trehalosa y glucógeno de los grupos CD y SD. Se puede observar que el contenido de los diferentes carbohidratos se ve modificado por los procesos de deshidratación y de desgrase. Para el grupo SD, la cantidad de glucosa fue de $1,16 \pm 0,08$ mg, el contenido de glucógeno fue de $0,054 \pm 0,006$ mg y no se pudo cuantificar trehalosa. Mientras que, para el grupo CD se cuantificó un contenido de glucosa, glucógeno y trehalosa de $0,13 \pm 0,03$ mg; $0,14 \pm 0,02$ mg y $0,037 \pm 0,003$ mg, respectivamente. Estos resultados muestran que en el grupo SD hay una disminución en el contenido de glucógeno y un aumento de aproximadamente 10 veces en el contenido de glucosa con respecto al grupo CD. En este punto, es relevante recordar que los insectos se homogeneizaron en la solución amortiguadora a pH 6 para asegurar la actividad enzimática de la trehalasa comercial utilizada para cuantificar el contenido de trehalosa endógena. Sin embargo, el pH del medio, puede favorecer la acción de otras enzimas presentes en el homogeneizado de insectos, entre estas se encuentran las glucosidasas y la trehalasa, las cuales actúan sobre sus sustratos promoviendo la liberación de glucosa. Debido a esto, en el grupo SD, no se cuantificó trehalosa y la cantidad de glucógeno es menor como fue señalado anteriormente. Además, los diferentes tratamientos, no sólo afectan la distribución de los carbohidratos sino también el contenido de carbohidratos totales (la suma de glucosa, trehalosa y glucógeno). Esto sugiere, que los carbohidratos que cumplen funciones estructurales, como por ejemplo, la membrana peritrófica que ha sido descrita como una malla de quitina embebida en una matriz de proteínas y carbohidratos (Terra, 1990), quedan expuestas a la acción de quitinasas, glucosidasas, entre otras enzimas, resultando en un incremento en el contenido de carbohidratos totales.

Lo antes expuesto, nos llevó a pensar que la homogeneización de los insectos en agua destilada, inactivaría las enzimas presentes en el extracto. Entonces se incluyó un

nuevo grupo de insectos que se denominó cH_2O , el cual fue tratado igual al grupo SD, pero la homogeneización fue realizada con agua. Para el grupo cH_2O , se encontró que el contenido de glucógeno fue similar al del grupo CD y el contenido de glucosa ($0,84 \pm 0,01$ mg) fue menor con relación al grupo SD (figura 5). Esto sugiere, que las enzimas que degradan el glucógeno fueron inactivadas. Sin embargo, la cantidad de trehalosa no se pudo cuantificar y el contenido de carbohidratos totales siguió siendo mayor que el encontrado en el grupo CD.

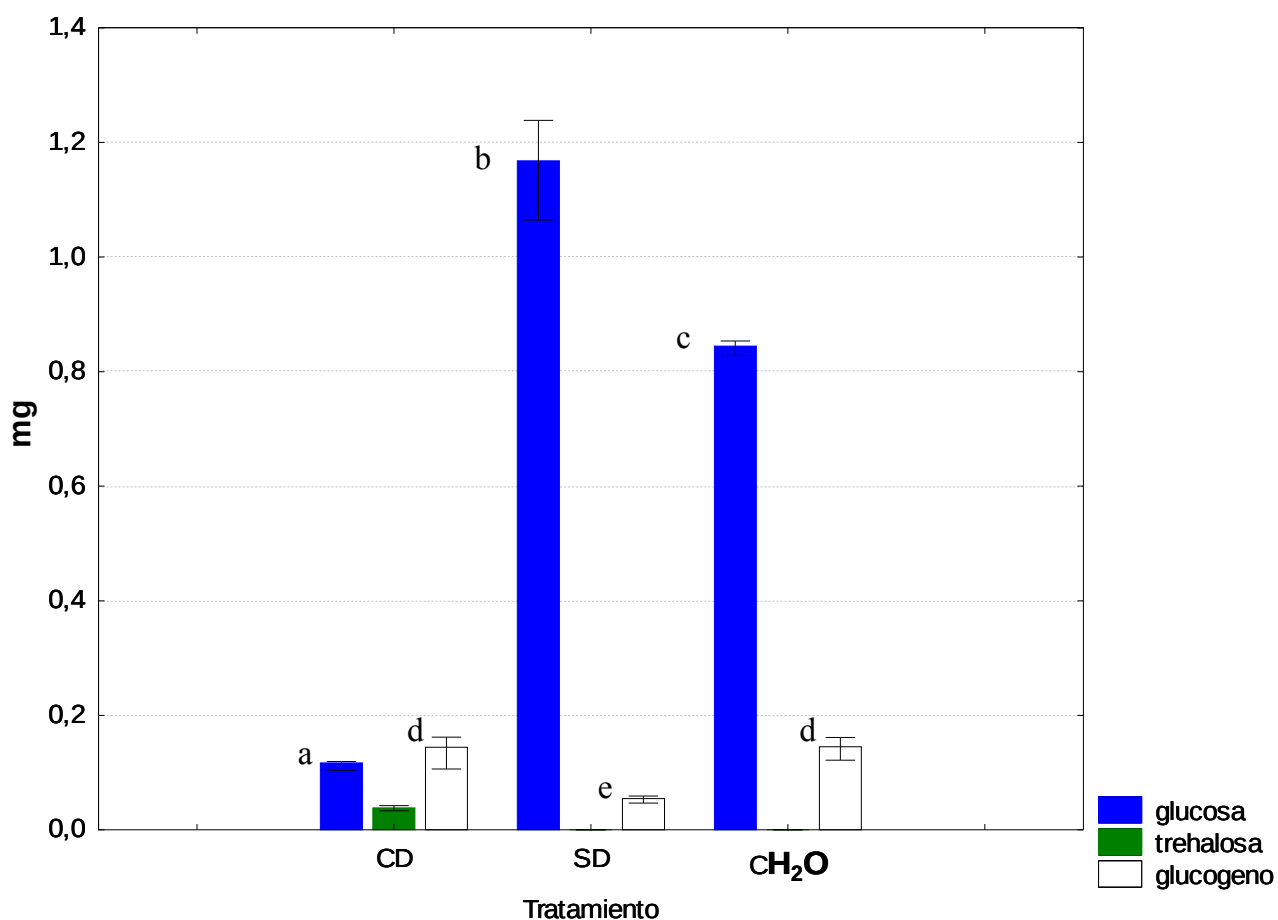


Figura 5. Efecto de la deshidratación y del desgrase en la cuantificación del contenido de carbohidratos (glucosa, trehalosa y glucógeno). Tratamiento con deshidratación y desgrase (CD), homogeneización en tampón citrato-fosfato (SD), homogeneización en agua destilada (cH_2O). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Otro tipo de tratamiento que se podría emplear en el futuro, para cuantificar los tres tipos de carbohidratos (glucosa, trehalosa y glucógeno), sin tener que realizar deshidratación ni desgrase y desnaturalizar las enzimas endógenas del insecto, es hervir la muestra inmediatamente después de homogeneizar, ya que las enzimas endógenas presentes en el extracto al estar expuestas a un calor extremo se desnaturalizan y no actuaran sobre los sustratos de trehalosa y glucógeno (Lehninger, 2006).

Para evaluar el efecto de dietas a base de carbohidratos simples y complejos (glucosa, almidón de maíz y almidón de papa) sobre el contenido de los carbohidratos glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz, aplicamos los pasos de deshidratación y desgrase, con los cual se aseguró que las enzimas presentes en el homogeneizado estaban completamente inactivadas.

5.1.2 Especificidad y sensibilidad del método químico-enzimático

La especificidad del método viene dada por la correcta separación de los carbohidratos y por la especificidad que presentan las enzimas utilizadas. La trehalasa presenta actividad únicamente sobre su sustrato trehalosa (Ganong, 2002; Asano y col., 1996). Siendo así, no puede hidrolizar los monómeros de glucosa presentes en el glucógeno. De igual manera, la cuantificación de glucosa a través de la glucosa oxidasa es altamente específica. Para verificar que la muestra de glucógeno, estaba libre de glucosa y trehalosa, se tomó una alícuota (muestra de glucógeno) y se incubó con trehalasa. Posteriormente se le aplicó el kit glucosa-oxidasa, el resultado obtenido fue negativo para glucosa. Por otra parte, también se comprobó que en la solución de trehalosa y glucosa no contenía el glucógeno. Para esto, se aplicó la metodología para precipitación de glucógeno, en la muestra de glucosa y trehalosa y la cuantificación de azúcares mediante el método de antrona fue negativo.

En cuanto a la sensibilidad, se determinó el número de individuos mínimos necesario en condiciones de ayuno para poder cuantificar glucosa, trehalosa y glucógeno. Se trabajó con los insectos en ayuno ya que, en esta condición, el contenido de carbohidratos es menor. En la figura 6, se representa las diferentes cantidades (medidas en mg) de glucosa, trehalosa y glucógeno con diferentes número de individuos. Se puede observar, que la curva de glucosa y glucógeno posee una linealidad en el intervalo de 10 a 100 individuos, cuya ecuaciones son $Y = 1,03 \times 10^{-3} X + 0,021$; $r = 0,996$; $n = 5$ y $Y = 3,05 \times 10^{-4} X + 0,003$; $r = 0,993$; $n = 5$, respectivamente. La cantidad de trehalosa aumentó a medida que se incrementó el número de individuos. Los datos indicaron que a partir de 10 individuos se puede estimar el contenido glucosa y glucógeno; mientras que, para cuantificar trehalosa se requiere un mínimo de 30 individuos.

Por otro lado, la trehalasa (0,1 U) fue incubada en diferentes concentraciones de sustrato, para determinar el rango de proporcionalidad entre la cantidad de sustrato hidrolizado y la cantidad de producto generado. En la figura 7, se puede observar que la curva obtenida presenta linealidad hasta 0,11 mg de glucosa ($Y = 1,08 X + 2,89 \times 10^{-4}$; $r = 0,999$; $n = 6$). Cantidades de glucosa (obtenidas por hidrólisis de trehalosa, 0,1 U) mayores a 0,11 mg, deben ser diluidas para no ser subestimadas.

