



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DEL ETANOL Y DE LA DIETA  
SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL DEL  
GORGOJO DE ARROZ, *Sitophilus oryzae* (L.)**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO  
Presentado ante la Ilustre Universidad  
Central de Venezuela, por la bachiller  
Mighay Carlet Lovera Fuchs como  
requisito parcial para optar por el título  
de Licenciada en Biología

Tutor: Dr. Alexander Laurentin

CARACAS, VENEZUELA  
JUNIO 2008

DEDICAR El presente Trabajo Especial de Grado presentado por la bachiller

**Mighay Carlet Lovera Fuchs**

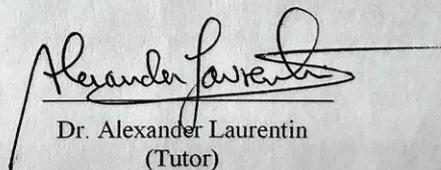
Ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciada en  
Biología y titulado:

**Efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz,  
Sitophilus oryzae.**

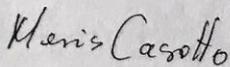
Fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias, bajo la dirección del Dr. Alexander Laurentin, siendo aprobado en discusión pública por los siguientes miembros del jurado, designados por el Consejo de Escuela,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

Caracas, a los 23 días del mes de mayo del año 2008.

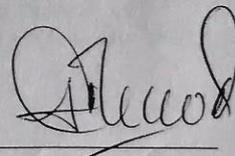
*A mis queridos padres*



Dr. Alexander Laurentin  
(Tutor)



Dra. Meris Casotto  
(Jurado)



Dr. Juan Carlos Navarro  
(Jurado)

## **DEDICATORIA**

***A mis queridos padres***

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres por el amor y el apoyo incondicional durante toda la vida.....*

*A Denisse y Mikhael, mis hermanos, sigan los pasos de su hermana mayor, ¿futuros biólogos?.....*

*A mis abuelos, mil gracias, los quiero mucho.....La Guacharacota*

*A toda mi familia, gracias por estar pendiente y darme apoyo, muchísimas gracias.....*

*Al Dr. Alexander Laurentin por la oportunidad, la enseñanza, la paciencia, la constancia, el conocimiento, la ayuda, los consejos, el profesionalismo y la amistad brindada durante todo este tiempo.....*

*A la Dra. Meris Casotto y a la Dra. Ana Gómez por la enseñanza, la amistad y las palabras de ánimo en todo momento.....*

*A la Dra. Mercedes Schnell y al Dr. Juan Carlos Navarro por su contribución en el mejoramiento de este Trabajo Especial de Grado.....*

*A los profesores Lourdes Suárez y Ernesto González por estar pendiente y ayudarme en los análisis estadísticos.....*

*Al profesor Jesús Romero por la ayuda en la obtención de un reactivo.....*

*A todos los profesores que de una u otra manera contribuyeron con mi educación, sinceramente gracias.....*

*A los compañeros del Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo: Carlos, Moisés, Denis, Olga, Gabriela, Daisy, Alejandro, Antonio..... por los ratos compartidos.*

*A Grecia por su gran ayuda prestada con el material de laboratorio.....*

*A mis compinches Alejandro y Giovanni, que sin ustedes nunca habría sido igual. Gracias por darle variedad, risas, alegrías, conocimiento, apoyo, compañerismo, diversión, colaboración, entusiasmo, aventura, consejos..... y lo más importante una amistad para toda la vida.*

*A mi grupo de amigos y amigas: Cristina, Mariela, Gabriela, Juliana, Laynet, Eligen, Beatriz, Ambar, Greiskelly, Alfonso, Jorjeth,.....por darme buenos tiempos, sacarme de la monotonía y enseñarme a vivir el momento y a disfrutar al máximo cada día.*

*A mis colegas, María Johana, Eluzmar, Daya, Kinski, Julimar, Katy, Indira, Jeismar, José Miguel, Jéser, Armando, Serráf y muchos otros más..... por la amistad y el compañerismo generado.*

*A mis amigos, Armando, Alfredo, Jonathan y César por seguir en contacto.....*

*A mi música y a mis libros (Harry Potter), sitio de refugio y relajación.....*

## RESUMEN

El uso de insectos en bioensayos nutricionales tiene como ventajas que son ensayos rápidos, sencillos y económicos donde se pueden realizar determinaciones simultáneas. En el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental ha sido utilizado con éxito el bioensayo con el gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*, y el gorgojo rojo de la harina, *Tribolium castaneum*, para el estudio de la calidad proteica; utilizando para ello herramientas de valoración que reciben el nombre de “biomarcadores”. El efecto del etanol ha sido ampliamente estudiado, no sólo como fuente de carbono de ciertos organismos como bacterias y por ser un producto de la fermentación de carbohidratos en levaduras, sino principalmente por los efectos perjudiciales del alcohol en humanos. En estudios nutricionales sobre el efecto del etanol, se ha encontrado que por su alto contenido calórico, el etanol puede desplazar los nutrientes causando malnutrición; incluyendo deficiencias de algunas vitaminas. De manera que para evaluar la biodisponibilidad de algunos nutrientes y el posible efecto del etanol sobre ellos, utilizando diversos biomarcadores, se planteó la búsqueda de una dieta óptima que permitiera poder observar el efecto del alcohol. El presente trabajo tuvo como objetivo general evaluar el efecto del etanol (al 1 % v/v) y de seis dietas de diferente valor nutritivo (agar al 5 %, almidón de maíz al 10 %, Ne-nerina y Ensure al 0,3 % y al 5 %) sobre los biomarcadores de la calidad y aprovechamiento biológico utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz. Los biomarcadores utilizados fueron: la supervivencia, la variación de peso, los cambios en la composición corporal (porcentaje de agua, grasa, nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular), la excreción de ácido úrico, la actividad específica y el porcentaje de activación de la enzima aspartato aminotransferasa. La supervivencia y la variación de peso no parecieron ser buenos indicadores para evaluar el efecto del etanol sobre el gorgojo de arroz; sin embargo, los biomarcadores porcentaje de agua y porcentaje de grasa si resultaron ser excelentes indicadores para evaluar el efecto del etanol. El efecto del etanol sobre la composición corporal del gorgojo de arroz se observó con la dieta de almidón de maíz al 10 %, en donde hubo una disminución del agua (variación porcentual: -4 %) y del nitrógeno proteico (-17 %), y un aumento de la grasa corporal (27 %). La excreción de ácido úrico pareciera ser un buen biomarcador para evaluar el efecto del etanol solo en dietas de baja concentración de nutrientes, a juzgar por lo obtenido con la dieta de Ensure al 0,3 % v/v. La actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa no pareció ser un buen indicador del estado nutricional de la vitamina B<sub>6</sub>. Finalmente, el análisis de componente principal (ACP) permitió detectar fuertes correlaciones entre el contenido de grasa y la variación de peso (correlación positiva); así como también, entre el contenido de agua y el porcentaje de supervivencia de los gorgojos (correlación negativa), por lo que la técnica de ACP, de novel aplicación en el campo de la bioquímica nutricional, resultó una herramienta muy útil para la evaluación de los resultados.

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES.....	5
1. El gorgojo de arroz.....	5
2. El etanol.....	13
3. Utilización del gorgojo de arroz <i>Sitophilus oryzae</i> como bioensayo para evaluar la calidad proteica de las dietas.....	21
III. OBJETIVOS.....	26
1. Objetivo general.....	26
2. Objetivos específicos.....	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
1. Cultivo de gorgojos.....	27
2. Diseño experimental.....	27
3. Dietas.....	28
4. Preparación de las dietas.....	29
5. Determinación de la supervivencia y la variación de peso.....	31
6. Determinación de la composición corporal.....	31
6.1 Contenido de agua.....	31
6.2 Contenido de grasa.....	31
6.3 Contenido de nitrógeno proteico y cuticular.....	31
6.3.1 Extracción de proteínas.....	32
6.3.2 Digestión de muestras.....	32
6.3.3 Determinación del contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler.....	33
6.4 Determinación del parámetro “otros”.....	33
7. Determinación de la excreción de ácido úrico.....	33
8. Determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa.....	34
8.1 Obtención de las fracciones para la medida de la actividad enzimática.....	34
8.2 Determinación de la concentración de proteínas.....	35
8.3 Determinación de la actividad enzimática.....	35

8.4	Cálculo del porcentaje de activación de la aspartato aminotransferasa.....	36
9.	Análisis estadístico.....	37
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
1.	Supervivencia .....	38
2.	Variación de peso.....	48
3.	Cambios en la composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con dietas de diferente densidad de nutrientes con y sin etanol.....	56
3.1	Contenido de agua corporal.....	61
3.2	Contenido de grasa corporal.....	62
3.3	Contenido de nitrógeno proteico.....	64
3.4	Contenido de nitrógeno cuticular.....	66
3.5	Contenido de “otros”.....	68
4.	Excreción de ácido úrico.....	69
5.	Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa con y sin piridoxal fosfato.....	74
6.	Análisis de componentes principales.....	83
7.	Perspectivas generales.....	91
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>		<b>94</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>		<b>96</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>98</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Biomarcadores utilizados para evaluar el efecto de dietas nutricionalmente diferentes en ensayos con insectos.	25
<b>Tabla 2.</b> Formulaciones de las semillas artificiales para cada una de las dietas investigadas.	28
<b>Tabla 3.</b> Composición de nutrientes y energía por cada 100 g de cada una de las dietas investigadas, basado en la información nutricional según la etiqueta del fabricante.	30
<b>Tabla 4.</b> Peso promedio y composición corporal de gorgojos alimentados con las dietas de diferente densidad de nutrientes en presencia y ausencia de etanol.	57
<b>Tabla 5.</b> Excreción de ácido úrico por los insectos alimentados con dietas de diferente densidad de nutrientes en presencia y ausencia de etanol.	70
<b>Tabla 6.</b> Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa en presencia y ausencia de piridoxal fosfato, actividad relativa y porcentaje de activación.	76
<b>Tabla 7.</b> Valores de los <i>autovalores</i> , porcentaje de varianza total y porcentaje de varianza acumulada para los 9 componentes principales.	85
<b>Tabla 8.</b> Coeficientes de correlación ( $r$ ) de los tres primeros componentes principales.	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gorgojo de arroz, <i>Sitophilus oryzae</i> .	5
<b>Figura 2.</b> Dibujo esquemático del tubo digestivo de un insecto.	8
<b>Figura 3.</b> Metabolismo del etanol, oxidación del etanol en el citosol de las células hepáticas por la alcohol deshidrogenada, enzima que conduce a la producción de NADH.	15
<b>Figura 4.</b> Metabolismo del etanol, oxidación del etanol en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos por el sistema de oxidación microsómico del etanol (SOME).	16
<b>Figura 5.</b> Metabolismo del etanol, sistema de la catalasa.	18
<b>Figura 6.</b> Alteración en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas mediada por la acción del etanol.	20
<b>Figura 7.</b> Efecto del ayuno (control negativo), de la arveja (control positivo) y del agar (control de las dietas a base de agar) sobre la supervivencia en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	39
<b>Figura 8.</b> Efecto de dietas de agar al 5 % y de almidón al 10 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	41
<b>Figura 9.</b> Efecto de dietas de Ne-nerina al 0,3 % y al 5 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	43
<b>Figura 10.</b> Efecto de dietas de Ensure al 0,3 % v/v y al 5 % v/v, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	45

<b>Figura 11.</b> Efecto del ayuno (control negativo), de arvejas (control positivo) y del agar (control de las dietas a base de agar) sobre la variación de peso en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	49
<b>Figura 12.</b> Efecto de dietas de agar al 5 % y de almidón al 10 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la variación de peso en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	51
<b>Figura 13.</b> Efecto de dietas Ne-nerina al 0,3 % y al 5 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la variación de peso en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	53
<b>Figura 14.</b> Efecto de dietas de Ensure al 0,3 % v/v y al 5 % v/v, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la variación de peso en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> .	54
<b>Figura 15.</b> Peso promedio y representación gráfica de la composición corporal de los gorgojos alimentados con las dietas de agar y almidón de maíz en presencia y ausencia de etanol y los controles del experimento.	58
<b>Figura 16.</b> Peso promedio y representación gráfica de la composición corporal de los gorgojos alimentados con las dietas de Ne-nerina y Ensure (0,3 % y 5 %) en presencia y ausencia de etanol.	59
<b>Figura 17.</b> Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa sin fosfato de piridoxal.	77
<b>Figura 18.</b> Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa con fosfato de piridoxal.	77
<b>Figura 19.</b> Efecto del fosfato de piridoxal (PLP) sobre los blancos de la reacción.	82
<b>Figura 20.</b> Ubicación de las 48 muestras (12 dietas con cuatro réplicas cada una) según sus coordenadas en los dos componentes principales y los vectores de las variables (biplot).	87

## I. INTRODUCCIÓN

Las dietas humanas se componen de una combinación de alimentos de origen animal y vegetal. Casi todos ellos contienen un gran número de compuestos químicos; algunos no son asimilables ni utilizables por el organismo, razón por la cual siempre quedan residuos excretados como masa fecal. Aquellos componentes que son aprovechados fisiológicamente se denominan nutrientes (Jaffé, 2002).

Los factores que determinan la utilización de los nutrientes se han englobado bajo el término genérico “biodisponibilidad”. Esta se define como aquella fracción, de la cantidad de nutrientes ingerida, que es absorbida a nivel intestinal y es retenida en el organismo a los fines de crecimiento, recambio tisular y reproducción (Carmona y Jaffé, 1999).

Las medidas de biodisponibilidad de un nutriente están influenciadas por múltiples factores. Aquellos propios del alimento, es decir, de la forma química como este se presenta en un alimento, de su solubilidad, de la digestibilidad de dichas formas para liberar al nutriente de los complejos en que se encuentra, de los mecanismos de transporte trans-epitelial, del transporte plasmático, de la captación tisular, incorporación en biomoléculas, de su almacenamiento y excreción. Otros factores que influyen en la biodisponibilidad de un nutriente son la forma de preparación del alimento, la combinación de alimentos que se ingiera, la condición fisiológica, el estado nutricional y las variantes genéticas del individuo que deba aprovecharlos (Carmona y Liuzzi, 1998).

Para una política de nutrición y producción de alimentos es indispensable conocer la composición de la dieta popular y sus posibles fallas, para así poder proveer

los ajustes necesarios. Igualmente importante para la ciencia médica es conocer la ingesta de ciertos nutrientes si se trata de definir enfermedades carenciales y, más todavía, para poder estimar los requerimientos en nutrientes de los distintos grupos (Jaffé, 2002).

El uso de insectos en bioensayos nutricionales tiene como ventajas la corta duración y el menor costo de los experimentos. La pequeña cantidad de alimento requerida para cada ensayo permite evaluar, por ejemplo, el efecto de factores antinutricionales purificados, de limitada disponibilidad. Por otra parte, para cada réplica, se utilizan entre 30 y 60 individuos, por lo que se trabaja con “pequeñas poblaciones”. Ello disminuye la variabilidad de los parámetros estudiados y facilita los análisis estadísticos (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997).

En las últimas décadas el estudio de nuevos modelos animales ha sido de gran utilidad para solucionar problemas nutricionales. En el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental donde se realizó este trabajo, ha sido utilizado con éxito el bioensayo con los gorgojos *Sitophilus oryzae* (López, 1999) y *Tribolium castaneum* (Carmona y col., 2001), para el estudio de la calidad proteica de los alimentos, la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados (García, 2003; Galeno, 2006), para determinar deficiencias en las vitaminas B1, B2 y B6 (Millán y Carmona, 2005) y más recientemente se ha utilizado como bioensayo las larvas del Lepidóptera *Spodoptera frugiperda* para determinar los niveles de glucógeno (Rojas y col., 2005).

Una de las utilidades del bioensayo con gorgojos ampliamente encontrada en la bibliografía, es la referente al estudio y control de las plagas de gorgojos de gran importancia en diversas regiones de Latinoamérica, debido a las condiciones

ambientales adecuadas para el crecimiento y desarrollo de este tipo de insectos y que atacan a los cultivos de cereales como maíz, trigo y arroz, lo cual ha sido objeto de estudio por diversos investigadores (Ajayi y Rahman, 2006; Bamaiyi y col., 2007; Law-Ogbomo y Enobakhare, 2007; Nijamo y col., 2007). Un ejemplo de ello, son estudios en los que se han evaluado las propiedades repelentes y antialimentarias de extractos crudos de plantas disueltos en diferentes solventes orgánicos sobre *Sitophilus* (Linnaeus, 1763); determinando los posibles efectos que tienen algunos metabolitos secundarios de las plantas con potencial uso como insecticida botánico (Viglianco y col., 2006).

Hoy en día, se han desarrollado herramientas importantes para evaluar la eficacia de utilización de los nutrientes; tales herramientas de valoración, reciben el nombre de “biomarcadores” (Anderson y Cockaune, 1995 citado por Millán y Carmona, 2005). Estos biomarcadores son parámetros sencillos, susceptibles de ser medidos en experimentos de corta duración en humanos y constituyen una alternativa para evaluar la eficacia de los componentes funcionales de los alimentos (Carmona y Jaffé, 1999).

El cuerpo humano es capaz de deshacerse muy fácilmente de la mayoría de los productos tóxicos de su propia elaboración, como el dióxido de carbono y los desechos nitrogenados. En contraste, la mayoría de las sustancias tóxicas ingeridas, como el etanol (en bebidas alcohólicas), primero deben ser degradadas por el hígado, órgano que posee enzimas que no están presentes en otros tejidos (Curtis, 2001).

El efecto del etanol ha sido ampliamente estudiado no sólo como fuente de carbono de ciertos organismos como bacterias, y por ser un producto de la fermentación de carbohidratos en levaduras, sino principalmente por los efectos perjudiciales del alcohol en humanos. Algunos científicos sostenían que bastaba con agregar ciertas vitaminas al alcohol para que desapareciera la mayor parte del daño físico que produce a

largo plazo, como hepatitis alcohólica y cirrosis hepática, pero la nueva evidencia sugiere que no es así (Curtis, 2001).

Siguiendo esta línea de pensamiento resulta de gran interés determinar el efecto del etanol y de la dieta sobre la composición corporal del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*, ya que es un modelo animal muy versátil para identificar biomarcadores que permitan evaluar la biodisponibilidad de algunos nutrientes y el posible efecto del etanol sobre ellos.

## II. ANTECEDENTES

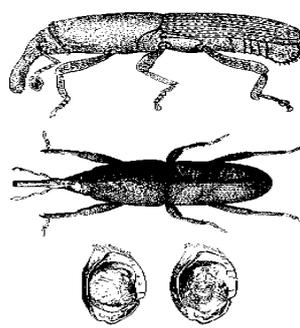
### 1. El gorgojo de arroz

El gorgojo de arroz pertenece al orden Coleóptera, familia Curculionidae y a la especie *Sitophilus oryzae* (L.). Externamente presenta una cabeza proyectada en forma de trompa y antenas acodadas en forma de maza (Figura 1). El protórax está densamente cubierto de depresiones circulares. Tiene alas y vuela con gran facilidad. El adulto mide de 2,5 a 3,5 mm y el color varía de café a negro. En los élitros, que constituyen el primer par de alas de consistencia coriácea, presenta cuatro manchas de color amarillento (Velásquez y Trivelli, 1983).

A)



B)



**Figura 1.** Gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*. A) Adulto visto desde arriba mostrando las depresiones circulares en el protórax, las manchas en los élitros (primer par de alas coriáceas) y el color café característico del cuerpo (Tomado de Velásquez y Trivelli, 1983). B) Vista lateral y desde arriba del adulto, y del estadio de pupa (Tomado de Anónimo, 2007a).

El gorgojo de arroz se alimenta principalmente de cereales y ataca tanto en el campo como en los depósitos. El adulto y las larvas se alimentan vorazmente de los granos como trigo, maíz, arroz, sorgo, cebada, avena y centeno. En Chile, se le ha encontrado atacando otros productos de origen cerealícola de consistencia dura, tales

como fideos y galletas. Ocasionalmente se ha encontrado en productos molidos, aunque difícilmente se multiplican en este medio (Velásquez y Trivelli, 1983).

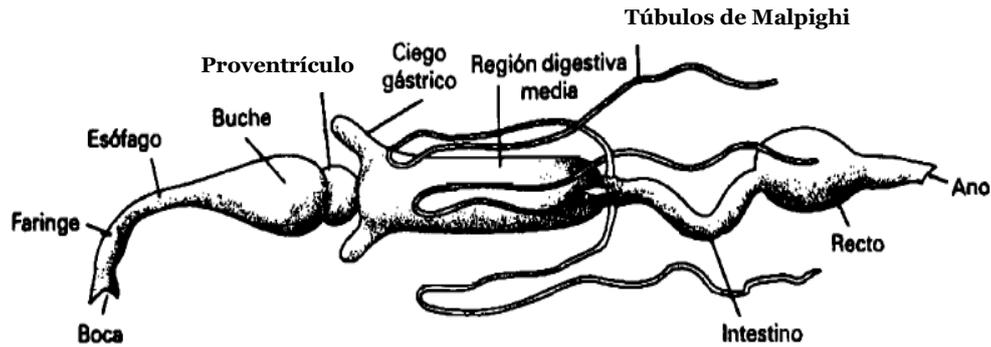
Es de distribución cosmopolita, encontrándose principalmente en las zonas cálidas húmedas, tropicales y subtropicales. En cuanto a la reproducción, estos insectos presentan un desarrollo completo denominado holometábolo, caracterizado por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras horadan el grano y depositan en cada diminuta perforación un huevecillo que posteriormente es cubierto con una secreción, por lo que su presencia pasa inadvertida. Cada hembra, deposita de 300 a 400 huevos que tardan entre 4 y 6 semanas en transformarse en adultos. La larva carente de patas, se alimenta, se transforma en pupa y finalmente en adulto, dentro del grano. Al emerger, el adulto deja orificios en el grano. El adulto vive de 4 a 5 meses. La hembra alcanza su máxima actividad de oviposición después de 3 semanas de haber emergido (Velásquez y Trivelli, 1983). El ciclo de vida tarda alrededor de 5 semanas (32-35 días) a 30 °C y 70 % de humedad relativa. Las condiciones óptimas de desarrollo son 27-31°C y más de 60 % de humedad relativa; por debajo de 17 °C, el desarrollo se interrumpe (Anónimo, 2007a).

Al gorgojo de arroz se le considera plaga primaria, pues el adulto es capaz de dañar granos sanos y las larvas se alimentan en su interior. Hasta hace algunos años esta especie era la principal plaga del trigo, arroz y maíz almacenados, pero ahora existen otras plagas como *Rhyzoperta dominica* "Capuchín del grano" que atacan los sembradíos de cereales (Velásquez y Trivelli, 1983), este gorgojo también es del orden Coleóptera pero de la familia Bostrichidae.

Con la excepción de los estadios más tempranos de algunos insectos parásitos, los cuales absorben nutrientes a través de la superficie corporal, todos los insectos

conducen el alimento a través de un canal alimentario. Este consiste siempre de tres regiones que son: intestino anterior (estomodeum), intestino medio (mesenterón) e intestino posterior (proctodeum). El intestino anterior y el posterior presentan cutícula; mientras que, en el intestino medio las células están expuestas libremente razón por la cual la secreción de los jugos digestivos ocurre en ésta región y también tiene lugar la mayor parte de la absorción (Wigglesworth, 1966).

El tracto anterior está formado por la boca con glándulas salivales, el esófago, el buche para almacenar y la molleja para triturar (esta última producto de una modificación del proventrículo en el caso de los insectos que comen alimentos sólidos (Ruppert y Barnes, 1996). El tracto medio está formado por el estómago y los ciegos gástricos. Por último, el tracto posterior está constituido por el intestino, el recto y el ano (Figura 2). Una parte de la digestión se puede realizar en el buche, cuando el alimento se mezcla con la saliva. El tracto medio es el principal sitio de digestión y absorción, y los ciegos gástricos pueden incrementar la superficie para estas funciones. En el tramo posterior, la absorción de nutrientes es escasa, pero es una zona fundamental para la reabsorción de agua y ciertos iones (Hickman y col., 1998). Una característica de la región digestiva media de casi todos los insectos, exceptuando los hemípteros, es la presencia de una membrana peritrófica que está compuesta de una fina capa de proteína y quitina. La membrana peritrófica protege a las paredes de esta delicada región de la abrasión producida por el alimento y, aún más importante, permite el reflujo de enzimas, al dividir la luz digestiva en dos compartimientos (Ruppert y Barnes, 1996).



**Figura 2.** Dibujo esquemático del tubo digestivo de un insecto. Tomado de Ruppert y Barnes (1996).

El gorgojo de arroz, al igual que cualquier otro insecto masticador, presenta un aparato bucal masticador y un tubo digestivo, extendido desde la boca hasta el ano. El aparato masticador de muchos insectos herbívoros está adaptado para cortar y triturar el alimento. Las mandíbulas de los insectos masticadores son placas dentadas fuertes, cuyos bordes pueden morder o desgarrar, mientras las maxilas sujetan el alimento y lo pasan hacia la boca (Hickman y col., 1998). En muchos insectos pertenecientes a los órdenes Orthoptera, Isoptera, Odonata, Hymenoptera y muchos Coleópteros, como es el caso del gorgojo de arroz, la parte final del intestino anterior está dilatada formando una especie de buche, donde la comida es almacenada antes de ser transmitida en pequeñas cantidades al intestino medio (Wigglesworth, 1966). Para insectos como el saltamonte, la cucaracha y los escarabajos, el buche es el lugar más importante para la digestión enzimática; las enzimas pasan al buche desde la región digestiva media (Ruppert y Barnes, 1996).

Las enzimas digestivas son capaces de hidrolizar los diferentes macronutrientes a sus unidades constituyentes y en los insectos algunas de estas enzimas son elaboradas en glándulas salivales especiales presentes en la cavidad bucal, pero la mayoría son producidas por las células del intestino medio (Wigglesworth, 1966). Entre las enzimas

encontradas en el intestino medio, principalmente en coleópteros, están: maltasas, invertasas, triptasas y lipasas (Wigglesworth, 1966). También se ha reportado la presencia de carbohidrasas y proteasas en el intestino de distintos tipos de insectos, así como algunos pocos que producen la enzima que degrada la celulosa (celulasa). La mayoría de los insectos poseen enzimas digestivas que digieren los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, de manera similar como ocurre en los animales vertebrados. Sin embargo, existe un número de especies que han desarrollado adaptaciones especiales asociado a hábitos alimenticios particulares, haciéndolos capaces de digerir productos animales, tales como quitina, keratina, colágeno, y productos vegetales como celulosa, que normalmente serían considerados altamente resistentes al ataque enzimático (Wigglesworth, 1966). También se conoce que hay enzimas producidas por los microorganismos presentes en el intestino del insecto, las cuales podrían mantener una relación de mutualismo con su hospedador (Meglitsch, 1967).

Los insectos poseen una cutícula que funciona como un tegumento y como un esqueleto articulado, y el material que lo forma debe tener una diversidad de propiedades, entre ellas ser flexible para que exista articulación de cada una de las partes del exoesqueleto. Según Wigglesworth (1966), la cutícula se forma producto de la actividad de las células epidérmicas y está constituida por tres capas, empezando desde la más interna que está en contacto con la epidermis tenemos: endocutícula (compuesta principalmente de microfibrillas de proteínas y del polisacárido quitina, en una estructura en forma de lamelas), la exocutícula (que está constituida por los mismos componentes de la endocutícula, pero en donde los componentes están estabilizados mediante un proceso denominado esclerotización) y, por último, la epicutícula que se encuentra en contacto con el medio externo (es la capa más pequeña pero es la más compleja porque tiene varias capas, entre ellas de lípidos y proteínas que constituye la

primera defensa de los insectos al medio externo, sobre todo en conferir impermeabilidad al agua).

