

# Efecto del quitosán en el desarrollo de larvas de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew, Diptera: *Tephritidae*)

## *Effect of chitosan on the development of larvae of mexican fruit fly (Anastrepha ludens Loew, Diptera: Tephritidae)*

MIGUEL SALVADOR-FIGUEROA<sup>1</sup>, RAFAEL GONZÁLEZ-JIMÉNEZ<sup>1</sup>, MARÍA DE LOURDES ADRIANO-ANAYA<sup>1</sup>, EMILIO HERNÁNDEZ-ORTÍZ<sup>2</sup> E ISIDRO OVANDO-MEDINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas.

Carretera a Puerto Madero Km 2.0. Tapachula, Chiapas. México. Tel y Fax (962) 6427972

<sup>2</sup>Programa MOSCAFRUT. Subdirección de Desarrollo de Métodos, Departamento de Colonización y Cría. Metapa de Domínguez, Chiapas (México).

\*Autor para correspondencia: Correo-e: msalvad@hotmail.com

RECIBIDO EL 28 DE MARZO DE 2013 / ACEPTADO EL 2 DE MAYO DE 2013

### RESUMEN

La ausencia de inmaduros viables de moscas de la fruta es un requisito para la comercialización de frutos del trópico húmedo. Recientemente se ha demostrado que el recubrimiento con quitosán de los frutos de mango interrumpe el desarrollo de los inmaduros de *Anastrepha ludens*. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del quitosán en la sobrevivencia de larvas de *A. ludens*. Se realizaron 148 tratamientos con base en la combinación de tipo de ácido empleado para la disolución de quitosán, concentración de quitosán, tipo de quitosán y estadio de desarrollo de la larva. Las larvas de primer estadio crecidas en dietas adicionadas con 2% de quitosán de baja viscosidad tuvieron 25% de sobrevivencia. La susceptibilidad de las larvas se incrementó al aumentar la concentración de quitosán, y decreció con el incremento de la viscosidad y el estadio de desarrollo. Se construyó un índice de inhibición y se discute el efecto del quitosán con base en las propiedades físicas y biológicas de dicha molécula.

**Palabras clave:** quitosán, *Anastrepha*, inhibición del desarrollo, larva, mortalidad, dieta.

### INTRODUCCIÓN

La mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: *Tephritidae*) es una de las principales plagas del mango, y de varias especies de cítricos en México, en el valle del Río Grande, Texas (USA), y Centroamérica (Aluja, 1993; Thomas & Loera-Gallardo, 1998). Por lo anterior, para que las frutas puedan ser movilizadas de áreas infestadas a áreas libres de *A. ludens* deben ser sometidas a algún tratamiento cuarentenario aprobado por el país comprador (Armstrong & Couey, 1989). Es por ello que los mangos que México exporta son sujetos a regulaciones de cuarentena mediante el tratamiento hidrotérmico (Mangan & Ingle, 1994; Thomas & Mangan, 1997; Hernández, Mangan, Neck, Rivera & Toledo, 2007). Dicho tratamiento elimina la capa de cera que cubre el fruto y acelera el proceso de maduración.

### ABSTRACT

The absence of viable immature fruit flies is a requirement for the marketing of fruits of the humid tropics. Recently it has been shown that the development of the immature stages of *Anastrepha ludens* is interrupted when mango fruit are covered with chitosan. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of chitosan on the survival of larvae of *A. ludens*. 148 treatments were performed according to the combination of type of organic acid used for the dissolution of chitosan, concentration of chitosan, chitosan type and larval stage. The first instar larvae grown on diets supplemented with 2% low viscosity chitosan had 25% survival. The susceptibility of larvae increased with the rise in concentration of chitosan, and decreased with the rise in viscosity and developmental stage. Inhibition index was created and the effect of chitosan is discussed based on the physical and biological properties.

**Keywords:** chitosan, *Anastrepha*, inhibition of development, larva mortality, diet.

Para evitar dichos efectos negativos, se ha propuesto el uso de biorecubrimientos fabricados con quitosán.