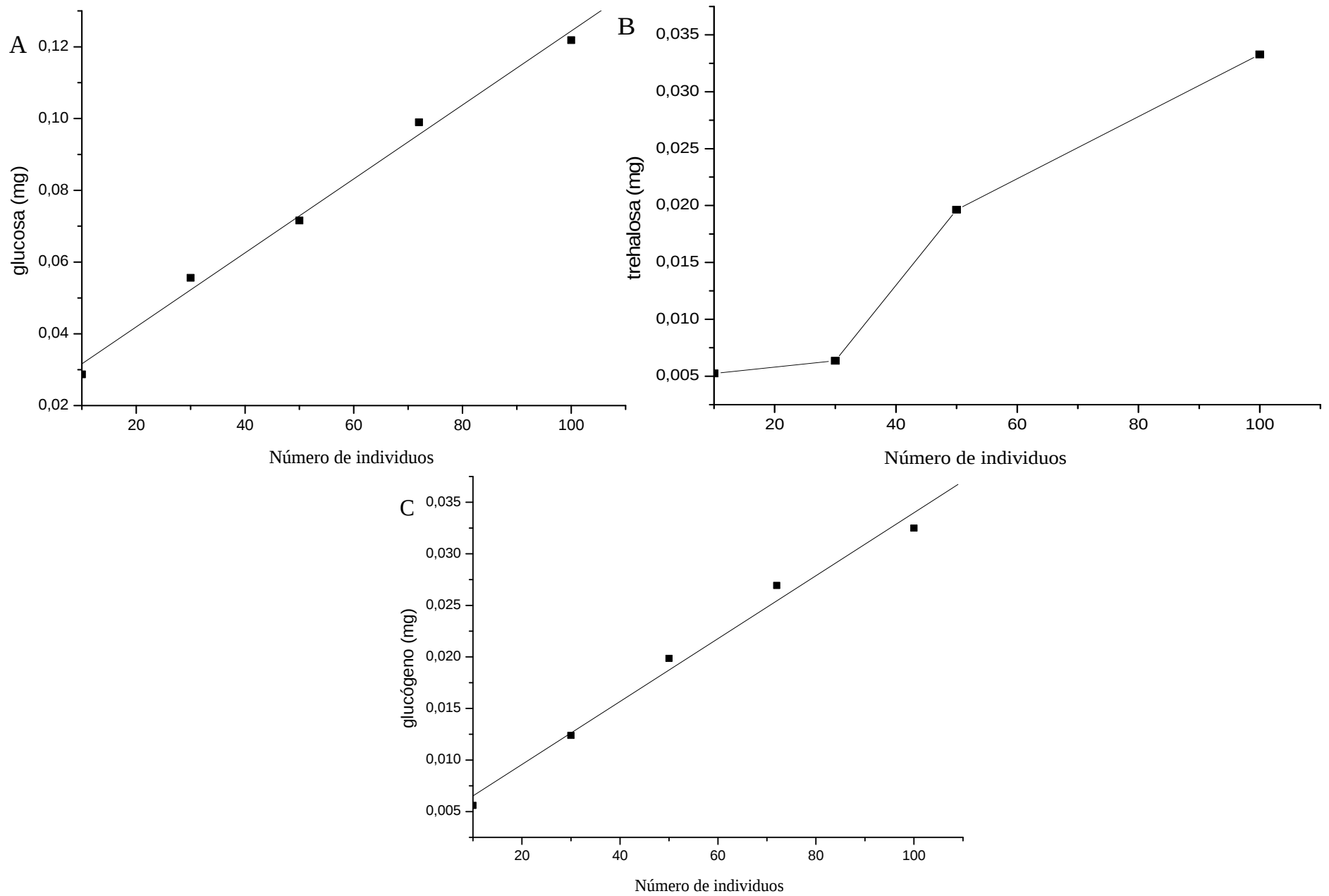


Figura 6. Número de insectos requeridos para la cuantificación de carbohidratos. (A) Glucosa, (B) Trehalosa, (C) Glucógeno

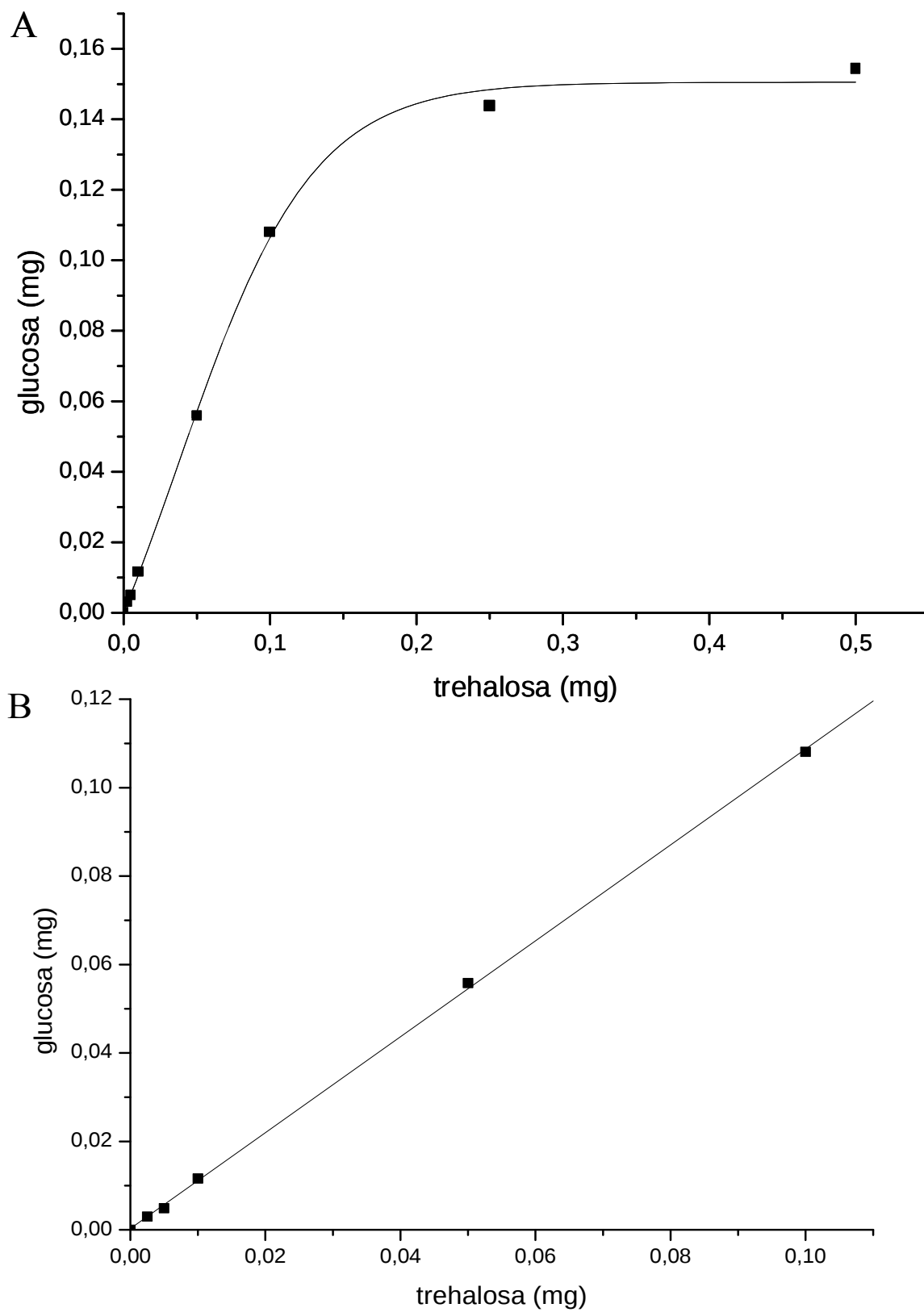


Figura 7. Proporcionalidad entre la cantidad de trehalosa hidrolizada y de glucosa producida. (A) Concentraciones de trehalosa entre 0,001 – 0,500 mg (n = 8), (B), expansión del grafico A, concentraciones de trehalosa entre 0,001 – 0,100mg (n = 6).

5.2 Efectos de las dietas a base de carbohidratos simples y complejos sobre la supervivencia y la variación de peso corporal en el gorgojo de arroz adulto

Para evaluar el efecto de las dietas a base de carbohidratos simples y complejos, sobre los parámetros supervivencia y peso corporal, fueron tomados tres grupos control, cada uno con 60 insectos, mantenidos en las diferentes condiciones durante 8 días: (1) control positivo, población de insectos alimentada con arvejas (rica en nutrientes), que es la dieta de mantenimiento; (2) control negativo, población de insectos mantenidos en ayuno (sin alimento); (3) control para la dieta de glucosa 5 %, los insectos fueron mantenidos en agar al 4 % (ayuno con suministro de agua). Este último, permitió verificar que los cambios obtenidos en los insectos alimentados con glucosa 5 % procedieran de la dieta y no del agua adicional que se les suministraba a través de las “semillas” de agar.

5.2.1 Supervivencia

El porcentaje de supervivencia para las poblaciones de insectos colocadas en las diferentes condiciones control se presentan en la figura 8. Se puede observar que los insectos alimentados con arvejas, presentaron una supervivencia del 99 % al término del experimento. Este resultado es esperado, ya que la arveja es un alimento rico en nutrientes, donde se realiza el mantenimiento de las poblaciones y los insectos están adaptados a esta condición. El grupo de insectos mantenidos en la condición de ayuno presentó una mortalidad acentuada a partir del segundo día del ensayo; obteniéndose al final del experimento un 85 % de supervivencia. La supervivencia durante los dos primeros días pudo deberse a la utilización del alimento contenido en el buche y a los tejidos de reserva presentes en el insecto; luego de este tiempo, se agota la reserva alimenticia y se evidencia una pérdida de agua metabólica (Carmona y Gomez-Sotillo, 1997). Además el sistema enzimático empieza a deteriorarse, promoviendo la alta mortalidad. La población sometida

al ayuno con suministro de agua (agar 4 %) presentó una menor mortalidad (4 %) con respecto a la del ayuno (15 %), esto puede indicar que el suministro de agua, favorece al mantenimiento del animal. Estos grupos controles, han sido utilizados en trabajos anteriores (Carmona y col., 1998; Millán y Carmona, 2005; Perez-Navarrete y col., 2007; Lovera, 2008) y los resultados reportados para la supervivencia concuerdan con los obtenidos en este trabajo. Esto permitió tener un punto de referencia apropiado para poder comparar el efecto de las dietas ensayadas sobre el parámetro de supervivencia, además de indicar que los experimentos fueron realizados de manera adecuada.

El parámetro supervivencia, permite evaluar la toxicidad de las dietas. Cuando la supervivencia de una población sometida a un determinado tratamiento es menor con respecto a la condición de ayuno, indica que la dieta es tóxica para los insectos (Carmona y col., 1998). En la figura 9, se muestra el efecto de las diferentes dietas ensayadas sobre la supervivencia. Ninguna de las dietas ensayadas presentó un efecto deletéreo sobre los insectos.

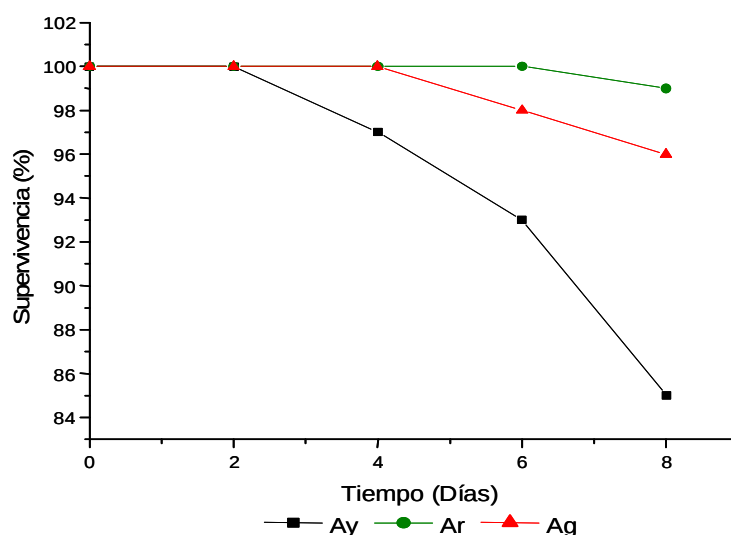


Figura 8. Supervivencia de los insectos, mantenidos en las diferentes condiciones control: ayuno (Ay), arveja (Ar) y agar al 4 % (Ag). Expresada como porcentaje del número inicial de individuos.

El porcentaje de supervivencia obtenido para los insectos mantenidos en glucosa, fue similar al encontrado en la población alimentada con almidón de maíz y almidón de papa 99 %, 99 % y 98 %, respectivamente, no poseen diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$) y fueron similares al control positivo (99 %). Galeno (2006) estudió la digestibilidad *in vitro* y el aprovechamiento por el gorgojo de arroz de diferentes almidones. Ella reportó una supervivencia similar para los insectos que fueron alimentados con las dietas de almidón de maíz y arvejas; mientras que, para el almidón de papa evidenció una alta mortalidad (supervivencia ligeramente superior a la determinada en el ayuno). Estas diferencias en la supervivencia, fueron explicadas por el contenido de almidón resistente que presenta el almidón de papa, el cual es mayor que el encontrado en el almidón de maíz (Engliyst y col., 1990). El resultado obtenido por Galeno (2006) para la supervivencia de la población alimentada con almidón de papa, difiere de los reportados por Zamora (2005) y por Applebaum y colaboradores (1964), quienes trabajaron con *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum*, respectivamente, durante 20 días. Los resultados de estos dos últimos concuerdan con los reportados en este trabajo. Estas discrepancias, pueden ser causadas por la condición fisiológica del animal ó por adaptación de los individuos al consumo del almidón de papa.

