

DETERMINACIÓN DEL pH EN EL FLUIDO DIGESTIVO DE LARVAS Y ADULTOS DE *Hypothenemus hampei* (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

Gustavo Adolfo Ossa-O*; Alex E. Bustillo-Pardey** ; Arnubio Valencia-Jiménez***

RESUMEN

OSSA O., G. A.; BUSTILLO P., A. E.; VALENCIA J., A. Determinación del pH en el fluido digestivo de larvas y adultos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Cenicafé 51 (2): 97-101. 2000.

Los insectos, por lo general, poseen diferentes valores de pH a lo largo de su tracto digestivo; así como diversos tipos de enzimas digestivas adaptadas a estas condiciones ambientales. Para determinar el pH del fluido digestivo de larvas y adultos de *H. hampei* se mezcló café pergamino seco molido a 12% de humedad con diferentes indicadores de pH en polvo al 2% p/p (rojo congo, azul de bromofenol, azul de bromotimol, púrpura de bromocresol, rojo de metilo). 2g de esta mezcla se infestaron con 20 brocas adultas y larvas de primer y segundo instar, y se dejaron durante 60 minutos a 28°C. Transcurrido este tiempo se hicieron disecciones del intestino de varios adultos para observar el viraje de cada uno de los indicadores evaluados. En larvas no fue necesario disecar el intestino, dado que es posible ver el color del indicador a través del cuerpo del insecto. Los resultados obtenidos mostraron valores de pH intestinal de la broca entre 4,5 y 5,2 y se constituyen en ayuda para futuros trabajos de investigación relacionados con la evaluación y caracterización de las enzimas digestivas presentes en el tracto intestinal, y muy especialmente, para la evaluación del potencial biológico de inhibidores específicos que actúen sobre estas enzimas y bajo estas condiciones de pH.

Palabras claves: Broca del café, *Hypothenemus hampei*, pH intestinal, indicadores de pH.

ABSTRACT

Insects have different pH values in their digestive tract and several types of digestive enzymes adapted to such conditions. In order to determine the pH of the digestive fluid in *Hypothenemus hampei* larvae and adults, different pH indicators (2% w/w, Congo red, bromophenol blue, bromothymol blue, bromocresol purple, and methyl red) were added to dry ground coffee with 12% humidity. 2g of the mixture were infested with 20 adults, and first and second-instar coffee berry borer larvae, during 60 minutes at 28°C, to allow ingestion. Then, gut dissection of adults was made to observe color changes. Dissection is not necessary in larvae because it is possible to see color through the insect body. Results indicated an intestinal pH value between 4.5 and 5.2.

Keywords: *Hypothenemus hampei*, intestinal pH, coffee berry borer, pH indicators.

* Licenciado en Biología y Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas.

** Investigador Principal I. Entomología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

*** Profesor Asociado. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Caldas. Manizales, Caldas, Colombia.

La determinación del valor del pH de los insectos a lo largo de su tracto digestivo es de gran importancia para desarrollar trabajos orientados a la evaluación de la actividad de enzimas digestivas y en particular, aquellas que están presentes en el fluido intestinal tanto de larvas como de adultos. Además, es indispensable tener claridad sobre los valores del pH intestinal en los insectos, en especial, si se desea utilizar inhibidores enzimáticos que bloqueen la función bioquímica de sus enzimas digestivas (4).

El orden Coleoptera es extremadamente grande, en consecuencia, es difícil hacer generalizaciones acerca de la concentración de iones hidrógeno que presentan estos insectos a lo largo de su intestino. Diversos estudios se han realizado con el objeto de determinar el pH intestinal de algunas especies de este orden (7). En trabajos orientados a la caracterización de las condiciones fisicoquímicas existentes en varias regiones del intestino de termitas, se han utilizado técnicas como: potenciales redox y colorantes indicadores de pH, suministrados a las termitas con el alimento antes de la disección (9, 14), o adicionados a los contenidos digestivos extraídos de los intestinos disecados (3).

Las medidas del pH en insectos también se han realizado usando microelectrodos (5, 6), electrodos convencionales (12), ó combinaciones de electrodos y contenidos del intestino disueltos en agua destilada (3). También se han empleado electrodos de platino para medir los potenciales redox en intestinos de *Zootermopsis nevadensis* y *Cubitermes severus*; dos especies de termitas relativamente grandes (2).

