

Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales: bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L)

Dennis Alexander Lugo González, Víctor Hugo Aguilar, Meris Casotto, Alexander Laurentin, Ana Gómez

Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Instituto de Geografía y Desarrollo Regional, Facultad de Humanidades y Educación, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela.

RESUMEN. El análisis de componentes principales (PCA), escalamiento multidimensional no-métrico (MDS) y el análisis de similitud (ANOSIM) son técnicas estadísticas multivariadas, las dos primeras representan gráficamente de manera simultánea las unidades estadísticas y las variables que las caracterizan, evaluando similitudes entre las unidades y correlaciones entre las variables, la última técnica dota de un test estadístico no paramétrico para comparar agrupaciones de las unidades. Este trabajo evaluó la aplicabilidad de estas técnicas para valorar la calidad nutricional de la dieta, utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz. Las dietas ensayadas fueron: almidón de maíz; almidón de papa; 5% glucosa; arvejas; ayuno y ayuno con agua. Se estudiaron las variables supervivencia, variación de peso y composición corporal. El PCA y MDS mostraron relaciones positivas de la supervivencia y variación de peso con los parámetros corporales grasa y carbohidratos, siendo mayor para dietas de almidón, similares al control positivo. En el PCA se observaron diferencias en las poblaciones mantenidas con las diferentes dietas; el MDS no distingue claramente entre ellas, aún cuando logra diferenciar la dieta definida por el ayuno de las restantes. Ambos estudios definieron un gradiente del valor nutritivo de las dietas, en el eje de las abscisas. El ANOSIM indicó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grupos de insectos sustentados con estas dietas. Esta prueba refuerza los resultados obtenidos en el PCA y MDS. La aplicación de estas herramientas estadísticas son promisorias para analizar procesos complejos, como la interacción de distintas variables que midan la calidad nutricional de diferentes dietas.

Palabras clave: PCA, ANOSIM, bioensayo, composición corporal, estadística multivariada, insectos, MDS, nutrición.

SUMMARY. *Applicability of Multivariate Statistics for nutritional studies: bioassay rice weevil (*Sitophilus oryzae* L).* The principal component analysis (PCA), non-metric multidimensional scaling (MDS) and analysis of similarity (ANOSIM) are multivariate statistical techniques that graphically represent numerical measures of several factors and display multiple relationships that may exist between them. In this study, we evaluated the applicability of these techniques to analyze the nutritional quality of diet, using as model, the bioassay rice weevil. The diets tested were: corn starch, potato starch, 5% glucose, peas, starved and starved with water supply. The variables studied were: survival, weight change and body composition. The PCA and MDS showed positive relationships of survival and weight change with body fat and carbohydrate parameters. Fat and carbohydrates were greater in starches diets, similar to the positive control. The PCA showed differences between populations fed with different diets, whereas the MDS showed similarity between diets. Both studies defined a gradient of the nutritive value of diets in the x-axis. The ANOSIM indicate significant ($p < 0,05$) differences between groups. This test is necessary to support the results obtained in the PCA and MDS. The application of these statistical tools is promising to analyze complex processes such as interaction of different variables to measure the nutritional quality of diets.

Key words: PCA, ANOSIM, bioassay, body composition, insects, MDS, multivariate statistics, nutrition.

INTRODUCCIÓN

Diferentes modelos biológicos han sido estudiados para determinar el valor nutritivo de diversos alimentos. Los insectos son utilizados con éxito en estos estudios, debido a la similitud de los procesos biológicos que estos presentan con los vertebrados, ya que todos los organismos heterótrofos consumen el mismo tipo de macronu-

trientes (1-3). Sin embargo, algunos procesos metabólicos distintivos son encontrados en insectos (2,4), entre ellos la síntesis de trehalosa en los cuerpos grasos a partir de glucosa y/o glucógeno (5), no poseen la capacidad para la esteroidogénesis y la fuente de colesterol es completamente dependiente de la dieta (1).