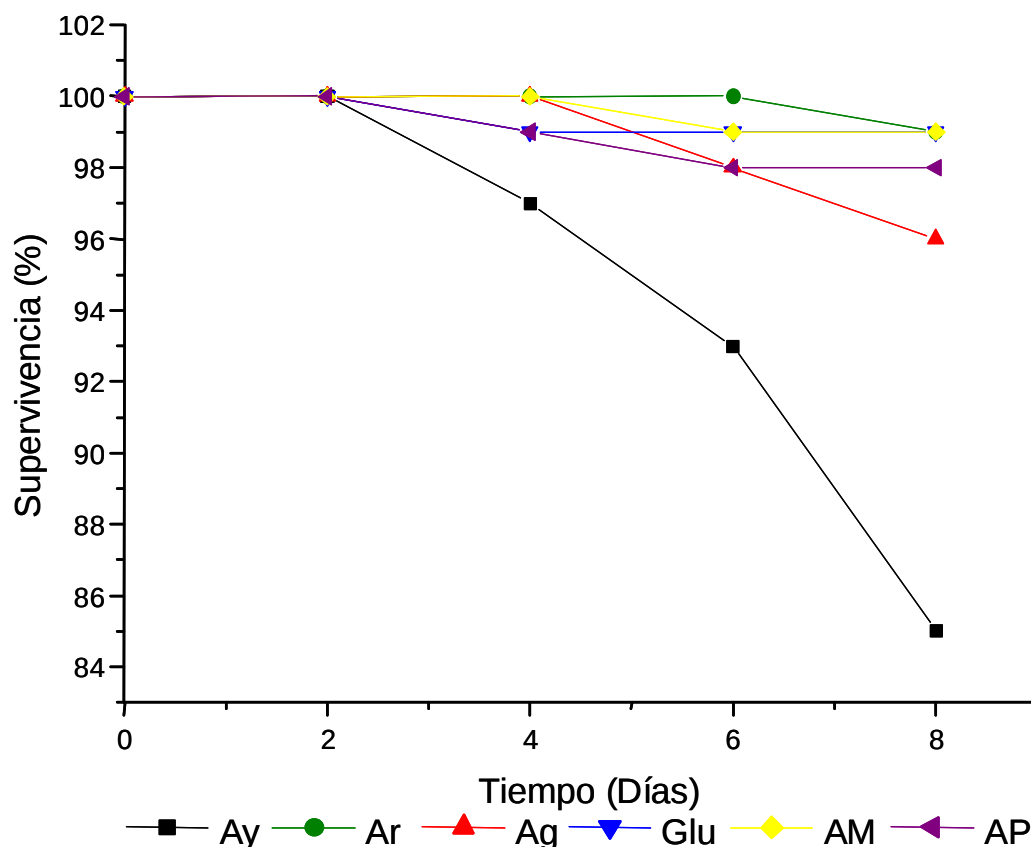


Figura 9. Supervivencia del gorgojo de arroz durante 8 días de los controles, ayuno (Ay), arveja (Ar), agar al 4 % (Ag), comparada con las poblaciones que fueron alimentadas con glucosa al 5 % (Glu), almidón de maíz (AM) y almidón de papa (AP).

Por otro lado, la supervivencia de los insectos mantenidos en glucosa (99 %), resultó superior, con una diferencia significativa ($p < 0,05$), a la determinada en el ayuno con agua (96 %). Dietas con muy poco aporte nutritivo, nada más con valor energético, han sido ensayadas en este sistema (Millán y col, 2005; Zamora, 2005), obteniéndose un resultado equivalente en la supervivencia.

5.2.2 Variación de Peso

El peso corporal es un parámetro, que permite evaluar el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Este se determinó, por el peso de las poblaciones dividido entre los individuos que sobrevivieron a las diferentes condiciones nutricionales y por diferencia con

el primer día se obtiene la variación de peso (Carmona y col., 1998). Este registro fue realizado durante el tiempo de experimentación cada 48 horas.

En la figura 10 se presenta el efecto de las dietas control sobre la variación de peso. En la arveja los gorgojos incrementaron 1,16 % su peso inicial; mientras que, en el ayuno los animales presentaron una pérdida de peso progresiva, disminuyendo un 18 % su peso inicial. En las primeras horas de ayuno, los animales pueden utilizar el alimento que se encuentra en el reservorio del canal alimentario, luego de esto pasan a consumir sus reservas corporales, lo cual conlleva a una disminución del contenido de grasa, proteínas y agua (Newsholme, 1986), evidenciándose una pérdida del peso corporal en la población mantenida en ayuno. Por otra parte, en la condición de suministro de agua (agar 4 %), los insectos presentaron un decrecimiento del 6 % en el peso corporal al término del experimento. Siendo la disminución más acentuada en los primeros días del ensayo. Pasado este tiempo, el peso corporal se mantuvo prácticamente constante. En este estado, hay un considerable aumento en el contenido de agua corporal y una disminución en el componente “otros” como se discutirá más adelante (tabla 2). Los valores del peso obtenido para las condiciones de ayuno (ayuno total y ayuno con agua) mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al término del experimento. Estos controles fueron implementados, cuando se estableció el uso de insectos en estudios nutricionales (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998; Carmona y col., 2001). En esos trabajos explican que la diferencia de peso de los animales que forman los controles negativos, es debida a que el agua promueve a una disminución del consumo de energía proveniente de los tejidos de reserva del animal unido al mejor aprovechamiento del alimento que se encuentra en el reservorio del canal alimentario, además de causar un aumento en el contenido de agua corporal.

Los resultados del peso corporal del gorgojo de arroz adulto, alimentado con las dietas en estudio, se presentan en la figura 11. La dieta a base de almidón de maíz promovió un incremento del peso corporal en un 3 %; mientras que, las poblaciones que fueron alimentadas con almidón de papa presentaron una ligera disminución del peso corporal (1 %). La digestibilidad de los almidones se ve afectada por el contenido de almidón resistente total, el cual varía dependiendo del origen del almidón, siendo el almidón de maíz más biodisponible que el almidón de papa, por contener una mayor proporción de cadenas de amilosa (Bjork y col., 1994; Galeno, 2006). Esto puede explicar la diferencia significativa del peso corporal obtenido para las poblaciones alimentadas con los carbohidratos complejos

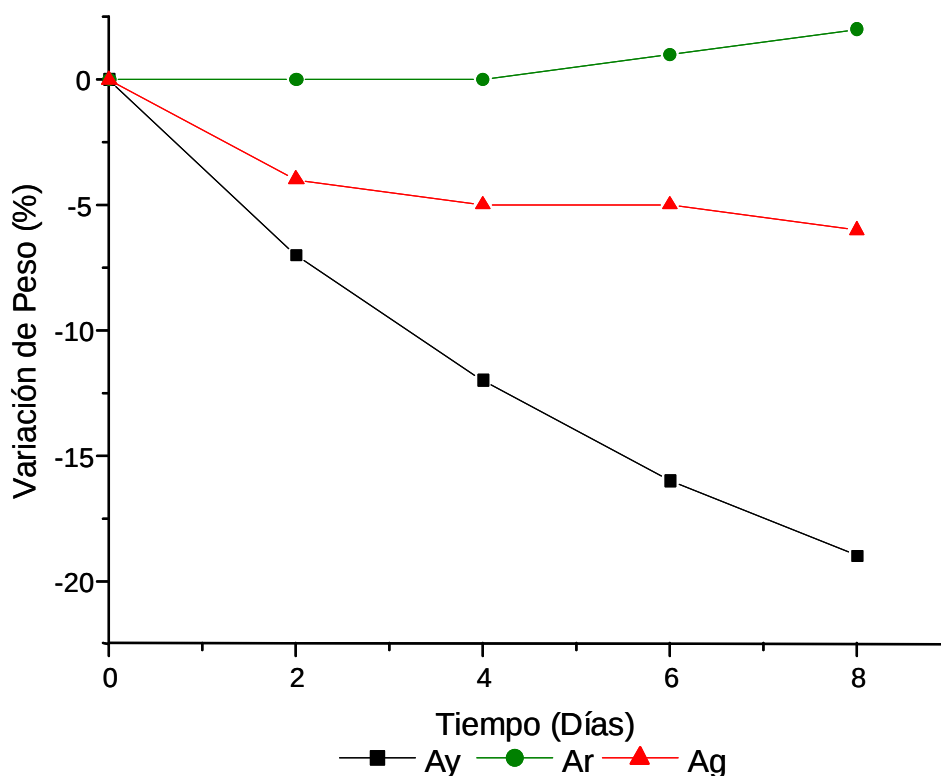


Figura 10. Variación de peso del gorgojo de arroz durante 8 días de los controles, ayuno (Ay) arveja (Ar) y agar al 4 % (Ag).

Los insectos mantenidos en la dieta a base de glucosa al 5 %, disminuyeron su peso inicial en un 4 % durante las primeras 96 horas, después de este tiempo mantuvieron el peso prácticamente constante hasta el final del experimento. En el control realizado para esta dieta (agar al 4 %), se observó el mismo comportamiento, pero con una pérdida de peso del 6 % con respecto al peso inicial. Resultados semejantes fueron descritos por Millan y Carmona (2005), para larvas y adultos de *Tribolium castaneum* utilizando agar al 10 %.

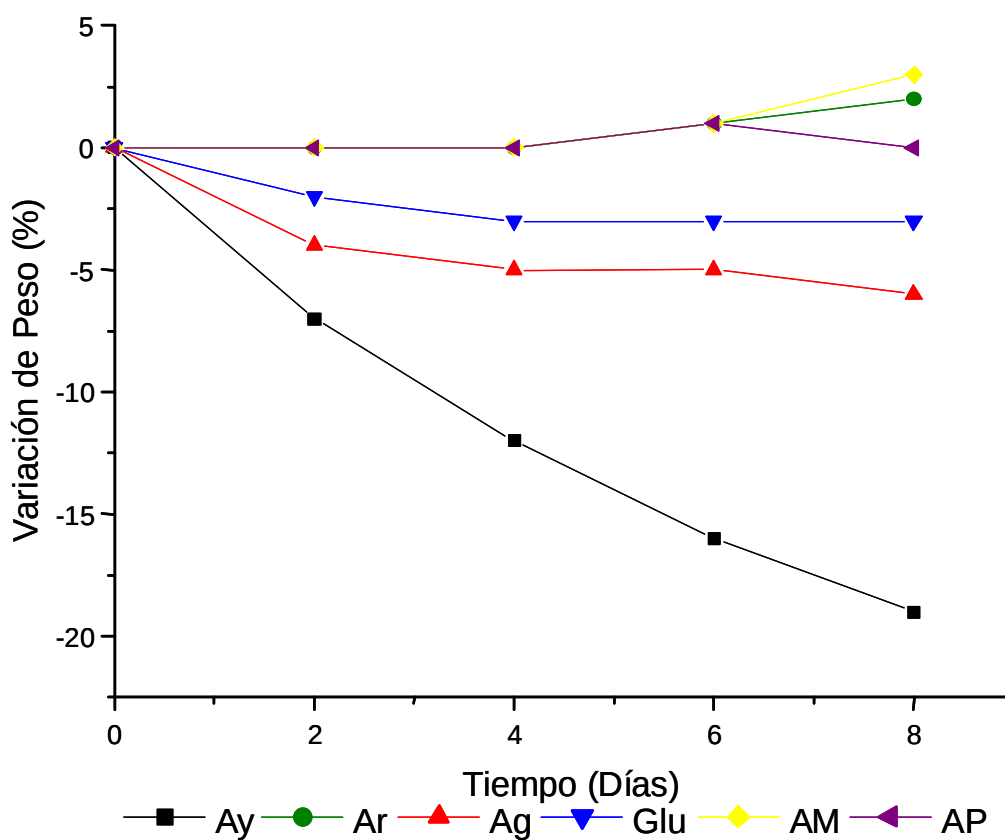


Figura 11. Variación de peso del gorgojo de arroz durante 8 días de los controles, ayuno (Ay), arveja (Ar) y agar al 4 % (Ag) comparada con las poblaciones de fueron alimentada con glucosa al 5 % (Glu), almidón de maíz (AM) y almidón de papa (AP).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la supervivencia del gorgojo adulto no se ve afectada por el consumo de carbohidratos simples y/o complejos con diferentes biodisponibilidad. Además, comparando los carbohidratos en estudio en cuanto al peso corporal, se encontraron que los insectos alimentados con almidón de maíz tuvieron un leve aumento comparado con los alimentados con el almidón de papa; evidenciando la diferencia en la composición de los almidones. Por otro lado, la dieta de glucosa al 5 % promovió una disminución del peso corporal de los insectos. Esto puede ser debido a que las dietas suministradas no fueron isocalóricas (tabla 1), siendo la dieta de glucosa al 5 %, la que proporcionó menos energía.