La función de los órganos excretores de los animales es mantener más o menos constante el “ambiente interno” (Wigglesworth, 1966). En insectos el equivalente de los riñones son los tubos de Malpighi, los cuales son tubos ciegos finos y elásticos, que se insertan en la separación existente entre el intestino medio y el posterior; ellos se encuentran en número variable (Figura 2). Los extremos libres de los túbulos flotan en el hemocele, bañados en la hemolinfa (Hickman y col., 1998).

Uno de los productos finales del catabolismo de las proteínas es el ácido úrico. En muchos casos es recolectado en forma sólida en células especiales llamadas células de urato, las cuales están distribuidas alrededor del cuerpo. Las sales de urato no son transferidas a los túbulos de Malpighi (del adulto) sino al final del estadio de pupa (Wigglesworth, 1966).

El ácido úrico, que es poco soluble en agua, entra en el extremo distal del túbulo de Malpighi donde el pH es ligeramente alcalino, como urato ácido de potasio, relativamente soluble. A medida que se va formando la orina hacia el extremo proximal del túbulo, el potasio se combina con el dióxido de carbono y se reabsorbe como bicarbonato potásico; el ambiente se torna ligeramente ácido y el ácido úrico precipita (Hickman y col., 1998). Los animales que excretan ácido úrico son llamados uricotélicos; los insectos, las aves y los reptiles son ejemplos de ellos.

Para que los insectos crezcan y se reproduzcan debe haber un adecuado aporte de carbono y nitrógeno, sales inorgánicas y todos los otros elementos que requiere un sistema viviente. Los nutrientes que van a satisfacer las necesidades pueden variar de

una especie a otra, pero en general los requerimientos no son muy diferentes de aquellos en los vertebrados (Wigglesworth, 1966).

Dado que el canal alimentario de los insectos contienen enzimas digestivas que hidrolizan los constituyentes de los alimentos, es probable que el alimento sea absorbido en la forma de los productos de hidrólisis: carbohidratos como monosacáridos, grasas como glicerol y ácidos grasos, proteínas como aminoácidos (Wigglesworth, 1966).

Una de las peculiaridades en el metabolismo de los insectos, es la presencia de un carbohidrato llamado trehalosa (disacárido no reductor compuesto de dos residuos de glucosa) que se produce paralelamente a la vía de la glucogenogénesis. El precursor normal para la síntesis de trehalosa es la glucosa 6-fosfato y la UDP-glucosa. Este último compuesto es un intermediario en la síntesis del glucógeno y puede, bajo la acción de la enzima trehalosa 6-fosfato sintetasa, efectuar el acoplamiento de la unidad glucosilo a glucosa 6-fosfato, en vez de unirse al glucógeno, para producir trehalosa 6-fosfato, y ésta, puede ser desfosforilada por la trehalosa 6-fosfatasa para producir la trehalosa. La trehalosa forma parte de una considerable proporción de la reserva de carbohidratos, lo que sugiere que probablemente constituya un sustrato rápidamente disponible para el metabolismo general y, particularmente, para obtener energía para el vuelo (Bursell, 1970).

Se han realizado estudios para determinar los requerimientos básicos de los insectos. En uno de ellos, se alimentaron insectos de diferentes especies con dietas sintéticas conteniendo caseína, almidón o glucosa, colesterol, levadura, sales y agua; para luego analizar la importancia relativa de cada constituyentes (Fraenkel y Brewett, 1943). Los autores encontraron que ninguna de las especies fue capaz de crecer sin la presencia de levadura de cerveza y los insectos murieron en los primeros días del

experimento. Luego prepararon extractos de la levadura, encontrando que estos eran menos eficientes que la levadura pura probada inicialmente y, además, que los insectos alimentados con las dietas que contenían solamente el extracto hidrosoluble de levadura (rico en vitaminas del complejo B), en vez del extracto completo de levadura, se volvían deficientes en esteroides y otros factores como el factor de crecimiento biotina contenidos en la fracción insoluble en agua. También encontraron que algunos de los insectos requerían carbohidratos en la dieta y otros no, como fue el caso de *Tribolium confusum*.

En el Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo del Instituto de Biología Experimental se ha determinado que una dieta de arvejas peladas proporciona los requerimientos energéticos de los gorgojos, por lo que se utiliza como dieta para el mantenimiento de los cultivos. Además se ha logrado establecer una dieta basal mínima, con el almidón de maíz (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997), la cual aporta una limitada cantidad de nutrientes, suficiente para satisfacer las demandas del mantenimiento de los gorgojos y promover cierta ganancia de peso, por encima de los valores mantenidos en arvejas (Carmona y col., 1998).

En los estudios nutricionales donde se evalúa la eficiencia de incorporación de un nutriente, es necesario emplear dietas con concentraciones limitantes del mismo, para que su utilización sea óptima. Este propósito puede alcanzarse suministrando dietas de baja concentración o limitando el tiempo de alimentación (“meal feeding”) (Leveille, 1970 citado por Carmona y Casotto, 2001). Una manera de suministrar la dieta en estudio a los gorgojos es utilizando un sistema de semillas artificiales con base de agar (material inerte) a la cual se le puede incluir concentraciones variables de almidón, glucosa y demás nutrientes, según sea el caso. Estos experimentos permiten calcular el

índice de eficiencia alimentaria, el cual mide la ganancia de peso (mg) por unidad de alimento consumido (mg) y, además, el estudio de biomarcadores que evalúen la eficacia de utilización de nutrientes (Carmona y Casotto, 2001).

## **2. Etanol**

El etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) es una molécula orgánica muy simple, compuesta por un grupo hidroxilo (-OH) y una cadena alifática de dos carbonos ( $\text{CH}_3\text{CH}_2-$ ). Los extremos hidroxilo y etilo le dan la propiedad hidrofílica y lipofílica, respectivamente, a la molécula. El grupo hidroxilo puede formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que explica su propiedad hidrofílica (Bermúdez, 2003). A diferencia de otras drogas, el etanol es una fuente sustancial de energía, con 29,7 kJ (7,1 kcal) por gramo, un valor que excede la energía contenida en los carbohidratos o proteínas (Lieber, 2004a).

El metabolismo del alcohol en humanos, se inicia cuando se ingiere y atraviesa fácilmente las membranas celulares por ser una sustancia de bajo peso molecular. Comienza su tránsito en la boca, luego pasa al esófago y al estómago, donde puede absorberse. No obstante, su principal sitio de absorción lo constituyen las vellosidades intestinales, porque es aquí donde se encuentra la mayor superficie de contacto. El alcohol se absorbe siguiendo una cinética de primer orden, mientras más cantidad de alcohol se ingiera más será absorbido (Llerena y Huerta, 1998 citado por Bermúdez, 2003). Varios factores afectan el metabolismo del etanol, incluyendo el consumo del etanol, alimentos, otras drogas, el peso y la composición corporal de los individuos, así como también las variantes genéticas de las enzimas que metabolizan el etanol (Ramchandani y col., 2001). Sobre el proceso de absorción influye, por ejemplo, la

presencia y el tipo de alimento. Las comidas ricas en grasas y carbohidratos disminuyen de manera significativa la absorción de alcohol (Newcombe, 1972).

Los animales superiores tienen tres sistemas independientes que pueden catabolizar el etanol: el sistema de la enzima alcohol deshidrogenasa, el sistema de oxidación microsómico y el sistema de la enzima catalasa.

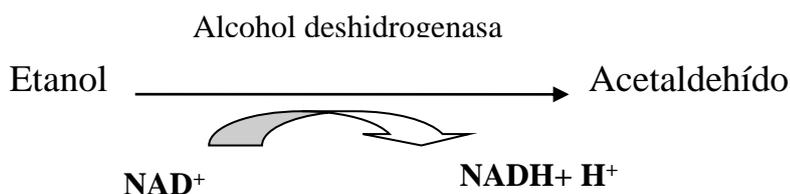
El primero de ellos y el más importante, es la vía en donde interviene la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH; EC 1.1.1.1) presente en el citosol (Figura 3). El acetaldehído resultante pasa a la mitocondria donde la enzima aldehído deshidrogenasa lo convierte a acetato para que finalmente la acetil-CoA sintasa lo transforme en acetil-CoA y entre al ciclo de Krebs (Matthews, 1997).

La ADH, cuyo  $K_m$  es 2 mmol/L, no sólo cataliza la conversión de etanol en acetaldehído, como se dijo anteriormente, sino que también puede oxidar al metanol, retinol (vitamina A) y otros alcoholes. Para que la ADH pueda realizar la oxidación del etanol necesita el dinucleótido de nicotina y adenina ( $NAD^+$ ) como cofactor (Teschke y col., 1976; Matsuzaki y col., 1981).

El sistema enzimático de la ADH está ampliamente distribuido en todas las especies, incluyendo organismos pertenecientes a todos los reinos en los que se clasifican los seres vivos (Jörnvall y col., 1993). Los genomas eucariotas codifican al menos 8 superfamilias de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media de la cual son miembros las ADH, y se encuentran divididas en dos grupos en base a la presencia o ausencia de Zn en su sitio activo (Jörnvall y col., 2003). La ADH de los animales (producida en el hígado) funciona para metabolizar el alcohol originado por la flora intestinal y el proveniente de fuentes externas (Anónimo, 2007b). Esta enzima pertenece

al grupo de las metaloenzimas y su estructura es dimérica, donde cada subunidad contiene un dominio catalítico y un dominio de unión a la coenzima, separados por una hendidura hidrofóbica que forma el bolsillo de unión al sustrato (Edenberg y Bosron, 1997).

Se ha demostrado que la aceleración del metabolismo del etanol debido a su consumo crónico no está necesariamente asociado con un incremento de la actividad de la ADH, y que el paso limitante en el metabolismo del etanol en la ruta de la ADH no depende de la actividad de la enzima pero si de la capacidad de los hepatocitos de reoxidar el NADH (Lieber, 1973), al incrementar la disponibilidad de su cofactor  $\text{NAD}^+$ .

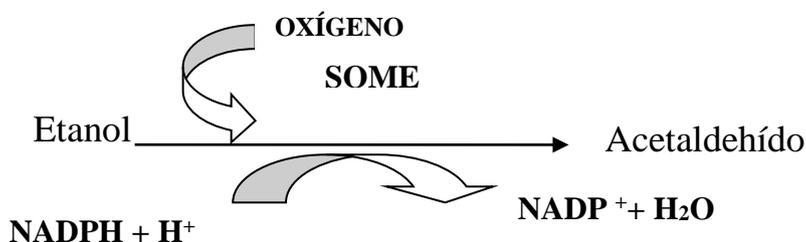


**Figura 3.** Metabolismo del etanol, oxidación del etanol en el citosol de las células hepáticas por la alcohol deshidrogenasa, enzima que conduce a la producción de NADH (modificado de Bermúdez y col., 2003).

El segundo sistema en el metabolismo del etanol es secundario y está representado por el sistema de oxidación microsómico del etanol, SOME (MEOS, por sus siglas inglés “microsomal ethanol-oxidizing system”; Lieber y DeCarli, 1970), el cual funciona en el retículo endoplásmico liso de los hepatocitos, su  $K_m$  es 10 mmol/L y es responsable de aproximadamente el 10 % del metabolismo del etanol (Teschke y col., 1972, citado por Bermúdez, 2003). El SOME metaboliza el etanol en acetaldehído y para ello requiere NADPH que es transformado en  $\text{NADP}^+$ . Durante la reacción, es

necesario que haya consumo de oxígeno. También está involucrado en este sistema el citocromo P-450 (Lieber, 2001), el cual es inducido por el etanol (Figura 4).

El SOME tiene importancia clínica porque permite que el individuo desarrolle resistencia a la acción del etanol cuando se consume en forma crónica, por lo que a medida que transcurre el tiempo la persona necesita mayores dosis de etanol para activar el mecanismo de degradación (Mezey y col., 1975; Miwa y col., 1978, citado por Bermúdez, 2003).



**Figura 4.** Metabolismo del etanol, oxidación del etanol en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos por el sistema de oxidación microsómico del etanol (SOME). Este sistema necesita la presencia de la coenzima NADPH y es necesario que haya consumo de oxígeno (modificado de Bermúdez y col., 2003).

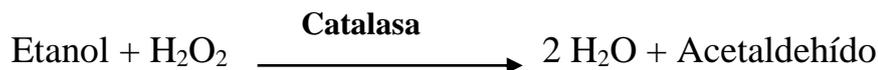
Debido a que con el consumo crónico de etanol, la actividad del SOME incrementa y, por lo tanto, la actividad del citocromo P-450, hay una inducción del catabolismo de otras drogas; permitiendo la tolerancia metabólica a las mismas (Lieber, 2004c). La tolerancia de las personas alcohólicas a varias drogas ha sido generalmente atribuida a una adaptación al sistema nervioso central. Sin embargo, adicional a esta adaptación, debe ser considerada la adaptación metabólica (Lieber, 1984). La importancia de este sistema como ruta para metabolizar el etanol es la capacidad que tiene para ser inducido. Así como incrementa la tolerancia a las drogas, existen muchos cambios a nivel microsomal que pueden ser interpretados como alteraciones “adaptativas” secundarias a la “inducción” luego del consumo crónico del alcohol. De

hecho, una aceleración del metabolismo del etanol resulta en un incremento de la producción de acetaldehído lo que exacerba varias de las manifestaciones tóxicas de este metabolito como se hablará más adelante. Un incremento en la actividad microsomal puede también incrementar el requerimiento de oxígeno, causando hipoxia. Los micronutrientes tales como las vitaminas pueden también servir como sustratos endógenos que son degradados por los microsomas, por lo que su “inducción” puede por lo tanto alterar los requerimientos vitamínicos e incluso afectar la integridad del hígado, un ejemplo de esto lo constituye los niveles bajos de vitamina A encontrados en el hígado de personas alcohólicas (Leo y Lieber, 1982, citado por Lieber, 1984), ocasionando daños a este órgano.

El aumento de la oxidación del etanol luego del consumo crónico podría resultar de una combinación de al menos dos mecanismos: un incremento adaptativo del SOME *per se* y una aceleración de la ruta de la ADH por el incremento de la disponibilidad de su cofactor  $\text{NAD}^+$ , como fue reportado por Matsuzaki y colaboradores (1981), en experimentos realizados con hepatocitos aislados de rata en presencia de concentraciones crecientes de etanol. Los autores encontraron que aproximadamente 30 % de la actividad de oxidación del etanol permanecía aún en presencia de un inhibidor de la ADH, y era dependiente de la concentración de etanol. El  $K_m$  aparente para los otros sistemas de oxidación del etanol era comparable con los valores del sistema oxidativo microsomal del etanol, por lo que concluyeron que este sistema podría contribuir con la mayor parte de la oxidación en las rutas no dependientes de ADH.

El tercer sistema para metabolizar el etanol está representado por la enzima catalasa, la cual contribuye aproximadamente con el 2 % del metabolismo del etanol. El

sistema de la catalasa se lleva a cabo en los peroxisomas y necesita el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). El peróxido de hidrógeno es generado en las reacciones catalizadas por las enzimas NADP oxidasa (que interviene en la formación de especies reactivas de oxígeno) y xantina oxidasa (del metabolismo de los nucleótidos purina), para oxidar al etanol y formar acetaldehído (Lieber, 2004b) (Figura 5).



**Figura 5.** Metabolismo del etanol, sistema de la catalasa. Este sistema oxida al etanol para formar acetaldehído y necesita al peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para llevar a cabo la reacción (modificado de Bermúdez y col., 2003).

Se sabe, desde hace muchos años, que los grandes bebedores tienen un alto riesgo de enfermedad hepática grave, la cual puede ser fatal. Las enzimas del hígado primero oxidan el etanol a acetaldehído. Luego el acetaldehído se oxida a acetato, el cual, a su vez, es oxidado a dióxido de carbono y agua. En ambas reacciones, se produce NADH. La alta relación NADH/NAD en el citoplasma inhibe la gluconeogénesis, al prevenir la oxidación de lactato a piruvato y, por lo tanto, lactato se acumula; causando acidosis (James, 2000). El elevado poder reductor de la célula también inhibe la glucólisis y el ciclo de Krebs. Por otra parte, la síntesis de los lípidos se acelera. El incremento de la proporción NADH/NAD, se asocia con una elevación de la producción de glicerol 3-fosfato, lo cual favorece la formación hepática de triglicéridos. Además, se observa un incremento en la actividad de las enzimas asociadas con la síntesis de ácidos grasos y colesterol. Esto puede ser uno de los factores asociados con el hígado graso observado en pacientes alcohólicos. Por otra parte, el acetaldehído es muy reactivo y puede formar enlaces covalentes con los grupos R de varios aminoácidos; afectando el funcionamiento de las proteínas. Si el consumo

de alcohol es muy alto, el acetaldehído puede causar severo daño y hasta la muerte del tejido hepático (James, 2000) (Figura 6).

Aún cuando los insectos no poseen hígado se cree que las enzimas encargadas del metabolismo del etanol podrían también encontrarse en insectos, principalmente en el intestino medio, donde se encuentra la mayor cantidad de enzimas responsables de la digestión de los alimentos (Wiggleworth, 1966). La ruta en la cual participa la ADH ha sido identificada en *Drosophila melanogaster* y la expresión de sus genes apoya la hipótesis de que existe una adaptación de este insecto a medios con alcohol (Dorado, 1984), de manera que pueden metabolizar esta fuente de carbono para obtener energía. La ADH de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) consta de dos subunidades idénticas de 254 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 27.400 Da (Thatcher, 1980, citado por Achkor, 2003). En humanos, el sistema ADH se encuentra dividido en 5 clases que están codificadas por 7 genes (Jörnvall y col., 2003), y la ADH de clase I es la que tiene mayor afinidad por el etanol por lo que es la principal enzima responsable de su metabolismo en el hígado (Höög y col., 2001). También es dimérica y consta de dos subunidades de 375 residuos de aminoácidos (Höög y col., 2001).



### **3. Utilización del gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* como bioensayo para evaluar la calidad proteica de las dietas**

El uso de modelos animales en estudios nutricionales se justifica ya que todos los animales utilizan en general los mismos nutrientes y poseen enzimas digestivas similares. El gorgojo de arroz ha sido utilizado para evaluar la presencia de factores tóxicos en alimentos (Carmona y col., 1998) y el valor nutritivo de la dieta (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; López, 1999; García, 2003; Galeno, 2006) combinando las ventajas de un ensayo *in vivo*, con aquellas de un ensayo *in vitro*, lo que permite el desarrollo de bioensayos rápidos, sencillos y económicos donde se realizan determinaciones simultáneas que pudieran conducir a resultados extrapolables a los humanos (Carmona y col., 2001).

En los bioensayos con gorgojos se ha medido la supervivencia, los cambios de peso y de la composición corporal como biomarcadores para evaluar la calidad de la dieta. La evaluación de parámetros como el valor nutritivo de las proteínas, requiere del uso de otros biomarcadores como los cambios de actividad de algunas enzimas, la excreción de nitrógeno, el potencial reproductivo y el crecimiento de larvas de los insectos (Carmona y col., 1998; 2001).

El gorgojo de arroz fue utilizado como bioensayo para evaluar la calidad de la proteína dietaria (López, 1999). En este trabajo se ensayaron diferentes dietas preparadas con la dieta basal y suplementada con proteínas de distinta calidad. Las dietas de almidón de maíz (dieta basal) estaban suplementadas con caseína, gelatina nutritiva, gluten de maíz y gelatina purificada a diferentes niveles (0,25; 0,5; 1,2 y 4 %) de la dieta. Se determinó el efecto de estas proteínas sobre la supervivencia, la variación de peso, la composición corporal, la excreción de ácido úrico y la actividad de algunas

enzimas digestivas (proteasas y amilasas) del insecto. En dicho trabajo se demostró que, al igual que en humanos y en ratas, la caseína fue la proteína de mayor calidad proteica, originando un aumento en el peso de los gorgojos. Con ella, el contenido de agua aumentó, mientras que hubo una menor acreción grasa y se impidió la pérdida del nitrógeno corporal que ocurre con las dietas aproteicas (López, 1999).

La forma más sencilla de evaluar la toxicidad de ciertos factores presentes en alimentos como cereales y leguminosas es registrando la supervivencia de aquellos insectos que reciben el alimento que se sospecha tóxico y compararla con la supervivencia de los insectos alimentados con dietas nutricionalmente satisfactoria (harina de arvejas peladas; control positivo) o mantenidos en ayunas (control negativo) (Carmona y col., 1998). Si la mortalidad con alguna de las dietas resulta mayor que la del grupo mantenido en ayunas, se considera que dicha dieta contiene factores tóxicos para los insectos (López, 1999). En este tipo de ensayo se puede estimar el biomarcador “tiempo de supervivencia media”, el cual es el tiempo (en días) en el cual muere la mitad de la población (Carmona y col., 1998). Este biomarcador ha sido utilizado con éxito para estimar el efecto tóxico de algunos compuestos presentes en las semillas de caraotas (Carmona y col., 1998) y en estudios en donde se evaluó la viabilidad de películas comestibles formuladas con alginato, goma gelano o almidón de papa como biopolímero, glicerol como agente plastificante y agua (Rojas, 2007).

La composición corporal refleja la composición de los alimentos que se consumen. El ayuno por ocho días produce cambios dramáticos en la composición corporal caracterizados por una disminución brusca del agua, la grasa y el nitrógeno proteico; estos efectos se han reportado también para otra especie de gorgojo, *Tribolium*

*castaneum* (Millán y Carmona, 2005; Millán, 2007), además del gorgojo de arroz (Carmona y col., 1998; Carmona y Casotto, 2001).

Cuando los gorgojos reciben una dieta aprroteica (como el almidón de maíz) se satisfacen los requerimientos energéticos y no los proteicos. En este caso, las reservas de proteínas corporales descienden, pero sólo hasta un tercio del valor habitual, sin que se afecte drásticamente la supervivencia del insecto (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; López, 1999). Como se ha observado en ratas, el suministro de una dieta aprroteica ejerce un efecto protector sobre las proteínas corporales, ya que estas no necesitan catabolizarse con fines energéticos (Miller, 1973, citado en García, 2003).

El ácido úrico ha resultado ser un excelente biomarcador para evaluar la calidad proteica de la dieta en aves (Millán y col., 1984; Vit y col., 1993, citado en García, 2003) y en insectos (López, 1999; Galeno, 2006), ya que permite, junto con la actividad de enzimas como la  $\alpha$ -amilasa, clasificar los almidones de acuerdo a su calidad nutricional. Los almidones de buena calidad nutricional son más digeribles y como consecuencia la actividad de  $\alpha$ -amilasa y la excreción de ácido úrico disminuyen (Galeno, 2006).

Estudios nutricionales realizados con el gorgojo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), utilizando semillas artificiales de agar para suministrarle agua y nutrientes a los insectos, han permitido determinar valores umbrales de deficiencia de proteínas, a juzgar por los cambios en el contenido corporal de nitrógeno proteico y la excreción de ácido úrico, utilizados como biomarcadores; y de deficiencia de vitaminas del complejo B, en base a los valores de actividad de las enzimas marcadoras como la transacetilasa, glutatión reductasa y aspartato aminotransferasa y los porcentajes de activación producidos por la adición de sus coenzimas exógenas (Millán y Carmona, 2005).

Las aminotransferasas constituyen una familia que difieren en la especificidad de sustratos. Todas las aminotransferasas tienen en común el mecanismo de acción y que utilizan el mismo grupo prostético que es el fosfato de piridoxal (PLP) (Millán, 2007). La reacción catalizada por la aspartato aminotransferasa (L-aspartato: 2-oxoglutarato aminotransferasa, EC 2.6.1.1) es utilizada como “biomarcador” del estado de la vitamina B<sub>6</sub> (Lehninger, 1993). En esta reacción de transaminación, el grupo  $\alpha$ -amino del aspartato se transfiere, de manera reversible, al carbono  $\alpha$  del  $\alpha$ -cetoglutarato para generar glutamato y oxalacetato (Lehninger, 1993).

En estudios sobre el efecto del etanol y de la dieta en *Tribolium castaneum*, se ha encontrado que la administración del etanol conduce a la disminución del porcentaje de agua y nitrógeno corporal, y al aumento del porcentaje de grasa (Millán, 2007). Además por su contenido calórico el etanol puede desplazar a los nutrientes causando malnutrición, incluyendo deficiencias de folato, tiamina y otras vitaminas (Lieber, 2004a).

En la Tabla 1, se resumen los diversos biomarcadores utilizados para evaluar la eficiencia de utilización de nutrientes en dietas con diferente valor nutritivo.

Con base en estos biomarcadores se ha planteado la búsqueda de una dieta óptima para poder observar el efecto de diversos compuestos, como el etanol. Por tal motivo se planteó como hipótesis de trabajo lo siguiente: *si al suministrarle a los insectos una dieta con concentraciones de nutrientes tal, que sea suficiente para satisfacer las demandas del mantenimiento de los gorgojos en condiciones mínimas; entonces será posible evidenciar algún efecto del etanol sobre la composición corporal de los insectos*. De tal manera que el propósito de esta investigación fue encontrar aquella dieta, entre una batería de dietas con densidad de nutrientes distintas, que

permitiera evaluar el efecto del etanol sobre la composición corporal del gorgojo de arroz adulto.

**Tabla 1.** Biomarcadores utilizados para evaluar el efecto de dietas nutricionalmente diferentes en ensayo con insectos (modificado de Millán, 2007).

BIOMARCADOR	EFEECTO	RESPUESTA	REFERENCIAS	RESULTADOS
Supervivencia y variación de peso	Toxicidad de la dieta y valor nutricional de diferentes dietas	Cambios en la supervivencia, variación de peso y en TSM	Millán y Carmona, 2005 ( <i>Tribolium castaneum</i> )	100 % S con Ne-nerina pura Agar 10 % ≈ ayuno Similarmente con % VP
Agua, grasa y nitrógeno corporal como parte de la composición corporal	Calidad y cantidad del aporte calórico-proteico de la dieta	Variaciones en el contenido de agua, grasa y nitrógeno corporal	Carmona y col., 1998 ( <i>Sitophilus oryzae</i> )	↓ % grasa, % agua y % nitrógeno proteico en ayuno  ↑ % grasa con almidón de maíz
Actividades enzimáticas (amilasa y proteasa)	Calidad y cantidad del aporte calórico-proteico de la dieta	Cambios en las actividades enzimáticas	Carmona y col., 2001 ( <i>Sitophilus oryzae</i> )	↑ AE con caseína, gelatina nutritiva y proteína de arveja (“buena calidad”)
Excreción de ácido úrico	Calidad y cantidad del aporte calórico-proteico de la dieta	Variaciones en la excreción de ácido úrico	Carmona y col., 2001; García, 2003 ( <i>Sitophilus oryzae</i> )	↓ EAU con caseína, gelatina nutritiva y proteína de arveja
Potencial reproductivo y desarrollo larval	Valor nutritivo de la proteína dietaria	Alteraciones en la ovoposición y la metamorfosis	Carmona y col., 2001 ( <i>Tribolium castaneum</i> )	La eclosión y la metamorfosis a adulto se ven afectada por la deficiencia de proteína en la dieta. Las larvas tienen ↑ requerimientos que los adultos

AE: actividad enzimática, EAU: excreción de ácido úrico, S: supervivencia, VP: variación de peso, TSM: tiempo de supervivencia media.

### **III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del etanol y de dietas de diferente valor nutritivo sobre los indicadores de la calidad y aprovechamiento biológico de la dieta utilizando el bioensayo del gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*).