El bioensayo con el gorgojo de arroz ha permi-

tido identificar diferentes biomarcadores, útiles para estudiar la toxicidad y/o el valor nutritivo de diferentes dietas; destacándose el monitoreo de la supervivencia y la determinación de la composición corporal (agua, grasa, proteínas, carbohidratos y otros) (6–10). Estas variables que caracterizan a las unidades bajo estudio han sido evaluadas por métodos estadísticos convencionales y es poco usual analizarlos por modelos estadísticos alternativos, como los análisis multivariados. Los análisis estadísticos multivariados son modelos de técnicas exploratorias de datos que sintetizan la información de los mismos reduciendo la dimensión del problema. Esto permite observar diferencias, semejanzas y/o relaciones que puedan existir entre cada una de las variables estudiadas. Entre ellos se encuentran el análisis de componentes principales (Principal component analysis, PCA), el escalamiento multidimensional no-métrico (Nonmetric multidimensional scaling, MDS) y el análisis de similaridad (ANOSIM). El PCA y el MDS crean una representación espacial a partir de las similitudes del conjunto de variables estudiadas (11–13). Mientras que el ANOSIM permite definir diferencias significativas entre dos o más grupos estudiados, es el equivalente no-paramétrico del test ANOVA, que determina las diferencias significativas entre las variables de estudio para índices univariados (11,14,15).

Actualmente, estas técnicas están siendo incorporadas en el área de la biología celular y la inmunología para comprender procesos complicados como los de señalización celular (16).

En el presente estudio se analizó la aplicabilidad de técnicas multivariadas para observar el efecto que tienen las dietas de diferente calidad nutricional sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Sitophilus oryzae* L.

Los insectos fueron cultivados en 300 g de arvejas verdes (*Pisum sativum* L) peladas y partidas de origen comercial, en envases de vidrio con una capacidad de 500g. Estos fueron tapados con una malla de muselina, protegidos de la luz y mantenidos a temperatura ambiente. Se infectaron lotes de arveja con 200 individuos adultos y se esperó la eclosión de la generación F1, con la cual se realizó el bioensayo para asegurar que las poblaciones fueran homogéneas.

Dietas

Las siguientes dietas fueron suministradas a los insectos en forma de semillas artificiales, lo cual permitió que los insectos perforaran el alimento: ayuno con suministro de agua (agar al 4%); glucosa al 5% en agar al 4%. El agar preparado con los diversos componentes, fue vertido en placas de microtitulación, una vez solidificado se retiraron de la placa en forma de pastillas. Para el almidón de maíz (Maizina Americana, Alfonso Rivas) y de papa (Potatis mjöl, Lyckeby Starkelsen): se suspendieron 10 g de almidón en 4 mL de agua destilada 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.

Como control positivo del experimento se utilizaron insectos alimentados con la dieta de mantenimiento del cultivo y como control negativo del bioensayo, se tomaron insectos sometidos a la condición de ayuno (sin alimento y sin agua).

Determinación de los diferentes parámetros nutricionales

El bioensayo con los gorgojos de arroz se realizó según descrito por Carmona y Gomez-Sotillo (7). Los ensayos fueron realizados por cuadruplicado, utilizando 60 insectos adultos por réplica y se alimentaron con 2 g de las diferentes dietas, durante 8 días. Al final del estudio se determinó el porcentaje de supervivencia (S) y la variación de peso corporal (P). Posteriormente, fueron sacrificadas las poblaciones de insectos por congelación y se estimó su composición corporal: agua, grasa, proteínas, nitrógeno proteico (NP), cutícula, nitrógeno cuticular (NC), otros (esqueletos carbonados de los compuestos nitrogenados y cenizas), los carbohidratos corporales (glucosa, trehalosa y glucógeno) fueron obtenidos según la metodología descrita por Gómez y colaboradores (10). Además, las variables antes mencionadas fueron determinadas en el día de inicio del experimento (control día cero, C0).

Análisis multivariado

La unidad estadística está definida por los insectos agrupados de acuerdo a las distintas dietas aplicadas, y luego se miden sobre ellos las variables de sobrevivencia, variación de peso y composición corporal. El conjunto de estos datos permitió crear una matriz que fue procesada y analizada mediante dife-

rentes pruebas multivariadas, las cuales revelan la asociación de los datos que no se observa con análisis estadísticos convencionales.