En esta investigación se determinó el pH en el tracto digestivo de larvas y adultos de *H. hampei*, mediante el uso de colorantes indicadores de pH como una metodología de fácil aplicación y confiabilidad para la evaluación de la actividad enzimática en el tracto digestivo de la broca del café.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico. Se utilizaron larvas de primer y segundo instar y adultos de broca provenientes de la unidad de cría de parasitoides de Cenicafé recién emergidas, criadas en café pergamino seco con humedad del 45% y mantenidas en condiciones de oscuridad a 27°C y humedad relativa entre 65 y 75 %.

Indicadores de pH evaluados. Se evaluaron: rojo congo (3,0 - 5,2) (violeta - rojo anaranjado), azul de bromotimol (5,8 - 7,6) (amarillo - azul), púrpura de bromocresol (5,2 - 6,8) (amarillo verdoso - violeta azulado), rojo de metilo (4,5 - 6,2) (violeta rojo - amarillo pardo), y azul de bromofenol (3,0 - 4,6) (amarillo verdoso - violeta azulado).

Determinación del pH. El pH del intestino de adultos y larvas de *H. hampei* se determinó usando una dieta consistente en harina de café pergamino seco, más colorantes indicadores de pH (11, 13, 3, 8), así: 2g de café se molieron con un micromolino MFC de IKA y se mezclaron con 0,04g de indicador (2% p/p). La mezcla se colocó en viales de vidrio y a cada uno se le adicionaron 20 larvas (primer y segundo instar) o adultos de *H. hampei* y se dejaron durante 60 minutos para que el insecto consumiera la dieta. Transcurrido este tiempo, se disecaron los adultos de *H. hampei*. En larvas no fue necesario hacer la disección debido a que el color del indicador podía verse fácilmente a través del cuerpo del insecto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del pH del fluido digestivo. En la Figura 1, se observan virajes positivos de pH con los indicadores: rojo congo (3,0 - 5,2), rojo de metilo (4,5 - 6,2), y azul de bromofenol (3,0 - 4,6), y virajes negativos con azul de bromotimol (5,8 - 7,6) y púrpura de bromocresol (5,2 - 6,8).

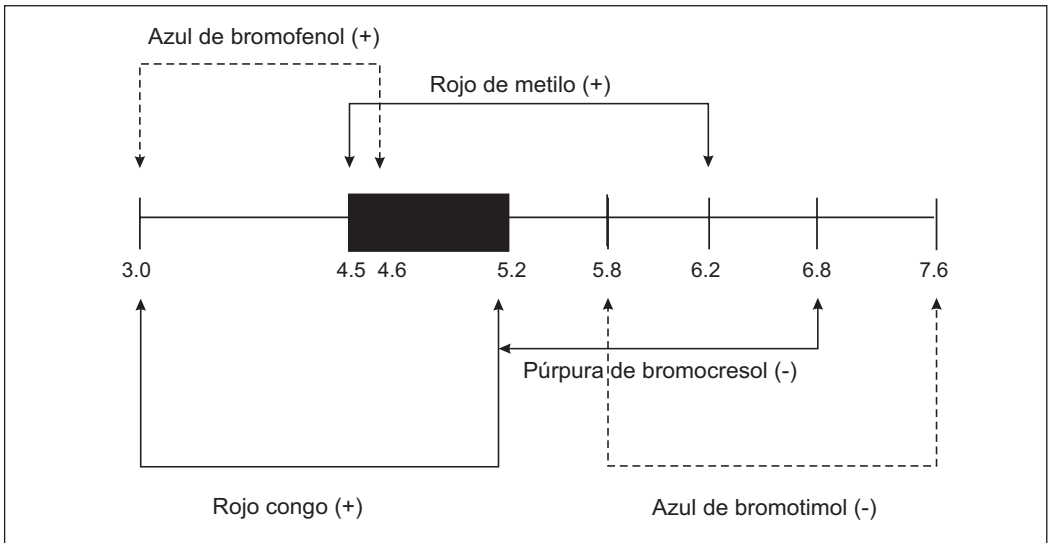


Figura 1. Intervalo de viraje de los indicadores evaluados en la determinación de pH del fluido digestivo en *hypotheremus hampei*.