Las variables supervivencia y variación de peso, presentaron una correlación positiva de $r^2 = 0,9344$ (tabla 3); esto sugiere que los individuos que sobreviven poseen una mayor probabilidad de aumentar de peso o también puede indicar que los individuos adultos tienen una mayor probabilidad de supervivencia.

5.3 Variación de la composición corporal del gorgojo adulto alimentado con carbohidratos con diferentes biodisponibilidad.

El análisis de la composición corporal ha sido una herramienta básica para los estudios nutricionales debido a que se presentan cambios adaptativos en el organismo en respuesta a la dieta suministrada (Carmona y col, 1998; Millán y Carmona, 2005). Diferentes factores pueden ocasionar resultados variables a lo largo del tiempo en diferentes bioensayos, siendo factores intrínsecos, como la edad, sexo, condición fisiológica, grado de actividad de los individuos; factores ambientales y climáticos, como la humedad, la estación del año elegida para el montaje de los ensayos, manipulación de los individuos, etc. (Millán y Carmona, 2005; Lovera, 2008).

En el estudio de la composición corporal, se incluyó el control cero. Como fue descrito en la sección 4.3, los ensayos con las diferentes dietas se realizaron en viales cerrados. Sin embargo, los insectos fueron cultivados en envases tapados con una malla, lo que permitió el intercambio gaseoso de los individuos con el medio ambiente. Por lo tanto, la finalidad de este control fue verificar que las condiciones experimentales en los que fueron ensayadas las diferentes dietas no interfirieran en los resultados. Para esto se determinó la composición corporal en el tiempo cero (día en que se comenzó el experimento) y se comparó con la obtenida para el control positivo al término del experimento. Los resultados obtenidos para el control positivo, no presentaron diferencias significativas con respecto al control cero (tabla 2). Esto indica que las condiciones del ensayo no afectaron a los insectos y que los cambios encontrados en las poblaciones provienen del efecto de las diferentes dietas.

En los siguientes apartados, describimos los cambios obtenidos para los diferentes componentes que forman la composición corporal de los insectos, sometidos a las diferentes dietas.

5.3.1 Contenido de agua corporal

El agua es uno de los principales componentes corporales, aporta alrededor del 50 % del peso del individuo (Forbes, 1997). Los insectos son capaces de evitar la pérdida del agua, debido a órganos altamente eficientes como los túbulos de Malpighi (figura 3), encontrado en el tubo digestivo del insecto (Klowden, 2007; Gillot, 2005). Sin embargo, cuando ocurre una pérdida de agua, esta es compensada por el agua ingerida o por el agua que se produce en la cadena transportadora de electrones (agua metabólica) (Lehninger, 2006). En la tabla 2, se resumen los resultados obtenidos para la composición corporal. El porcentaje de agua en los insectos alimentados con arvejas (control positivo) fue

significativamente diferente al resto de las dietas control. El contenido de agua en el ayuno disminuyó en un 2 %; mientras que, en el ayuno con suministro de agua se promovió un aumento del 9 %, cuando se compararon con el control positivo. El valor encontrado para el ayuno difirió de los reportados por varios investigadores (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; López, 1999 y Rojas, 2007), quienes encontraron una considerable disminución de este parámetro con respecto al control positivo.

Los valores del porcentaje de agua en los animales alimentados con almidón de maíz y almidón de papa, fueron iguales (45,2 %), estos valores fueron significativamente inferiores al control positivo (48,9 %). Galeno (2006) señala que almidones con baja digestibilidad *in vivo*, como es el caso del almidón de papa, ocasionan una disminución en el contenido del agua corporal. No obstante, García (2003), reportó que el contenido de agua corporal de *Sitophilus oryzae* aumenta cuando es alimentado con una dieta de almidón papa, lo que indica que los cambios en este parámetro no están muy bien esclarecidos. Por otro lado, la diferencia del contenido de agua corporal puede estar influenciada por la humedad que contengan las dietas. En nuestro caso, las “semillas” realizadas para el almidón de maíz y el almidón de papa se dejaron secar a temperatura ambiente por 12 horas; el contenido de humedad determinado para estos almidones fue de 16,4 % y 26,2 %, respectivamente. Estos valores están por encima de los encontrados para las semillas que son secadas en la estufa a 37 °C por 24 horas, donde ha sido reportada una humedad del 11,5 % y de 15,1 % para el almidón de maíz y el almidón de papa, respectivamente (Sívoli, 1995). Como dijimos anteriormente, el contenido de humedad en el almidón de papa es un 10 % mayor que la encontrada en el almidón de maíz (tabla 1). Quizás, la pérdida de agua en el insecto que es ocasionada por el consumo de almidón de papa, está apantallada por el mayor contenido de agua que se le suministró a estos individuos a través de la pastilla de

almidón. Por otra parte, los insectos mantenidos en glucosa al 5 % presentaron una disminución del 1,91 % del agua corporal con respecto a la condición de ayuno con agua (agar 4 %) y un incremento (aproximadamente 13 %) con relación a los valores obtenidos para los insectos alimentados con los carbohidratos complejos.

En general, los resultados muestran que el suministro de agua a los insectos por medio de semillas artificiales a base de agar promueve un aumento en el contenido de agua corporal. Este hecho ha sido reportado por Millán y Carmona (2005) y Lovera (2008) en donde se señala un incremento del 10 % del agua corporal en el gorgojo adulto.

Los análisis de correlación simple (tabla 3), de la variable agua corporal con respecto al resto de las variables dio positiva para la supervivencia ($r^2 = 0,60871$) y para la variación de peso corporal ($r^2 = 0,69488$); mientras que, para la variable grasa y el componente “otros” la correlación fue negativa ($r^2 = -0,70688$ y $r^2 = -0,85052$; respectivamente). El agua es una molécula vital para los organismos, que esta implicada en todos los procesos metabólicos, constituyendo aproximadamente 47 % del peso corporal de los insectos (tabla 2). Los resultados obtenidos para los insectos mantenidos en ayuno total y ayuno con suministro de agua, muestran que a mayor contenido de agua corporal (47,1 % y 57,8 %, para ayuno y ayuno con suministro de agua, respectivamente), menor es la cantidad de grasa presente en los organismos (6,36 % y 4,69 %) para ayuno y ayuno con suministro de agua), pareciera indicar que el agua favorece la degradación del tejido graso; esto se refleja en una menor mortalidad de la población.

5.3.2 Contenido de grasa corporal

La grasa corporal es la reserva energética más importante que poseen los organismos, siendo, principalmente consumida en condición de estrés (Klowden, 2007). Los valores del porcentaje de grasa expuestos en la tabla 2 muestran que, la población

mantenida en ayuno con suministro de agua, presentó menor contenido de grasa corporal (4,69 %), con respecto a la del ayuno total (6,56 %)($p < 0,05$). Estos valores son considerablemente menor a los encontrados con insectos alimentados con arvejas (12,1 %). Este hecho, indica que las reservas energéticas están siendo utilizadas para el mantenimiento del organismo y el suministro de agua promueve a la utilización de estas reservas. El consumo de glucosa al 5 %, condujo a una disminución de las grasas corporales (hasta un 8,83 %) con respecto al control positivo y fue un 88 % mayor al ayuno con suministro con agua (tabla 2). Millán y Carmona (2005) encontraron que en larvas y adultos de *Tribolium castaneum* que fueron alimentados con una dieta de glucosa al 5 %, el contenido de grasa corporal aumentó con respecto al ayuno con suministro de agua (agar al 10 %) y fue igual al control positivo que fue realizado con Ne-nerina. Por otro lado, diferentes factores pueden ocasionar resultados variables en los diferentes bioensayos, entre estos se encuentran: la edad, las condiciones fisiológicas y la manipulación de los individuos, entre otros. En contraste, las dietas de almidón de maíz y de papa promovieron un aumento significativo de la grasa (15,0 % y 14,4 %, respectivamente) con respecto al control positivo. En trabajos anteriores (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; López, 1999 y Rojas, 2007) se ha descrito que dietas aprroteicas inducen una mayor acumulación de grasa corporal y este parámetro ha sido utilizado como un indicador en los estudios de carbohidratos. Adicionalmente, Galeno (2006) reportó que el contenido de grasa corporal se ve afectado por los diferentes almidones, porque el contenido de almidón resistente total varía dependiendo del origen del mismo. Aunque, en nuestros resultados se obtuvo un pequeño aumento en el porcentaje de grasa corporal para los insectos alimentados con almidón de maíz con respecto a los alimentados con almidón de papa, los análisis estadísticos mostraron que no existen diferencias significativas.

El contenido de grasa, presentó una correlación positiva con las variables de variación de peso ($r^2 = 0,65791$), contenido de glucosa ($r^2 = 0,71015$) y contenido de glucógeno ($r^2 = 0,89438$). Como fue descrito anteriormente, el consumo de los almidones promueve en los insectos un aumento en el contenido de grasa. En mamíferos, la utilización de carbohidratos desplaza el metabolismo lipídico desde la oxidación hacia el almacenamiento. El acetil CoA, formado a partir de piruvato que se obtiene de la ruta glucolítica, promueve la formación de citrato. Este metabolito activa la vía de síntesis de ácidos grasos que junto con la disponibilidad del glicerol fosfato incrementa la producción de triglicéridos (grasas) y disminuye la oxidación de los lípidos. Por otro lado, al elevarse el aporte de ácidos grasos se incrementa la β -oxidación. Varios de los productos de esta vía, por ejemplo la CoA, enlentecen la glucólisis, estimulan la gluconeogénesis y la síntesis de glucógeno. Por tanto, a mayor utilización de lípidos como sustrato energético se desplaza el metabolismo de carbohidratos desde la oxidación al almacenamiento. Los controles de estos mecanismos están reforzados por señales hormonales (Lehninger, 2006). En los insectos este mecanismo es similar (Klowden, 2007). En la tabla 4, se indican los resultados obtenidos para los carbohidratos, mostrando que los insectos alimentados con almidones presentan un mayor contenido de glucógeno y glucosa, con respecto a los mantenidos en arvejas y ayuno total.

5.3.3 Contenido de carbohidratos

De la degradación del almidón por la acción de diferentes carbohidrasas digestivas, se obtiene exclusivamente glucosa. La absorción de esta molécula a nivel intestinal se produce de forma pasiva en el intestino del insecto; aunque recientemente han sido reportados transportadores de glucosa similares a los de mamíferos (GLUT2 y GLUT5) en la membrana del epitelio del intestino medio en *Aphidius ervi* (Caccia, 2007). La glucosa es

la principal fuente de energía de los individuos. Además es el precursor en la síntesis de todos los carbohidratos que componen el organismo, incluidos el glucógeno para almacenamiento, la ribosa y desoxirribosa en los ácidos nucleicos, se combinan con proteínas y lípidos en las glucoproteínas y glucolípidos; constituyendo moléculas importantes que participan en numerosas funciones. En los insectos, adicionalmente se sintetiza la trehalosa que es el principal azúcar circulante de la hemolinfa (Klowden, 2007; Gillot, 2005).