Análisis de componentes principales
(Principal component analysis, PCA)

Es un método estadístico exploratorio de reducción de datos, en el que las variables originales son transformadas a un pequeño número de nuevas variables (llamadas componentes principales). Los componentes principales (CP) captan la mayor parte de la variabilidad presente en las unidades estadísticas (12,13). La representación gráfica de este análisis es el biplot, el cual consiste en representar en un mismo espacio las muestras (que se encuentran simbolizadas como puntos), y las variables (que son representadas como vectores).

Escalamiento multidimensional no-métrico (Non-metric multidimensional scaling, MDS) Este método estadístico también es exploratorio de reducción de datos, pero al contrario del PCA que trabaja con métodos de autovectores, esta técnica utiliza un algoritmo iterativo que toma los datos multidimensionales de una matriz de similitudes y la presenta sobre un espacio, típicamente de dos dimensiones. Dado que el MDS es un algoritmo iterativo, se utiliza para evaluar la bondad de ajuste de las estimaciones una medida denominada estrés. Con un valor de estrés menor a 0,1 indica que el gráfico corresponde a una ordenación de las unidades que resulta ideal, conteniendo toda la información original en la matriz de datos relacionada con similitudes entre las unidades (11,12,17). Para el presente estudio el estrés se calculó como lo describe Kruskal (18).

Análisis de similitud (ANOSIM)
prueba *a posteriori*

Se utilizó un ANOSIM de una vía, con una permutación de 9999, para determinar las diferencias estadísticas, con un nivel de significancia $p < 0,05$; entre los grupos de poblaciones alimentadas con las diferentes dietas de estudio. ANOSIM prueba la hipótesis nula de la similitud de los parámetros que describen el comportamiento de las variables, en los distintos grupos de insectos definidos según el tipo de dieta a que han sido sometidos. Un valor de la significación de las diferencias entre grupos se produce para este análisis (11).

Se realizó el MDS y el ANOSIM mediante distancia Euclídea, ya que el PCA trabaja con este tipo de distancia y permite la comparación entre las técnicas. Para los análisis multivariados (PCA, MDS, ANOSIM) se utilizó el paquete de software PAST (Palaeon-

tological Statistics) v2.16 (19).

RESULTADOS

Análisis de componentes principales

En el PCA, los dos primeros componentes explicaron el 61,5% del total de la variabilidad de los insectos (Tabla 1). Las variables: variación de peso (0,348), grasa (0,398), glucosa (0,330), glucógeno (0,390) y cutícula (-0,358) aportaron la mayor contribución en el primer componente (CP1), el cual representa el 41,8% de la variabilidad total del conjunto de datos originales. Mientras que el segundo componente (CP2) representa el 19,7% de la variabilidad total, siendo las variables con mayor contribución para este componente supervivencia (0,348), agua (0,487), trehalosa (0,312), proteínas (0,240), nitrógeno proteico (0,029) y otros (-0,544) (Tabla 1).

En la Figura 1 se muestra el gráfico obtenido con el PCA, para los dos primeros componentes. La correlación entre cada par de variable queda representada por el ángulo que se forma entre los vectores que las representan. Las variables de supervivencia (S), variación de peso (P) y trehalosa corporal, presentaron correlaciones positivas entre ellas. Al igual, que los parámetros de grasa, glucógeno y glucosa, siendo mayor la de la grasa con el glucógeno. En este dispositivo gráfico biplot, puede observarse que las replicas tratadas con la dieta determinada por el control positivo (arvejas) se ubicaron en el primer cuadrante en un

TABLA 1. Contribución de las variables de la composición corporal en el PCA.