En larvas, el viraje de algunos indicadores puede observarse con facilidad cuando se trata de un color diferente al hialino del tracto digestivo de larvas, no alimentadas. Así, por ejemplo, el rojo congo vira en un intervalo de pH de 3,0 a 5,2 pasando de violeta a rojo anaranjado (Figura 2), evidenciando con esto un viraje positivo y que el pH del fluido intestinal en larvas está por encima de 3,0 pero inferior a 5,2. En este estado del insecto no se notaron cambios significativos de pH entre el intestino medio y posterior (Figura 3). En adultos, los resultados con rojo congo fueron similares a los encontrados en el estado larval (Figura 4).

El indicador azul de bromofenol pasó de amarillo verdoso a violeta azulado en el fluido digestivo de las larvas (Figura 5), y también en adultos de *H. hampei*. Esto reconfirma los datos obtenidos con el indicador anterior. Además, estos resultados evidencian que en el interior del tracto digestivo de *H. hampei* existen las concentraciones de iones hidrógeno necesarias para que el viraje de color sea percibido.

Otro indicador que se muestra en la Figura 1 es el rojo de metilo, el cual viró de violeta rojo a amarillo pardo (pH 4,5 - 6,2), indicando que el fluido intestinal de la broca presenta un valor de pH dentro del rango de viraje establecido para este indicador.

Los otros dos indicadores evaluados, azul de bromotimol (pH 5,8 - 7,6) y púrpura de bromocresol (pH 5,2 - 6,8) (Figura 6), viran en un rango de pH que se desplaza más hacia la alcalinidad. Éstos, no exhibieron ningún cambio de color que indicara que el pH intestinal de la broca fuera ligeramente alcalino. Por el contrario, los resultados obtenidos con estos dos indicadores de pH evidencian nuevamente que *H. hampei* tiene un valor de pH intestinal ácido (4,5 - 5,2). Valores semejantes de pH se han registrado para el tracto digestivo de varios insectos pertenecientes al orden Coleoptera. Así, por ejemplo, *Cryptolestes turcicus* presenta valores de pH en el intestino anterior de 3,6 a 4,6 y de 4,6 a 5,2 en el intestino posterior, *Tribolium confusum* tiene un pH de 4,6 a 5,2 en la parte anterior del intestino y de 3,6 a 4,6 en la parte



Figura 2. Porción intestinal de una larva de broca del café *H. hampei* tratada con rojo congo (pH 3,0 - 5,2).



Figura 3. Sección del intestino medio y posterior de una larva de *H. hampei* tratada con rojo congo (pH 3,0 - 5,2).



Figura 4. Porción intestinal de un adulto de broca del café *H. hampei* tratado con rojo congo (pH 3,0 - 5,2).

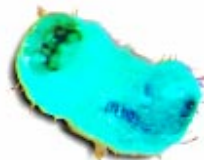


Figura 5. Sección del intestino medio y posterior de una larva de *H. hampei* tratada con azul de bromofenol (pH 3,0 - 4,6).



Figura 6. Sección del intestino posterior de una larva de *H. hampei* tratada con púrpura de bromocresol (pH 5,2 - 6,8).

Imágenes tomadas en un estereoscopio con ocular 10X

posterior del mismo. Para *Tribolium castaneum* se registra un valor de pH de 5,2 en la parte anterior y de 3,6 a 4,6 en la región posterior y en *Sitophilus granarius* el pH en la parte anterior es de 5,2 y de 4,6 a 5,2 en la región posterior del intestino (7).

A diferencia de los coleópteros como *H. hampei*, los cuales presentan valores de pH del intestino medio en un rango ácido, los lepidópteros en general han mostrado valores alcalinos en el intestino medio. Esta alcalinidad intestinal en larvas de lepidópteros, al parecer, es una adaptación evolutiva al efecto detrimental de los compuestos fenólicos presentes en el

alimento que consumen (1). Una razón similar se ha sugerido para explicar el pH alcalino del intestino medio de larvas de algunos dípteros, cuyas dietas son también ricas en compuestos fenólicos (10).