Debido a la importancia de estas moléculas sobre el metabolismo, nos propusimos a evaluar el efecto del consumo de glucosa que es de rápida absorción y de carbohidratos complejos de diferentes biodisponibilidad sobre los niveles de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz.

Como ya se ha mencionado, en nuestros ensayos incluimos el control cero, para verificar si había cambios en la composición corporal y en la distribución de los carbohidratos con respecto al control positivo durante el tiempo de experimentación. No se observaron cambios con respecto a los componentes agua, grasa y proteínas. Sin embargo, diferencias significativas fueron encontradas entre el contenido de carbohidratos totales y en la distribución de estos carbohidratos (glucosa, trehalosa y glucógeno) (tabla 4). En la población del control positivo, el contenido de glucosa y trehalosa fue duplicado (0,207 %, 0,069 %, respectivamente) y la cantidad de glucógeno disminuyó con respecto a los valores encontrados para los insectos del control cero. Estas diferencias pudieran deberse a que los carbohidratos varían en respuesta a la ingesta de alimentos y son los compuestos de mayor circulación en la célula.

5.3.3.1 Contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz alimentado con carbohidratos simples y complejos

Los insectos alimentados con arveja presentaron un mayor contenido de glucosa ($0,207 \pm 0,009$ %), trehalosa ($0,069 \pm 0,006$ %) y glucógeno ($0,102 \pm 0,003$ %) referente a los individuos mantenidos en condiciones de ayuno (glucosa, trehalosa y glucógeno; $0,113 \pm 0,008$ %, $0,012 \pm 0,006$ %, $0,033 \pm 0,006$ %, respectivamente). En los insectos sometidos al ayuno con suministro de agua, se obtuvo una disminución significativa en la cantidad de glucosa ($0,079 \pm 0,009$ %), un incremento en el contenido de trehalosa ($0,032 \pm 0,001$ %) y no hubo diferencias significativas en el contenido de glucógeno, con respecto al ayuno total (tabla 4).

Los datos muestran, que el contenido de glucógeno disminuyó aproximadamente tres veces para los insectos sometidos a las condiciones de ayuno en comparación al control positivo, indicando que la reserva de glucógeno fue movilizada y utilizada como fuente de energía para la supervivencia de los individuos. En humanos, el contenido de glucógeno corporal (hepático y muscular), está alrededor del 1 % (Wang y col., 1992). El glucógeno hepático, funciona como reserva de glucosa, el cual es movilizado para mantener el nivel de glucosa sanguínea prácticamente constante (Mahan, 2001). En condiciones de ayuno, el glucógeno hepático puede durar entre 12 y 24 horas, siendo la primera reserva a ser enteramente degradada (Mahan, 2001). Esto difiere de los insectos, donde el glucógeno no fue consumido totalmente. Sin embargo, hubo una disminución considerable en el contenido de grasas (tabla 2). Por otra parte, los niveles de glucosa decrecieron en un 45 % y 62 % para la condición de ayuno y ayuno con suministro de agua, respectivamente. Resultados análogos han sido reportados en humanos sometidos a ayuno durante 8 días, donde la concentración de glucosa en sangre disminuye un 20 % (Newsholme, 1986). Las

dos condiciones de ayuno, causaron en los individuos un decrecimiento de la cantidad de trehalosa, siendo mayor para el ayuno sin suministro de agua. El gliceraldehído 3-fosfato obtenido desde los triglicéridos, entra en la ruta de la gluconeogénesis para formar glucosa, a partir de la cual se puede sintetizar trehalosa en los cuerpos grasos. Este disacárido es el principal azúcar circulante de la hemolinfa y tiene funciones similares a la glucosa en sangre de mamíferos (Chen, 2004). La concentración de trehalosa es variada, puede estar comprendida entre 0,5 y 5 g/100 mL (Blatt, 2001; Klowden, 2007), y normalmente es mayor que el contenido de glucosa en la sangre humana (0,1 g/100 mL). En insecto otras funciones se le han atribuido a este disacárido, como la de regulador osmótico (Elbein, 2003), esto podría explicar un mayor contenido de trehalosa, debido a un ajuste osmótico, en los insectos que tuvieron suministro de agua.

Comparando los valores de glucógeno y de trehalosa de los animales sometidos en ayuno con suministro de agua y los mantenidos con glucosa al 5 %, se observó que en esta última condición los individuos duplicaron los valores. El contenido de glucosa no varió (tabla 4).

Para los insectos mantenidos en el almidón de maíz y el almidón de papa, el contenido de trehalosa fue equivalente al control positivo ($0,069 \pm 0,006$ %) (tabla 4).

En general, los resultados mostraron que bajo las diferentes condiciones de alimentación (carbohidratos complejos, arveja, glucosa 5 %), no se alteró el nivel de trehalosa en la hemolinfa del insecto; apuntando a que el mantenimiento de este disacárido es fundamental para el organismo. Este disacárido, además de proteger al animal en condiciones de estrés, favorece el transporte de la glucosa contra un gradiente de concentración (Klowden, 2007). Por otra parte, el contenido de glucógeno se vio influenciado por los diferentes almidones. Para los individuos alimentados con almidón de

maíz ($0,233 \pm 0,032$ %) fue mayor que para los mantenidos con almidón de papa ($0,164 \pm 0,009$ %). Diferencia que puede atribuirse al contenido de almidón resistente que presentan estos almidones, siendo mayor para el almidón de papa (Sívoli, 1995). En ambas condiciones se incrementó el contenido de glucógeno, con respecto al control positivo ($0,102 \pm 0,003$ %). También se obtuvieron diferencias en el contenido de glucosa, el almidón de papa promovió un incremento de glucosa ($0,245 \pm 0,013$ %) con respecto al control positivo ($0,207 \pm 0,009$ %), el cual no presentó diferencias significativas con los mantenidos en almidón de maíz ($0,196 \pm 0,009$ %). Estos resultados difieren de los reportados por Van der Meulen (1997), donde mostró que la concentración de glucosa arterial y portal obtenida en cerdos alimentados con almidón de papa, era significativamente inferior a la obtenida en los alimentados con almidón de maíz. Sin embargo, Deng en 2001, trabajando con esturiones, observó que no se promueven cambios en el índice glucémico, cuando el animal es alimentado con estos dos almidones.

En este trabajo nos propusimos analizar el afecto del consumo de glucosa y de almidones con diferentes biodisponibilidad sobre la distribución de los carbohidratos. Sin embargo, no fue posible comparar entre las dietas de carbohidratos simples y complejos, debido al variado contenido de humedad que ellas poseen; como fue demostrado con el control de agar al 4 %, el suministro de agua promueve alteraciones en el metabolismo del insecto. Además de que las dietas suministradas no fueron isocalóricas.

En la tabla 3, se puede observar una correlación positiva entre el porcentaje de trehalosa y las variables supervivencia ($r^2 = 0,69653$) y peso corporal ($r^2 = 0,72277$). Como fue descrito anteriormente, este disacárido está comprometido en diferentes funciones del organismo. Para el porcentaje de glucosa se obtuvo una correlación positiva referente al componente grasa ($r^2 = 0,71015$). De igual modo, el glucógeno presentó correlación

positiva con la variables de grasa ($r^2 = 0,89438$), de glucosa ($r^2 = 0,65236$) y variación de peso corporal ($r^2 = 0,66055$). Esto es ejemplificado en los insectos alimentados con las dietas de almidones (tabla 2). Estas dietas, promueven un aumento de glucosa en el organismo. El exceso de este monosacárido es almacenado en forma de glucógeno y conlleva al acúmulo de grasa, con lo cual se favorece un incremento en el peso corporal.

5.3.4 Contenido de nitrógeno proteico y de proteínas solubles

El método más asequible para determinar el contenido de proteínas corporales, es medir el contenido de nitrógeno y establecer una proporcionalidad entre esta medida y el contenido de nitrógeno de las proteínas (Lopez y col, 2002). Sin embargo, ha sido aceptado estimar solamente el contenido de nitrógeno Kjeldahl (A.O.A.C., 2005), el cual en las proteínas representa un 16 % (Heymsfield, 1991). En la tabla 2, se muestra el porcentaje de nitrógeno proteico de los insectos mantenidos en los diferentes tratamientos. Los individuos sometidos en las dos condiciones de ayuno presentaron un porcentaje de nitrógeno corporal similar a los alimentados con arveja ($3,40 \pm 0,26$ %). Analizando este resultado en conjunto con el obtenido para la grasa corporal, se puede deducir que los insectos que sobreviven a los ayunos utilizan primero la grasa corporal y preservan las proteínas, con lo cual aseguran el mantenimiento de las funciones vitales para su supervivencia. Por otra parte, en la población colocada en el ayuno con agua (agar al 4 %), se obtuvo un mayor porcentaje de nitrógeno proteico ($3,36 \pm 0,32$ %), que en la del ayuno total ($2,82 \pm 0,26$ %), valores estadísticamente no significativos. Posiblemente el consumo de agua por los insectos, promueve una menor degradación de las proteínas que forman parte de la estructura básica de los tejidos, promoviendo la utilización de los tejidos de reserva como la grasa, ya que el glucógeno se mantuvo igual (tabla 4), lo cual favorece a la subsistencia del animal, conllevando a una menor mortalidad (ver figura 8). En general, estos resultados coinciden

con los obtenidos por Lovera (2008), en donde reporta porcentajes equivalentes en el contenido de nitrógeno para los insectos alimentados con arvejas y sometidos al ayuno. El almidón de maíz, el almidón de papa y glucosa al 5 %, indujeron a una disminución del contenido de nitrógeno corporal de los insectos, con relación al control positivo. Observaciones semejantes fueron realizadas en diferentes trabajos (Carmona y col., 2001; García, 2003; Galeno, 2006), en donde apuntan que dietas aproteicas conllevan a un aumento del contenido de grasa y a una disminución de las proteínas, debido a que los carbohidratos cubren el requerimiento energético, mas no el proteico. Los valores de nitrógeno proteico para los individuos sometidos a las diferentes condiciones, estuvo alrededor de 2,52 % y 3,40 %. Estos datos son similares a los conseguidos en seres humanos, donde el contenido de nitrógeno proteico, está en torno de 2,5 % (Wang y col., 1992).

Adicionalmente, se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry y col. (1951) (tabla 5). Los valores cuantificados por este método fueron menores que los calculados a partir del nitrógeno proteico multiplicado por 6,25 (resultados no mostrados). Esto pudo deberse a que las proteínas ligadas a membranas o formando parte de otras estructuras, no fueron solubilizadas en la muestra ensayadas por el método de Lowry y col. El contenido de proteínas fue similar entre muestras del control positivo ($6,09 \pm 0,51$ %) y ayuno ($5,99 \pm 0,37$ %). Estos valores fueron significativamente mayores con respecto a las dietas aproteicas. Sin embargo, en el control de ayuno con agua, la cantidad de proteínas fue menor que para el ayuno total. Esto difiere de los datos de nitrógeno proteico, en donde se obtuvo un menor porcentaje de nitrógeno en la muestra de ayuno total (tabla 2).