VARIABLES	CP1	CP2
Supervivencia (S)	0,289	0,348
Variación de peso (P)	0,348	0,261
Agua	-0,245	0,487
Grasa	0,398	-0,115
Glucosa	0,33	-0,209
Trehalosa	0,309	0,312
Glucógeno	0,39	-0,085
Proteínas	-0,104	-0,24
Nitrogeno proteico	-0,004	0,029
Cutícula	-0,358	0,057
Nitrogeno cuticular	0,009	-0,009
Otros	0,15	-0,544
<i>Proporción total de varianza (%)</i>	41,8	19,74

punto intermedio entre las correspondientes a la dieta tratada con control cero y las poblaciones alimentadas con almidón de maíz y almidón de papa, mientras que las poblaciones mantenidas en ayuno se ubicaron en el tercer cuadrante. Por otro lado, las poblaciones sustentadas con las semillas artificiales a base de agar (ayuno con suministro de agua) y de glucosa se localizaron en el segundo cuadrante, e incidieron positivamente en el agua corporal de los gorgojos. En los individuos alimentados con las dietas de almidón y arvejas se promovió un aumento de glucosa, trehalosa, glucógeno y de la grasa corporal relativamente mayor que la observada en la dieta control cero. Con mayor intensidad en los insectos alimentados con dietas a base de almidón de maíz y de papa. Además, se obtuvo un aumento del peso corporal y una supervivencia del 100% (datos no mostrados). Ninguna de estas dietas incidió sobre los parámetros corporales de proteínas, cutícula y nitrógeno cuticular.

Escalamiento multidimensional no-métrico

Se ajustó el MDS a dos dimensiones con distancia Euclídea, donde se relacionan las variables de la composición corporal dependientes de la supervivencia y variación de peso. El estrés contenido en el MDS fue de 0,005.

Al igual que el PCA, se observó en el MDS (Figura 2), una clara separación de las poblaciones alimentadas con las diferentes dietas. Los grupos se estructuraron en forma de gradiente con respecto a la calidad de las dietas. A la izquierda se ubicaron los grupos que fueron alimentados con almidón de maíz y arvejas, considerados como controles positivos nutricionales en diferentes ensayos con este biomodelo (7); a la derecha se encontraron los grupos que se mantuvieron en ayuno, control negativo, y que presentaron un valor menor en su masa corporal y una mayor mortalidad. Estas características permitieron una buena separación de los grupos, además de caracterizarlos con respecto a las variables que los describen. El ayuno y ayuno con suministro de agua (agar), están representados en el eje positivo de las abscisas. El ayuno presentó una mayor dispersión entre las poblaciones, con una mayor separación del resto de los grupos. Las demás poblaciones se encontraron en el lado negativo del eje de las abscisas, con una menor dispersión dentro de las poblaciones experimentales. La dieta de arveja y las de almidón promovieron en los insectos un incremento de grasa, glucógeno, glucosa, trehalosa y nitrógeno proteico. Estos parámetros, a su vez, poseen una alta relación positiva entre si. La grasa y glucógeno cor-