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de dietas de distinta densidad de nutrientes (agar, almidón de maíz, Ne-nerina y Ensure a distintas concentraciones) con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia, la variación de peso y la variación de la composición corporal.
2. Evaluar la utilización de un biomarcador, como la excreción de ácido úrico, como parámetro para la estimación de la biodisponibilidad de nutrientes.
3. Evaluar la utilización de dos biomarcadores, la actividad específica y el porcentaje de activación de la enzima aspartato aminotransferasa, como parámetro para la estimación de la biodisponibilidad de la vitamina B<sub>6</sub>.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo de gorgojos

Para el cultivo de insectos se emplearon individuos adultos del gorgojos de arroz, *Sitophilus oryzae*, plaga común de granos y productos almacenados, los cuales fueron cultivados en arvejas (*Pisum sativum*) peladas, contenidas en envases cerrados, mantenidos a temperatura ambiente, humedad ambiental y al resguardo de la luz. Para cada experimento se utilizaron cohortes de individuos de aproximadamente la misma edad. Para ello, se infestaron lotes de 300 g de arvejas con 200 individuos adultos. Luego de un mes, o al momento en que se observó abundante material particulado en el fondo del frasco, se procedió a eliminar a los padres y se esperó la emergencia de la generación F<sub>1</sub>, que ocurre aproximadamente en 15 días.

### 2. Diseño experimental

Grupos de 60 individuos adultos obtenidos de la generación F<sub>1</sub> fueron alimentados con las diferentes dietas. Para ello, los individuos se mantuvieron en un vial de vidrio con 2 g de alimento por vial. El tiempo de duración del experimento con las distintas dietas fue de 8 días. Un grupo se mantuvo en ayuno como control negativo (sin alimento ni agua) y uno como control positivo (en arvejas peladas, dieta utilizada para el cultivo de estos gorgojos). Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Al finalizar los 8 días, se sacrificaron por congelación los insectos que sobrevivieron y se tomaron 30 individuos para la evaluación de la composición corporal y de los restantes se tomaron 20 individuos para la medición de la actividad enzimática.

### 3. Dietas

Una manera de suministrar la dieta en estudio a los gorgojos es utilizando un sistema de semillas artificiales con base de agar que funciona como vehículo para incluir concentraciones variables de los distintos nutrientes. Además de los controles del experimento (arvejas peladas y la condición de ayuno), las dietas a base de agar (BBL-Medium) con y sin etanol al 1 % v/v fueron preparadas como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Formulaciones de las semillas artificiales para cada una de las dietas investigadas.

<b>Dieta</b>	<b>Etanol</b>	<b>Agar (g)</b>	<b>Volumen agua (mL)</b>	<b>Dieta (g ó mL)</b>	<b>Volumen etanol (mL)</b>
<b>Agar 5 %</b>	-	2	40	-	-
	+	2	39,6	-	0,4
<b>Almidón de maíz 10 %</b>	-	2	40	4	-
	+	2	39,6	4	0,4
<b>Ne-nerina 0,3 %</b>	-	2	40	0,12	-
	+	2	39,6	0,12	0,4
<b>Ne-nerina 5 %</b>	-	2	40	2	-
	+	2	39,6	2	0,4
<b>Ensure 0,3 % v/v</b>	-	2	40	0,12	-
	+	2	39,6	0,12	0,4
<b>Ensure 5 % v/v</b>	-	2	40	2	-
	+	2	39,6	2	0,4

- Dieta sin etanol, + dieta con etanol.

Fuente de cada una de las dietas: agar (BBL-Medium) de Laboratorios HiMedia (Bombay, India); almidón de maíz de Alfonso Rivas, Maizina Americana (Caracas, Venezuela); cereal infantil Ne-nerina enriquecido con arroz (Maracay, Venezuela) y Ensure con fibra y fructooligosacáridos, sabor a vainilla de Laboratorios Abbott (Columbus, E.U.A). El Ensure utilizado fue de preparación líquida. Los porcentajes en las dietas de Ensure están expresadas como volumen/volumen.

#### 4. Preparación de las dietas

Las diferentes dietas se prepararon como semillas artificiales. En un vaso de precipitados se pesaron 2 g de agar-agar (BBL-Medium) y se mezclaron con un volumen apropiado de agua destilada (Tabla 2). Para las dietas sin etanol, la suspensión se calentó por 20 seg en un horno de microondas (Panasonic, NN-6372WN) a máximo poder para permitir que el agar se disolviera. La suspensión se agitó con una espátula metálica hasta no ver grumos y luego fueron añadidos los respectivos ingredientes para cada una de las dietas, una vez que el agar tuviera una consistencia semilíquida. En el caso de las dietas de harina al 5 % (almidón de maíz y Ne-nerina) la mezcla se realizó en dos tandas con la mitad de la harina en cada caso, para asegurar que la mezcla final quedara homogénea y sin grumos. Para la elaboración de las dietas de agar con etanol, 2 g de agar se mezclaron con 30 mL de agua destilada y se calentó en un horno de microondas a máximo poder por 15 seg, agitando como se explicó anteriormente. En los restantes 9,6 mL de agua destilada se diluyó el etanol (0,4 mL) y se añadió a la preparación anterior una vez que la suspensión se hubiera enfriado lo suficiente como para no evaporar el etanol cuando fuera añadido a esta, pero no tanto como para ocasionar la solidificación del agar. Luego se procedió a incluir los demás ingredientes de la dietas de la misma manera como se detalló antes. Finalmente, las mezclas fueron colocadas en placas de microtitulación para darle forma de “semilla”, y permitir que el agar se enfriara a temperatura ambiente; y luego las semillas artificiales fueron almacenadas a 4 °C (Millán y Carmona, 2005). En la Tabla 3 se muestra la composición de macronutrientes, vitaminas y minerales para cada una de las dietas comerciales (en las distintas proporciones utilizadas). En el caso de la arveja lavada (control positivo), 100 g de esta dieta contiene los siguientes nutrientes y energía: carbohidratos: 58,8 g; proteínas: 26,6 g; grasa: 1,77 g y energía 1489 kJ (356 kcal) (Rojas, 2007).

**Tabla 3:** Composición de nutrientes y energía por 100 g de cada una de las dietas investigadas, basado en la información nutricional según el fabricante.

Nutriente	Agar 5 %	Almidón de maíz 10 %	Ne-nerina		Ensure	
			0,3 %	5 %	0,3 %	5 %
Carbohidratos (g)	-	9	0,207	3,45	0,053	0,885
Proteínas (g)	-	-	0,048	0,80	0,011	0,185
Grasa (g)	-	-	-	-	0,008	0,130
Energía sin etanol kJ (kcal)	-	151 (36)	4,26 (1,02)	71,1 (17,0)	1,37 (0,33)	22,8 (5,45)
Energía con etanol kJ (kcal)	9,27 (2,22)	160 (38,2)	13,5 (3,24)	80,3 (19,2)	10,6 (2,54)	32,1 (7,67)
Vitamina A (UI)	-	-	9	150	0,375	6,25
Vitamina D (UI)	-	-	0,9	15	0,03	0,5
Vitamina E (UI)	-	-	-	-	0,0023	0,0375
Vitamina K (µg)	-	-	-	-	0,006	0,1
Vitamina C (mg)	-	-	-	-	0,009	0,15
Vitamina B <sub>1</sub> (mg)	-	0,05	0,003	0,05	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	0,0019
Vitamina B <sub>2</sub> (mg)	-	0,02	-	-	1,3 x 10 <sup>-4</sup>	0,0022
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	-	-	0,0036	0,06	1,5 x 10 <sup>-4</sup>	0,0025
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	-	-	-	-	4,5 x 10 <sup>-4</sup>	0,0075
Niacina (mg)	-	0,36	0,03	0,5	0,0015	0,025
Ácido Fólico (µg)	-	-	-	-	0,03	0,5
Ácido pantoténico (mg)	-	-	-	-	7,5 x 10 <sup>-4</sup>	0,0125
Biotina (µg)	-	-	-	-	0,0225	0,375
Colina (mg)	-	-	-	-	0,03	0,5
Potasio (mg)	-	-	-	-	0,111	1,85
Cloruro (mg)	-	-	-	-	0,096	1,6
Sodio (mg)	-	-	0,528	8,8	0,06	1
Calcio (mg)	-	-	1,5	25	0,105	1,75
Fósforo (mg)	-	-	0,75	12,5	0,09	1,5
Magnesio (mg)	-	-	-	-	0,03	0,5
Zinc (mg)	-	-	-	-	0,0011	0,019
Hierro (mg)	-	0,36	0,045	0,75	0,0014	0,0225
Manganeso (mg)	-	-	-	-	3,9 x 10 <sup>-4</sup>	0,0065
Cobre (mg)	-	-	-	-	1,5 x 10 <sup>-4</sup>	0,0025
Yodo (µg)	-	-	-	-	0,0114	0,19
Selenio (µg)	-	-	-	-	0,0054	0,09
Cromo (µg)	-	-	-	-	0,009	0,15
Molibdeno (µg)	-	-	-	-	0,0114	0,19

Según el fabricante, 100 g de Maizina Americana contiene los siguientes nutrientes y energía: carbohidratos: 90 g; energía: 1506 kJ (360 kcal); vitaminas B<sub>1</sub>: 0,5 mg; vitamina B<sub>2</sub>: 0,2 mg; niacina: 3,6 mg e hierro 3,6 mg. Ne-nerina contiene los siguientes nutrientes y energía: carbohidratos: 69 g; proteínas: 16 g; energía: 1381 kJ (330 kcal); vitamina A: 3000 UI; vitamina D: 300 UI; vitamina B<sub>1</sub>: 1 mg; vitamina B<sub>6</sub>: 1,2 mg; niacina: 10 mg; sodio: 176 mg; calcio: 500 mg; fósforo: 250 mg e hierro: 15 mg. Ensure de Laboratorios Abbott contiene los siguientes nutrientes y energía: carbohidratos: 17,7 g; proteínas: 3,7 g; grasa: 2,6 g; energía: 439 kJ (105 kcal); vitamina A: 125 UI; vitamina D: 10 UI; vitamina E: 0,75 UI; vitamina K: 2 µg; vitamina C: 3 mg; vitamina B<sub>1</sub>: 0,038 mg; vitamina B<sub>2</sub>: 0,043 mg; vitamina B<sub>6</sub>: 0,05 mg; vitamina B<sub>12</sub>: 0,15 µg; niacina: 0,5 mg; ácido fólico: 10 µg; ácido pantoténico: 0,25 mg; biotina: 7,5 µg; colina: 10 mg; potasio: 37 mg; cloruro: 32 mg; sodio: 20 mg; calcio: 35 mg; fósforo: 30 mg; magnesio: 10 mg; zinc: 0,38 mg; hierro: 0,45 mg; manganeso: 0,13 mg; cobre: 0,05 mg; yodo: 3,8 µg; selenio: 1,8 µg; cromo: 3 µg y molibdeno: 3,8 µg.

## **5. Determinación de la supervivencia y la variación de peso**

Para determinar la supervivencia y la variación de peso se llevó un registro interdiario del número y del peso de los individuos sobrevivientes. El peso se registró como peso promedio por individuo. Se emplearon las siguientes fórmulas para la determinación de la supervivencia (% S) y la variación de peso (% VP):

$$\% S = (\text{número total de individuos} - \text{número de muertos}) \times 100 / \text{número total de individuos.}$$

$$\% VP = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) \times 100 / \text{peso inicial.}$$

## **6. Determinación de la composición corporal**

### **6.1 Contenido de agua**

Los cadáveres de 30 insectos fueron pesados y luego deshidratados en una estufa a 100 °C durante una hora y media. Se calculó el contenido de agua por diferencia entre el peso total y el peso seco (AOAC International, 1984).

### **6.2 Contenido de grasa**

Los cadáveres deshidratados se homogenizaron en un homogenizador Potter-Evelhem, con 2 mL de éter de petróleo durante 2 min a temperatura ambiente. Se colocó la solución éter-grasa en un vidrio de reloj, previamente tarado y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente alrededor de una hora en una campana de extracción de gases. Posteriormente se pesó el vidrio con el material seco y se estimó el contenido de grasa por diferencia entre los pesos final e inicial (AOAC International, 1984).

### **6.3 Contenido de nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular**

Para determinar el contenido de nitrógeno corporal es necesario separar el nitrógeno proveniente de la cutícula del insecto, del nitrógeno de las proteínas corporales. Para ello, se realizó primero la extracción de las proteínas corporales, luego se hizo la

mineralización de la materia orgánica (digestión), para finalmente determinar el contenido de nitrógeno (proteico y cuticular) mediante un método colorimétrico como se describe a continuación.

### **6.3.1 Extracción de proteínas**

Para extraer las proteínas se incubó el material seco y desgrasado, con 2 mL de NaOH (0,5 mol/L) por 24 horas, con agitación constante a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 16000 x g por 15 min en tubos Eppendorf, para recuperar la proteína solubilizada en el sobrenadante y la cutícula (material insoluble en álcali) en el residuo. Se le agregó 1 mL de NaOH al residuo y se repitió la extracción por 24 horas bajo las mismas condiciones. Luego de la centrifugación, se combinaron los dos sobrenadantes (conteniendo el nitrógeno proteico, NP) y se recuperó el residuo, el cual se filtró al vacío realizando varios lavados con agua destilada. El papel de filtro con el residuo (conteniendo el nitrógeno cuticular, NC) se secó en la estufa a 100 °C por una hora. Tanto el sobrenadante como el residuo filtrado se utilizaron para la mineralización de la materia orgánica (digestión).

### **6.3.2 Digestión de muestras**

Las muestras de 1 mL del sobrenadante anterior (NP) y el residuo cuticular (NC) fueron colocadas en tubos grandes de digestión. Luego fueron mezcladas con 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A cada tubo se añadió una pizca (58-61 mg) de catalizador de cobre (sulfato de cobre: sulfato de potasio, 1:9) previamente pulverizado con un mortero. Luego se realizó la mineralización de la materia orgánica en un digestor Kjeldhal a 350 °C hasta lograr la transparencia total de las muestras (usualmente 3 horas). La temperatura del digestor se incrementó gradualmente para evitar que las muestras se dispersaran por el tubo. Finalmente se dejaron enfriar las muestras

digeridas, se les añadió 5 mL de agua destilada a cada una y se registró el volumen final para luego determinar el contenido de nitrógeno (AOAC International, 1984).

### **6.3.3 Determinación del contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler**

Para determinar el contenido de nitrógeno con el reactivo de Nessler, alícuotas de 20 µL de NC digerido ó 50 µL de NP digerido fueron mezcladas con 2,5 mL de agua destilada y 0,4 mL de KOH (4 mol/L). Una vez agitado en vórtex se agregó 0,1 mL del reactivo de Nessler (Fluka) a cada muestra. Transcurridos 10 min, fue medida la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro. Se estimó el contenido de nitrógeno, utilizando una curva estándar de sulfato de amonio ( $Y = 6,91 \times 10^{-2} X$ ,  $R^2 = 0,995$ ;  $n = 3$ ) construida usando una solución patrón a una concentración de 47,19 µg/mL (10 µg/mL de nitrógeno) (Cherry, 1973, modificado por Gómez-Sotillo, 1997).

### **6.4 Determinación del parámetro “Otros”**

En el renglón de otros se encuentran los carbohidratos, las cenizas y los esqueletos carbonados de las proteínas. Este parámetro se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Otros} = \text{materia inicial} - (\text{agua} + \text{grasa} + \text{nitrógeno cuticular y no cuticular})$$

### **7. Determinación de la excreción de ácido úrico**

Para la extracción de ácido úrico, se homogenizaron mecánicamente el contenido de los viales donde se cultivaron los gorgojos (excretas más semillas artificiales con las dietas). Luego se deshidrató el material en una estufa a 100 °C durante una hora y se extrajo el ácido úrico con 2 mL de agua destilada hirviente (4 mL en el caso del control positivo). Finalmente, se centrifugó la suspensión a 16000 x g por 5 min en tubos Eppendorf a temperatura ambiente, para obtener en el sobrenadante el ácido úrico excretado (López, 1999, modificado por Millán, 2007).

Para la estimación del contenido de ácido úrico se utilizó el estuche ácido úrico enzimático (Industrias Qualitest, Caracas, Venezuela). En cada determinación, se

mezcló 25  $\mu\text{L}$  del sobrenadante con 1 mL del reactivo. Luego se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 30 min para finalmente leer la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro. La cantidad de ácido úrico excretado se estimó utilizando una curva de calibración estándar ( $Y = 1,37 \times 10^{-1} X$ ,  $R^2 = 0,995$ ;  $n = 2$ ) usando una solución 0,1 g/L de ácido úrico como patrón.

Este método colorimétrico acopla las reacciones de dos enzimas: la uricasa y la peroxidasa. El ácido úrico es oxidado enzimáticamente por la uricasa produciendo alantoína, dióxido de carbono y agua oxigenada. Esta última, oxida a los cromógenos (4-aminofenazona y 2,4-dicloro-fenolsulfonado) en presencia de la peroxidasa produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de ácido úrico en la muestra analizada.

## **8. Determinación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa**

Para determinar la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa primero se realizó la obtención de los extractos proteicos, se determinó la concentración de proteínas en esos extractos, para luego determinar la actividad específica de la enzima y el porcentaje de activación después de la preincubación con la coenzima fosfato de piridoxal (derivado de piridoxina o vitamina B<sub>6</sub>).

### **8.1 Obtención de las fracciones para la medida de la actividad enzimática**

Los cadáveres de 20 insectos se homogenizaron con 2 mL de agua destilada en un Potter-Evelhem a 1000 r.p.m. por 2 min a 4 °C. El homogenizado se centrifugó a 16000  $\times g$  por 5 min en tubos Eppendorf a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido (extracto acuoso) se utilizó para la estimación de la concentración de proteínas y de la actividad enzimática.

## 8.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas en cada uno de los extractos, se mezcló 50  $\mu$ L del extracto y se completó el volumen a 0,5 mL con agua destilada. Luego se añadió 2,5 mL de la solución de cobre alcalino, se mezcló en vórtex y se dejó en reposo por 10 min. Posteriormente fue añadido a cada tubo 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:1 con agua destilada) mezclando nuevamente en vórtex y dejando en reposo por 30 min para finalmente determinar la absorbancia a 580 nm. La concentración de proteína se estimó utilizando una curva de calibración de albúmina sérica bovina ( $Y = 3,43 \times 10^{-3} X$ ,  $R^2 = 0,992$ ;  $n = 3$ ) construida con una solución patrón de 0,5 g/L (Lowry y col., 1951).

## 8.3 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la aspartato aminotransferasa (AAT) se determinó según el método de Reitman y Frankel (1957) utilizando el estuche Transaminasa 200 (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina) y la activación por la coenzima se realizó según una modificación del método de Bayoumi y Rosalki (1976). Para ello, fueron preincubados 10 volúmenes del extracto proteico (diluído 1/10) con 1 volumen de fosfato de piridoxal (PLP, Sigma, St. Louis, U.S.A) (concentración final de preincubación, 750  $\mu$ mol/L en buffer fosfato 100 mmol/L, pH 7,4) o con 1 volumen del mismo buffer fosfato por 30 min a 25 °C. Luego se añadió 0,1 mL de la mezcla preincubada con o sin PLP a 0,5 mL de la mezcla de sustrato previamente temperado a 37 °C por unos minutos (solución que contenía 100 mmol/L de L-aspartato y 2 mmol/L de  $\alpha$ -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mmol/L, pH 7,4). Estas mezclas se agitaron suavemente, se incubaron por 30 min y luego se les agregó 0,5 mL del reactivo 2,4-DNFH a cada una (solución que contenía 1 mmol/L de 2,4-dinitrofenilhidracina en ácido clorhídrico 1 mol/L) para detener la reacción. Luego de mezclar, se dejaron las muestras durante

10 min a 37 °C, se les agregó 5 mL del diluyente para enzimas (solución de hidróxido de sodio 0,4 mol/L) para permitir la formación del color, se mezclaron por inversión y se retiraron del baño. La absorbancia fue leída en un espectrofotómetro a 505 nm, ajustando el cero del aparato con agua destilada. La actividad de la enzima con o sin PLP se midió de manera simultánea. Adicionalmente se prepararon dos blancos específicos agregando la mezcla de preincubación respectiva (con y sin PLP) después de añadir el reactivo 2,4-DNFH.

El método colorimétrico para la determinación de la actividad de la AAT según Reitman y Frankel (1957) se fundamenta en la siguiente reacción:



El oxalacetato es inestable bajo las condiciones del ensayo y se transforma en piruvato que reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina; produciéndose en medio alcalino, un compuesto coloreado que absorbe a 505 nm. La actividad de la AAT se estimó utilizando una curva de calibración ( $Y = 2,91 \times 10^{-3} X$ ,  $R^2 = 0,969$ ;  $n = 4$ ) usando una solución patrón de piruvato de sodio 2 mmol/L.

#### 8.4 Cálculo del porcentaje de activación de la aspartato aminotransferasa

Para calcular el porcentaje de activación (% A) de la enzima, que se define como el porcentaje de actividad después de la preincubación con el cofactor correspondiente con respecto a la actividad basal de la enzima estudiada (Bayoumi y Rosalki, 1976), se utilizó la fórmula siguiente:

$$\% A = \frac{\text{Actividad con coenzima} - \text{Actividad sin coenzima}}{\text{Actividad sin coenzima}} \times 100.$$

## 9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA de una vía) con el programa estadístico Statistica, versión 6 (2002). Se realizó como prueba *a priori* el test de Brown-Forsythe para verificar la homogeneidad de varianzas y como prueba *a posteriori* el test de la diferencia mínima significativa de Fisher. Además se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el programa Past:Hammer versión 1,73 b (Hammer y col., 2001).

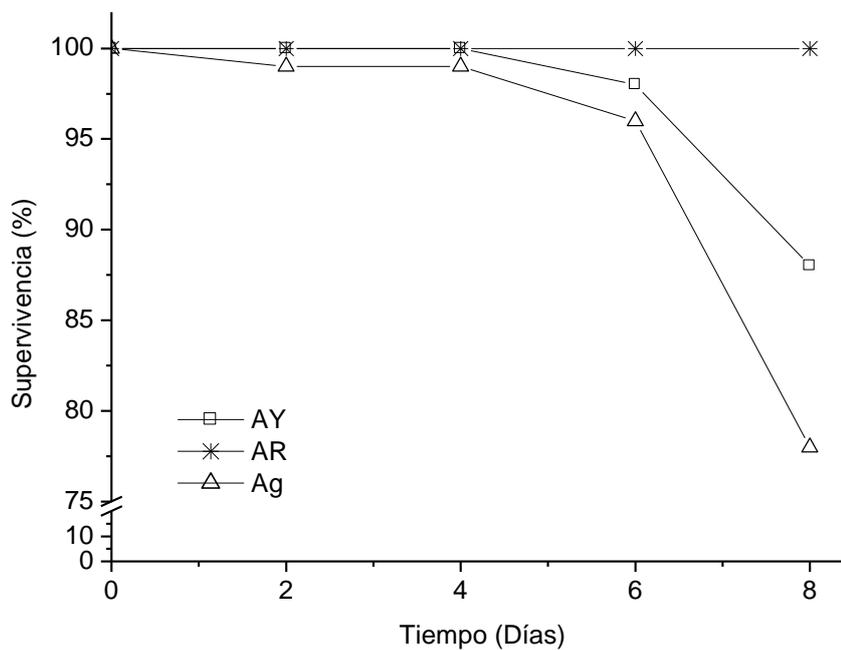
## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Supervivencia

Los experimentos con las distintas dietas fueron divididos en bloques, cada uno con seis dietas en total (dos dietas con y sin etanol, más los controles: arveja y ayuno), cada dieta tenía cuatro réplicas con un total de 24 viales con 60 individuos cada uno. Se registró interdiariamente el número de individuos vivos para la estimación de la supervivencia. La Figura 7 muestra la supervivencia de los insectos mantenidos en ayuno, con la dieta de arveja y con la dieta de agar al 5 %. Los dos primeros grupos corresponden a los controles del experimento y la existencia de estos grupos está apoyada por el hecho de que ellos nos van a permitir asegurar que el ensayo se está llevando de una manera adecuada y que no existen variables externas que estén afectando el desarrollo del experimento (Rojas, 2007). Adicionalmente se presenta el grupo alimentado con la dieta de agar al 5 %, que corresponde a un control de las dietas preparadas con este mismo material inerte a las que se les fueron añadiendo distintas proporciones de nutrientes, como se verá posteriormente.

Se pudo observar que la supervivencia de los gorgojos en ayuno comenzó a disminuir drásticamente a partir del sexto día que es cuando se ha reportado que incrementa la tasa de mortalidad (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998). Para el día 8 se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 88 %. Estos resultados coincidieron con los estudios realizados tanto con el bioensayo del gorgojo de arroz, como con el bioensayo del gorgojo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Millán, 2007). Los individuos sometidos a ayuno pueden resistir a la falta de alimentos y agua, debido al reservorio de alimentos que tienen almacenados en el buche. El tiempo estimado de la duración de esta reserva es de tres días (Carmona y col., 2001). No obstante se pudo observar en la Figura 7, que en este caso la reserva alcanzó para cuatro

días a partir del cual es que comenzó a disminuir ligeramente la supervivencia, asumiendo entonces que el insecto empieza a consumir sus reservas de energías (grasas, carbohidratos). Se considera que la muerte sobreviene cuando ocurren cambios irreversibles en el funcionamiento de los sistemas enzimáticos esenciales, como la cadena respiratoria (Klieber, 1975).



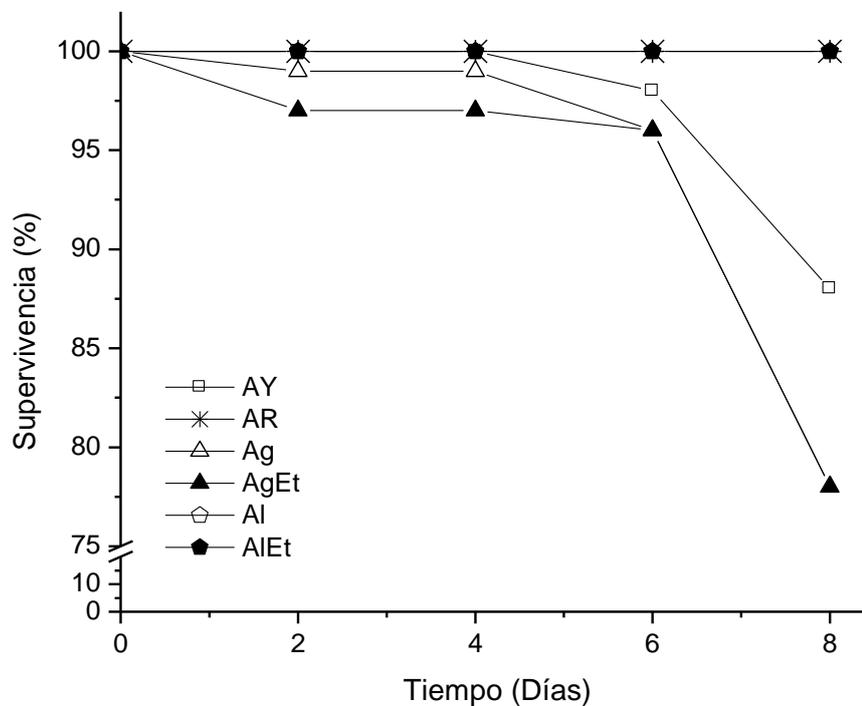
**Figura 7.** Efecto del ayuno (control negativo), de la arveja (control positivo) y del agar (control de las dietas a base de agar) sobre la supervivencia en adultos de *Sitophilus oryzae*. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %.