5.3.5 Contenido de cutícula y nitrógeno cuticular

El nitrógeno cuticular es una estimación del nitrógeno proveniente de la quitina y/o de las proteínas que conforma la cutícula en el insecto. En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos para los parámetros del porcentaje de cutícula y de nitrógeno cuticular. El porcentaje de la cutícula varió entre un 15 % y 20 %, pero el contenido neto de cutícula corporal estuvo alrededor de $8,60 \pm 0,86$ mg por cada 30 individuos, para todas las poblaciones alimentadas con las diferentes dietas. Mientras que, el porcentaje de nitrógeno cuticular de los insectos sometidos a las diferentes dietas, estuvo alrededor del 3 % aproximadamente. Valores semejantes han sido reportados por Lovera (2008). Ella señaló que el componente de nitrógeno cuticular no varía en los insectos adultos alimentados con las distintas dietas. Este hecho, ya había sido observado por López (1999) y por Carmona y colaboradores (2001), en donde se propone que el nitrógeno cuticular es afectado por la edad de los individuos y no por la dieta que consuma. Es importante resaltar que, en el proceso de esclerotización de la cutícula ocurre una estabilización de proteínas de manera irreversible (Klowden, 2007; Gillot, 2005), lo que fue demostrado por los datos obtenidos (tabla 2), siendo la cutícula la estructura fundamental del exoesqueleto.

5.3.6 Contenidos de “otros”

Las poblaciones mantenidas con arvejas, almidón de maíz, almidón de papa, y ayuno presentaron valores para este componente comprendidos entre 18,73 % y 22,66 %, (tabla 2). Estos difieren significativamente de los obtenidos para los de glucosa al 5 % y agar al 4 %. Lovera (2008) señala que la dieta con menor cantidad de “otros” fue la de agar al 5 %, dato que coincide con el presente trabajo. Este parámetro se obtiene por la diferencia de los componentes corporales (agua, grasa, carbohidratos totales (glucógeno, trehalosa y glucosa), nitrógeno proteico, cutícula), englobando todos los parámetros que no

fueron medidos (esqueletos carbonados de los compuestos nitrogenados, cenizas y minerales), por lo tanto es difícil de analizar.

Tabla 2. Peso promedio y composición corporal de gorgojos alimentados con carbohidratos con diferente biodisponibilidad.

Dieta	Peso promedio al día 8 (mg)	Agua corporal (%)	Grasa corporal (%)	Nitrógeno proteico (%)	Cutícula (%)	Nitrógeno cuticular (%)	Otros (%)
Control cero (C0)	1,73 ± 0,04 ^a	48,64 ± 0,32 ^a	11,34 ± 0,55 ^a	2,94 ± 0,46 ^a	14,87 ± 1,13 ^a	2,83 ± 0,44 ^{ab}	21,91 ± 0,56 ^a
Ayuno (Ay)	1,42 ± 0,05 ^b	47,05 ± 0,57 ^b	6,56 ± 0,93 ^b	2,82 ± 0,26 ^a	21,83 ± 0,27 ^b	3,48 ± 0,52 ^a	21,62 ± 0,36 ^a
Arveja (Ar)	1,75 ± 0,05 ^a	48,91 ± 0,60 ^a	12,13 ± 0,74 ^a	3,40 ± 0,26 ^a	16,44 ± 0,45 ^c	3,09 ± 0,27 ^a	18,73 ± 1,26 ^b
Agar 4 % (Ag)	1,62 ± 0,06 ^c	57,76 ± 0,80 ^c	4,69 ± 0,65 ^c	3,36 ± 0,32 ^{ab}	19,22 ± 0,67 ^d	3,28 ± 0,39 ^a	14,91 ± 1,78 ^c
Glucosa 5 % (Glu)	1,66 ± 0,03 ^c	55,85 ± 0,67 ^d	8,83 ± 1,63 ^d	2,52 ± 0,34 ^{ac}	19,80 ± 0,70 ^d	3,35 ± 0,24 ^a	12,77 ± 1,41 ^d
Almidón de maíz (AM)	1,78 ± 0,08 ^a	45,22 ± 0,73 ^e	15,04 ± 0,88 ^e	2,81 ± 0,40 ^a	16,70 ± 1,05 ^c	3,46 ± 0,16 ^a	19,59 ± 1,23 ^b
Almidón de papa (AP)	1,71 ± 0,08 ^{ac}	45,21 ± 0,53 ^e	14,38 ± 1,32 ^e	2,93 ± 0,62 ^a	14,34 ± 1,43 ^a	3,53 ± 0,28 ^{ac}	22,66 ± 2,02 ^a

El peso promedio al inicio del ensayo (día 0) fue de 1,73 ± 0,03 mg para todas las dietas. Los valores representan X ± DS (n = 4). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Tabla 3. Resumen de los coeficientes de correlación simple producto de las correlaciones simples entre los diferentes parámetros medidos en el ensayo con el *Sitophilus oryzae*

	S	P	agua	grasa	NP	NC	cutícula	glucosa	trehalosa	glucógeno
S										
P	0,9344									
Agua	0,60871	0,69488								
Grasa	0,51403	0,65791	-0,70688							
NP	0,50666	0,44584	0,68819	0,42254						
NC	0,15897	0,30158	-0,13046	0,0062477	0,38001					
cutícula	-0,66094	-0,77812	0,43454	-0,74378	-0,099618	0,24916				
Glucosa	0,25043	0,41961	-0,69005	0,71015	0,16747	0,12934	-0,57266			
trehalosa	0,69653	0,72277	-0,083439	0,00037243	-0,13624	0,081674	-0,40332	0,45441		
glucógeno	0,51484	0,66055	0,00015789	0,89438	0,56609	0,032927	-0,69193	0,65236	0,5333	
“otros”	-0,20744	-0,050707	-0,85052	0,40413	0,013812	0,013904	-0,48032	0,51585	-0,2467	0,034045

S: supervivencia, P: variación de peso, NP: nitrógeno proteico, NC: nitrógeno cuticular. Número de casos = 28; los valores resaltados representan las correlaciones mas significativas.

Tabla 4. Carbohidratos de la composición corporal (glucosa, trehalosa y glucógeno) del gorgojos alimentados con carbohidratos con diferente biodisponibilidad.

Dieta	Glucosa (%)	Trehalosa (%)	Glucógeno (%)	Carbohidratos totales (%)
Control cero (C0)	0,110 ± 0,008 ^a	0,031 ± 0,009 ^b	0,127 ± 0,019 ^a	0,27
Ayuno (Ay)	0,113 ± 0,008 ^a	0,012 ± 0,006 ^a	0,033 ± 0,006 ^b	0,16
Arveja (Ar)	0,207 ± 0,009 ^b	0,069 ± 0,006 ^c	0,102 ± 0,003 ^c	0,37
Agar 4 % (Ag)	0,079 ± 0,009 ^c	0,032 ± 0,011 ^b	0,032 ± 0,00005 ^b	0,14
Glucosa 5 % (Glu)	0,087 ± 0,005 ^c	0,061 ± 0,018 ^c	0,067 ± 0,013 ^d	0,21
Almidón de maíz (AM)	0,196 ± 0,009 ^b	0,064 ± 0,009 ^c	0,233 ± 0,032 ^c	0,49
Almidón de papa (AP)	0,245 ± 0,013 ^d	0,059 ± 0,001 ^c	0,164 ± 0,019 ^f	0,47

El peso promedio al inicio del ensayo (día 0) fue de 1,73 ± 0,03 mg para todos las dietas. Los valores representa X ± DS (n = 4). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Tabla 5. Valores de proteínas solubles presentes en el gorgojo de arroz y estimadas por el método de Lowry.

Dieta	Proteínas (%)
Control cero (C0)	6,08 ± 0,55 ^a
Ayuno (Ay)	5,99 ± 0,37 ^a
Arveja (Ar)	6,09 ± 0,51 ^a
Agar 4 % (Ag)	4,86 ± 0,26 ^b
Glucosa 5 % (Glu)	5,74 ± 0,59 ^c
Almidón de maíz (AM)	5,04 ± 0,31 ^c
Almidón de papa (AP)	5,05 ± 0,22 ^c

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05)

5.4 Análisis de Componentes Principales

El análisis estadístico de componentes principales (ACP) muestra la relación que existe entre las variables estudiadas; sintetizando la información de los datos en un gráfico bidimensional (Terradez, 2007). También permite observar las diferencias y semejanzas entre réplicas de una misma dieta, lo que indirectamente es un indicativo del trabajo experimental (Lovera, 2008).

Para la aplicación del ACP tiene que haber una alta correlación entre las variables, lo que facilita el análisis, ya que pocos factores acopiarán la información total del sistema. La elección de estos factores se realiza de tal forma, que el primero acumule la mayor proporción posible de la variabilidad original (Terradez, 2007). La tabla 6 muestra los resultados del análisis de componentes principales, se puede observar que el primer factor acumula un 44,9 % de la varianza y el segundo factor acopia 20,8 % de varianza. Este segundo factor incluye la máxima variabilidad posible que no fue acumulada por el primero y así sucesivamente con los demás factores. Los primeros dos factores aportan en conjunto un 65,7 % de la varianza (varianza acumulada). A cada factor se les denomina componente principal (CP), que son los que recogen el porcentaje con una variabilidad mayor, siendo suficiente para aplicar el análisis en base a estos dos componentes (Romero, 2007; Ferrero, 2007).

Los autovalores (matriz que se origina a partir de los datos originales) proporcionan las dimensiones del espacio y originan los autovectores (componentes de la composición corporal y las demás variables) que son los que nos permiten identificar las variables que mejor están representadas en cada uno de los CP (Romero, 2007; Ferrero, 2007).

Tabla 6. Valores de los autovalores y porcentaje de varianza de los componentes principales.

Componentes principales (CP)	Autovalores	% Varianza
1	5,39	44,9
2	2,49	20,8
3	1,79	14,9
4	1,01	8,4
5	0,47	3,9
6	0,30	2,5
7	0,27	2,2
8	0,12	1,0
9	0,10	0,8
10	0,05	0,4
11	0,01	0,1
12	$3,37 \times 10^{-19}$	$2,8 \times 10^{-18}$

Para el calculo de los autovalores se utiliza una matriz de correlación, la cual proporciona una estandarización de los datos. Esta matriz se obtiene al dividir las variables entre su desviación estándar (Hammer y col, 2001). Cuando el porcentaje de variabilidad por los dos primeros componentes principales es mayor o igual al 60 % la técnica es exitosa, representándose gráficamente las variables originales, permitiendo correlacionarlas entre si (Terradez, 2007). El porcentaje de varianza acumulado de los dos primeros componentes fue de 66 %, mayor que 60 %, lo que indica que se puede analizar un ACP con estos dos componentes. Mientras que, el porcentaje acumulado entre el primer y tercer componente fue de 60 %, por lo que existe una mejor relación de varianzas entre los dos primeros componentes y por lo tanto se trabajo con ellos. Sin embargo, se analizó la relación entre el CP1 y CP3 (datos no mostrados) para avalar correlaciones que no estuviesen claras con los dos primeros componentes.

La figura 12 muestra el biplot obtenido con el ACP para los dos primeros componentes. Los componentes se utilizan como coordenadas para poder relacionar las variables, donde el eje “x” representa el CP 2 y el eje “y” el CP 1. En este gráfico cada punto es una réplica de las dietas y cada autovector es una variable (supervivencia, variación de peso, agua, grasa, glucosa, trehalosa, glucógeno, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular, cutícula y “otros”). Los autovectores presentaron un coeficiente de correlación con los CP1 y CP2, ubicándolos en el espacio generado por estos dos componentes (Romero, 2007).

Los autovectores de supervivencia (0,289), variación de peso (0,349), grasa (0,404), glucosa (0,333), trehalosa (0,307), glucógeno (0,391), nitrógeno cuticular (0,0007) y “otros” (0,160) presentaron correlaciones positivas con el CP1; mientras que, para las variables: agua (-0,253), nitrógeno proteico (-0,005) y nitrógeno cuticular (-0,362) las correlaciones fueron negativas. Con el CP2 las correlaciones positivas fueron con los autovectores de grasa (0,093), glucosa (0,216), glucógeno (0,085), nitrógeno cuticular (0,129) y “otros” (0,541). Las variables que presentaron correlaciones negativas con CP2 fueron supervivencia (-0,408), variación de peso (-0,312), agua (-0,491), nitrógeno proteico (-0,051), trehalosa (-0,316) y cutícula (-0,012).