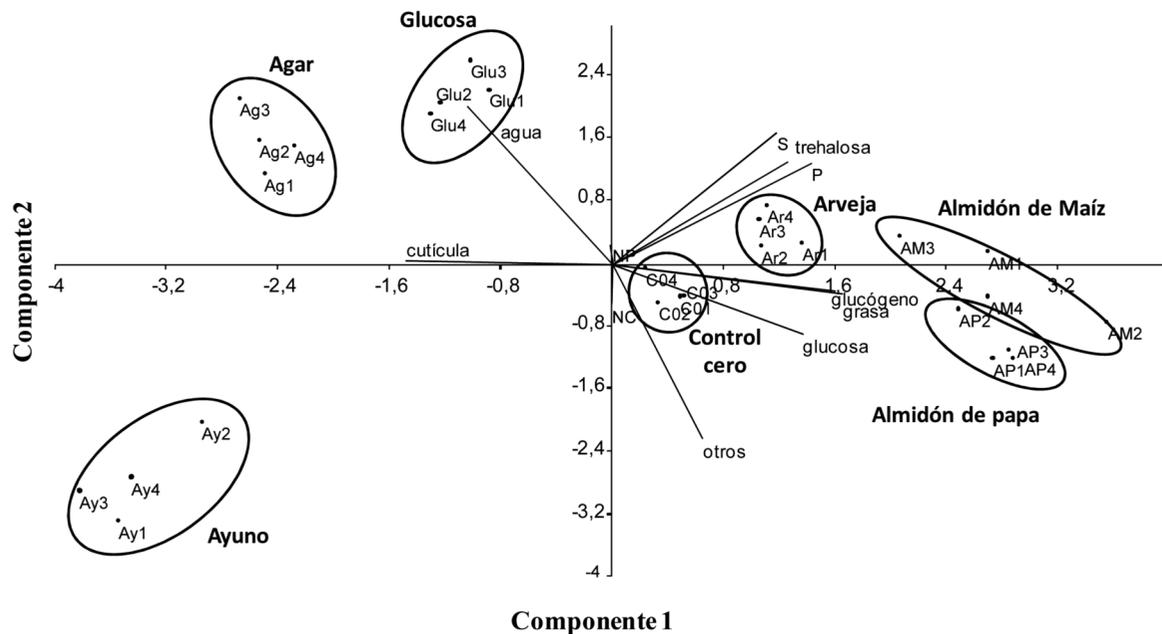


FIGURA 1. Biplot del análisis de componentes principal. Las siete dietas (por cuadruplicado) se ubican según sus coordenadas en los primeros componentes y los autovectores de las variables. C0: control día cero; Ay: ayuno; Ar: arveja; Ag: Agar al 4%; Glu: glucosa al 5% en agar al 4%; AM: almidón de maíz; AP: almidón de papa. Los números del 1-4 corresponden a las réplicas. Parámetros: S: supervivencia, P: variación de peso, NC: nitrógeno cuticular, NP: nitrógeno proteico.

poral se relacionaron de manera similar a lo observado en el PCA, sin embargo la variable de agua corporal fue influenciada mayormente por las dietas a base de agar (agar y glucosa).

Análisis de similaridad

Los análisis PCA y MDS diferenciaron los grupos de insectos alimentados con las distintas dietas utilizadas en este ensayo y podría ser un indicativo de la influencia que ellas tienen sobre la composición corporal de los insectos. El análisis de similaridad complementa los estudios multivariados realizados anteriormente, ya que se obtiene un valor de significancia que confirma estadísticamente las diferencias en las características de los insectos tratados mediante las distintas dietas.

En la Figura 3 se observa que los grupos definidos por las poblaciones de insectos alimentados con las diferentes dietas, presentaron diferencias significativas entre sí en relación con las variables bajo estudio ($p < 0,05$). El box-plot que simboliza la variabilidad entre los grupos (distribución de similaridades entre grupos) indica obviamente claras diferencias entre ellos, si se compara con la variabilidad de los box-plots que representan la variación de las similaridades den-

tro de cada una de las poblaciones alimentadas con las diferentes dietas. Se encontró las mayores diferencia entre las poblaciones alimentadas con almidón de maíz y de papa ($p = 0,0259$). Las poblaciones en ayuno y el control del día cero ($p = 0,0316$) mantuvieron una menor diferencia, aunque en el MDS se muestra una mayor dispersión de los datos del ayuno (Figura 2). El resto de los tratamientos se mantuvieron en este rango de probabilidades, lo que es considerando como grupos diferentes, apoyando los resultados de los otros análisis multivariados.

DISCUSIÓN

El PCA mostró que los parámetros grasa, glucosa, glucógeno y cutícula son los más determinantes de la variación de peso, por la alta correlación que ellos tienen con el primer componente. Se ha reportado que la grasa y la cutícula representan entre 15% y 19% de la composición corporal de insectos (4). De los carbohidratos corporales la glucosa y el glucógeno son los que poseen un mayor peso porcentual, en gorgojos alimentados con arvejas (10). El parámetro agua, que aporta alrededor del 50% del peso de los individuos