Este método utilizado para la determinación de pH del fluido digestivo en *Hypothenemus hampei*, resulta bastante simple, confiable y de fácil aplicación en insectos tan pequeños como la broca del café, y en donde la disección del intestino completo es una tarea difícil y de poca confiabilidad, especialmente, si tenemos en cuenta que una vez disecado el intestino sufre una deshidratación inmediata. Con esta metodolo-

gía se facilita no sólo el estudio rápido del pH a lo largo del tracto digestivo de muchos insectos con volúmenes intestinales pequeños, sino que además, es un método que no destruye los gradientes de pH preexistentes a través del tracto intestinal sin limitar la resolución espacial (6). Igualmente, cuando el tracto digestivo de los insectos se destruye durante el análisis del pH, la capacidad amortiguadora del mismo se puede perder fácilmente, obteniéndose valores erróneos en la determinación.

Finalmente, el análisis del pH del fluido digestivo de *H. hampei* mostrado en este trabajo se constituye en una valiosa ayuda para futuros trabajos de investigación relacionados con la evaluación y caracterización de las enzimas digestivas presentes en el tracto intestinal y, muy especialmente, para la evaluación del potencial biológico de inhibidores específicos que actúen sobre estas enzimas y bajo estas condiciones de pH.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias por el apoyo financiero para la realización de este trabajo, dentro del marco del Proyecto ENT - 1000. "Evaluación de inhibidores de amilasa y proteasa y estudio de las enzimas digestivas de la broca del café (*Hypothenemus hampei*)".

LITERATURA CITADA

1. BERENBAUM, M. Adaptive significance of midgut pH in larval lepidoptera. *American Naturalist* 115: 138-146. 1980.
2. BIGNELL, D. E. Direct potentiometric determination of redox potentials of the guts contents in the termites *Zootermopsis nevadensis* and *Cubitermes severus* and in three other arthropods. *Journal of Insect Physiology* 30: 169-174. 1984.
3. BIGNELL, D. E.; ANDERSON, J. M. Determination of pH and oxygen status in the guts of lower and higher termites. *Journal of Insect Physiology* 26: 183-188. 1980.

4. BLANCO, L.A.; MARTINEZ, N.A.; SANDOVAL, L.; DELANO, J. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26(1): 95-100. 1996.
5. BRUNE, A.; EMERSON D.; BREZNAK, J.A. The termite gut microflora as an oxygen sink: microelectrode determination of oxygen and pH gradients in guts of lower and higher termites. *Applied Environmental Microbiology* 61: 2681-2687. 1995.
6. BRUNE, A.; KUHLE, M. pH profiles of the extremely alkaline hindguts of soil-feeding termites (Isoptera: Termitidae) determined with microelectrodes. *Journal of Insect Physiology* 42 (11-12): 1121-1127. 1996.
7. CROWSON, R.A. The biology of the Coleoptera. London, Academic Press, 1981. 802 p.
8. ESPINOZA-FUENTES, F.P.; TERRA, W.R. Physiological adaptations for digesting bacteria, water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochemistry* 17: 809-817. 1987.
9. EUTICK, M. L.; O'BRIEN, R.W.; SLAYTOR, M. Aerobic state of gut of *Nasutitermes exitiosus* and *Coptotermes lacteus*, high and low caste termites. *Journal of Insect Physiology* 22: 1377-1380. 1976.
10. SHARMA, B.R.; MARTIN, M.M.; SHAFER, J.A. Alkaline proteases from the gut fluids of detritus-feeding larvae of the crane fly, *Tipula abdominalis* (Say) (Diptera: Tipulidae). *Insect Biochemistry* 14: 37-44. 1984.
11. SINHA, R.N. The Hydrogen-ion concentration in the alimentary canal of beetles infesting stored grains and grains products. *Annals of the Entomological Society of America* 52: 763-765. 1959.
12. SWINGLE, M.C. Hydrogen ion concentration within the digestive tract of certain insects. *Annals Entomological Society of America* 24: 489-495. 1931.
13. TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BIANCHI, A.G. Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology* 25: 487-494. 1979.
14. VEIVERS, P.C.; O'BRIEN, R.W.; SLAYTOR, M. The redox state of the gut of termites. *Journal of Insect Physiology* 26: 75-77. 1980.