La correlación entre cada variable viene dada por el ángulo que se forma entre estas, es decir, si los autovectores son paralelos (crecen en un mismo sentido) la correlación es positiva; si los autovectores son opuestos (crecen en sentido contrario) la correlación es negativa y si estos son perpendiculares la correlación es nula, no posee interpretación alguna. Los autovectores de supervivencia y peso presentaron correlaciones positivas entre ellas y con los autovectores de grasa, glucógeno, trehalosa y nitrógeno proteico, siendo la trehalosa la que mostró una mayor correlación con la supervivencia y variación de peso

(figura 12). La grasa, el glucógeno y la trehalosa son las reservas energéticas del organismo (Klowden, 2007). La trehalosa, además de suministrar energía protege al individuo en condiciones de estrés y permite mantener la homeostasis en el organismo (Elbein, 2003). Por otra parte, las proteínas son responsables de todos los procesos metabólicos que ocurren en los individuos. Esto pudiera explicar la correlación positiva entre el porcentaje de componentes antes señalados con la supervivencia. En dietas sustanciosas, los niveles de glucógeno y grasa tienden a aumentar, conllevando a un incremento en el peso corporal.

El autovector agua posee una correlación negativa con respecto al autovector de grasa. Lo cual podría sugerir que un aumento en el contenido de agua induce la disminución del contenido de grasa, tal como lo habíamos reportado en la sección 5.3.2. Estas correlaciones fueron observadas por Lovera (2008) con dietas totalmente diferentes a las ensayadas en este trabajo.

Las variables de grasa, glucosa y glucógeno presentaron correlaciones positivas, siendo mayor la de la grasa con el glucógeno, posiblemente debido a que las rutas metabólicas de estos combustibles están muy ligadas. Por otro lado, el biplot también puede proporcionar información de cómo la dieta influye en las diferentes variables estudiadas. Como fue el caso de los almidones, que promovieron la acreción de grasa, aumentaron el contenido de glucosa y glucógeno, en los insectos (figura 12). Las dietas con alto contenido de humedad (agar 4 %, glucosa 5 %) influyeron sobre el parámetro de agua corporal. Una dieta con alto valor nutricional (arvejas) ocasionó un aumento de la trehalosa y del nitrógeno proteico. Mientras que, el ayuno influyó negativamente en la supervivencia, variación de peso y en los combustibles de reserva.

Los autovectores que representan las variables del contenido de cutícula, nitrógeno cuticular y “otros”, no se proyectaron hacia ninguna dieta. Indicando que las dietas

ensayadas no afectaron estos parámetros. Nótese que el ACP ubicó en el centro del biplot, al control del día cero (figura 12).

Al comparar los dos tipos de correlaciones empleadas en este trabajo, encontramos que las correlaciones simples permitieron distinguir en magnitud las relaciones entre las variables estudiadas (tabla 3), en cambio el ACP, aunque no indicó en magnitud la correlaciones entre las variables estudiadas, representó gráficamente las correlaciones simples encontradas (figura 12), además permitió distinguir variabilidad entre las replicas de una misma dieta y el efecto que poseen estas dietas con las diferentes variables estudiadas, por lo tanto el ACP ofreció una mayor cantidad de información en comparación con las correlaciones simples.

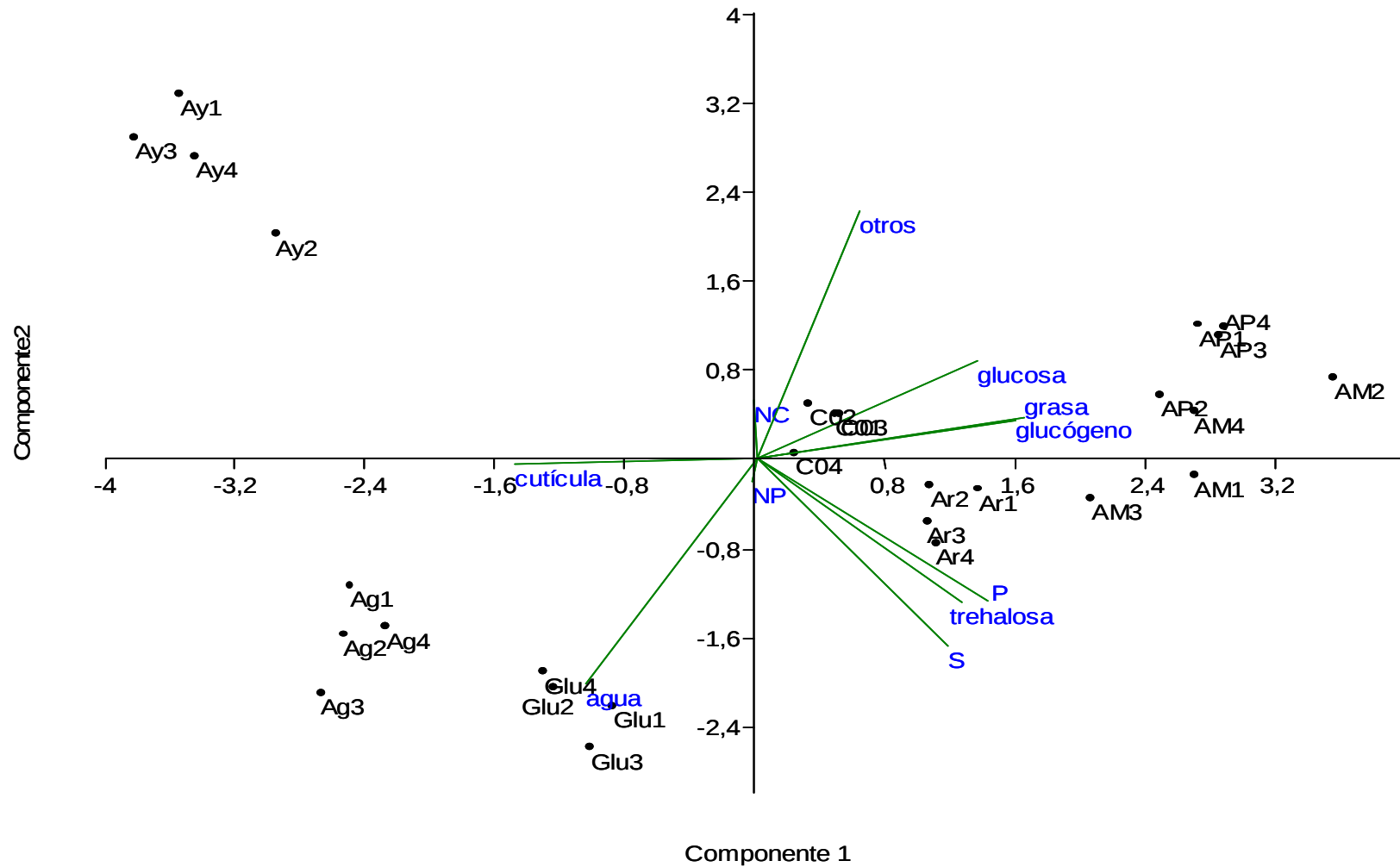


Figura 12. Biplot de la ubicación de las muestras (7 dietas con cuatro réplicas cada una) según sus coordenadas en los dos componentes principales y los autovectores de la variables. C0: control día cero, Ay: ayuno, Ar: arveja, Ag: Agar al 4 %, Glu: glucosa al 5 %, AM: almidón de maíz, AP: almidón de papa. Los números del 1-4 corresponden a las réplicas. Variables: S: supervivencia, P: variación de peso, composición corporal (tabla 2,4), NC: nitrógeno cuticular, NP: nitrógeno proteico.

6 Consideraciones finales

La aplicación del método químico-enzimático (deshidratando y desgrasando los insectos, procesos que inactivan las enzimas presentes en el homogeneizado) permitió estimar, a partir de una misma muestra, las diferencias en el contenido de carbohidratos (glucosa, trehalosa y glucógeno) inducidas por las dietas. La correcta separación de los carbohidratos determinó la especificidad del método, ya que las enzimas utilizadas para la cuantificación de los mismos son altamente específicas. Utilizando 0,1 U de trehalasa comercial, se obtuvo una linealidad hasta 0,11 mg de glucosa y se evaluó que se requieren mínimo 30 individuos para la condición de ayuno.

En general, la ingesta de carbohidratos complejos ocasionó un aumento en el peso y en las reservas corporales (grasa y glucógeno) del animal, siendo mayor para los alimentados con almidón de maíz. Indicando que el contenido de almidón resistente total (menor en almidón de maíz), varía dependiendo del origen del almidón. El análisis de componente principal, mostró que las dietas de carbohidratos no influyen directamente sobre la variable trehalosa. Los niveles de este disacárido cuantificados en los individuos alimentados en estas dietas fueron similares al control positivo. Además en el ayuno con suministro de agua, se promovió un aumento significativo de este carbohidrato, con respecto al ayuno total. Apuntando a que el individuo trata de mantener los niveles de trehalosa en la hemolinfa. Por otra parte, el suministro de carbohidrato simple (glucosa 5 %), disminuyó el peso de los insectos un 5 %, a pesar del acentuado decrecimiento en el contenido de grasa. Este hecho, pudiera indicar que el agua promueve a una mayor degradación de las reservas corporales. Esto es respaldado, en el análisis de anova por una vía y el de componentes principales, en donde se obtuvo una correlación negativa

para el autovector del agua con respecto al autovector de la grasa. Los carbohidratos simples y complejos, promovieron pérdida de las proteínas corporales con respecto al control positivo. Esto está de acuerdo, con lo reportado por Carmona y colaboradores (2001), en donde señalan que dietas aproteicas proporcionan energía para el mantenimiento del animal, pero inducen a una disminución en el contenido de proteínas. Con respecto a la supervivencia, no se observaron diferencias significativas entre los carbohidratos ensayados. Sin embargo, el almidón de maíz promovió un aumento en el peso corporal del individuo. Mientras que, en la glucosa al 5 % y en el almidón de papa, los insectos disminuyeron su peso con relación al control positivo.

7 CONCLUSIONES

- El método químico-enzimático, permitió diferenciar entre los carbohidratos corporales (glucosa, trehalosa y glucógeno) presentes en los insectos, este es aplicable para cuantificar el contenido de los tres carbohidratos cuando se realiza junto con los procesos de deshidratación y desgrase; en insectos sometidos a ayuno, es necesario un mínimo de 30 individuos.
- Las poblaciones que fueron alimentadas con los diferentes carbohidratos (simples y complejos) presentaron una supervivencia similar al control positivo. Sin embargo, el almidón de maíz promovió un incremento del peso corporal en los insectos, sugiriendo que el mismo es más biodisponible.
- El contenido de trehalosa fue similar en los insectos alimentados con las dietas a base de glucosa 5 %, almidón de maíz y almidón de papa. La variable porcentaje de trehalosa corporal presentó correlación positiva con respecto a las variables supervivencia y peso.
- La ingesta de carbohidratos complejos, ocasionó un aumento de las reservas corporales (glucógeno y grasas), con relación al control positivo. Siendo mayor para los insectos alimentados con almidón de maíz.
- El suministro de un carbohidrato simple (glucosa 5 %), disminuyó el peso de los insectos un 5 %, a pesar del acentuado decrecimiento en el contenido de grasa.
- El porcentaje de agua corporal presentó correlación negativa con respecto a la grasa corporal. Hecho que fue evidenciado en los controles de ayuno total y ayuno con suministro de agua. Esto puede sugerir que el mayor contenido de agua corporal promueve mayor degradación de las grasas.