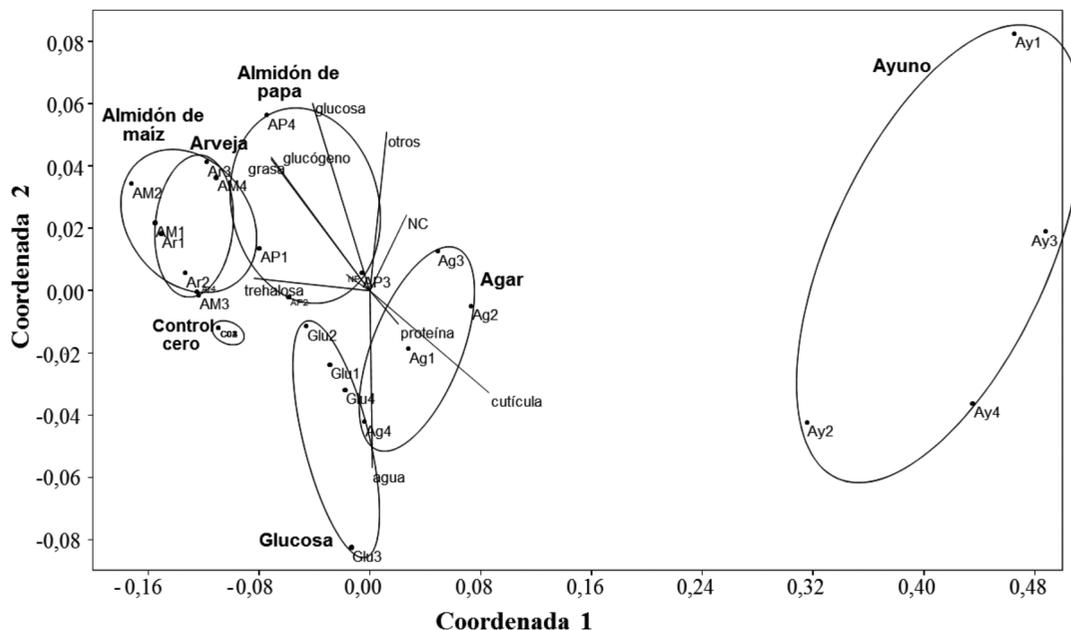


FIGURA 2. Escalamiento multidimensional no-métrico, plot basado en la distancia Euclídea. Siete dietas con cuatro réplicas cada una, situadas en dos coordenadas (2D), el estrés contenido fue de 0,005. C0: control día cero, Ay: ayuno; Ar: arveja; Ag: Agar al 4%; Glu: glucosa al 5% en agar al 4%; AM: almidón de maíz; AP: almidón de papa. Los números del 1-4 corresponden a las réplicas. Parámetros: S: supervivencia; P: variación de peso; NC: nitrógeno cuticular; NP: nitrógeno proteico.

(20,21), define al segundo componente del PCA. En este componente fueron agrupados los nutrientes plásticos o estructurales, junto con la trehalosa (4).

Los resultados de los gráficos del PCA y MDS fueron similares, indicando que las poblaciones de insectos que tuvieron mayor peso corporal poseen una mayor probabilidad de supervivencia y/o que los individuos que sobrevivieron incrementaron su talla o peso corporal. La trehalosa, como molécula importante en el metabolismo de los insectos, estuvo directamente relacionada con estos dos parámetros. Dicha molécula, además de suministrar energía a los diferentes tejidos, también protege al individuo en condiciones de estrés y permite mantener la homeostasis en el organismo de estos invertebrados (4,22). Las variables de grasa, glucógeno y glucosa igualmente presentaron relaciones positivas entre ellas, siendo mayor la de la grasa con el glucógeno, para ambos análisis, posiblemente debido a que las rutas metabólicas de estas moléculas de reserva energética están relacionadas (22).

Estas pruebas mostraron que las dietas de almidón de papa, de maíz y la de arveja promovieron la acreción grasa y aumentaron el contenido de glucosa y glucógeno en los insectos. El almidón de maíz al ser más

biodisponible comparado con el almidón de papa (23), promovió un aumento del peso corporal y una mayor acumulación de trehalosa, semejante a lo encontrado en las poblaciones alimentadas con arveja. Aunque en el MDS estas dietas aparecen muy cercanas entre sí, la prueba de ANOSIM reflejó diferencias significativas ($p=0,028$) entre ellas. Los individuos alimentados con almidón mostraron un aumento de las reservas energéticas corporales, si se los compara con individuos alimentados con las demás dietas, siendo menor ($p<0,05$) para los alimentados con almidón de papa. Las dietas con alto contenido de humedad (agar y glucosa) influyeron sobre la variable de agua corporal, estas dos dietas presentaron diferencias significativas ($p=0,030$). Ambos análisis situaron a las poblaciones alimentadas con glucosa más próximas a las poblaciones mantenidas con almidón y arvejas, sugiriendo que las moléculas de glucosa proporcionadas con el agar son absorbidas por el insecto, ocasionando un leve aumento en los lípidos y carbohidratos corporales. Ambas pruebas mostraron que el ayuno influyó negativamente en la supervivencia, variación de peso y en los combustibles de reserva.