Con respecto a los gorgojos mantenidos en arvejas se observó que la supervivencia de los mismos fue de 100 % al día 8; siendo la tendencia a permanecer constante durante los 8 días, lo que es de esperarse porque es la dieta de mantenimiento de los insectos en el laboratorio. Las arvejas peladas a diferencia de otras leguminosas como las semillas de caraotas, no manifiestan toxicidad, por lo que ha sido utilizada para mantener las poblaciones de gorgojos. En este sustrato, la sobrevivencia media de individuos adultos (TMS, tiempo en el cual se muere la mitad de la población) es de seis

meses (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). Estos granos son muy ricos en nutrientes y dificultan la evaluación del aprovechamiento de otros componentes añadidos a la dieta (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997), como es el caso del etanol. Por tal motivo se ha desarrollado un sistema de semillas artificiales con base de agar (material inerte) a la cual se le pueda incluir concentraciones variantes de ciertos nutrientes (Carmona y col., 2001). La Figura 7 muestra el efecto del suministro de una dieta de agar a una proporción de 5 % sobre la supervivencia de los insectos mantenidos por 8 días. Se pudo observar que la supervivencia de los insectos disminuyó (78 %) con la dieta de agar al 5 % (considerado como un ayuno con suministro de agua) de manera más acentuadamente que con el ayuno (88 %), aunque no resultó diferente estadísticamente. Utilizando el bioensayo con larvas y adultos del gorgojo *T. castaneum* (Millán, 2007), se han reportado valores de supervivencia ligeramente superiores con la dieta de agar al 10 %, en comparación con el ayuno total. Según Millán (2007) aún cuando estas “semillas” proveen un suministro de agua en relación al ayuno total, tales diferencias no fueron estadísticamente significativas, indicando que el suministro de agua no produjo una mejora sustancial en la supervivencia de los individuos.

La Figura 8 muestra el efecto del etanol sobre la supervivencia de los insectos alimentados con dietas de agar al 5 % y almidón de maíz al 10 %, con la presencia de etanol. Cuando se suministró a los insectos una dieta de agar con etanol, la supervivencia se mantuvo en 78 % igual que la dieta de agar sin etanol, pero diferente a lo reportado por Millán (2007) en estudios realizados con el gorgojo rojo de la harina, en donde se obtuvo un incremento de la supervivencia en presencia de etanol. Aún cuando la supervivencia no varió para el día 8, durante los primeros cuatro días se pudo observar un incremento de la mortalidad de los insectos en presencia del etanol, posiblemente debido a la toxicidad producto de su ingestión. La ausencia de nutrientes

en la dieta podría ocasionar que la absorción del etanol se acelere y con ello la toxicidad. En la mayoría de los estudios en donde se evalúa el efecto del alimento y la composición de estos en la farmacocinética del etanol, han mostrado una disminución en el grado de absorción y en los niveles del etanol (Watkins y Adler, 1993), posiblemente debido a que el alimento retarda el vaciado gástrico (Rasmussen y col., 1996; Sidery y col., 1994) y con ello también se atenúan los efectos que trae como consecuencia el metabolismo del etanol.



**Figura 8.** Efecto de dietas de agar al 5 % y de almidón al 10 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia en adultos de *Sitophilus oryzae*. Se muestran los controles de la Figura 7. Para las dietas de arveja, almidón de maíz con y sin etanol las curvas están superpuestas en 100 % de supervivencia. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %; AgEt: agar + etanol 1 % v/v; Al: almidón 10 %; AlEt: almidón + etanol 1 % v/v.

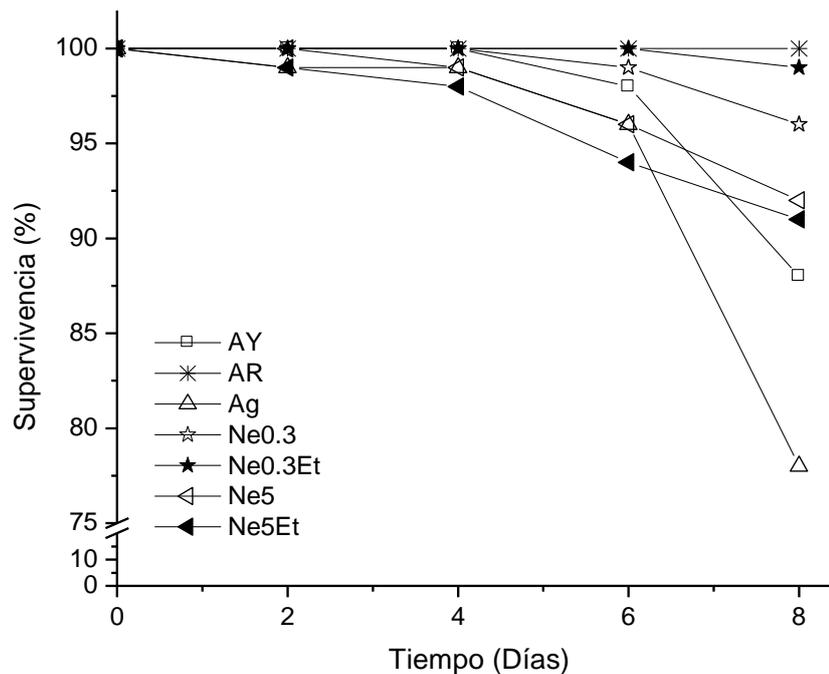
Con respecto al suministro de una dieta de almidón de maíz al 10 % (dieta basal), la supervivencia de los insectos fue del 100 %, igual que la obtenida en arvejas. Estos resultados fueron reportados por Carmona y colaboradores (1998), quienes

determinaron que aún cuando el almidón de maíz (puro, no preparado con agar), aporta una limitada cantidad de nutrientes, es suficiente para satisfacer las demandas de mantenimiento de los insectos. Con esto se infiere que el agar es un material que no interfiere con la utilización de los nutrientes ya que la supervivencia de los insectos fue igual al suministrar el almidón de maíz sin las semillas de agar.

Cuando se adicionó el etanol a la dieta basal (almidón de maíz al 10 %), la supervivencia no varió, manteniéndose en 100 %, constante durante los 8 días del experimento, por lo que no se pudo ver el efecto del etanol sobre los insectos. La dieta de almidón de maíz al 10 % sigue siendo una dieta rica en energía (Tabla 3), por lo que los insectos utilizan dichos nutrientes y no es posible determinar si el etanol interfiere o no con su utilización.

En cuanto a las dietas de origen comercial, la Figura 9 muestra la supervivencia de los gorgojos mantenidos con las dietas de harina de arroz enriquecida (Ne-nerina) al 0,3 % y al 5 %, con y sin etanol. Se pudo observar que en comparación con el ayuno las dietas preparadas con Ne-nerina tanto a una concentración baja (0,3 %) como a una concentración mayor (5 %) se logró incrementar la supervivencia de los insectos, 96 % y 92 %, respectivamente. Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas en relación a la condición de ayuno, pero si en relación a la dieta de agar al 5 %, lo que es un indicativo de que los gorgojos pudieron extraer de manera eficiente los nutrientes de las semillas artificiales a juzgar por los niveles de supervivencia. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Millán y Carmona (2005) y Millán (2007), quienes obtuvieron una supervivencia con Ne-nerina entre 90-95 % en estudios realizados con el gorgojo rojo de la harina, *T. castaneum*, en donde las dietas comerciales aumentaron consistentemente la supervivencia aún sin alcanzar los valores obtenidos con el control positivo (Ne-nerina pura en este caso). Sin embargo cabe destacar que no hubo

diferencias significativas entre añadir 0,3 % y 5 % de Ne-nerina al agar, y la bibliografía reporta valores de supervivencia mayores con una concentración de 5 % de la harina de arroz enriquecida (Millán , 2007), posiblemente porque a esta concentración se aporta mayor energía en la dieta (Tabla 3).



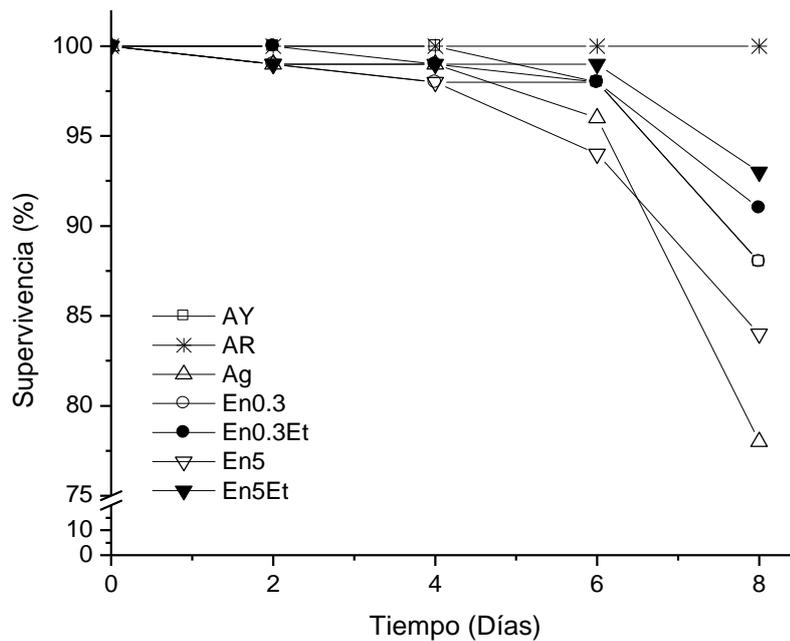
**Figura 9.** Efecto de dietas de Ne-nerina al 0,3 % y al 5 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia en adultos de *Sitophilus oryzae*. Se muestran los controles de la Figura 7. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %; Ne0,3: Ne-nerina al 0,3 %; Ne0,3Et: Ne-nerina al 0,3 % + etanol 1 % v/v; Ne5: Ne-nerina al 5 %; Ne5Et: Ne-nerina al 5 % + etanol 1 % v/v.

Con respecto a la adición de etanol a las dietas de Ne-nerina, en el caso de la dieta de Ne-nerina al 0,3 % aún cuando el etanol ocasionó un incremento de la supervivencia de 96 % a 99 %, casi similar a los valores mantenidos con arveja, no se pudo observar un efecto estadísticamente significativo. Posiblemente este aumento en la supervivencia de los insectos se deba a la utilización del etanol como fuente calórica considerando que la dieta de Ne-nerina al 0,3 % es la que aporta menos energía entre las dietas de Ne-nerina y con la adición del etanol el aumento en la energía calórica de la

dieta es notable en el caso de las dietas de baja proporción de nutrientes (Tabla 3). En relación a la dieta de Ne-nerina al 5 % con etanol ocurrió una ligera disminución de la supervivencia de 92 % a 91 % con respecto a la dieta sin etanol, lo que no fue estadísticamente significativo. La disminución de la supervivencia debido a la ingesta del etanol en los insectos, probablemente resulta de la maldigestión o malabsorción de nutrientes producto de la toxicidad desarrollada tras su ingestión (Millán, 2007).

La Figura 10, muestra el efecto de las dietas de Ensure al 0,3 % v/v y al 5 % v/v, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia de los gorgojos mantenidos por 8 días. En relación a las dietas de Ensure al 0,3 % v/v, la supervivencia al día 8 se mantuvo igual que en el control negativo (88 %), mientras que con Ensure al 5 % v/v disminuyó la supervivencia de las gorgojos (84 %). Esto podría deberse a que esta preparación tiene una gran cantidad de nutrientes entre ellos minerales y vitaminas (Tabla 3) que posiblemente a la proporción utilizada constituyan un exceso para los insectos; ocasionándole cierta toxicidad, lo que se evidencia en la disminución de la supervivencia, aún estando por encima de los valores mantenidos con agar al 5 % (78 %). Estos resultados no coincidieron con los reportados por Millán (2007) en estudios realizados con adultos de *T. castaneum*, en el que la dieta de Ensure al 0,3 % v/v ocasionó un incremento de la supervivencia (93 %), aún sin alcanzar los valores mantenidos con arveja.

Con la adición de etanol a estas dietas, se ocasionó un incremento de la supervivencia de los insectos, 91 % con Ensure 0,3 % v/v y 93 % con Ensure al 5 % v/v; siendo ésta última dieta la que resultó estadísticamente diferente de su correspondiente sin etanol. Esto podría deberse a su utilización como fuente calórica, aún cuando es la dieta con mayor proporción de nutrientes entre las dietas de Ensure (Tabla 3).



**Figura 10.** Efecto de dietas de Ensure al 0,3 % v/v y al 5 % v/v, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la supervivencia en adultos de *Sitophilus oryzae*. Se muestran los controles de la Figura 7. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %; En0,3: Ensure al 0,3 % v/v; En0,3Et: Ensure al 0,3 % v/v + etanol 1 % v/v; En5: Ensure al 5 % v/v; En5Et: Ensure al 5 % v/v + etanol 1 % v/v.

Los resultados de supervivencia sugieren que los insectos pueden aprovechar el alimento de manera diferente dependiendo del estado como se presente el alimento (sólido o líquido), ya que estos resultados arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre las dietas de Ne-nerina y Ensure, siendo las primeras, las dietas con las que se obtuvieron valores de supervivencia mayores. Según Millán (2007) las dietas de Ne-nerina forman una suspensión que probablemente dificulta el aprovechamiento del alimento, mientras que el Ensure es un producto líquido y se mezcla perfectamente con el agua del agar. Sin embargo, los resultados mostrados no ratifican esta hipótesis ya que justamente las dietas preparadas con las harinas (almidón de maíz y Ne-nerina), cuyas semillas artificiales eran opacas, fueron las dietas en donde la supervivencia de los insectos fue mayor. Mientras que aún cuando las semillas artificiales de Ensure eran

traslúcidas muy similares a las de agar al 5 %, lo que podría ser un indicio de una buena mezcla durante la preparación de la dieta, la supervivencia fue menor que la obtenida con las dietas preparadas con las harinas. Ne-nerina 0,3 % resultó estadísticamente diferente de las dietas de Ensure (0,3 % v/v y 5 % v/v) con una supervivencia de 96 % y Ne-nerina 5 % resultó diferente solamente de Ensure 5 % v/v. Posiblemente lo que está influyendo en la supervivencia de los insectos, más que un efecto de la consistencia de las semillas artificiales sea la composición de nutrientes y energía de cada una de las dietas ensayadas (Tabla 3). Además es importante considerar que el gorgojo de arroz, al igual que cualquier otro insecto masticador, presenta un aparato bucal masticador adaptado para cortar y triturar el alimento (Hickman y col., 1998), esto podría ser una de las razones por las cuales no se les dificulta el aprovechamiento de los nutrientes en las semillas artificiales preparadas con harinas, mientras que si sucede con las dietas líquidas aspecto que no ocurriría en caso de tener un aparato bucal succionador.

Un hecho particular del efecto del etanol es el estado de latencia en que entran los insectos una vez colocados en las respectivas dietas con el alcohol (Millán, 2007). Esto constituyó una dificultad al momento de registrar la supervivencia de los gorgojos interdiariamente, ya que se puede tener la impresión de que los insectos están muertos y ser contados como tales, pero realmente están en ese estado de latencia. El tiempo del estado de latencia pareció variar dependiendo de la dieta.

El problema del estado de latencia se solucionó en gran medida al sacar todos los insectos de cada uno de los viales, para luego pasarlos a otros envases cerrados más grandes, dejándolos aproximadamente 5 horas en dichos envases antes de ser contados y pesados. Se pudo observar que a partir del día 4, el tiempo de latencia disminuía (5 a 3 horas aproximadamente), lo que posiblemente se debía a una pérdida de etanol por evaporación. Esto se comprobó organolépticamente ya que el olor a etanol en las

semillas artificiales se perdía. Con esta estrategia se evitaron dos cosas, primero, que se sobrestimara el peso de los insectos al contarlos directamente después de ser sacados de sus viales con las dietas, particularmente en el caso de las dietas preparadas con agar en donde la humedad fue alta y posiblemente la absorbía el exoesqueleto. Segundo, que se subestimara la supervivencia de los insectos al contarlos directamente luego de sacarlos de los viales, porque posiblemente muchos se encontraban en estado de latencia por el efecto del etanol.

Sorprendentemente, el estado de latencia también fue observado aunque de manera menos acentuada con las dietas que no tenían etanol y es posible que se deba principalmente a la cantidad de agua en las semillas artificiales, lo que podría ocasionar que la entrada de aire a las tráqueas a través de los espiráculos sea obstaculizada y los insectos entren en un estado de letargo por la falta de oxígeno. Esto tal vez pudiera mejorar al utilizar agar al 10 %, con menor proporción de agua.

Dado que no es posible discernir si es el etanol, el agua o la proporción de ambos en las dietas lo que ocasiona que los insectos entren en estado de latencia, lo más acertado sería pensar que lo que interfiere con el sistema respiratorio de los gorgojos es el líquido (sea agua o etanol), ya que el gorgojo de arroz es un insecto terrestre por lo tanto un exceso en la humedad del medio podría afectar su supervivencia.

Estos resultados sobre la supervivencia de los insectos alimentados con dietas de diferentes densidades de nutrientes, sugieren que entre las dietas a base de agar, el almidón de maíz al 10 % y las Ne-nerinas, fueron las dietas que demostraron ser de buena calidad y son justamente las que aportan más energía (Tabla 3). Sin embargo, para evaluar el efecto del etanol, este biomarcador no resultó muy eficiente en el caso de

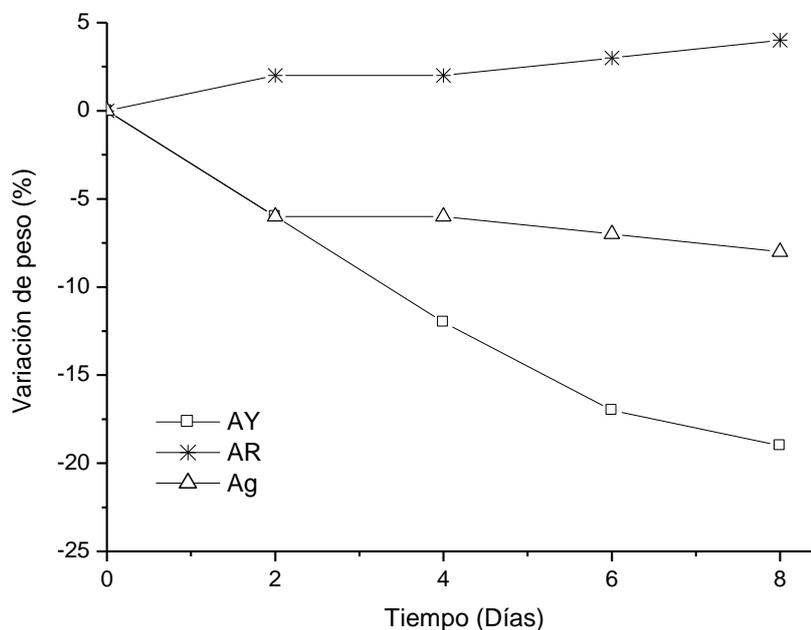
estas dietas, solo con Ensure al 5 % se pudo observar un efecto estadísticamente significativo.

## 2. Variación de peso

La variación de peso es otro de los biomarcadores que ha sido utilizado para evaluar cambios en los insectos que se producen como consecuencia de las manipulaciones nutricionales (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). Las variaciones de peso de los individuos que sobrevivían se evaluaron interdiariamente por 8 días, después de separarlos de cada una de las dietas de estudio.

La Figura 11 muestra el efecto del ayuno, de la dieta de arveja y la dieta de agar al 5 % sobre la variación de peso corporal en adultos de *Sitophilus oryzae*. Cuando los insectos se sometieron a la restricción alimentaria total (ayuno), el peso se redujo gradualmente con respecto al inicial, con una pérdida de peso al día 8 de 19 %. Resultados similares reportaron Carmona y Gómez-Sotillo (1997), López (1999) y García (2003). El patrón de pérdida de peso podría reflejar la utilización de las reservas energéticas tales como trehalosa, glucógeno, lípidos y proteínas para el sustento de la vida a consecuencia del ayuno (Shakoori y col., 1988, citado por Millán, 2007). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en relación al resto de las dietas. Con la dieta de arveja, los insectos mantuvieron una ganancia progresiva de peso, alcanzando un aumento del 4 % al final del ensayo. Se ha reportado un incremento de peso con la dieta de arvejas peladas de 10 % (Galeno, 2006) con este mismo bioensayo, mientras que con los adultos de *T. castaneum*, utilizando como control positivo *Ne-nerina* pura en vez de arvejas peladas, la ganancia de peso reportada ha sido no mayor del 3 % (Millán, 2007), lo que podría ser un indicio de la similitud de ambos

bioensayos en relación a la utilización de los nutrientes y adaptación metabólica de ambas especies de coleópteros.



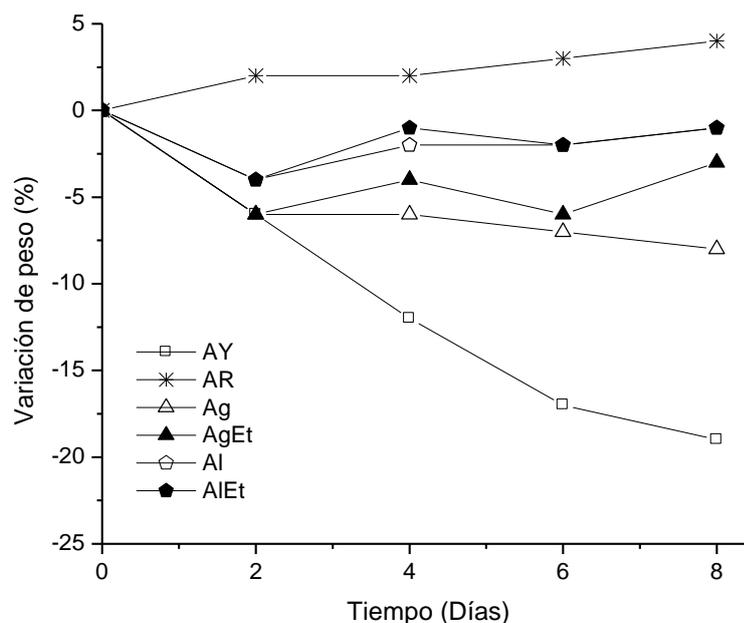
**Figura 11.** Efecto del ayuno (control negativo), de arvejas (control positivo) y del agar (control de las dietas a base de agar) sobre la variación de peso en adultos de *Sitophilus oryzae*. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %.

Con la dieta de agar al 5 % (ayuno con suministro de agua) se pudo observar que la variación de peso fue mucho menor a lo reportado en estudios con *T. castaneum*, usando agar al 10 % (Millán y Carmona, 2005; Millán, 2007), encontrándose diferencias estadísticamente significativas en comparación con la condición en ayuno. En el presente estudio la pérdida de peso en los gorgojos alimentados con agar al 5 % fue considerablemente más atenuada; tendiendo a mantener el peso constante a partir del segundo día con una pérdida de peso para el último día equivalente al 8 % del peso inicial. En contraste, la variación de peso de individuos adultos de *T. castaneum* alimentados con agar al 10 % fue muy similar al ayuno (Millán, 2007). Es importante destacar que en ambos estudios se utilizaron especies distintas de coleópteros, por lo

que estas diferencias en cuanto a la pérdida de peso en los insectos con una dieta de agar, pudieran deberse a las diferencias fisiológicas entre ambas especies de gorgojos. Los insectos mantenidos en agar al 5 % mueren más que con el ayuno, como se mencionó en la sección sobre supervivencia, pero los insectos que sobreviven mantienen su peso, posiblemente esto se deba al consumo de agua de las semillas artificiales. Esto último fue comprobado mediante el análisis de la composición corporal de los insectos, en el que se obtuvo un aumento estadísticamente significativo del contenido de agua en los insectos alimentados con una dieta de agar al 5 % en comparación con los insectos mantenidos en ayuno.

La Figura 12 muestra la variación de peso de los insectos mantenidos por 8 días con las dietas de agar al 5 % y almidón al 10 %, con y sin etanol al 1 % v/v, con los respectivos controles. Con respecto a la dieta de almidón de maíz se obtuvo una ligera pérdida de peso (1 %) en relación al peso inicial de los gorgojos, siendo la tendencia al transcurrir los días atenuar la pérdida de peso. Carmona y colaboradores (1998) reportaron un incremento de peso de aproximadamente 30 % del peso inicial, utilizando el almidón de maíz; mientras que Carmona y Casotto (2001) utilizando la dieta de agar-almidón al 10 % reportaron que el almidón, aún cuando se proporcionó a los insectos en una baja concentración fue capaz de prevenir la pérdida de peso, con un incremento aproximado de 3 % en relación al peso inicial de los gorgojos. Ambos estudios fueron realizados con el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*, lo que hace pensar que con respecto a la variación de peso existe una diferencia en la manera como se proporciona el almidón, ya sea puro o diluido con agua en la matriz de agar. Cuando se preparan las dietas en agar es necesario calentar para disolver el agar en un volumen apropiado de agua destilada, de manera que al añadir el almidón de maíz a esta mezcla podría promoverse la gelatinización parcial del almidón. Esto es posible ya

que la temperatura a la cual se calienta el agar está por encima del punto de gelatinización del almidón de maíz (70-72 °C, Anónimo, 2008), por lo que esto pudiera estar influenciando la biodisponibilidad de ese nutriente en las semillas artificiales de agar-almidón (Galeno, 2006).



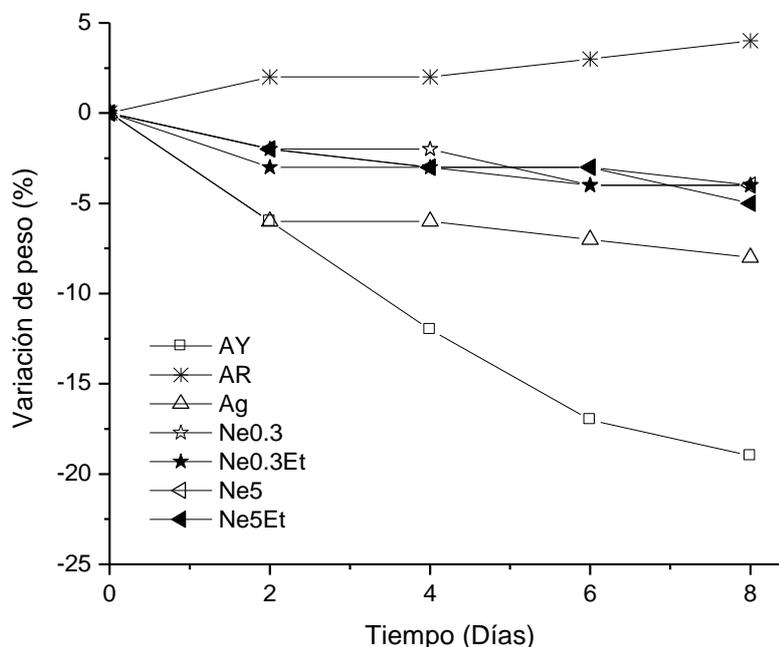
**Figura 12.** Efecto de dietas de agar al 5 % y de almidón al 10 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la variación de peso en adultos de *Sitophilus oryzae*. Se muestran los controles de la Figura 11. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %; AgEt: agar + etanol 1 % v/v; Al: almidón al 10 %; AlEt: almidón + etanol 1 % v/v.

Cuando se le adicionó el etanol a las dietas de agar al 5 % (equivalente a un ayuno con suministro de alcohol) y de almidón al 10 %, fue en la primera en la que se obtuvo una atenuación de la pérdida de peso (3 % del peso inicial de los gorgojos, en comparación con un 8 % sin etanol), posiblemente por el uso del etanol como fuente calórica (Tabla 3), siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambas dietas. Esto permitió evidenciar el efecto del etanol al ocasionar cambios en la composición corporal como un aumento de la grasa corporal y una disminución del agua como se describe más adelante (sección 3); mientras que con la dieta basal, la variación de peso

permaneció igual que con la dieta sin etanol. El aumento de peso con respecto al ayuno podría atribuirse al efecto inhibitorio de la oxidación de lípidos que se ejerce con el consumo de etanol (Lieber, 1984), favoreciendo el almacenamiento de grasa con el consiguiente aumento de peso (Millán, 2007). Esto fue observado al analizar la composición corporal de los gorgojos alimentados con la dieta de almidón de maíz con etanol, en donde también se obtuvo un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de grasa en relación a esta misma dieta sin etanol, como se describe más adelante. Sin embargo, este aumento no ocasionó un incremento de peso en los insectos, posiblemente porque el etanol hace que disminuyan otros parámetros de la composición corporal como lo son el agua y el nitrógeno proteico.