- Los carbohidratos simples y complejos, promovieron pérdida de las proteínas corporales con respecto al control positivo.
- El análisis de componentes principales permitió representar y comparar gráficamente las respuestas que tuvieron los insectos al ser alimentados con las diferentes dietas ensayadas.

8 REFERENCIAS

A.O.A.C. 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Décima cuarta edición. Washington D.C.

A.O.A.C. 2005. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. Décima octava edición. Washington D.C.

Applebaum, S.W., Konijn A.M. 1964. The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Nutrition*, **85**(65):275-282.

Asano, N., Kato, A., Matsui, K. 1996. Two subsites on the active center of pig kidney trehalase. *European Journal of Biochemistry*. **240**: 692-698

Asp, N. 1992. Preface: Resistant Starch. Proceeding of the second plenary meeting of EURESTA: European Flair Concerted Action. No. 11 on physiological implications of the consumption of resistant starch in man. *European Journal of Clinical Nutrition*. **46**: S1.

Baker, J., Woo, S. 1992. Digestion of granules by α -amylases from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: effect of starch type, fat extraction, granule size, mechanical damage and detergent treatment. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **22**: 529-537.

Becker, A., Schloder P., Steele, J. E., Wegener, G., 1996. The regulation of trehalase metabolism in insects. *Experientia*, **52**: 433-430.

Bjork, I., Granfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J. 1994. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*. **59**: 699S-705S.

Blatt, J., Rocas, F. 2001. Hemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *Journal of Experimental Biology*. **204**: 2709-16.

Bounias, M., Bahjou, A., Gourdoux, L., Moreau, R. 1993. Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a Coleoptera insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **31**: 249-266.

Brioschi, D., Nadalini, L., Bengtson, M., Sogayar, M., Moura, D., Silva-Filho, M. 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **37**: 1283-1290

- Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., Eguileor M., Pennacchio, F., Giordana B.** 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *American Journal of Physiology*. 292: R2284–R2291.
- Carmona, A.** 1998. A simple *in vitro* system to measure intestinal nutrient uptake. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **9**: 52-57.
- Carmona, A., Gomez-Sotillo, A.** 1997. Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anuales Venezolanos de Nutrición*. **10**: 20-26.
- Carmona, A., Gomez-Sotillo, A. Casotto, M.** 1998. Toxicología nutricional: un enfoque “artropocéntrico”. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **1**:37-40.
- Carmona, A., Gómez-Sotillo, A., Seidl, D. S.** 1993. Uso de pruebas bioquímicas para el estudio de problemas nutricionales en *Canavalina ensiformes*. En: Vargas, R., León, A. Y Escobar, A. *Canavalina ensiformis* (L) (DC). Producción, procesamiento y utilización en alimentación animal. Editorial Future. San Cristobal. 141-152.
- Carmona, A., Liuzzi, J.P.** 1998. Biodisponibilidad de nutrientes: fácil de definir, difícil de evaluar. *Anuales Venezolanos de Nutrición*. **11** (1): 66-78.
- Carmona, A., Lopez, Y., Gómez-Sotillo, A., Casotto M.** 2001. Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **3**: 53-56.
- Chen, Q., Haddad, G.G.** 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *Journal of Experimental Biology*. **207**: 3125-29
- Cherry, J.** 1973. Molecular biology of plants. En: Columbia University Press, editors a text manual. Columbia, USA. pp 37-42
- Cubillos, A.** 1983. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Deposito de documentos de la FAO.
- Deng, D.F., Refstie, S., Hung, .S.S.O.** 2001. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates. *Aqua culture*. **199**:107-117
- Devlin, M.T.** 1992. Textbook of biochemistry with clinical correlations. tercera edición. Editorial Wiley-Liss. Nueva York, EEUU.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D.** 2003. New insights on trehalosa: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. **13**: 17R-27R.

Englyst, H.N., Cummings, J.H. 1990. Non-starch polysaccharides (dietary fibre) and resistant starch. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **270**:205-25.

Ettinger, S. 2001. Nutrición y Dietoterapia de Krause. 10^a Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.

Fernandes, A., Queiroz, A., Lana, R., Pereira, J., da Silva L., Vittori A., Pereira E., (2001), Estimativas da produção de leite por vacas holandesas mestiças, segundo o sistema CNCPS, em dietas contendo cana-de-açúcar com diferentes valores nutritivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*. **30** (4):1350-1357

Ferreira, H., Cristofolletti, P.T., Pimenta, D., Ribeiro, Terra, W., Ferreira, C. 2007. Structure, processing and midgut secretion of putative peritrophic membrane ancillary protein (PMAP) from *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **38**: 233–243

Ferrero, S. B., Palacio, M. G., Campanella, O. R. 2007. Análisis de componentes principales en teledetección. [En línea] [citada: 2008/10/24] Consideraciones estadísticas para optimizar su interpretación. Encontrada en: <http://www.gabrielortiz.com/index.asp?Info=062a>.

Forbes, G.B. 1997. Composición del organismo. en: Conocimientos actuales sobre nutrición. 7^a ed. Instituto nacional de ciencias de la vida. Washington, DC. pp 8-14

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*. **269**: 397-412.

Galeno, F. 2006. Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Galliard T., Bowler P. 1987. Morphology and composition of starch. En: *Galliard, T. Starch properties and potential*, Critical Reports on Applied Chemistry, vol 13. pp. 57–78.

Ganong, W.F. 2002. Fisiología médica. Editorial Manual Moderno. México

García, O. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos y modificado, utilizando el bioensayo con el gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae*. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Gillot, C. 2005. Entomology. Tercera edición. Editorial Springer. Holanda.

Giuntini, E., Lajolo F., Wenzel de Menezes E. 2006. Composição de alimentos: um pouco de história. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **52** (3).

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**(1): 9. [En línea] [citada: 2008/10]. Encontrada en: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Heymsfield, S.B., Waki, M., Kehayias. J. 1991. Chemical and elemental analysis of humans *in vivo* using improved body composition models. *American Journal of Physiology*. **261**: 190-8.

IDF (International Diabetes Federation). 2006. Consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Bruselas, Belgica.

Johnson, P. E., Hunt, J. R., Ralston, N. V. C. 1998. The effect of past and current dietary Zn intakes on absorption and endogenous excretion in the rat. *Journal of Nutrition*. **118**: 1205-9.

Jouanin, L., Bonade-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Giband, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*. **131**: 1-11.

Kennedy, J., While, C., Cabral, J. y Sá-Correia, I. 1987. Starch biomass: a chemical feedstock from enzyme and fermentation processes. En: Properties and potential. *Critical Reports on Applied Chemistry*. **13**(6): 115-149

Klowden, M. J. 2007. Physiological systems in insects. Segunda edición. Editorial Elsevier. Idaho, EE.UU.

Law, J.H., Wells M. 1989. Insects as biochemical models: a minireview. *Journal of Biological Chemistry*. **264** (28):16335-8.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2006. Bioenergetic and metabolism. En: Principles of Biochemistry. Cuarta edición. Editorial Worth publishers, Nueva York.. pp 512-520

Leonetti, F., Lacobellis, G., Zappaterreno, A., Di Mario, U. 2002. Clinical, physiopathological and dietetic aspects of metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease*. **21**: 134-9

Lopez, J., Garcia, E., Schwartz, S. 2002. El cuerpo humano: metabolismo proteico. En: De La Torre, M. Farmacéutica Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana. Editorial Glosa, S.L.

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*. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Lovera, M. 2008. Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Lowry, P.B., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**: 265-275

Mahan, L.K., Escott-Stump, S. 2001. Nutrición y dietoterapia de Krause. Décima edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.

Millán, G., Carmona, A. 2005. Estudios nutricionales en *Tribolium castaneum*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*. **4**: 53-56.

Mulhia-Almazán, A., Sánchez-Paz, A., García-Carreño, F.L. 2008. Invertebrate trypsins: a review. *Journal of Comparative Physiology [B]*. **178**: 655-672

Newsholme, E.A., Leech, A.R. 1986. Integración del metabolismo durante el ayuno, realimentación y traumatismo. En: Bioquímica médica. Interamericana. México. pp 447-446

Pérez-Navarrete, C., Betancourt-Ancona, D., Casotto, M., Carmona, A., Tovar, J. 2007. Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteína y almidón en mezclas de harinas de maíz y frijol lima. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **57**(3): 278-286

Portugal, A.V. 1994. La eficacia de la utilización de la energía por los rumiantes: recursos energéticos locales. *Archivos de Zootecnia*. **43**(162): 105-117.

Rojas, C. 2007. Evaluaciones nutricionales de películas comestibles con ingredientes pre y probióticos usando como modelo biológico el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Romero. 2007. Capítulo 9: Análisis de componentes principales. [En línea] [citada: 2008/10]. Encontrada en: http://es.geocities.com/r_vaquerizo/Manual_R9.htm.

Ruppert, E.E., Barnes, R.D. 1994. Invertebrate Zoology. 6ª Ed. Fort Worth: Saunders College Publishing.

Sacktor, B. 1968. Trehalase and the transport of glucose in the mammalian kidney and intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **60**: 1007-1014

Schilder, R.J., Marden, J.H. 2006. Metabolic syndrome and obesity in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**(49): 18805-09.

Sívoli, L. 1995. Modificación química de almidones de maíz y papa. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

StatSoft. 2007. Electronic statistics textbook. [En línea]. 2008. [citada: 2008 dic], encontrada en: <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>.

Talma, M. 1995. Aplicación de técnicas enzimáticas de digestión *in vitro* a la valoración nutritiva de piensos de conejo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid España.

Terra, W., Ferrereira C. 2005. Biochemistry of digestion. En: Gilbert, L. I., Latrov, K., Gill, S. *Comprehensive Molecular Insect Science*. vol. 4. Elsevier, Oxford.

Terra, R.W. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*. **35**: 181-200.

Terra, W., Cristofolletti, P.T. 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. **113**: 725-730.

Terra, W., Ferrereira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. **109**: 1-62

Terra, W., Ferrereira, C. 2003. Digestive System. En: Resh, V.H., Cardé R.T. *Encyclopedia of Insects*. Academic press. Elsevier. Florida. pp 313-323.

Terradez, M.M. 2007. Análisis de Componentes Principales. [En línea] [citada: 2008/10]. Encontrada en: www.scielo.org.co/pdf/rccp/v20n2/v20n2a04.pdf.

Thompson, S.N., Simpson, S.J. 2003. Nutrition. En: Resh, V.H., Cardé R.T. *Encyclopedia of Insects*. Academic press. Elsevier. Florida. pp 807-814

Van Beers, E. H., Buller, A., Grand, R. J., Einerhand, A. W. C., Dekker, J. 1995. Intestinal brush border glycohydrolases: Structure, function, and development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **30**, 197-162.

Van der Meulen, J., Bakker, G.C.M., Bakker, J.G.M., de Visser, H. 1997. Effect of resistant starch on net portal-drainage viscera flux of glucose, volatile fatty acids, urea and ammonia in growing pig. *Journal of Animal Science*. **75**: 2697-2704

Vonk, J. H., Western, J. R. H. 1984. Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion. Academic Press, Nueva York.

Wang, Z., Pierson, Jr., Heymsfield, S.B. 1992. The five-level model: a new approach to organizing body- composition research. *American Journal of Clinical Nutrition*. **56**:19-28.

Warbrick-Smith, J., Behmer, S.T., Lee, K.P., Raubenheimer, D., Simpson, S.J. 2006. Evolving resistance to obesity in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**(38):14045-49

WHO/FAO. 2003. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. WHO technical report series; 916. Geneva,. [En Linea]. Encontrada en: http://www.who.int/hpr/NPH/docs/who_fao_expert_report.pdf.

Wigglesworth, V.B. 1972. The principles of insect Physiology. 7^a Ed. Methuen, London.

Zamora, N.C. 2005. Sobrevivencia de *Sitophilus oryzae* (L.) en harina cruda y extruida de granos de *Canavalia ensiformis*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"*. **36** (1): 21-27.