Las dietas de este estudio son apteicas, por lo tanto no proporcionan a los organismos los aminoácidos esenciales para la síntesis de proteínas corporales (funcionales y/o estructurales). Otros trabajos señalan que las dietas apteicas proporcionan energía para el mantenimiento del animal, preservando una disminución en el contenido de proteínas (8). En el PCA y el MDS el parámetro de proteínas no se proyectó claramente a ninguna dieta. Este efecto también se observó en las variables de cutícula, nitrógeno cuticular (medida indirecta de la quitina y/o de las proteínas que conforma la cutícula en el insecto) y el parámetro otros; indicando que las dietas ensayadas no afectaron estas variables. Debido a esto, se han descartado como biomarcadores para estudiar la calidad nutricional de la dieta con el bioensayo del gorgojo de arroz (7).

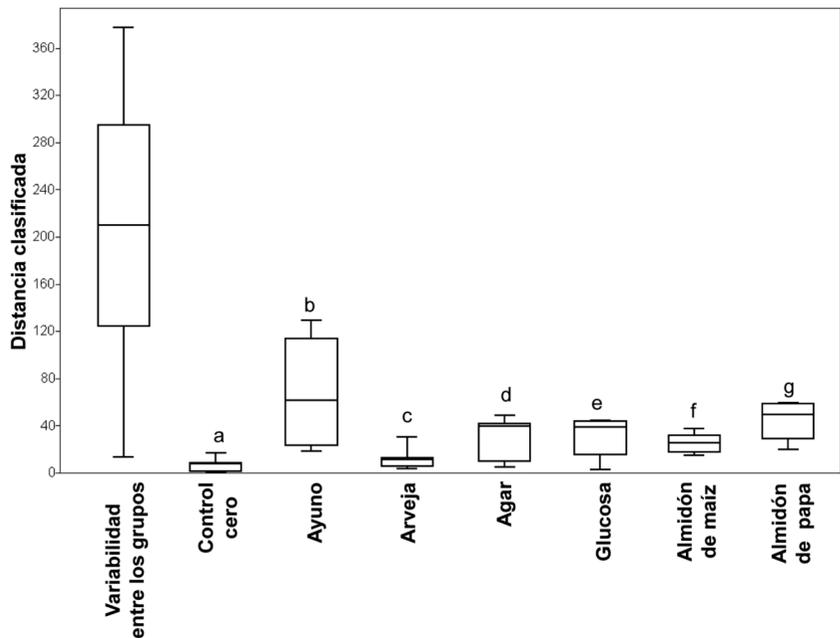


FIGURA 3. Box plots del análisis de similaridad. Grupos alimentados con las siete dietas con cuatro réplicas cada una. C0: control día cero, Ay: ayuno; Ar: arveja; Ag: Agar al 4%; Glu: glucosa al 5% en agar al 4%; AM: almidón de maíz; AP: almidón de papa. Distintas letras indican diferencias significativas ($p<0,05$).