La Figura 13 muestra el porcentaje de variación de peso de los gorgojos mantenidos con las dietas de Ne-nerina al 0,3 % y al 5 % con y sin etanol al 1 % v/v. En relación a estas dietas comerciales, se promovió un incremento de peso en comparación a la dieta de agar al 5 %, pero no lograron restablecer el peso de los insectos, se observó una disminución del peso para día 2 y luego se mantuvo prácticamente constante hasta el día 8. No se encontraron diferencias significativas entre Ne-nerina 0,3 % y Ne-nerina 5 %, siendo en ambas la pérdida de peso igual a 4 % en relación al peso inicial de los gorgojos. Sin embargo ambos tratamientos con y sin etanol fueron diferentes estadísticamente de aquellos mantenidos con agar al 5 %, lo que nuevamente sugiere la eficacia de este sistema para suministrar nutrientes a los insectos, evitando así la pérdida de peso. Estos resultados no concuerdan con los consultados en la bibliografía (Millán, 2007), en estudios realizados en *T. castaneum*, en los que la Ne-nerina al 5 % fue la dieta que amortiguaba mejor la pérdida de peso ya que el aporte de nutrientes era mayor que la Ne-nerina 0,3 % (Tabla 3). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos con y sin etanol, en Ne-nerina 0,3 % se mantuvo igual (4 %) y

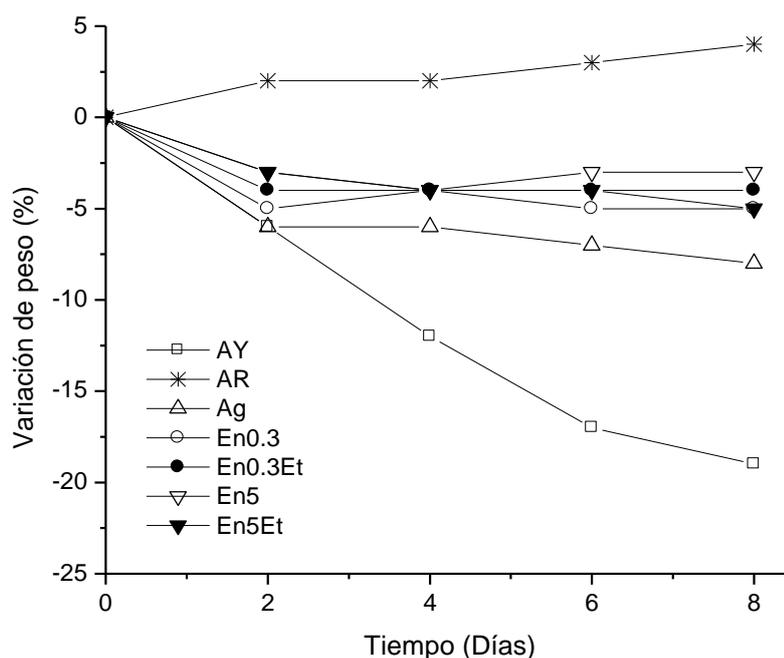
en Ne-nerina al 5 % aumentó ligeramente la pérdida de peso (5 %), por lo que no se pudo observar el efecto de etanol sobre la variación de peso en estas dietas.



**Figura 13.** Efecto de dietas Ne-nerina al 0,3 % y al 5 %, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la variación de peso en adultos de *Sitophilus oryzae*. Se muestran los controles de la Figura 11. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %; Ne0,3: Ne-nerina al 0,3 %; Ne0,3Et: Ne-nerina al 0,3 % + etanol 1% v/v; Ne5: Ne-nerina al 5 %; Ne5Et: Ne-nerina al 5 % + etanol 1 % v/v.

La Figura 14 muestra el porcentaje de variación de peso de los gorgojos mantenidos con las dietas de Ensure al 0,3 % v/v y al 5 % v/v con y sin etanol al 1 % v/v. De igual manera que con las dietas de Ne-nerina se promovió un incremento de peso en relación a la dieta de agar al 5 %, pero este incremento no logró restablecer el peso de los insectos, siendo la tendencia bajar de peso para el día 2 y luego mantenerse ligeramente constante. No se encontraron diferencias significativas entre Ensure 0,3 % v/v y Ensure 5 % v/v, siendo la pérdida de peso para Ensure 0,3 % v/v mayor que para Ensure 5 % (5 % y 3 % respectivamente), posiblemente porque esta dieta tiene menos nutrientes y energía (Tabla 3). Ambos tratamientos con y sin etanol fueron

diferentes estadísticamente de los mantenidos con agar al 5 %, evitando parcialmente la pérdida de peso. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dietas de Ensure y Ne-nerina. Estos resultados concuerdan con los reportados por Millán (2007), en estudios realizados en *T. castaneum* en el que Ensure 0,3 % v/v y Ne-nerina 0,3 % son muy parecidos entre si pero con una pérdida de peso ligeramente superior entre 7 % y 10 % en relación al peso inicial de los gorgojos, pero sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. Era de esperarse que la dieta de Ensure al 5 % v/v amortiguara mejor la pérdida de peso algo similar a lo que Millán (2007) reportó para Ne-nerina 5 %, debido al mayor aporte de nutrientes en relación a la dieta de Ensure 0,3 % v/v.



**Figura 14.** Efecto de dietas de Ensure al 0,3 % v/v y al 5 % v/v, con y sin etanol al 1 % v/v sobre la variación de peso en adultos de *Sitophilus oryzae*. Se muestran los controles de la Figura 11. AY: ayuno; AR: arveja; Ag: agar al 5 %; En0,3: Ensure al 0,3 % v/v; En0,3Et: Ensure al 0,3 % v/v + etanol 1 % v/v; En5: Ensure al 5 % v/v; En5Et: Ensure al 5 % v/v + etanol 1 % v/v.

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tratamientos con y sin etanol, en Ensure 0,3 % v/v se atenuó ligeramente la pérdida de peso (4 %) y en Ensure al 5 % aumentó ligeramente la pérdida de peso (5 %) muy similar a lo mantenido con las dietas de Ne-nerina, por lo que no se pudo ver el efecto de etanol sobre la variación de peso en estas dietas.

La estimación de la variación de peso de los gorgojos alimentados con diferentes dietas a base de agar, no resultó ser un biomarcador útil para evaluar el efecto del etanol sobre los insectos, ya que entre todas las dietas solo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con la dieta de agar al 5 %, lográndose atenuar la pérdida de peso posiblemente por la utilización del etanol como fuente calórica (Tabla 3).

La supervivencia y la variación de peso fueron biomarcadores apropiados para cuantificar los efectos de tratamientos extremos como el ayuno y la alimentación con la dieta de arveja, pero no permitieron evidenciar diferencias entre grupos alimentados con dietas de proporción intermedia como las dietas de Ne-nerina y de Ensure. Por esta razón, un estudio más detallado de los componentes de la composición corporal podrían arrojar resultados interesantes sobre como cambiaron las reservas en los insectos mantenidos con dietas de diferentes densidades de nutrientes en presencia y ausencia de etanol.

### **3. Cambios en la composición corporal del gorgojo de arroz alimentado con dietas de diferente densidad de nutrientes con y sin etanol.**

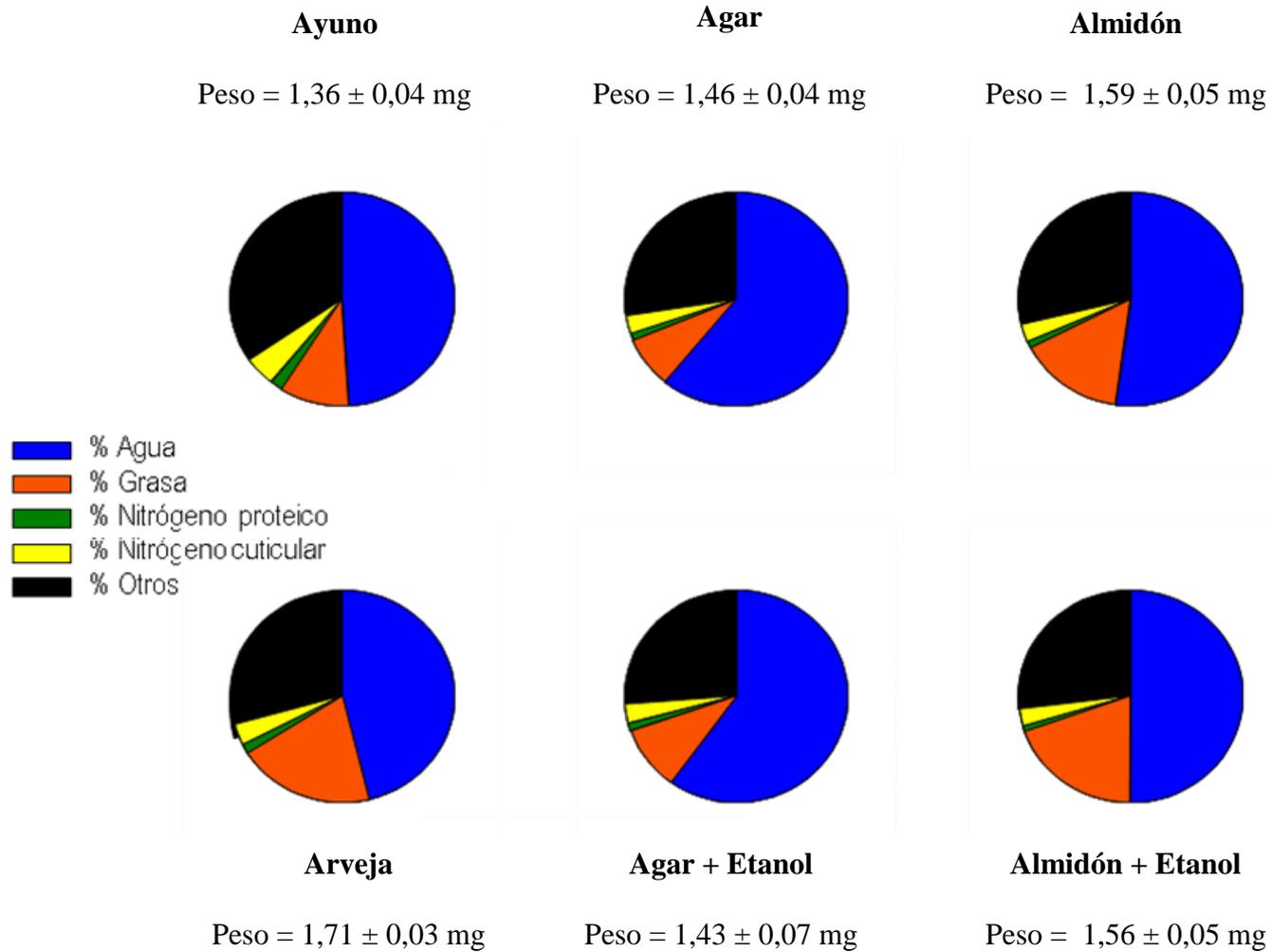
Los cambios en el porcentaje de supervivencia y variación de peso observados en las poblaciones de insectos alimentados con las dietas en estudio se deben al suministro de diferentes proporciones de nutrientes y podrían considerarse como el resultado de adaptaciones metabólicas que procuran compensar los desbalances en las dietas (Millán, 2007). La composición corporal es un indicador, que refleja la calidad de los nutrientes que se ingieren, además de ser una herramienta para el análisis de transacciones metabólicas, identificación de cambios adaptativos y la evaluación del estado nutricional (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997). A través de reacciones complejas, los alimentos son transformados para obtener energía; dicho proceso es sometido a una eficiente regulación homeostática que puede desequilibrarse cuando la dieta ingerida no se ajusta a las necesidades o es de mala calidad (García, 2003). Esto se traduce en un desequilibrio de la composición corporal del insecto: agua, grasa, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular y otros (minerales, cenizas y esqueletos carbonados de los aminoácidos).

La Tabla 4 y las Figuras 15 y 16 muestran las diferencias porcentuales encontradas para cada uno de los reglones de la composición corporal, en las 12 dietas ensayadas más las dietas control.

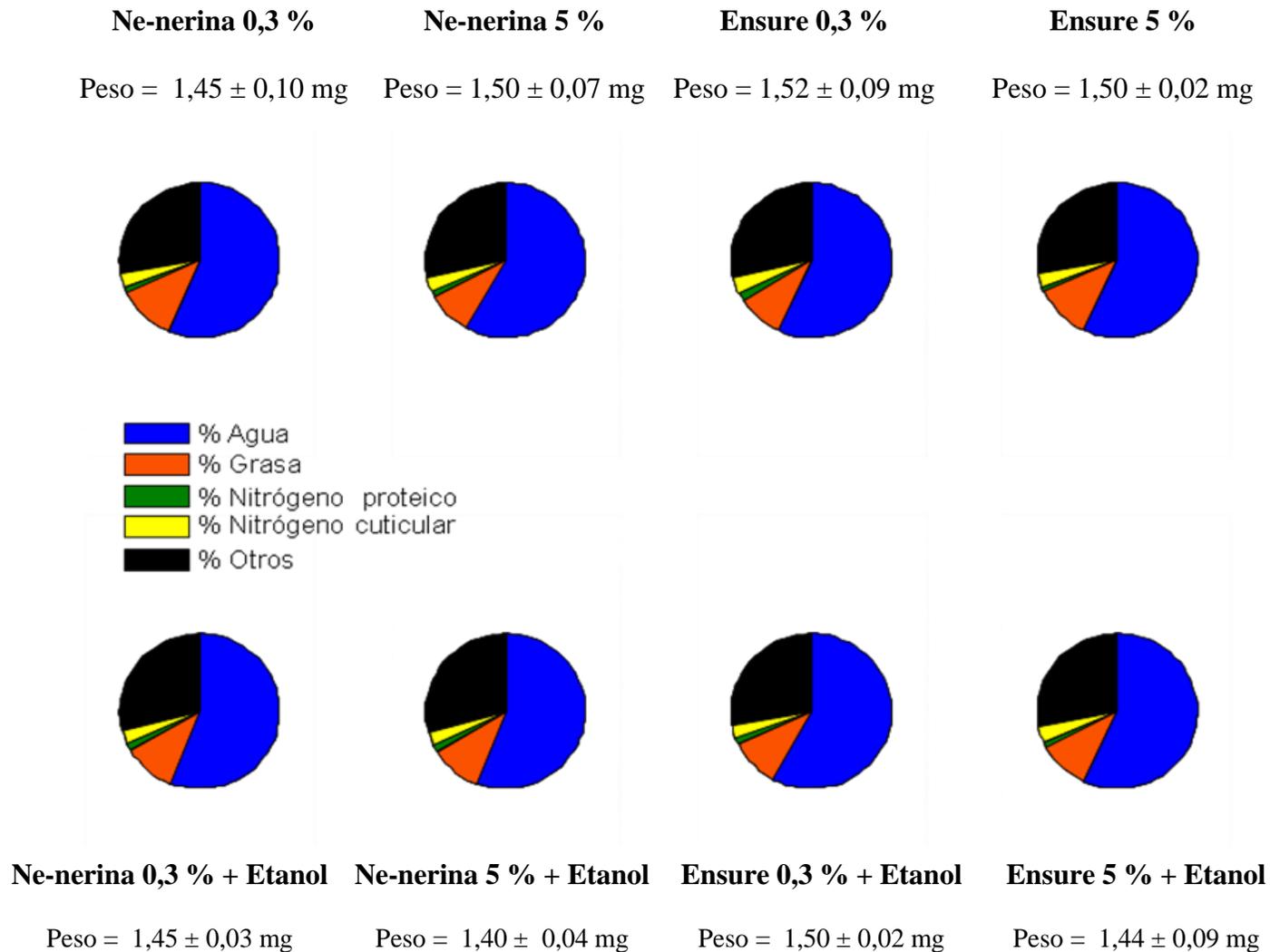
**Tabla 4:** Peso promedio y composición corporal de gorgojos alimentados con las dietas de diferente densidad de nutrientes en presencia y ausencia de etanol.

Dieta	Etanol 1 % v/v	Peso promedio al día 0 (mg)	Peso promedio al día 8 (mg)	Agua Corporal (%)	Grasa Corporal (%)	Nitrógeno proteico (%)	Nitrógeno cuticular (%)	Otros (%)
<b>Ayuno</b>	-	1,73 ± 0,07 <sup>d</sup>	1,36 ± 0,04 <sup>a</sup>	49,0 ± 1,69 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,86 <sup>abc</sup>	1,86 ± 0,30 <sup>f</sup>	4,49 ± 0,40 <sup>e</sup>	34,7 ± 1,22 <sup>f</sup>
<b>Arveja</b>	-	1,83 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,71 ± 0,03 <sup>c</sup>	46,1 ± 0,15 <sup>a</sup>	19,9 ± 2,46 <sup>e</sup>	1,54 ± 0,03 <sup>ef</sup>	3,15 ± 0,33 <sup>bcd</sup>	29,3 ± 2,35 <sup>abcd</sup>
<b>Agar 5 %</b>	-	1,60 ± 0,05 <sup>bc</sup>	1,46 ± 0,04 <sup>a</sup>	60,8 ± 0,70 <sup>h</sup>	7,8 ± 1,08 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,10 <sup>ab</sup>	2,86 ± 0,44 <sup>abc</sup>	27,5 ± 1,04 <sup>ab</sup>
	+	1,55 ± 0,01 <sup>abc</sup>	1,43 ± 0,07 <sup>a</sup>	60,0 ± 1,20 <sup>h</sup>	9,7 ± 0,61 <sup>ab</sup>	1,12 ± 0,16 <sup>ab</sup>	2,96 ± 0,35 <sup>ab</sup>	26,3 ± 1,61 <sup>a</sup>
<b>Almidón 10 %</b>	-	1,64 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,59 ± 0,05 <sup>b</sup>	52,2 ± 0,53 <sup>c</sup>	15,3 ± 1,10 <sup>d</sup>	1,07 ± 0,14 <sup>bcd</sup>	2,70 ± 0,32 <sup>abc</sup>	28,8 ± 0,68 <sup>bcde</sup>
	+	1,60 ± 0,05 <sup>bc</sup>	1,56 ± 0,05 <sup>b</sup>	50,1 ± 0,93 <sup>b</sup>	19,5 ± 1,02 <sup>e</sup>	0,89 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,61 ± 0,14 <sup>a</sup>	26,9 ± 0,53 <sup>ab</sup>
<b>Ne-nerina 0,3 %</b>	-	1,56 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,45 ± 0,10 <sup>a</sup>	56,5 ± 0,86 <sup>ef</sup>	11,6 ± 0,81 <sup>bc</sup>	1,29 ± 0,16 <sup>bcde</sup>	3,01 ± 0,03 <sup>abc</sup>	27,6 ± 1,28 <sup>abc</sup>
	+	1,51 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,45 ± 0,03 <sup>a</sup>	56,2 ± 0,90 <sup>de</sup>	10,8 ± 0,36 <sup>bc</sup>	1,34 ± 0,18 <sup>cdef</sup>	2,78 ± 0,17 <sup>ab</sup>	28,9 ± 1,05 <sup>cde</sup>
<b>Ne-nerina 5 %</b>	-	1,56 ± 0,04 <sup>abc</sup>	1,50 ± 0,07 <sup>ab</sup>	58,3 ± 4,49 <sup>def</sup>	8,9 ± 1,17 <sup>ab</sup>	1,22 ± 0,12 <sup>bcd</sup>	2,90 ± 0,32 <sup>abc</sup>	28,7 ± 3,28 <sup>e</sup>
	+	1,50 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,04 <sup>a</sup>	55,5 ± 1,33 <sup>d</sup>	10,6 ± 1,73 <sup>bc</sup>	1,44 ± 0,18 <sup>def</sup>	2,74 ± 0,28 <sup>ab</sup>	29,7 ± 0,85 <sup>de</sup>
<b>Ensure 0,3 % v/v</b>	-	1,66 ± 0,08 <sup>abc</sup>	1,52 ± 0,09 <sup>ab</sup>	56,8 ± 0,43 <sup>efg</sup>	9,5 ± 1,57 <sup>abc</sup>	1,58 ± 0,35 <sup>bcdef</sup>	3,45 ± 0,43 <sup>de</sup>	28,7 ± 1,28 <sup>abcde</sup>
	+	1,62 ± 0,06 <sup>bc</sup>	1,50 ± 0,06 <sup>ab</sup>	57,7 ± 1,63 <sup>g</sup>	10,3 ± 1,88 <sup>ab</sup>	1,13 ± 0,10 <sup>bcd</sup>	2,88 ± 0,40 <sup>ab</sup>	28,0 ± 2,37 <sup>abc</sup>
<b>Ensure 5 % v/v</b>	-	1,61 ± 0,03 <sup>abc</sup>	1,50 ± 0,02 <sup>ab</sup>	57,4 ± 1,13 <sup>efg</sup>	11,0 ± 2,23 <sup>cd</sup>	1,03 ± 0,15 <sup>ab</sup>	2,85 ± 0,11 <sup>ab</sup>	27,8 ± 2,52 <sup>a</sup>
	+	1,59 ± 0,08 <sup>bc</sup>	1,44 ± 0,09 <sup>a</sup>	57,3 ± 0,89 <sup>fg</sup>	10,1 ± 1,03 <sup>ab</sup>	1,11 ± 0,10 <sup>abc</sup>	3,31 ± 0,38 <sup>cde</sup>	28,2 ± 1,68 <sup>abcd</sup>

El n para cada una de las dietas fue 4. Dentro de una misma columna las letras distintas señalan la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). La composición de las diferentes dietas están en la Tabla 3. "Otros"= carbohidratos, las cenizas y los esqueletos carbonados de las proteínas. La media de los pesos promedios de las dietas en las semillas artificiales fue  $1,58 \pm 0,004$  mg ( $n = 12$ ). - Dieta sin etanol, + dieta con etanol.



**Figura 15.** Peso promedio y representación gráfica de la composición corporal de los gorgojos alimentados con las dietas de agar y almidón con y sin etanol y los controles del experimento. Los datos representados en estas gráficas fueron tomados de la Tabla 4. El peso promedio al inicio del ensayo fue  $1,61 \pm 0,10$  mg. Peso = peso promedio por individuo al final del ensayo (día 8).



**Figura 16.** Peso promedio y representación gráfica de la composición corporal de los gorgojos alimentados con las dietas de diferente densidad de nutrientes en presencia y ausencia de etanol. Los datos representados en estas gráficas fueron tomados de la Tabla 4. El peso promedio al inicio del ensayo fue  $1,61 \pm 0,007$  mg ( $n = 14$ ). Peso = peso promedio por individuo al final del ensayo (día 8).

El peso promedio de gorgojos adultos mantenidos en arvejas peladas fue de  $1,71 \pm 0,03$  mg, de los cuales 46 % correspondió al agua, 20 % a las reservas de grasa, 1,5 % al nitrógeno proteico (NP), 3,2 % al nitrógeno cuticular (NC) y 29 % al reglón “otros” estimado por diferencia. Según Galeno (2006), la proporción de agua equivale al 51 %, las reservas de grasa a 22 %, el NP a 2,1 %, el NC a 6,3 % y la porción “otros” a 19 %. Estas diferencias encontradas en el bioensayo del gorgojo de arroz se pueden deber a una variedad de factores como edad, sexo, condiciones fisiológicas, grado de actividad de los individuos, factores ambientales y climáticos como la humedad, la estación del año elegida para el montaje, entre otros, que pueden provocar variaciones en los resultados cuando se comparan con otros trabajos (Millán y Carmona, 2005). Una evidencia de ello, es que los gorgojos en 15 días luego de sacar los padres, ya tenían un peso promedio por individuo superior a 1,6 mg y esto variaba dependiendo de la época en que se sembraban los cultivos.

Durante el ayuno, se observó un incremento en el contenido de agua (49 %), así como en el NP (1,9 %), en el NC (4,5 %) y en el contenido de “otros” (35 %), con respecto al control positivo (arvejas peladas), solamente se encontró una disminución de las reservas de grasa (10 %). El peso promedio de los gorgojos mantenidos 8 días en ayuno fue de  $1,36 \pm 0,04$  mg (21 % menos que el peso del control positivo). El incremento del agua, del nitrógeno cuticular y del reglón “otros” resultaron ser estadísticamente significativos en relación al control positivo de arvejas, así como también la disminución de la grasa corporal en un 50 % con respecto a los valores mantenidos en arveja. Por lo que la declinación del peso promedio de los gorgojos mantenidos en ayuno se debió principalmente a la pérdida de grasa corporal, lo que demuestra la utilización de las reservas corporales por parte de los insectos al ser sometidos a largos períodos de ayuno (Millán, 2007). Según Carmona y Gómez-Sotillo

(1997), el peso corporal de los individuos que sobrevivían a 8 días de ayuno disminuía en un 50 % en relación a su valor inicial, el contenido de agua representaba el 38 % del peso, el NP el 1 %, la grasa el 4 %, mientras que el NC se mantenía constante (11 %) y el componente “otros” resultaba relativamente aumentado (23 %). Estos investigadores encontraron que entre todos estos componentes de la composición corporal, la pérdida de agua desde el punto de vista cuantitativo resultó ser el parámetro que principalmente ocasionaba la declinación del peso, a pesar de que los cambios mayores con respecto al control positivo ocurrían en el nitrógeno proteico y en la grasa. En este trabajo, el componente de la composición corporal que cambió más desde el punto cuantitativo fue el porcentaje de grasa y no el contenido de agua como lo reportado por Carmona y Gómez-Sotillo (1997).

### **3.1 Contenido de agua corporal**

Los insectos son capaces de evitar la pérdida de agua, influenciada por el medio ambiente y ésta, en muchos casos se correlaciona con la tasa metabólica del animal (Addo-Bediako y col., 2001, citado por García, 2003). Esta pérdida de agua puede ser compensada de varias formas: por el consumo de agua propiamente dicha, de la ingesta de alimentos y por la producción de agua metabólica. El agua se produce cuando el oxígeno, aceptor final de la cadena transportadora de electrones, comparte sus electrones con los hidrogeniones producidos durante dicho proceso (Lehninger, 2000).

Como se muestra en la Tabla 4, el agua corporal aumentó en todas las dietas preparadas a base de agar al 5 %, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas, por lo que se comprueba la capacidad de las semillas artificiales como medio para proporcionarle agua a los insectos. Los gorgojos alimentados con la dieta de agar al 5 % fueron los que tuvieron una mayor proporción de agua corporal (60-61 %), seguida de las dietas de Ne-nerina y Ensure con una contribución intermedia de agua

(56-58 %) y finalmente las dietas con una proporción de agua menor, que fueron los insectos mantenidos con la dieta de almidón de maíz (50-52 %). Entre las dietas de proporción intermedia de agua no se encontraron diferencias significativas por lo que aún cuando el Ensure utilizado estaba en estado líquido (Tabla 3), la proporción de agua fue similar a los alimentados con Ne-nerina. Millán (2007) ha reportado un porcentaje de agua de 63 % para las dietas de Ne-nerina 0,3 % y 5 % igual que para Ensure 0,3 %, ligeramente superior que para la dieta de agar al 10 % (62 %). Esto indica que las concentraciones de Ensure utilizadas, 0,3 % v/v y 5 % v/v (Tabla 2), son lo suficientemente bajas como para no producir cambios en el contenido de agua de las semillas artificiales.