Se ha demostrado que el uso de quitosán aumenta la vida de anaquel de la papaya (González-Aguilar, Monroy-García, Goycolea-Valencia, Díaz-Cinco & Ayala-Zavala, 2005), del aguacate (Salvador, Miranda & Aragón, 1999) y del mango (González, Aragón & Godínez, 2006), además de disminuir la proliferación de microorganismos dañinos. La habilidad del quitosán de formar una cubierta semipermeable, su aplicación en frutas u hortalizas mejora la vida de anaquel. Lo anterior se debe a que los frutos tratados con dicho compuesto reducen la tasa respiratoria, la producción de etileno y la pérdida de agua por efecto de la transpiración. Cabe mencionar que el quitosán no afecta las características organolépticas de los vegetales ni las propiedades físicas de los frutos (González-Aguilar et al., 2005), además es un recurso renovable y biodegradable.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio demuestran que en los frutos de mango variedad Ataulfo, recubiertos con quitosán, se inhibe el desarrollo de huevos y larvas de *A. ludens* (Salvador-Figueroa, Hernández-Ortiz, Ventura-González, Ovando-Medina & Adriano-Anaya Salvador, 2013; González et al., 2006), además de prolongar la vida de anaquel e inhibir el crecimiento de hongos. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del quitosán en la sobrevivencia y desarrollo de larvas de *Anastrepha ludens* crecidas en dietas artificiales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Departamento de Colonización y Cría de Moscas de la Fruta de, la Subdirección de Desarrollo de Métodos del Programa MOSCAFRUT, en Metapa de Domínguez, Chiapas (México), y en el laboratorio de investigación del Centro de Biociencias, de la Universidad Autónoma de Chiapas, Campus IV, Tapachula, Chiapas.

### Material biológico

Las larvas de *A. ludens* fueron obtenidas de las colonias de producción masiva establecidas en la planta MOSCAFRUT, de acuerdo con el procedimiento descrito por Stevens (1991). Las larvas se cultivaron en dieta preparada con sacarosa (9.0%), harina de maíz (8.7%), levadura "Torula" (6.3%), polvo de olote de maíz (16.3%), goma Guar (0.1%), Nipagin® (0.2%), benzoato de sodio (0.3%), ácido cítrico (0.4%) y agua suficiente para obtener 100 g de base húmeda.

### Selección de larvas de diferentes estadios de desarrollo

El estadio de desarrollo de la larva se determinó en función del nivel de esclerotización de los ganchos bucales. Las larvas de primer estadio se colectaron un día después de la eclosión del huevo y los ganchos bucales estuvieron completamente transparentes. Las larvas de segundo estadio se colectaron cuando la base de los ganchos bucales se esclerotizó. Cuando los ganchos bucales estuvieron totalmente esclerotizados, se colectaron las larvas de tercer

estadio (Frías, Hernández & López, 2009).

### Diseño de tratamientos

Para determinar el efecto del quitosán sobre la sobrevivencia y desarrollo de las larvas de *A. ludens* se empleó un diseño factorial completamente al azar de 148 tratamientos. Los factores evaluados fueron: el ácido orgánico empleado para la disolución del quitosán (acético, láctico, tartárico y ascórbico, todos a la concentración de 0.1 M), tipo de quitosán (baja, media y alta viscosidad), concentración de quitosán (2.5, 5.0, 10 y 20 g L<sup>-1</sup>) y el estadio de desarrollo de las larvas (1°, 2° y 3°). Por cada tratamiento se ensayó, en paralelo, el desarrollo de los diferentes estadios de las larvas en la dieta convencional (control positivo) y en dieta donde el agua se sustituyó con el correspondiente ácido orgánico (control de ácido). Para cada tratamiento se emplearon lotes de 50 individuos y seis repeticiones.

### Condiciones de ensayo

Los ensayos se realizaron en cajas de Petri que contenían 10 g de dieta. La dieta se formuló como previamente se describió, sustituyendo el agua con la correspondiente disolución de quitosán. Una vez colocadas las larvas en las cajas de Petri, éstas se incubaron en un cuarto a 26±1 °C y 90% de humedad relativa, donde permanecieron hasta que estuvieron listas para pupar (ausencia de alimento en el tracto digestivo).

### Recuperación de larvas de tercer estadio, transformación a pupa y emergencia de adultos

La separación de las larvas que alcanzaron el tercer estadio de desarrollo se realizó diluyendo la dieta en agua y posterior tamizado (Tamiz 14). Las larvas recuperadas se colocaron en vermiculita húmeda y se mantuvieron a 24±1 °C y 70% de humedad relativa por 24 h. La transformación de pupas a adultos se realizó manteniendo las pupas a 26±1 °C.

### Variables evaluadas

En todos los tratamientos se evaluaron las siguientes variables: obtención de larvas de tercer estadio (%), el peso promedio individual de las larvas de tercer estadio (mg), el tiempo requerido para alcanzar el tercer estadio de desarro-

llo (d), la transformación de larva a pupa (%), la transformación de pupa a adulto (%) y la transformación global desde larvas de primer estadio hasta adultos (%). Los procedimientos empleados fueron descritos previamente por Orozco, Schwarz y Pérez (1983), Hernández, Flores, Sosa y Ezquivel (2005) y Rivera, Hernández, Toledo, Salvador y Silva (2007).