CONCLUSIÓN

Los datos analizados de forma convencional, ANOVA de una vía, Mann-Whitney, entre otros, permiten contrastar el comportamiento de cada variable individualmente entre los grupos bajo estudio. La aplicación de las pruebas multivariadas representan una buena herramienta para analizar estudios nutricionales, en particular, el MDS permite al igual que el PCA, reducir la dimensionalidad de los datos originales. El resultado de estos análisis se puede visualizar en un gráfico indicativo de la relación entre la supervivencia, la variación de peso junto con el comportamiento de los parámetros de la composición corporal de los insectos después de la aplicación de distintas dietas, sobre el cual es posible determinar de manera indirecta el efecto de estas dietas. Sobre el primer plano factorial del PCA se observaron claras diferencias en las poblaciones mantenidas con las dietas ensayadas. El MDS produce un gráfico que presenta esencialmente la misma estructura que el anterior, aún cuando parece producir menos diferencias entre las dietas de almidón de papa, de maíz y la de arveja. El ANOSIM proporcionó diferencias significativas de los grupos sustentados con estas dietas, por lo que se sugiere realizar esta última prueba para reforzar los resultados obtenidos en el PCA y MDS. Los plots de ambos estudios definieron un gradiente del valor nutritivo de las dietas, en el eje de las abscisas. La aplicación de estas herramientas estadísticas son promisorias para analizar procesos complejos, como la interacción de distintas variables que midan la calidad nutricional de diferentes dietas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Plásticos Eurobags, C.A. por el aporte al Proyecto LOCTI No. 25 (AL) de la Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS

1. Law JH, Wells MA. Insects as biochemical models. *J Biol Chem* 1989; 264 (28): 16335-16338.
2. Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 2010; 55: 207-225.
3. Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA. Fat Metabolism in Insects. *Ann Rev Nutr* 2001; 21(1): 23-46.
4. Klowden MJ. *Physiological systems in insects*. Idaho, EE.UU.: Elsevier; 2007.
5. Thompson SN, Simpson SJ. Nutrition. *Encyclopedia of Insects*. Florida, EE.UU.: Academic press. Elsevier. ; 2003. p. 313-23.
6. Laurentin A, Lovera M, Rojas C, Gamero M, Edwards CA, Tapia MS, Diez N, Bernal C y Carmona A. Estudios nutricionales con el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*. *MIBE* 2008; 5:57- 60.
7. Carmona A, Gomez-Sotillo A. Uso de insectos en estudios nutricionales. Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *An Venez Nutr* 1997; 10:20-26.
8. Carmona A, Lopez Y, Gomez-Sotillo A, Casotto M. Uso de biomarcadores para evaluar la calidad proteica de la dieta en bioensayos con gorgojos. *MIBE* 2001; 3:53-56.
9. Pérez-Navarrete C, Betancur-Ancona D, Casotto M, Carmona A, Tovar J. Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteína y almidón en mezclas de harinas de maíz y frijol lima. *Arch Latinoam Nutr* 2007; 57(3):278-286.
10. Gómez A, Lugo DA, Coronil G, Casotto M, Carmona A, Laurentin A. Determinación del contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en gorgojos de arroz. Efectos de la dieta. *MIBE* 2008; 5:53-56.
11. Clarke KR. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* 1993; 18(1):117-143.
12. Legendre P, Legendre L. *Numerical Ecology*. Oxford, Inglaterra, UK.: Elsevier; 2012.
13. Härdle WK, Simar L. *Applied multivariate statistical analysis*. New York, EE.UU.: Springer; 2012.
14. Clarke KR, Green RH. Statistical design and analysis for a «biological effects» study. *Mar Ecol Prog Ser* 1988; 46(1): 213-226.
15. Clarke KR. Comparisons of dominance curves. *J Exp Mar Biol Ecol* 1990; 138(1): 143-157.
16. Genser B, Cooper PJ, Yazdanbakhsh M, Barreto ML, Rodrigues LC. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC immunology* 2007; 8(1): 27.
17. Guerrero Casas FM. El análisis de escalamiento multidimensional: una alternativa y un complemento a otras técnicas multivariantes. *La Sociología en sus escenarios*. Universidad Antioquía, Medellín, Colombia: CEO; 2012; (25).
18. Kruskal JB. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 1964; 29(1): 1-27.

19. Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 2001; 4(1): 1-9.
20. Forbes G. Composición del organismo. Conocimientos actuales sobre nutrición. PAHO/WHO, Washington DC: EE.UU. 1991; (532): 8-15.
21. Abu-Zeid MA. Water and sustainable development: the vision for world water, life and the environment. *Water Policy* 1998; 1(1): 9-19.
22. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. 2003;13(4):17R-27R.
23. Galeno F. Digestibilidad in vitro y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano [TEG]. [Caracas, Venezuela]: Universidad Central de Venezuela; 2006.

Recibido: 07-07-2013

Aceptado: 13-11-2013