Con respecto al efecto del etanol, este ocasionó una ligera disminución del porcentaje de agua en los gorgojos en todas las dietas con excepción de las dietas de Ensure aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, con excepción de la dieta de almidón (Tabla 4). La ingesta de etanol causa deshidratación en los tejidos (Lieber, 1984), aún cuando existe la disponibilidad de agua en la semilla artificial, como ha sido encontrado en este estudio y también reportado por Millán, (2007) en estudios realizados con el gorgojo rojo de la harina.

### **3.2 Contenido de grasa corporal**

El componente grasa corporal ha resultado un buen biomarcador para el estudio de almidones nativos y modificados (Galeno, 2006). Se ha demostrado que una dieta apteica como el almidón de maíz induce una mayor acumulación de grasa en estos insectos en comparación con una dieta que contenga proteínas, sobre todo si se trata de una proteína de buena calidad como la caseína (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; López, 1999). La respuesta de los insectos a dietas apteicas o deficientes en proteínas,

el contenido de nitrógeno proteico ha demostrado ser un parámetro sensible para evaluar la calidad proteica de las dietas (Carmona y col., 1998). Sin embargo, la eficiencia de los distintos biomarcadores va a depender del tipo de dieta suministrada y por lo tanto de los nutrientes que esta tenga, por ejemplo, el biomarcador contenido de grasa ha resultado ser más sensible al consumo de dietas de aporte proteico insuficiente o poco disponible, que el nitrógeno corporal (Laurentin y col., 2008).

Como muestra la Tabla 4, la contribución de este componente en la composición corporal del insecto estuvo distribuida de la siguiente manera: las dietas de agar al 5 % con los valores de grasa más bajos (8-10 %) similar al ayuno total, luego le siguieron las dietas de Ne-nerina y Ensure en una posición intermedia con valores ubicados entre 9 -12 %, mientras que con las dietas de almidón de maíz se obtuvieron los valores más altos (15 y 20 %) muy similar al control positivo (arveja peladas). Las dietas que tuvieron un porcentaje de grasa menor a ayuno fueron: las dietas de agar al 5 %, Ne-nerina al 5 % y Ensure al 0,3 % v/v. Las dietas de agar al 5 % y Ensure al 0,3 % v/v son dietas de bajo contenido calórico a excepción del agar con suministro de agua que no tiene nutrientes (Tabla 3), por lo que es razonable que exista una disminución del contenido de grasa lo que refleja la utilización de las reservas. Mientras que en el caso de la dieta de Ne-nerina al 5 %, el bajo contenido de grasa se explica, porque dicha dieta es la que tiene mayor concentración de proteínas (Tabla 3), lo que evita la acumulación de grasa. Sin embargo, esta disminución de la acreción grasa no resultó estadísticamente significativa. Este efecto no fue observado con la dieta de Ensure 5 %, posiblemente porque el aporte proteico fue menor en comparación a Ne-nerina 5 %, además de que es la dieta que tiene más grasa (Tabla 3). La dieta que resultó tener un mayor porcentaje de grasa en relación al ayuno fue la de almidón de maíz, lo que constituye el ejemplo de una dieta aprotéica. Sin embargo no ocasionó un incremento por encima de los valores

mantenidos por arveja (20 %) como se ha reportado en la bibliografía (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Carmona y col., 1998) utilizando dietas de almidón de maíz puro (no preparado con agar en forma de semillas artificiales).

Con respecto al efecto del etanol sobre el porcentaje de grasa en los gorgojos, se obtuvo un aumento de la grasa corporal con las dietas de agar al 5 %, almidón al 10 %, Ne-nerina 5 % y Ensure 0,3 % v/v, mientras que con las dietas de Ne-nerina 0,3 % y Ensure 5 % v/v este efecto no fue observado. De las dietas en donde incrementó el contenido de grasa en los gorgojos, solo resultó estadísticamente significativa la dieta de almidón de maíz al 10 %, igualando los valores mantenidos con arveja. Se ha reportado que la ingesta crónica de etanol se asocia con una exagerada acumulación de lípidos en los tejidos y quizás, la fracción más elevada se corresponde con los triglicéridos ya que el incremento de la proporción NADH/NAD, conduce a una elevación de la producción de glicerol 3-fosfato, lo cual favorece la formación hepática de triglicéridos (James, 2000). En los insectos, dichas moléculas energéticas son almacenadas en agregados celulares denominados cuerpos grasos. Estas estructuras funcionan principalmente como almacenes de reserva metabólica de grasas (bajo la forma de triglicéridos), carbohidratos (bajo la forma de glucógeno) y en menor proporción de proteínas (Wigglesworth, 1966; Rojas y col., 2005).

### **3.3 Contenido de nitrógeno proteico**

Las proteínas de la dieta, además de servir de combustible, deben compensar las pérdidas obligatorias de nitrógeno (desgaste metabólico basal diario) y proveer una mezcla de aminoácidos suficiente en término de calidad y cantidad para que ocurra la síntesis de proteínas corporales (Torun, 1989, citado por Carmona y col., 2001). Los niveles de proteína corporal de estos gorgojos responden al tipo de proteína

suministrado, en función a la capacidad de las mismas para satisfacer sus requerimientos de aminoácidos (Carmona y col., 2001). En tal sentido, el suministro de dietas de diferente densidad de nutrientes, que van desde dietas apteicas como la de almidón de maíz (Tabla 3), dietas con un contenido intermedio de proteínas como Ensure, hasta dietas ricas en proteínas como Ne-nerina podría arrojar información relevante sobre los requerimientos proteicos de estos gorgojos.

La Tabla 4 y las Figuras 15 y 16 muestran los valores de porcentaje de nitrógeno proteico (NP). Se pudo observar que con todas las dietas a base de agar al 5 % ocurrió una disminución del NP al compararlas con la dieta de arveja, estas dietas resultaron estadísticamente diferentes (con excepción de Ne-nerina 0,3 % con y sin etanol, Ne-nerina 5 % con etanol y Ensure 0,3 % sin etanol). No se encontraron diferencias en cuanto a esta variable entre las dietas de Ne-nerina; mientras que, con las dietas de Ensure resultó diferente pero no estadísticamente el agregar 0,3 % de la dieta al agar o agregar 5 %, siendo el porcentaje de NP sorprendentemente mayor con la proporción de 0,3 % (1,6 %), igual que la dieta de arveja. En el caso del almidón de maíz, se obtuvo una disminución de alrededor de 1/3 del NP, el cual resultó estadísticamente significativo en comparación con los controles y muy similar a la dieta de ayuno con suministro de agua. Estos resultados no reflejan la respuesta de los insectos a la dieta apteica con respecto al efecto protector de los carbohidratos sobre las proteínas corporales. Carmona y colaboradores (1998) encontraron que con el suministro de la dieta basal las reservas corporales de nitrógeno se protegían en relación al ayuno, aunque los valores de nitrógeno proteico se mantenían bajos. De acuerdo a esto, la administración de dietas exclusivamente a base de carbohidratos conduce a un aumento del contenido de grasa y a una disminución atenuada de las proteínas, puesto que la mayoría de los requerimientos energéticos son suplidos por productos generados del

metabolismo de los carbohidratos; pero no los requerimientos proteicos, disminuyendo así las proteínas corporales como fue reportado por Carmona y colaboradores (2001). De manera que el nitrógeno proteico está estrechamente ligado con el contenido de grasa a la hora de estimar la calidad de una dieta (Rojas, 2007).

Con respecto al efecto del etanol, se pudo observar una disminución del NP en la dieta de almidón de maíz y con la dieta de Ensure al 0,3 % v/v. Solamente resultó estadísticamente significativa la diferencia observada en la dieta de almidón de maíz. Este efecto podría atribuirse al efecto nocivo que ejerce el consumo de esta sustancia, relacionado con cambios en las estructuras y funciones del intestino que deterioran la capacidad de absorción, lo que pudiera originar un desbalance en la concentración de aminoácidos libres circulantes requeridos para la síntesis proteica (Millán, 2007). Además, el etanol tiene un alto contenido calórico que puede desplazar la utilización de los nutrientes provenientes de la dieta causando malnutrición como ha sido reportado por Lieber, 2004a. Probablemente, los efectos del etanol sobre los insectos sean una combinación de sus efectos tóxicos y de su uso como combustible como ha sido referido por Millán (2007). Con las dietas de agar al 5 % y Ne-nerina 0,3 % el porcentaje de NP se mantuvo igual (1,1 % y 1,3 % respectivamente). En cambio con las dietas de mayor proporción de nutrientes Ne-nerina y Ensure al 5 % v/v, existió un ligero aumento del nitrógeno proteico, lo que podría significar la utilización de las proteínas de la dieta que están en mayor proporción (Tabla 3), aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

### **3.4 Contenido de nitrógeno cuticular**

Los insectos poseen una cutícula constituida por tres capas las cuales son: endocutícula, exocutícula y epicutícula (Wigglesworth, 1966). La Tabla 4 y las Figuras

15 y 16 muestran los valores del porcentaje de nitrógeno cuticular (NC) para cada una de las dietas. Se pudo observar que los cambios en este componente no variaron sustancialmente en adultos alimentados con las distintas dietas, como ha sido reportado por López (1999) cuando se utilizan adultos que ya han alcanzado el máximo crecimiento. Ello podría indicar que la cutícula sufre un proceso de esclerotización, que involucra la estabilización de la proteína de manera irreversible (Gélvez, 1998, citado por Millán, 2007). Un hecho curioso fue el obtenido con la condición de ayuno en donde se encontraron los valores más altos de NC (4,5 %), y resultó ser estadísticamente significativo del resto de las dietas incluso del control positivo. Esto podría deberse a que justamente estas dietas fueron las que tuvieron un peso promedio inicial de los gorgojos mayor (1,73 y 1,83 mg, respectivamente Tabla 4), lo que indicaría que estos gorgojos estaban más desarrollados. Estos resultados no concuerdan con los encontrados por Rojas (2007) en estudios realizados con *Sitophilus oryzae*, quien obtuvo una disminución del 44 % con respecto al control positivo en aquellos individuos mantenidos en ayuno. Entre las dietas preparadas con agar, se encontraron pocas diferencias, siendo la dieta de Ensure 0,3 % v/v la que resultó estadísticamente diferente, registrando el mayor porcentaje de NC (3,5 %), aún cuando este valor no resultó diferente del control positivo, si fue diferente estadísticamente en relación a la dieta de Ne-nerina al 0,3 %. Millán (2007) con el bioensayo del gorgojo rojo de la harina, *T. castaneum* reportó valores de NC muy similares entre las dietas comerciales, lo que podría indicar una composición proteica diferente en la cutícula entre estas dos especies de coleópteros, producto de cambios en la utilización de las proteínas provenientes de la dieta.

Con respecto al efecto del etanol se pudo observar una disminución del nitrógeno cuticular en las dietas de almidón de maíz, las dietas de Ne-nerina (0,3 % y

5 %) y en la dieta de Ensure 0,3 % v/v, siendo ésta última diferente estadísticamente. Lo que podría deberse a la utilización de las reservas de proteína que existen en la cutícula como respuesta al déficit de aminoácidos, posiblemente la proteína susceptible de ser degradada por proteasas sea la de la endocutícula, en donde la proteína todavía no está unida de manera irreversible a la quitina. También se encontró un aumento significativo del nitrógeno cuticular con la dieta de Ensure 5 % v/v, por lo que podría deberse a que con esta dieta (de mayor proporción de nutrientes) se satisfacen los requerimientos energéticos evitando la pérdida de nitrógeno cuticular debido al catabolismo de las proteínas, de alguna manera el etanol ejercería un efecto protector sobre las proteínas.

### **3.5 Contenido de “otros”**

Con respecto al componente “otros” que incluye a los carbohidratos (glucógeno, trehalosa y glucosa), esqueletos carbonados de los compuestos nitrogenados y cenizas, se obtuvo un aumento significativo de este componente en los gorgojos mantenidos en ayuno por 8 días en relación a las demás dietas (Tabla 4), consistente con lo encontrado en la bibliografía tanto con el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* (Carmona y Gómez-Sotillo, 1997; Galeno, 2006; Rojas, 2007), como con el gorgojo rojo de la harina, *T. castaneum* (Millán, 2007). Con el suministro de una dieta de agar al 5 % disminuyó este parámetro con respecto al ayuno posiblemente por el suministro de agua aportado por las semillas artificiales de agar, al igual que con las dietas de Ne-nerina y Ensure. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la adición de etanol a las dietas de agar. La interpretación de los cambios en este componente no es fácil, pues su composición es variable y su proporción se obtiene por diferencia, una vez que se ha restado el contenido de agua, grasa, nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular (Millán, 2007).

#### 4. Excreción de ácido úrico

En los animales uricotélicos, el exceso de proteína de la dieta, que no es usada para la síntesis proteica, es desaminada y el nitrógeno es excretado en forma de ácido úrico. Asimismo, el consumo de proteínas de baja calidad resulta en el incremento de este producto de excreción, como un mecanismo para deshacerse del exceso de nitrógeno no aprovechable (Carmona y col., 2001). El ácido úrico ha resultado ser un excelente biomarcador para evaluar la calidad proteica en insectos (López, 1999), así como en la evaluación de la calidad nutricional de almidones nativos y modificados (García, 2003; Galeno, 2006).

En la Tabla 5 se puede observar el efecto de diferentes dietas sobre la excreción de ácido úrico por el gorgojo de arroz. Se pudo observar que el mayor contenido de ácido úrico excretado se encontró en los gorgojos alimentados con la dieta de arvejas, seguido muy de cerca por la condición en ayuno, estas diferencias fueron estadísticamente significativas. En el caso de los insectos mantenidos por 8 días en ayuno, es de esperarse que la excreción de este metabolito sea alta, puesto que durante este tiempo el insecto recurre a sus reservas corporales de proteínas para mantener un balance favorable en el “pool” de aminoácidos, por lo que las proteína son degradadas.

La síntesis de ácido úrico puede darse a partir de dos fuentes: la primera implica un proceso bien complejo que involucra la formación de un anillo de purina a partir de moléculas o fragmentos de moléculas derivadas de distintos precursores incluyendo glutamina, glutamato y aspartato, que finalmente se metabolizan originando la molécula de ácido úrico (Wigglesworth, 1966). La segunda fuente la constituye las purinas (adenina o guanina) que se obtienen a partir de los nucleótidos de purina, que son un producto de la degradación de los ácidos nucleicos. Una vez que los nucleótidos son

clivados para liberar la base nitrogenada (purina) y ocurre la desaminación del anillo, las purinas pueden ser oxidadas a ácido úrico bajo la influencia de la enzima, xantina deshidrogenasa (Wigglesworth, 1966).

**Tabla 5:** Excreción de ácido úrico por los insectos alimentados con dietas de diferente densidad de nutrientes en presencia y ausencia de etanol.

<b>Dietas</b>	<b>Etanol</b>	<b>Ácido úrico</b>
	<b>1 % v/v</b>	<b>(<math>\mu\text{g}/\text{mg}</math>)</b>
<b>Ayuno</b>	-	$531 \pm 129^g$
<b>Arveja</b>	-	$697 \pm 119^h$
<b>Agar 5 %</b>	-	$2,4 \pm 0,5^{ef}$
	+	$2,2 \pm 0,6^f$
<b>Almidón 10%</b>	-	$0,6 \pm 0,06^a$
	+	$1,5 \pm 0,2^d$
<b>Ne-nerina 0,3 %</b>	-	$1,3 \pm 0,1^{cd}$
	+	$1,6 \pm 0,2^d$
<b>Ne-nerina 5 %</b>	-	$2,3 \pm 0,2^{ef}$
	+	$2,8 \pm 0,4^f$
<b>Ensure 0,3 % v/v</b>	-	$2,0 \pm 0,6^{de}$
	+	$1,0 \pm 0,2^{bc}$
<b>Ensure 5 % v/v</b>	-	$0,9 \pm 0,4^{ab}$
	+	$2,8 \pm 0,7^f$

– Dieta sin etanol, + dieta con etanol.

El n para cada una de las dietas fue 4. Excreción de ácido úrico expresada como  $\mu\text{g}$  ácido úrico por mg de peso de los gorgojos al día 8. Letras distintas señalan la existencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

La proporción de ácido úrico excretado derivado de las purinas dependerá de la dieta del insecto en cuestión. Será alta en insectos cuyos alimentos consistan principalmente de carbohidratos y baja en insectos cuyas dietas incluyan una gran cantidad de proteína (Wigglesworth, 1966). Sin embargo, cuando la dieta presenta un exceso de proteína, la excreción de este metabolito también aumenta por lo que la excreción de ácido úrico presenta un comportamiento bifásico como fue reportado por López (1999). Carmona y colaboradores (2001) encontraron que las pérdidas de nitrógeno disminuían con el suministro de caseína, gelatina nutritiva y proteína de arvejas a medida que aumentaba el tenor proteico de la dieta, hasta alcanzar un nivel óptimo de proteína cercano al 0,5 %, luego con concentraciones superiores al óptimo de proteína la excreción de ácido úrico aumentaba.

En el caso de la dieta de arveja, los altos valores de excreción de este metabolito pueden ser atribuidos a que la arveja por ser una leguminosa es un alimento rico en proteínas vegetales. En comparación con los cereales que tienen aproximadamente un 10 % en contenido proteico, la mayoría de las leguminosas tienen un 20 % (Jaffe, 2002). La arveja utilizada en este estudio tiene un 26,6 % de proteínas (Rojas, 2007).

Para el humano la arveja es un alimento que cubre con las necesidades proteicas en cuanto a aminoácidos esenciales, de manera similar ocurre para los insectos con la diferencia de que para estos últimos el contenido proteico se encuentra muy por encima de los niveles óptimos de proteína reportados para este insecto (0,5-1 %), establecidos por López en 1999, por lo tanto lo que excede es excretado como ácido úrico.

Los valores de excreción de ácido úrico con las dietas preparadas como semillas artificiales a base de agar al 5 % fueron muy diferentes de lo obtenido con el ayuno y la arveja. Posiblemente esto se debió a la metodología empleada para la extracción del

ácido úrico de las semillas artificiales, ya que primero se realizó la maceración y luego fueron deshidratadas las semillas, pudiendo ocurrir una pérdida durante el proceso de maceración. A pesar de lo ocurrido, se pueden realizar comparaciones entre los valores ya que todas estas dietas fueron tratadas de la misma manera.

Con el suministro de una dieta de agar al 5 % (ayuno con suministro de agua), se obtuvo una excreción de este metabolito sorprendentemente baja como se muestra en la Tabla 5. En estudios realizados con el gorgojo rojo de la harina, *T. castaneum*, en los insectos mantenidos en ayunas y agar al 10 %, la excreción aumenta considerablemente, en relación al control positivo (en ese caso *Ne-nerina* pura), presumiblemente a consecuencia del hipercatabolismo de las proteínas corporales por la privación de alimentos (Millán, 2007). Aún cuando disminuyeron los niveles de nitrógeno con la dieta de agar (Tabla 4) en relación a la arveja, esto no se vio reflejado con la excreción de ácido úrico. En cambio, con los gorgojos mantenidos en ayuno el contenido de nitrógeno corporal que es definido como la cantidad de nitrógeno que el gorgojo es capaz de retener y almacenar para mantener su balance de nitrógeno (Pérez-Navarrete y col., 2007) y que incluye al nitrógeno cuticular y al nitrógeno proteico, fue alto (Tabla 4) aún cuando la excreción de ácido úrico fue grande, esto hace pensar que estos gorgojos pudieron estar en un nivel de desarrollo más avanzado en donde las reservas de proteínas resultaron suficientes para atenuar las pérdidas por catabolismo, un hecho que apoya esta hipótesis es el alto peso inicial de estos insectos (Tabla 4).

En cuanto a las dietas preparadas a base de agar sin etanol, en todas se encontró una disminución de la excreción de ácido úrico con respecto a la dieta de agar al 5 %, teniendo los valores más bajos con la dieta de almidón de maíz lo que podría deberse al efecto protector de los carbohidratos sobre las proteínas, ya que no se necesita degradar las proteínas con fines energéticos sino que son utilizados los carbohidratos de la dieta.

La dieta de almidón resultó diferente estadísticamente del resto de las dietas (con excepción de Ensure 5 % v/v que fue la otra dieta con valores bajos de excreción de ácido úrico). La dieta de Ensure 5 % v/v tiene una concentración de proteína de 0,19 %, mientras que Ensure 0,3 % v/v tiene 0,01 % de proteína, ambos valores se encuentran por debajo del intervalo óptimo de proteína reportado por López (1999) para este insecto. La disminución de la excreción de este metabolito en relación a la dieta de agar al 5 %, con una dieta de mayor proporción de proteína como Ensure 5 % v/v resultó estadísticamente diferente de Ensure 0,3 % v/v, lo que parece indicar que la dieta de Ensure es de buena calidad ya que la proteína proveniente de la dieta está siendo utilizada para la síntesis proteica. Con las dietas de Ne-nerina (0,3 % y 5 %) se obtuvieron diferencias significativas al incrementar el tenor proteico en la dieta, ocasionando un aumento en la excreción de ácido úrico en relación a la dieta de agar al 5 %, lo que podría atribuirse al exceso de proteína en la dieta. Aún cuando la dieta de Ne-nerina al 5 % presenta 0,8 % de proteína, concentración que estaría dentro del intervalo de 0,5 y 1 % que reportó López (1999), se encontró un aumento de la excreción de ácido úrico. Ello podría deberse a que la calidad de la proteína en la dieta de Ne-nerina no se ajusta a los requerimientos de estos insectos, teniendo en consideración que el intervalo óptimo reportado por López (1999) fue calculado para un conjunto de proteínas específicas (caseína, gelatina nutritiva y proteína de arvejas).

En relación al efecto del etanol sobre la excreción de ácido úrico, se obtuvo una disminución de la excreción de este metabolito en las dietas de agar 5 % y Ensure 0,3 % v/v, solo ésta última de manera significativa. Lieber y colaboradores (1984) han concluido que la hiperuricemia asociada a la ingesta de etanol resulta de la oxidación del etanol a acetaldehído con la generación de NADH (Figura 3) y la subsecuente reducción del piruvato a lactato con la regeneración del NAD (Figura 6). En el humano,

ambas reacciones son responsables de elevar las concentraciones de lactato en sangre y la acción de este metabolito secundario en los túbulos renales resulta en la reducción de la excreción de ácido úrico con el concomitante incremento de la concentración sérica de ácido úrico (Newcombe, 1972). La disminución de la excreción de ácido úrico con la dieta de Ensure 0,3 % v/v podría ser atribuida a elevados niveles de lactato por aumento de la proporción NADH/NAD<sup>+</sup>; en consecuencia, pudiera haberse inhibido la excreción de ácido úrico en los túbulos de Malpighi como fue reportado por Millán (2007) en *T. castaneum*, con el suministro de una dieta de agar con etanol. En cambio, con las dietas de almidón de maíz, Ne-nerina y Ensure 5 % v/v se obtuvo un aumento de la excreción de ácido úrico, resultando estadísticamente significativo solamente con las dietas de almidón de maíz y Ensure al 5 %.

#### **5. Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa**

Un aspecto más complejo de abordar se refiere al aprovechamiento de las vitaminas provenientes de la dieta. La biodisponibilidad de las mismas está determinada por diversos factores como la forma química (vitámero) presente, efecto de antagonistas o de los tratamientos a los que se someten los alimentos (Millán y col., 2005). La suficiencia o aprovechamiento del suministro dietario de las vitaminas se ve reflejado en el grado de estimulación de la actividad de las enzimas marcadoras cuando se las ensaya en presencia de la coenzima exógena (Millán y col., 2005). La utilización de las medidas de la actividad de enzimas como la transacetolasa, glutatión reductasa y aspartato aminotransferasa y las determinaciones del porcentaje de activación por las coenzimas han demostrado ser valiosos marcadores para determinar deficiencias de tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>) y piridoxina (B<sub>6</sub>) en estudios realizados en *T. castaneum* (Millán y col., 2005).

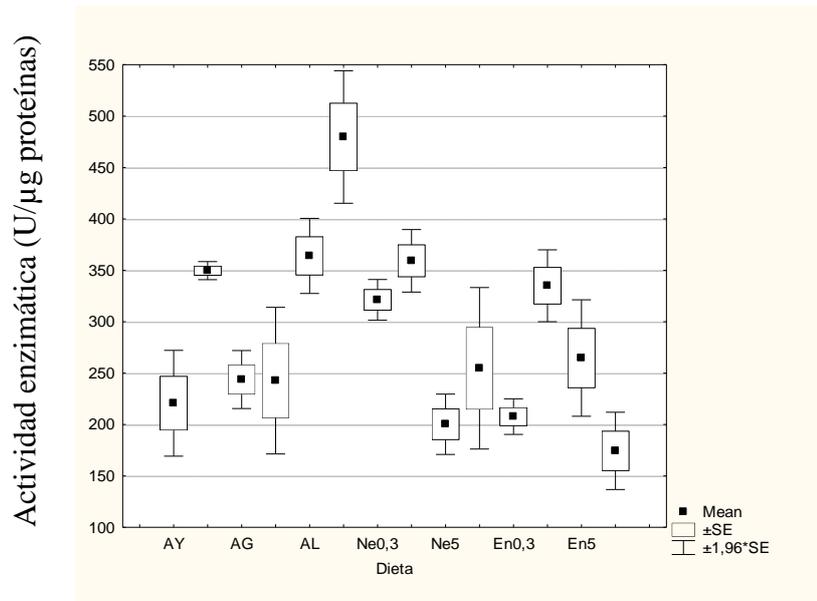
La Tabla 6 y las figuras 17 y 18 muestran los valores de la actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa sin y con fosfato de piridoxal. En ausencia de coenzima y en ayuno se obtuvieron valores de actividad enzimática menores que los encontrados con el ayuno con suministro de agua y con el control positivo (arvejas peladas), pero no resultaron ser diferencias estadísticamente significativas, al igual que las encontradas entre las dietas comerciales y la dieta de agar al 5 % en ausencia de etanol. Millán (2007) en estudios con *T. castaneum* encontró que con la dieta de agar al 10 % (ayuno con suministro de agua), los valores de la actividad de las enzimas marcadoras sin coenzima eran mayores que los obtenidos con las dietas de Ne-nerina 0,3 y 5 % y Ensure 0,3 % v/v, pero iguales a los encontrados en el ayuno. El aumento de la actividad posiblemente sea debido al hipercatabolismo de las sustancias de reserva causada por la restricción de alimentos. Sin embargo, Millán (2007) reporta que habría la posibilidad de un “enriquecimiento relativo” de los extractos en estas enzimas por disminución de otros componentes (pérdida de peso y de nitrógeno no cuticular), de tal manera que la actividad expresada por mg de proteína total de la enzima aumente. Esto se pudo observar para la dieta de agar al 5 % donde se obtuvo una disminución del nitrógeno cuticular y nitrógeno proteico, como fue explicada en la sección sobre composición corporal (Tabla 4). Esto también podría explicar el hecho de que se haya encontrado valores más bajos con el ayuno total, siendo justamente el tratamiento en donde los valores de nitrógeno tanto proteico como cuticular resultaron mayores (Tabla 4), lo que podría estar haciendo que la actividad enzimática específica disminuya. Los valores de actividad enzimática con la dieta de agar al 5 % fueron ligeramente mayores que las dietas de Ne-nerina (0,3 % y 5 %) y Ensure 0,3 % v/v, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas, similar a lo reportado por Millán (2007).

**Tabla 6:** Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa en presencia y ausencia de piridoxal fosfato, actividad relativa y porcentaje de activación.

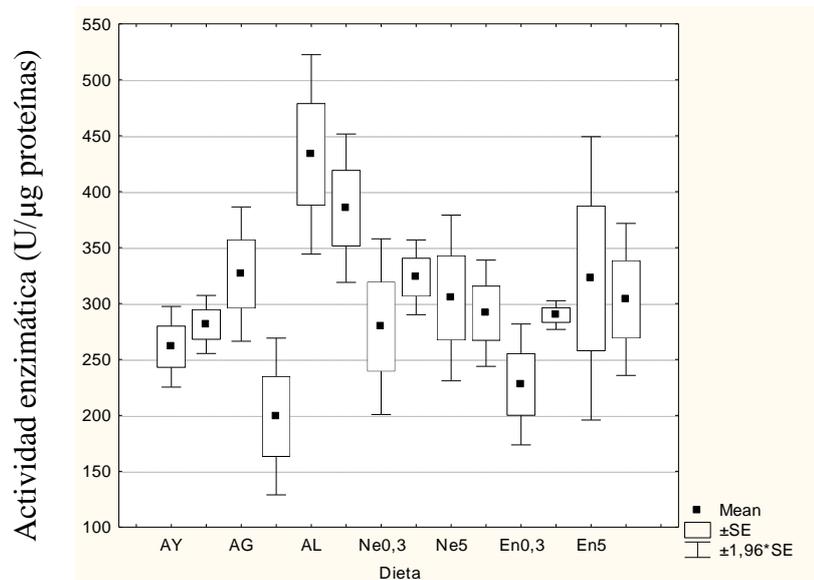
<b>Dietas</b>	<b>Etanol 1 % v/v</b>	<b>AEE Sin PLP (U/μg)</b>	<b>AR</b>	<b>AEE Con PLP (U/μg)</b>	<b>% A</b>
<b>Ayuno</b>	-	261 ± 46 <sup>abcd</sup>	0,93	221 ± 45 <sup>ab</sup>	-15,3
<b>Arveja</b>	-	281 ± 27 <sup>abcd</sup>	-	350 ± 8 <sup>d</sup>	24,6
<b>Agar 5 %</b>	-	326 ± 53 <sup>abcd</sup>	1,16	244 ± 29 <sup>bc</sup>	-25,2
	+	199 ± 62 <sup>a</sup>	0,71	243 ± 63 <sup>ab</sup>	22,1
<b>Almidón 10%</b>	-	433 ± 79 <sup>d</sup>	1,54	364 ± 32 <sup>d</sup>	-15,9
	+	385 ± 68 <sup>d</sup>	1,37	480 ± 57 <sup>e</sup>	24,7
<b>Ne-nerina 0,3 %</b>	-	279 ± 69 <sup>abc</sup>	0,99	321 ± 20 <sup>cd</sup>	15,1
	+	324 ± 34 <sup>cd</sup>	1,15	359 ± 31 <sup>d</sup>	10,8
<b>Ne-nerina 5 %</b>	-	305 ± 76 <sup>bcd</sup>	1,09	200 ± 30 <sup>ab</sup>	-34,4
	+	291 ± 42 <sup>abcd</sup>	1,04	255 ± 69 <sup>bc</sup>	-12,4
<b>Ensure 0,3 % v/v</b>	-	228 ± 48 <sup>abc</sup>	0,81	208 ± 15 <sup>ab</sup>	-8,8
	+	290 ± 11 <sup>abcd</sup>	1,03	335 ± 36 <sup>cd</sup>	15,5
<b>Ensure 5 % v/v</b>	-	323 ± 129 <sup>ab</sup>	1,15	265 ± 50 <sup>bc</sup>	-18,0
	+	304 ± 60 <sup>abcd</sup>	1,08	174 ± 33 <sup>a</sup>	-42,8

– Dieta sin etanol, + dieta con etanol.

El n para cada una de las dietas fue 4. Letras distintas señalan la existencia de diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ). Actividad enzimática específica fue expresada como U/μg de proteínas. AR: actividad relativa con respecto al valor de la dieta de “arveja” (281 U/μg). PLP= fosfato de piridoxal. % A: porcentaje de activación, calculado de la siguiente manera: actividad con PLP – actividad sin PLP/ actividad sin PLP x 100.



**Figura 17.** Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa sin fosfato de piridoxal. Se muestra el promedio, la desviación estándar y el intervalo de confianza para cada una de las dietas ensayadas. AY: ayuno; AG: agar al 5 %; AL: almidón al 10 %; Ne0,3: Ne-nerina al 0,3 %; Ne5: Ne-nerina al 5 %; En0,3 %: Ensure al 0,3 % v/v; En5: Ensure 5 % v/v.



**Figura 18.** Actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa con fosfato de piridoxal. Se muestra el promedio, la desviación estándar y el intervalo de confianza para cada una de las dietas ensayadas. AY: ayuno; AG: agar al 5 %; AL: almidón al 10 %; Ne0,3: Ne-nerina al 0,3 %; Ne5: Ne-nerina al 5 %; En0,3 %: Ensure al 0,3 % v/v; En5: Ensure 5 % v/v.

La actividad enzimática en la dieta de almidón de maíz (en ausencia de la coenzima) resultó ser mucho mayor que en ayuno, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, posiblemente por el incremento del catabolismo de las proteínas. Con la dieta de almidón de maíz la actividad enzimática fue mayor a las dietas de Ne-nerina al 0,3 % y Ensure, siendo diferente estadísticamente. Entre las dietas de Ne-nerina y Ensure no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En relación a la actividad relativa la Tabla 6 muestra los valores obtenidos por comparación con el “valor inicial” (arveja). Se pudo observar que con el ayuno total la actividad relativa fue menor que 1 lo que indica menor actividad de la enzima en relación a lo mantenido con la dieta de arveja. Sin embargo con la dieta de agar al 5 % se obtuvo una actividad relativa mayor que 1 indicando un aumento de la actividad enzimática, lo que refleja lo antes señalado sobre el incremento del catabolismo de las proteínas. Además de esto, con la dieta de agar al 5 % se obtuvieron valores ligeramente superiores en comparación con los obtenidos con las dietas de Ne-nerina y Ensure sin etanol, esto concuerda con lo señalado por Millán (2007) en donde este parámetro no parece ser adecuado para evaluar la deficiencia vitamínica, pues tratamientos de privación total de las mismas como los tratamientos de ayuno (ayuno y agar al 10 %) condujeron a niveles de actividad ligeramente superiores a los obtenidos con las dietas comerciales.

Con respecto al efecto del etanol en este biomarcador, la tendencia fue disminuir la actividad relativa, con excepción de las dietas de Ne-nerina y Ensure al 0,3 % v/v en donde aumentó la actividad relativa. Con el suministro de etanol a la dieta, se observó una baja actividad sin coenzima, ello probablemente indica restricción proteica y podría explicar la disminución de la actividad con las dietas de agar al 5 % (ayuno con

suministro de agua) y con las dietas de almidón de maíz (dieta aproteica), pero no explica lo ocurrido con las dietas de Ne-nerina y Ensure al 5 % v/v que son justamente las dietas con mayor proporción de nutrientes (Tabla 3). Esta disminución de la actividad fue reportada también por Millán (2007) con una dieta de agar al 10 %. En dietas donde se aporta sólo energía (almidón al 10 %) o deprivación total se activan diferentes mecanismos homeostáticos que pueden afectar las reservas de vitaminas, las apoproteínas (como la aspartato aminotransferasa) o ambos (Millán, 2007).

Bajo condiciones de “extrés” se incluyen condiciones adversas de temperatura, humedad, iluminación, elevada densidad de población, escasez de alimentos (Saleem y Shakoori, 1986, citado por Millán, 2007). La hiperactividad enzimática causada por el “extrés”, en casos del ayuno, probablemente se deba a la utilización incrementada de las reservas corporales para el sustento de la vida (Saleem y col., 1998). Estudios realizados con larvas de *T. castaneum* sometidos a condiciones de estrés por exposición a insecticidas demostraron que, las actividades de las transaminasas aumentaban subsecuentemente a medida que incrementaba la concentración del compuesto insecticida utilizado (Shakoori y col., 1988).

El papel de la coenzima fosfato de piridoxal en los sistemas donde intervienen las aminotransferasas (transaminasa) ha sido bien establecido. La determinación del porcentaje de activación de enzimas marcadoras como la aspartato aminotransferasa ha sido sugerida como un ensayo bioquímico funcional en la evaluación de reservas corporales y estado metabólico de la vitamina B<sub>6</sub> en individuos (Hoorn y col., 1975). Sin embargo, estudios en ratas han demostrado una relación inversa entre la activación de la aspartato aminotransferasa por fosfato de piridoxal y la deficiencia de piridoxina como fue observado por Raica y Sauberlich, (1964), y más tarde, correlacionó tal

activación con la concentración de vitaminas en los eritrocitos (Bayoumi y Rosalki, 1976).

En insectos, principalmente con el gorgojo de la harina se ha logrado determinar los valores umbrales de las vitaminas del complejo B, en base a los valores de actividad de las enzimas marcadoras antes señaladas y los porcentajes de activación de coenzimas endógenas. Encontrando por ejemplo deficiencias más severas en las larvas de *T. castaneum* que en los adultos, ya que en las primeras los porcentajes de activación fueron mayores. Además la dieta de Ne-nerina al 0,3 % ha resultado ser sorpresivamente el tratamiento en donde el aporte vitamínico pudo considerarse como casi satisfactorio puesto que los valores de porcentaje de activación se encontraban alrededor del valor referencial del control en este caso Ne-nerina pura (Millán y col., 2005). Más tarde, Millán (2007) observó que los gorgojos adultos de *T. castaneum* eran ligeramente deficientes en piridoxina con las dietas de Ensure y Ne-nerina 0,3 %; por su parte, con la dieta de Ne-nerina al 5 %; los índices de activación eran similares a los mantenidos con Ne-nerina pura, por lo tanto, se consideró que tal dieta pudo satisfacer con el requerimientos mínimo de la vitamina para el desarrollo normal del insecto.

La Tabla 6 y Figura 18 muestra la actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa con fosfato de piridoxal. Con la presencia de la coenzima y sin etanol la actividad de la enzima solamente aumentó con la dieta de arveja y Ne-nerina 0,3 %. Un hecho curioso es que no se obtuvo un incremento de la actividad como debía esperarse con las dietas de restricción alimentaria (ayuno y agar al 5 %), como se ha sido reportado por Millán (2007). Sin embargo, cuando se adicionó etanol a la dieta, se obtuvo un incremento de la actividad de la aspartato aminotransferasa con las dietas de agar al 5 %, almidón de maíz, Ne-nerina al 0,3 % y Ensure al 0,3 % v/v. Solamente la dieta de almidón de maíz logró superar los valores mantenidos con la dieta de arveja en

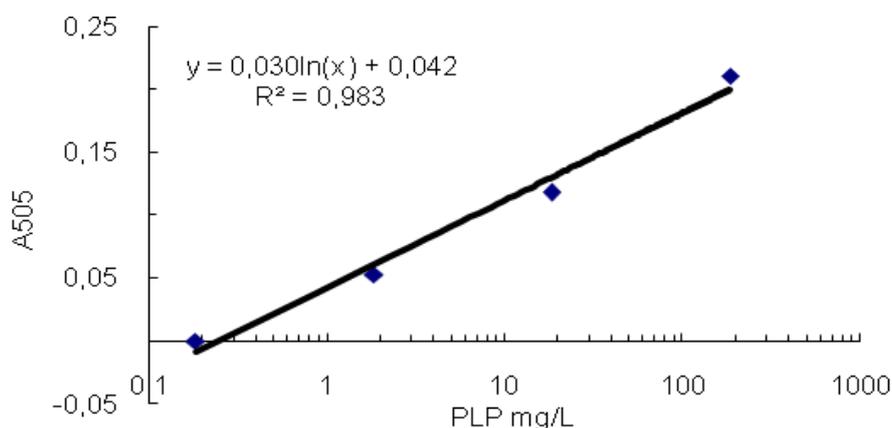
presencia de la coenzima, resultando ser estadísticamente diferente del resto de las dietas, lo que indica que con esta dieta los insectos presentaron deficiencias en la vitamina B<sub>6</sub> posiblemente porque la Maizina Americana no se encuentra suplementada con esta vitamina (Tabla 3). Según Millán (2007) cuando se añade la coenzima respectiva *in vitro* al extracto proteico, el aumento de la actividad es mayor en el extracto de insectos deficitarios de vitaminas. El aumento de la actividad con la dietas de Ne-nerina y Ensure al 0,3 % v/v, aún cuando no se logró alcanzar los valores mantenidos con arveja, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas con respecto al control positivo esto podría ser un indicio de un buen aporte vitamínico con la dieta ya que están suplementadas con vitamina B<sub>6</sub> (Tabla 3).

La Tabla 6 muestra los porcentajes de activación de la aspartato aminotransferasa en presencia de fosfato de piridoxal. Con respecto al porcentaje de activación no se observaron diferencias significativas entre las dietas y en varios de los tratamientos incluyendo la condición de ayuno donde se esperaría una mayor estimulación de la enzima indicando deficiencia de la vitamina B<sub>6</sub>, se observó una inhibición de la actividad (expresada con el signo negativo).

Varios factores pudieron haber afectado los resultados del porcentaje de activación. Uno de ellos, es que en presencia del L-aspartato (sustrato de la enzima) la unión de la coenzima (fosfato de piridoxal) a la apoenzima (aspartato aminotransferasa) es inhibida en presencia del buffer fosfato (el utilizado en el estuche comercial usado en este trabajo) mucho más que con el buffer Tris-HCl, como lo refiere Bayoumi y Rosalki (1976). Sin embargo el método utilizado para medir la actividad de la enzima según Reitman y Frankel, (1957), emplea el buffer fosfato en la solución que contiene los sustratos de la reacción como se detalló en la metodología. Por esta razón posiblemente no se pudo ver la activación en varios de los tratamientos.

Otro efecto que pudo influir en la activación de la coenzima pudo haber sido el estado de los extractos (almacenados aproximadamente 2 meses a  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Aunque se ha demostrado que la actividad de la aspartato aminotransferasa de hemolizados almacenados a  $-17^{\circ}\text{C}$ , aún cuando sufren un mínimo de cambio en el porcentaje de activación luego de dos semanas de almacenados, la actividad de la enzima sin la coenzima declina 17 % mientras que con la coenzima solo un 8 % (Bayoumi y Rosalki, 1976).

Otro factor que pudo influir en una inhibición de la actividad de la aspartato aminotransferasa pudo ser la concentración de la coenzima, ya que se ha reportado que si está presente en los reactantes, puede por si mismo contribuir con el valor de la absorbancia (Bayoumi y Rosalki, 1976). Para verificar esto, se realizó un curva dosis/respuesta con los blancos específicos señalados en la sección de materiales y métodos. Obteniéndose un aumento de la absorbancia a 505 nm a medida que incrementaba la concentración de fosfato de piridoxal como se observa en la Figura 19.



**Figura 19.** Efecto del fosfato de piridoxal (PLP) sobre los blancos de la reacción.

Todos estos factores pudieron haber ocasionado la inhibición de la enzima o la pérdida de la actividad. Sin embargo, se pudo observar con la dieta de Ne-nerina al

0,3 % que el porcentaje de activación fue menor (15 %) en comparación con la dieta de arveja (24 %) que corresponde al valor de referencia, lo que indicaría un aporte vitamínico importante con el suministro de esta dieta a los gorgojos (Tabla 3). Con la adición de 1 % v/v de etanol a esta dieta se ocasionó además de un incremento de la actividad en presencia de la coenzima (similar al mantenido con la dieta de arveja), una ligera disminución del porcentaje de activación de la enzima aspartato aminotransferasa, lo que podría deberse a que el etanol es utilizado como fuente de energía y las proteínas corporales son protegidas, indicando así suficiencia proteica y vitamínica. Esto fue reportado por Millán y Carmona (2005) en estudios realizados con el gorgojo rojo de la harina.

Las deficiencias de piridoxina en humanos, ha sido medida por los bajos niveles de fosfato de piridoxal en plasma, reportada en más del 50 % de personas alcohólicas que no presentan una función hepática anormal (Lumeng y Li, 1974, citado por Lieber, 2001). Un consumo inadecuado de la vitamina puede parcialmente explicar los bajos niveles fosfato de piridoxal, pero un incremento en la destrucción de la coenzima pudiera también contribuir (Lumeng y Li, 1974, citado por Lieber, 2001). El fosfato de piridoxal es rápidamente destruido en eritrocitos en presencia de acetaldehído, el producto de la oxidación del etanol, remueve la coenzima de la proteína (apoenzima) quedando expuesto a las fosfatasas que la hidrolizan (Mezey, 1985). Estudios han demostrado que con el consumo crónico del etanol disminuye el contenido hepático de fosfato de piridoxal por una disminución neta de la síntesis de piridoxina (Lumeng y Li, 1974, citado por Lieber, 2001).

## **6. Análisis de componentes principales.**

El análisis de componentes principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables)

(Terradéz, c2007). El objetivo principal que persigue el ACP es la representación de las medidas numéricas de varias variables en un espacio de pocas dimensiones donde nuestros sentidos puedan percibir relaciones que de otra manera permanecerían ocultas en dimensiones superiores. Dicha representación debe ser tal que al desechar dimensiones superiores (generalmente de la tercera o cuarta en adelante) la pérdida de información sea mínima (Bulla, 1995 citado por Suárez, 2000). Los factores que recogen el porcentaje de variabilidad mayor son denominados componentes principales. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales y además serán independientes entre sí (Terradéz, c2007). Esta técnica es muy sensible a las varianzas de las diferentes variables (Bulla, 1995 citado por Suárez, 2000), pues aquellas con varianzas muy altas dominarán el análisis. Se utilizó una matriz de correlación en vez de una matriz de varianza-covarianza, ya que ésta se usa cuando las variables están medidas en diferentes unidades, lo que implica la estandarización de todas las variables al dividir las entre su desviación estándar (Hammer y col., 2007).

La importancia de ésta técnica por ser exploratoria es que permite observar en un mismo gráfico la ubicación de todas las réplicas en relación a las variables estudiadas, esto facilita la observación de las relaciones entre las variables y las muestras, así como las diferencias y semejanzas entre las réplicas de una misma dieta lo que indirectamente es un indicativo del éxito del trabajo experimental.

La Tabla 7 muestra los resultados del análisis de componentes principales. Los resultados del ACP, muestran que los primeros dos ejes aportan aproximadamente el 61 % de la información contenida en la matriz original. El tercer componente aporta un 11 % de varianza, por lo que se podría trabajar con los tres primeros componentes principales (CP), con una varianza acumulada de 72 % aproximadamente. Los

componentes restantes mantienen muy poca información sin variables altamente correlacionadas con ellos. Se mide el éxito de la técnica por la proporción de información contenida en los primeros ejes (Joliffe, 1986, citado por Suárez, 1999).

**Tabla 7:** Valores de los *autovalores*, porcentaje de varianza total y porcentaje de varianza acumulada para los 9 componentes principales.

Componente	Autovalores	% Varianza	% Varianza acumulada
<b>1</b>	<b>3,75498</b>	<b>41,722</b>	<b>41,7220</b>
<b>2</b>	<b>1,75191</b>	<b>19,466</b>	<b>61,1880</b>
<b>3</b>	<b>1,01291</b>	<b>11,255</b>	<b>72,4430</b>
4	0,853649	9,485	81,9280
5	0,659653	7,3295	89,2575
6	0,460024	5,1114	94,3689
7	0,303071	3,3675	97,7364
8	0,203722	2,2636	100,0000
9	7,80E-05	0,00086715	100,0009

Los componentes de los autovectores permiten identificar las variables que mejor están representadas en cada uno de los componentes principales (Suárez, 1999). Estos valores, se usaron como coordenadas para representar gráficamente, las dietas mediante puntos y así relacionarlas con las variables, ésta forma de representación se conoce como biplots (Gabriel, 1971).

La Tabla 8 muestra los coeficientes de correlación ( $r$ ) para los tres primeros componentes principales con las 9 variables estudiadas que son justamente los que recogen mayor porcentaje de varianza (Tabla 7). El coeficiente de correlación indica la relación entre cada variable y cada eje, sus valores están acotados entre cero y uno. CP1 está correlacionado más positivamente con el porcentaje de grasa ( $r = 0,8945$ ) lo que implica que incrementa en el mismo sentido que el CP1, mientras que está más relacionado negativamente con el porcentaje de agua ( $r = -0,8696$ ) por lo que incrementa hacia donde disminuye el CP1. CP2 está relacionado más positivamente con el porcentaje de agua ( $r = 0,3152$ ) y está relacionado más negativamente con porcentaje

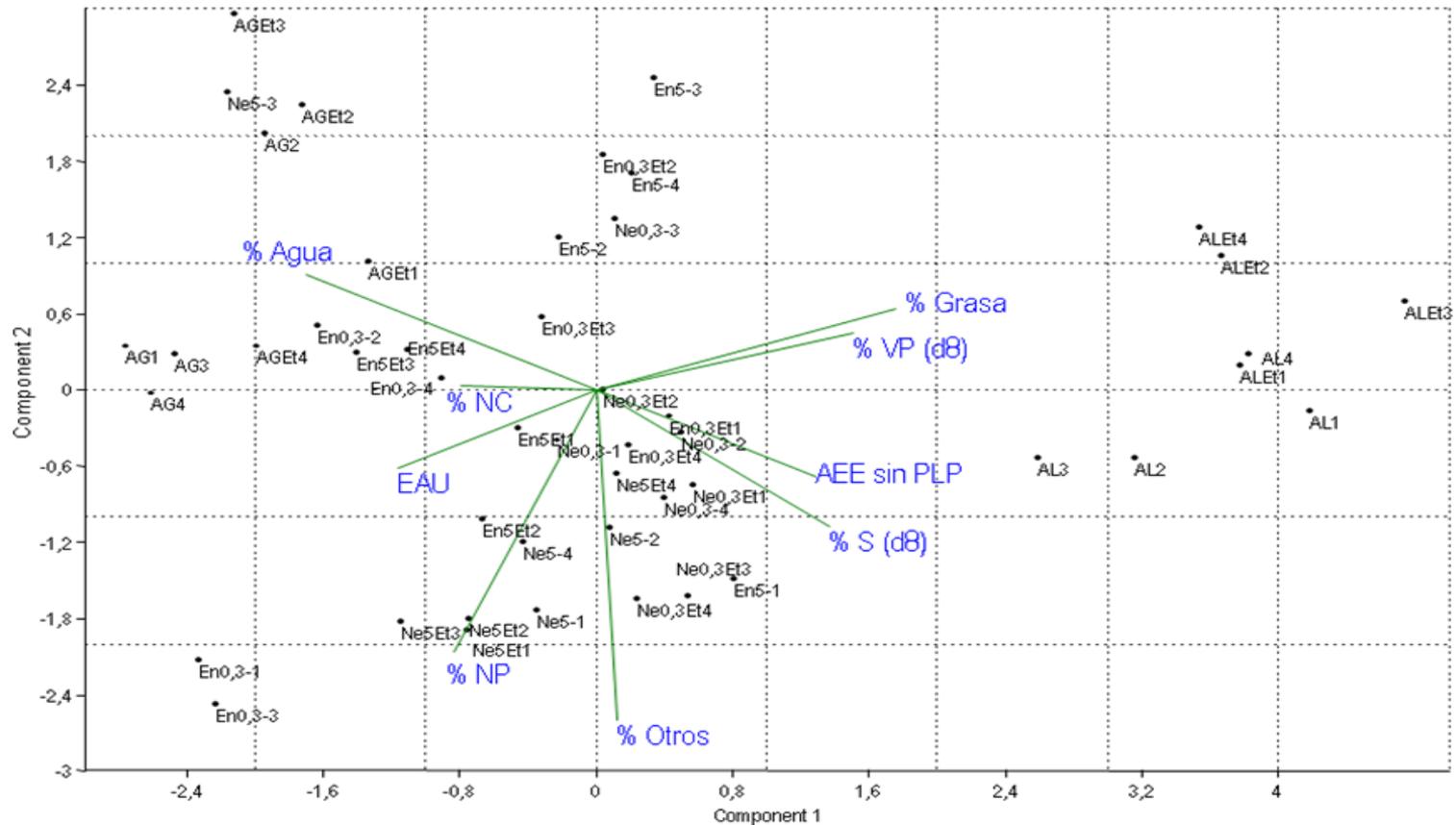
de “otros” ( $r = -0,9036$ ). CP3 está correlacionado más positivamente con el porcentaje de nitrógeno proteico ( $r = 0,8229$ ) mientras que está más relacionado negativamente con el porcentaje de otros ( $r = -0,2207$ ).

**Tabla 8:** Coeficientes de correlación ( $r$ ) de los tres primeros componentes principales.

Variables	R		
	1	2	3
%S(d8)	0,694	-0,3739	0,3842
%VP(d8)	0,7656	0,1548	-0,06663
Agua	-0,8696	0,3152	-0,1906
Grasa	0,8945	0,2219	0,2047
Nitrógeno cuticular	-0,4252	-0,7198	0,1059
Nitrógeno proteico	-0,4064	0,01285	0,8229
Otros	0,06179	-0,9036	-0,2207
EAU	-0,5955	-0,2162	0,0651
AEE sin PLP	0,653	-0,2407	-0,2032

En la Figura 20 se puede observar la correlación de los primeros dos componentes principales con las 9 variables. En el eje “x” está representado el componente principal uno (CP1) y en el eje “y” el componente principal 2 (CP2), cada punto constituye una réplica que tiene una etiqueta que indica el tipo de dieta por ejemplo, AG1 corresponde a una dieta de agar al 5 % réplica 1. El diagrama se construyó a partir de los dos primeros componentes, ya que como se dijo anteriormente aportan aproximadamente el 61 % de la varianza.

En la Figura 20 se observa cómo están distribuidas las muestras en relación al tipo de dieta y cómo varían las variables estudiadas. Los coeficientes de los autovectores pueden proyectarse desde el origen de coordenadas describiendo un vector que indica el sentido en el que incrementa cada una de las variables (porcentaje de supervivencia al día 8, porcentaje de variación de peso al día 8, porcentajes de agua, grasa, nitrógeno proteico, nitrógeno cuticular, “otros”; excreción de ácido úrico y actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa en ausencia de la coenzima).



**Figura 20.** Ubicación de las 48 muestras (12 dietas con cuatro réplicas cada una) según sus coordenadas en los dos componentes principales y los vectores de las variables (biplot). AG: agar al 5 %; AGEt: agar + etanol 1 % v/v; AL: almidón al 10 %; ALEt: almidón + etanol 1 % v/v; Ne0,3: Ne-nerina al 0,3 %; Ne0,3Et: Ne-nerina al 5 % + etanol 1 % v/v; Ne5: Ne-nerina al 5 %; Ne5Et: Ne-nerina al 5 % + etanol 1 % v/v; En0,3: Ensure al 0,3 % v/v; En0,3Et: Ensure al 0,3 % v/v + etanol 1 % v/v; En5: Ensure al 5 % v/v; En5Et: Ensure al 5 % v/v + etanol 1 % v/v. Los números 1-4 corresponden a las réplicas. Variables: S (d8): supervivencia al día 8; VP (d8): variación de peso al día 8; NC: nitrógeno cuticular; NP: nitrógeno proteico; EAU: excreción de ácido úrico y AEE sin PLP: actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa en ausencia de fosfato de piridoxal.

De las variables estudiadas solamente algunas pudieron ser evaluadas con esta técnica, de manera de correlacionarlas entre sí y darle sentido biológico a lo que pudiera estar pasando en los gorgojos con respecto al aprovechamiento de los nutrientes de la dieta. Un ejemplo de ello, fue lo encontrado con la variable porcentaje de grasa, cuyo vector se encuentra hacia donde están las dietas de almidón de maíz demostrando el aumento estadísticamente significativo del porcentaje de grasa en los gorgojos en relación a las demás dietas (Tabla 4), siendo más evidente con las dietas de almidón de maíz con etanol, lo que ilustra el efecto que ejerce en la acumulación de grasa. Casi opuesto al vector grasa se encuentra el vector de agua, lo que indicaría que éstas dos variables estarían relacionadas negativamente ( $r = -0,83383$ ), mientras que una incrementa la otra disminuye, por ello las dietas de almidón de maíz fueron las dietas a base de agar que presentaron menores porcentajes de agua. Las dietas de agar al 5 % presentaron los valores más altos en porcentaje de agua por lo que se encuentran ubicadas hacia donde incrementa el vector porcentaje de agua (Figura 20). La variable porcentaje de agua resultó ser la variable que agrupaba a la mayor cantidad de dietas ya que todas las dietas fueron preparadas en semillas artificiales con excepción de los controles del experimento (arvejas peladas y la condición de ayuno), lo que demuestra la utilidad de las semillas artificiales preparadas con agar como vehículo para proporcionarle agua a los insectos. Por esta razón se realizó el análisis de componentes principales eliminando los controles para poder dilucidar el comportamiento de las variables en cada una de las dietas a base de agar al 5 %. Se pudo observar que las dietas con mayor porcentaje de agua fueron las de agar con suministro de agua, agar con etanol y las dietas de Ensure 0,3 % v/v y 5 % v/v (no pudiéndose diferenciar entre la ausencia y presencia del etanol), lo que evidencia el tipo de preparación líquida de la dieta (Tabla 2). La variable porcentaje de agua resultó estar correlacionada

negativamente con la variable porcentaje de supervivencia ( $r = -0,69427$ ) y refleja lo ocurrido con las dietas de agar al 5 %, en donde los insectos tuvieron un mayor contenido de agua, pero la supervivencia fue menor. La variable porcentaje de grasa resultó estar correlacionada positivamente con el porcentaje de variación de peso ( $r = 0,6538$ ), lo que es un indicativo de que el aumento del peso de los insectos es producto de un incremento de la grasa corporal, como se evidenció con las dietas de almidón de maíz.

Los vectores de las variables nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular se encuentran correlacionadas positivamente con la excreción de ácido úrico, aunque de manera débil a juzgar por la magnitud de las correlaciones ( $r = 0,25435$  y  $r = 0,19695$  respectivamente). Sin embargo, una correlación positiva implicaría que las variables incrementan o disminuyen hacia la misma dirección y en este caso tendría sentido biológico, ya que el nitrógeno que se excreta en forma de ácido úrico es producto de un incremento del nitrógeno corporal que no es utilizado y es eliminado, es decir que el incremento de una conduce al aumento de la otra variable. Al suministrar dietas apteicas o con bajo contenido de proteínas se comienzan a degradar las proteínas corporales para cubrir con los requerimientos proteicos de los insectos y el nitrógeno total disminuye y con este la excreción del metabolito. La dieta de almidón de maíz fue con la que se obtuvo la más baja excreción de ácido úrico como se evidencia en la Figura 20, estas dietas se encuentran en la dirección contraria a la que apunta el vector de excreción de ácido úrico. También en estas dietas disminuyó el nitrógeno proteico como se señaló en la sección de composición corporal (Tabla 4 y Figura 15) y resultó mayor la pérdida de nitrógeno proteico en presencia del etanol y esto se puede observar con la ubicación de las muestras en relación al vector del porcentaje de nitrógeno proteico. Las dietas con la que se obtuvieron una mayor excreción de este metabolito

fueron las de agar al 5 % con y sin etanol, Ensure 0,3 % v/v y Ne-nerina 5 % cuya ubicación es hacia donde incrementa la variable excreción de ácido úrico. Como se mencionó al inicio de esta sección, esta técnica es muy sensible a las varianzas de las diferentes variables (Bulla 1995, citado por Suárez, 2000), pues aquellas con varianzas muy altas dominarán el análisis, por esta razón la variable excreción de ácido úrico para los controles (ayuno y arveja) estaba afectando el análisis de las demás dietas ya que se obtuvieron valores muy altos con ambas dietas (Tabla 5) en comparación con las dietas a base de agar, por lo que su eliminación del análisis permitió ver ciertas diferencias entre estas dietas.

Con respecto a la variable actividad enzimática específica en ausencia de coenzima, se pudo observar que las dietas de Ne-nerina al 0,3 % con y sin etanol fueron similares entre si y presentaron mayores valores de actividad, al observar la ubicación en relación al vector de esta variable. También las dietas de almidón presentaron valores altos de actividad, hecho curioso puesto que esto indicaría suficiencia proteica y vitamínica pero esta dieta es aprotéica y no está enriquecida con la vitamina B<sub>6</sub>. Esto podría deberse a la posibilidad de un “enriquecimiento relativo” de los extractos en estas enzimas por disminución de otros componentes (pérdida de peso y de nitrógeno no cuticular), de tal manera que la actividad expresada por mg de proteína total de la enzima aumente como fue reportado por Millán (2007). Al observar los vectores de las variables nitrógeno proteico y nitrógeno cuticular en relación al vector de actividad enzimática basal, se puede notar que en el caso del nitrógeno cuticular este es casi opuesto al de la actividad enzimática. Sin embargo la correlación entre estas dos variables fue positiva ( $r = 0,046191$ ) aspecto que no refleja la ubicación de los vectores. No obstante, al observar la relación de ambos vectores representados en otra dimensión mediante los diagramas obtenidos al graficar el CP2 versus el CP3 (datos no mostrados)

se pudo constatar que definitivamente no se encuentran opuestos, más bien se acerca a una correlación casi nula es decir, que si una aumenta, no sabemos si la otra aumenta o disminuye. De manera que desde el punto de vista biológico una disminución en el nitrógeno corporal en sus dos componentes (proteico y cuticular) no permite dilucidar que es lo que pasaría con la variable actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa en ausencia de piridoxal fosfato.

El análisis de componentes principales además de que permitió observar todas las muestras representadas en un mismo gráfico, hizo posible evidenciar las relaciones entre las variables ensayadas permitiendo detectar cuales de ellas agrupan a la mayor cantidad de dietas, como lo fue la variable porcentaje de grasa. También con esta técnica es posible detectar las variables que son más sensibles de ser modificadas por la dieta, como lo fue el porcentaje de grasa en el caso de dietas apteicas, mientras que con dietas de densidad de nutrientes variables como la Ne-nerina y el Ensure los parámetros más sensibles fueron la actividad enzimática, excreción de ácido úrico y los porcentajes de nitrógeno, aún cuando las diferencias no fueron tan notables.

## **7. Perspectivas generales**

Entre los diversos biomarcadores utilizados para evaluar la eficiencia de utilización de nutrientes en dietas de distinta densidad de los mismos, en presencia y ausencia de etanol, se obtuvieron diferencias dependiendo de la dieta es decir, de su contenido de nutrientes y energía calórica. Con este estudio se pudo detectar cuales de los indicadores no variaron en la mayoría de las dietas investigadas, así como también, cuales de los biomarcadores son los que más cambian por el efecto del etanol. Biomarcadores como la supervivencia y variación de peso solo mostraron ciertos cambios con algunas de las dietas, por lo que no resultaron eficientes para determinar el efecto del etanol con dietas de diferente densidad de nutrientes como las Ne-nerinas y

Ensure. Sin embargo, el porcentaje de agua como parte de la composición corporal del insecto, si resultó eficiente para evaluar el efecto del etanol al igual que el contenido de grasa. Aún cuando la diferencia entre la ausencia y presencia de etanol en la dieta, no resultó estadísticamente significativo para todas las dietas a base de agar (con excepción de la dieta de almidón de maíz al 10 %), si se pudo observar que la tendencia en la mayoría de las dietas fue la disminución del porcentaje de agua en los insectos, esto debido a la deshidratación de los tejidos a causa del etanol. Mientras que el porcentaje de grasa en la mayoría de las dietas aumentó por efecto del etanol. Posiblemente estos cambios si sean significativos desde el punto de vista biológico, principalmente cuando el peso promedio de los insectos ronda los 1,6 mg.

La excreción de ácido úrico, la actividad específica y el porcentaje de activación de la enzima aspartato aminotransferasa no resultaron ser buenos indicadores del efecto del etanol sobre los insectos, ya que no se encontraron mayores diferencias entre las dietas. Sin embargo, estos parámetros en relación a los anteriores parecieran ser más susceptibles a los cambios en la composición de nutrientes y energía en cada una de las dietas ensayadas.

Los modelos animales han sido utilizados para el estudio de los efectos del consumo de alcohol, bajo condiciones nutricionales controladas. Un ejemplo de ello, fue el estudio en donde se evaluó el efecto de una dieta líquida de etanol sobre el estado nutricional y el balance hídrico de ratas introducidas gradualmente en una concentración final de 9 % v/v (13 g etanol/kg/día). Los autores encontraron que los cambios en el peso corporal y la excreción de orina en los grupos alimentados con la dieta de etanol, fueron parámetros que resultaron eficientes para estimar la pérdida de fluidos. La pérdida de peso después de la fase de adaptación al etanol, puede en parte deberse al

consumo de agua, pero también esta relacionada con una disminución en el consumo calórico y a una adaptación metabólica al etanol (Piano y col., 2001).

Estudios en humanos sobre el abuso crónico del etanol han demostrado que los alcohólicos en comparación con los bebedores sociales presentan un peso corporal menor, debido esencialmente a una reducción de la grasa. Estos resultados sugieren que posiblemente el efecto del alcohol en el peso corporal, como otros efectos del alcohol, tenga un comportamiento bifásico, principalmente asociado a la ruta metabólica que tiene mayor importancia de acuerdo al consumo del etanol, ya sea la de la ADH o la del SOME (Addolorato y col., 1998).

Estos estudios nutricionales sobre el efecto del etanol realizados con insectos, ratas y humanos, demuestran que a pesar de las diferencias existentes entre las especies, es posible detectar indicadores que reflejen los cambios que se producen debido al consumo del etanol y pareciera ser, que la importancia de estos biomarcadores como herramientas de valoración de la eficiencia en la utilización de los nutrientes provenientes de la dieta, va a depender del sistema biológico utilizado, aún cuando pueden encontrarse ciertas similitudes.

## VI. CONCLUSIONES

- Los biomarcadores supervivencia y variación de peso no resultaron ser buenos indicadores para evaluar el efecto del etanol sobre el gorgojo de arroz.
- Los biomarcadores porcentaje de agua y porcentaje de grasa resultaron ser los mejores indicadores para evaluar el efecto del etanol.
- El efecto del etanol sobre la composición corporal del gorgojo de arroz se observó con la dieta de almidón de maíz al 10 %, en donde hubo una disminución del agua y del nitrógeno proteico, y un aumento de la grasa corporal.
- La excreción de ácido úrico pareciera ser un buen biomarcador para evaluar el efecto del etanol solo en dietas de baja concentración de nutrientes.
- La actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa no pareciera ser un buen indicador del estado nutricional de la vitamina B<sub>6</sub>.
- El porcentaje de activación no resultó un buen biomarcador para evaluar el estado nutricional de la vitamina B<sub>6</sub>, posiblemente por las características del estuche comercial utilizado para medir la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa, en ausencia y presencia de su cofactor, fosfato de piridoxal.
- Las semillas artificiales de agar demostraron ser un vehículo para el suministro de agua a los insectos.
- El análisis de componente principal (ACP) permitió detectar fuertes correlaciones entre el contenido de grasa y la variación de peso (correlación positiva); así como también, entre el contenido de agua y el porcentaje de supervivencia de los gorgojos (correlación negativa).
- La técnica de ACP resultó una herramienta importante para la evaluación de los resultados, primero como herramienta exploratoria en el procesamiento de los

datos y segundo porque permitió ver los cambios en cada una de las variables estudiadas de manera de tener una visión global de cómo se afectan los biomarcadores utilizados para evaluar el aprovechamiento de los nutrientes con dietas de diferente densidad de nutrientes y el efecto del etanol en el bioensayo del gorgojo de arroz.

## VII. RECOMENDACIONES

El bioensayo del gorgojo de arroz resultó ser útil para evaluar el aprovechamiento de los nutrientes de la dieta, así como también para evaluar el efecto del etanol sobre algunos de los biomarcadores aquí utilizados, por lo que se sugiere continuar estas investigaciones, principalmente la búsqueda de una dieta de densidad de nutrientes que cumpla con los requerimientos mínimos del insecto y que permita ver el efecto de ciertos factores incluidos a las dietas. Probablemente el utilizar dietas de glucosa a distintas concentraciones contribuya a ampliar esta búsqueda, ya que con este trabajo se demostró que con la dieta basal de almidón de maíz (rica en carbohidratos) fue posible ver el efecto del etanol sobre la composición corporal del gorgojo. También podría utilizarse la dieta de almidón de maíz al 10 % suplementada con concentraciones de nutrientes variables como caseína.

Igualmente sería interesante estudiar el efecto del etanol cambiando las semillas artificiales interdiariamente, de manera de garantizar que el suministro de etanol a los insectos sea constante durante los 8 días del experimento. Adicionalmente sería importante determinar cuál es el tiempo de vida media del etanol en las semillas artificiales, debido a que el tiempo de latencia de los insectos (señalado en la sección de supervivencia) fue disminuyendo con el transcurso de los días, lo que pudiera deberse a la pérdida de etanol en las semillas artificiales. Un experimento simultáneo, cambiando interdiariamente las semillas artificiales con etanol y otras sin cambiarlas, podría arrojar resultados concluyentes sobre este hecho. Otro experimento por hacer con respecto al efecto del etanol, sería probar concentraciones crecientes como por ejemplo 0,5 %, 1 %, 2 % y 4 % de manera de determinar los niveles umbrales de toxicidad en los insectos.

Debido a que las semillas artificiales de agar demostraron ser un vehículo eficiente para proporcionarle agua a los insectos, un experimento por realizar con

respecto a esto, sería mantener a los insectos con semillas de distintas concentraciones de agar, por ejemplo 2 %, 5 % y 10 %. Luego de los 8 días del experimento, medir el contenido de agua en las semillas artificiales y en los insectos.

En vista que el método utilizado para la determinación de la actividad enzimática específica de la aspartato aminotransferasa no resultó el más apropiado para la determinación del porcentaje de activación en presencia de fosfato de piridoxal, sería conveniente realizar estos estudios utilizando el ensayo de complementación basado en la reducción del NADH, siendo la actividad de la enzima directamente proporcional a la disminución de la absorbancia a 340 nm.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Achkor H (2003) Estudio funcional de la formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión de *Arabidopsis thaliana*, aplicaciones en fitoremediación. Tesis de postgrado (Doctor en Ciencias). España: Universidad Autónoma de Barcelona. pp 1-4. [http://www.tesisenxarxa.net/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-1222103-144657//ha1de2.pdf](http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1222103-144657//ha1de2.pdf). (Fecha de acceso: 30-mayo-2008).
- Addolorato G, Capristo E, Greco AV, Stefanini GF, Gasbarrini G (1998) Influence of chronic alcohol abuse on body weight and energy metabolism: is excess ethanol consumption a risk factor for obesity or malnutrition?. *Journal of Internal Medicine*, **244**: 387-395.
- Ajayi FA, Rahman SA (2006) Susceptibility of some staple processed meals to red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9**: 1744-1748.
- Anónimo (2007a) El gorgojo del arroz. Ficha “Insectos plagas” N° 9. <http://www.insectariumvirtual.com/termitero/nicaragua/DOCUMENTOS%20DE%20INTERES/PLAG-9.htm>. (Fecha de acceso: 24-mayo-2007).
- Anónimo (2007b) [http://fbio.uh.cu/metabol/Metabolismo\\_glucosa.htm](http://fbio.uh.cu/metabol/Metabolismo_glucosa.htm). (Fecha de acceso: 23-marzo-2007).
- Anónimo (2008) <http://www.elergonomista.com/alimentos/almidon.htm>. (Fecha de acceso: 29-mayo-2008).
- AOAC International (1984) **Official Methods of Analysis** (14<sup>th</sup> ed). Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.

- Bayoumi R, Rosalki S (1976) Evaluation of Methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>6</sub>. *Clinic of Chemistry*, **22**: 327-335.
- Bamaiyi LJ, Dike MC, Onu I (2007) Relative susceptibility of some sorghum varieties to the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology*, **4**: 387-392.
- Bermúdez V, Leal E, Bermúdez F, Cano C, Cabrera M, Ambard M, Medina M, Toledo A, Leal N, Cano R, Mengual E, Lemus M (2003) El Alcohol: ¿Factor de riesgo o de protección para la enfermedad coronaria? *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, **22**: 116-125.
- Bursell E (1970) **An introduction to insect physiology**. Londres: Academic Press. pp 3-43.
- Carmona A, Gómez-Sotillo A (1997) Uso de insectos en estudios nutricionales: Cambios en la composición corporal inducidos por la dieta. *Anales Venezolanos de Nutrición*, **10**: 20-26.
- Carmona A, López Y, Gómez-Sotillo A, Casotto M (1998) Toxicología nutricional: un enfoque “artropocéntrico”. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **1**: 37-40.
- Carmona A, Liuzzi JP (1998) Biodisponibilidad de nutrientes: fácil de definir, difícil de evaluar. *Anales Venezolanos de Nutrición*, **11**: 66-78.
- Carmona A, Jaffé W (1999) Alimentos funcionales: Uso de biomarcadores para evaluar su efectividad como promotores de la salud. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **2**: 179-182.

- Carmona A, López 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.
- Carmona A, Casotto M (2001) Índice de eficiencia alimentaria (FER) en gorgojos de arroz (*Sitophilus oryzae*): Herramienta para evaluar la utilización metabólica del alimento. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **3**: 49-52.
- Cherry J (1973) **Molecular biology of plants**. A text manual. EE.UU: Columbia University Press (Eds). pp 37-42.
- Curtis H, Barnes N (2001) **Biología** (6ª ed). Madrid: Editorial Médica Panamericana. p 233.
- Devlin TM (2006) **Textbook of biochemistry with clinical correlations** (6ª ed). Hoboken (EE.UU.): Wiley-Liss. p. 885.
- Dorado G (1984) Determinación de la actividad enzimática alcohol deshidrogenasa (ADH) en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). Córdoba: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biolumol/pdfs/35%20ACTIVIDAD%20ADH.pdf>. (Fecha de acceso: 16-abril-2007).
- Edenberg HJ, Bosron WF (1997) Alcohol dehydrogenases. En: F.P Guengerich (Ed). **Comprehensive Toxicology**. New York: Pergamon Press. pp. 119-131.
- Fraenkel G, Brewett M (1943) The basic food requirements of several insects. *Journal of Experimental Biology*, **20**: 28-34.
- Gabriel KR (1971) The biplot graphic display of matrices with application to PCA. *Biometrika*, **58**: 453-467.
- Galeno F (2006) Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 51-80.

- García O (2003) Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados, utilizando el bioensayo con el gorgojo de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 21-93.
- Gómez-Sotillo A (1997) Uso potencial del insecto *Sitophilus oryzae* en la evaluación del control biológico de semillas de leguminosas. Un método rápido y económico: Trabajo de Ascenso (Categoría de Profesor Titular). Cumaná: Universidad de Oriente. pp 206-70.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* **4**: 9pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm). (Fecha de acceso: 30-agosto-2007).
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2007) PAST: Paleontological statistics, ver. 1.73. <http://folk.uio.no/ohammer/past>. (Fecha de acceso: 28-septiembre-2007).
- Hickman C, Roberts L, Parson, A (1998) **Principios integrales de zoología** (10<sup>a</sup> ed). Madrid: MacGraw- Hill/Interamericana. pp 415-419.
- Höög J, Brandt M, Hedberg J, Stromberg P (2001) Mammalian alcohol dehydrogenase of higherclasses: analyses of human ADH5 and rat ADH6. *Chemico-Biological Interaction*, **130**: 395–404.
- Hoorn RKJ, Plikweert JP, Westerink D (1975) Vitamin B-1, B-2 and B-6 deficiencies in geriatric patients, measured by coenzyme stimulation of enzyme activities, *Clinica Chimica Acta*, **61**: 151-162.
- Jaffé W (2002) **Nuestros alimentos, ayer, hoy y mañana** (2<sup>a</sup> ed). Caracas: Fundación Bengoa. pp 19-26.

- James A (2000) Alcohol: its metabolism and effects. En: Garrow J, James WPT, Ralf A (Eds). **Human Nutrition and Dietetics**. Londres: Churchill Livingstone. pp 121-136.
- Jörnvall H, Danielsson O, Eklund H, Hjelmquist L, Höög JO, Parés X, Shafqat J (1993) Enzyme and isozyme developments within the medium-chain alcohol dehydrogenase family. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **328**: 533-544.
- Jörnvall H, Nordling E, Persson B (2003) Multiplicity of eukaryotic ADH and other MDR forms. *Chemico-Biological Interactions*, **143**: 255-261.
- Klieber M (1975) **The fire of the life**. Nueva York: Robert E. Krieger Publishing. p 179.
- Laurentin A, Lovera M, Rojas C, Gamero M, Edwards CA, Tapia MS, Diez N, Bernal C, Carmona A (2008) Estudios nutricionales con el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **5**: 57-60.
- Law-Ogbomo KE, Enobakhare DA (2007) The use of leaf powders of *Ocinum gratissimum* and *Vernonia amygdalina* for the management of *Sitophilus oryzae* (Lin) in stored rice. *Journal of Entomology*, **4**: 253-257.
- Lehninger A (1993) **Principles of biochemistry** (2<sup>a</sup> ed). Nueva York: Worth Publishers, 33 Irving Place. p 1013.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (2000) Bionergetic and metabolism, En: Principles of biochemistry. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (Eds). Nueva York: Worth publishers. pp 512-520.
- Lieber CS, DeCarli LM (1970) Hepatic microsomal ethanol oxidizing system: *in vitro* characteristics and adaptive properties *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, **245**: 2505-2512.

- Lieber CS (1973) Hepatic and metabolic effects of alcohol. *Gastroenterology*, **65**: 821-846.
- Lieber CS (1984) Metabolism and metabolic effects of alcohol. *Medical Clinics of North America*, **68**: 3-31.
- Lieber CS (2001) Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. *Pathology Biological*, **49**: 738-752.
- Lieber CS (2004a) Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, **34**: 9-19.
- Lieber CS (2004b) Milestones in liver disease: the unexpected outcomes of medical research: serendipity and the microsomal ethanol oxidizing system. *Journal of Hepatology*, **40**: 198-202.
- Lieber CS (2004c) The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metabolism Review*, **36**: 511-529.
- López Y (1999) Efecto de la concentración y calidad de la proteína dietaria sobre la composición corporal, la actividad de las enzimas digestivas y el potencial reproductivo de gorgojos de arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 8-68.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1971) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- Matsuzaki S, Gordon E, Lieber CS (1981) Increased alcohol dehydrogenase independent ethanol oxidation at high ethanol concentrations in isolated rat hepatocytes: the effect of chronic ethanol feeding. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **217**: 133-137.
- Matthews H, Freedland R, Miesfeld R (1997) **Biochemistry: A Short Course**. Nueva York: Wiley-Liss. p 210.

- Meglitsch P (1967) **Invertebrate zoology**. Nueva York: Oxford University. pp 887-880.
- Mezey E (1985) Metabolic effects of alcohol. *Federation proceedings*, **44**: 134-138.
- Millán G, Carmona, A (2005) Estudios nutricionales con *Tribolium castaneum*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **4**: 53-56.
- Millán G (2007) Uso de biomarcadores para evaluar la biodisponibilidad de nutrientes en *Tribolium castaneum*. Tesis de postgrado (Doctor en Ciencias). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 27-212.
- Newcombe DS (1972) Ethanol metabolism and uric acid. *Metabolism*, **21**: 1193-1203.
- Nijamo TSL, Ngatanko I, Ngasson MB, Mapongmestsem PM, Hance T (2007) Insecticidal efficiency of essential oils of 5 aromatic plants tested both alone and in combination towards *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Research Journal of Biological Sciences*, **2**: 75-80.
- Pérez-Navarrete C, Betancur-Ancona D, Casotto M, Carmona A, Tovar J (2007) Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteína y almidón de harinas de maíz y frijol de lima. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **57**: 278-286.
- Piano M, Artwohl J, Dixon S, Gass G (2001) The effect of a liquid ethanol diet nutritional status and fluid balance in the rat. *Alcohol & Alcoholism*, **36**: 298-303.
- Raica N, Sauberlich H (1964) Blood cell transaminase activity in human vitamin B<sub>6</sub> deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, **15**: 67-72.
- Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK (2001) Research advances in ethanol metabolism. *Pathologie Biologie*, **49**: 676-682.
- Rasmussen L, Oster-Jorgensen E, Qvist N, Holst JJ, Rehfeld JF, Hovendahl CP, Pedersen SA (1996) The relationship between gut hormone secretion and gastric

- emptying in different phases of the migrating motor complex. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **31**: 458-462.
- Reitman S, Frankel F (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinic Pathology*, **28**: 56-63.
- Rojas C (2007) Evaluación nutricional de películas comestibles con ingredientes pre y probióticos usando como modelo biológico el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 62-93.
- Rojas M, Dorta B, Casotto M (2005) Grasa y glucógeno como indicadores de la utilización de la dieta en el Lepidóptera: *Spodoptera frugiperda*. *Memorias del Instituto de Biología Experimental*, **4**: 57-60.
- Ruppert E, Barnes R (1996) **Zoología de los invertebrados** (6<sup>a</sup> ed). México: MacGraw-Hill/Interamericana. pp 838-843.
- Saleem MA, Shakoori AR, Mantle D (1998) Macromolecular and enzymatic abnormalities induce by a synthetic pythroid, Ripcord (cypermethrin), in adult beetles of a stored grain pest. *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **39**: 144-154.
- Shakoori AR, Fayyaz M, Saleem MA (1988) Biochemical changes induced by fenpropathrin in the sixth instar larvae of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, **24**: 215-220.
- Sidery MB, Macdonald IA, Blackshaw PE (1994) Superior mesenteric artery blood flow and gastric emptying in humans and the differential effects of high fat and high carbohydrate meals. *Gut*, **35**: 186-190.

- Suárez L (1999) Caracterización de la composición taxonómica y dieta de la herpetofauna colectada en trampas de caída ubicadas en algunas sabanas de *Trachypogon* sp. y bosques de *Pinus caribaea* en Uverito, Estado Monagas. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Caracas: Universidad Central de Venezuela. pp 15-17.
- Suárez L, Molina C, Bulla L, Francisco V (2000) Efecto de plantaciones de *Pinus caribaea* sobre la herpetocenosis en Uverito, Venezuela. *Ecotropicos*, **13**: 67-74.
- Terrádez M (c2007) Análisis de componentes principales. [http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes\\_principales.pdf](http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/Componentes_principales.pdf). (Fecha de acceso: 30-agosto-2007).
- Teschke R, Hasumura Y, Lieber CS (1976) Hepatic ethanol metabolism: respective roles of alcohol deshydrogenase, the microsomal ethanol-oxidizing system, and catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **175**: 635-643.
- Velásquez C, Trivelli H (1983) Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. *Archivo de documentos de la FAO*, X5030/5. Santiago de Chile: <http://www.fao.org/docrep/X5030S/x5030S01.htm>. (Fecha de acceso: 24-abril-2007).
- Watkins RL, Adler EV (1993) The effect of food on alcohol absorption and elimination patterns. *Journal of Forensic Sciences*, **38**: 285-291.
- Wigglesworth V (1966) **Insect Physiology**. Londres: Science Paperbacks. pp 39-82.
- Viglianco A, Novo R, Cragolini C, Nassetta M (2006) Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L). *Agriscientia XXIII*, **2**: 83-39. <http://crean.org.ar/agriscientia/volumenes/resumen/volumen23/numero2/viglianco.pdf>. (Fecha de acceso: 16-mayo-2007).