### Análisis de los datos

El análisis de los datos se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se llevó a cabo con la prueba de Duncan ( $\alpha = 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico InfoStat Profesional 2010.

## RESULTADOS

### Efecto del quitosán en el desarrollo de larvas de primer estadio

En el Cuadro 1 se muestra la cantidad, en porcentaje, de larvas de primer estadio que alcanzaron el tercer estadio de desarrollo cuando crecieron en dieta adicionada con diferentes concentraciones de quitosán disuelto en distintos ácidos orgánicos. En dicho cuadro se observa que en las dietas adicionadas con los ácidos donde se solubilizó el quitosán, la sobrevivencia de las larvas fue igual a la encontrada en la dieta control. Por lo anterior, de los datos presentados sólo se tomó en consideración el tipo de quitosán y su concentración. De esta forma se encontró que conforme se incrementó la concentración de quitosán la sobrevivencia de larvas fue menor; también se encontró que la disminución en la sobrevivencia fue inversamente proporcional a la viscosidad del quitosán.

**Cuadro 1.** Porcentaje de larvas de primer estadio de *A. ludens* que alcanzaron el tercer estadio de desarrollo cuando se crecieron en dieta artificial adicionada con diferentes concentraciones de quitosán de distintas viscosidades

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	86.9 b	91.1 b	86.8 b
0.50	78.4 c	89.3 b	88.4 b
1.00	61.0 d	66.3 d	86.4 b
2.00	25.1 f	55.8 e	59.2 e
Control 98.7 a	Control de ácidos 98.3 a		

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

Las diferencias en el porcentaje de sobrevivencia fueron significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=33.48$ ;  $p<0.0001$ ; concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=428.78$ ;  $p<0.0001$ ).

### Tiempo requerido para que las larvas de primer estadio alcancen el tercer estadio

La adición a la dieta de cualquiera de los ácidos orgánicos empleados para la disolución del quitosán, no modificó el tiempo requerido para que las larvas alcanzaran el tercer estadio (Cuadro 2). Por otro lado, conforme se incrementó la concentración de quitosán en la dieta, las larvas requirieron mayor tiempo para alcanzar el tercer estadio de desarrollo. De esa forma, las larvas cultivadas en dieta adicionada con 2% de quitosán de baja viscosidad requirieron 2.3 veces más tiempo que las larvas del tratamiento control. Por otra parte, en las dietas adicionadas con 2% de quitosán de mediana y alta viscosidad, las larvas ocuparon, respectivamente, 1.8 y 1.6 veces más tiempo para alcanzar el tercer estadio de desarrollo respecto a las larvas que se desarrollaron en la dieta de referencia. Las diferencias observadas en el tiempo requerido para que las larvas alcanzaran el tercer estadio de desarrollo sólo fueron estadísticamente significativas para las crecidas en dietas formuladas con 1 y 2% de quitosán.

### Peso de larva de tercer estadio

No se observó cambio significativo en el peso promedio de una larva de tercer estadio de *A. ludens* cuando a la dieta de cultivo se le adicionó cualquiera de los ácidos donde se disolvió el quitosán (Cuadro 3). Por otro lado, la adición de quitosán afectó negativamente el

**Cuadro 2.** Promedio de días requerido para que las larvas de primer estadio de *A. ludens* alcanzaran el tercer estadio de desarrollo al cultivarse en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con distinta concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	11 ab	11 ab	11 ab
0.50	11 ab	11 ab	11 ab
1.00	14 c	12 b	12 b
2.00	23 f	18 e	16 d
Control 10 a	Control de ácidos 10 a		

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

**Cuadro 3.** Peso promedio de una larva de tercer estadio de *A. ludens* desarrollada en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con distinta concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	25.53 b	24.69 b	24.89 b
0.50	24.45 b	24.43 b	19.78 c
1.00	24.78 b	21.60 c	21.51 c
2.00	10.11 c	16.44 d	13.21 e

Control 97.4 a

Control de ácidos 27.1 a

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

peso promedio de la larva. En este sentido, dicho efecto fue mayor conforme se incrementó la concentración de quitosán. Así mismo, el efecto negativo fue mayor conforme se incrementó la viscosidad del quitosán. De esta forma, las larvas que se cultivaron en dietas adicionadas con 2% de quitosán de alta, mediana y baja viscosidad tuvieron, respectivamente, 2.05, 1.66 y 1.36 veces menos peso que las larvas crecidas en la dieta de referencia. Las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=59.1$ ;  $p<0.0001$ ; concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=160.46$ ;  $p<0.0001$ ).

### Transformación de larva de tercer estadio a pupa

La transformación a pupa de las larvas de tercer estadio desarrolladas en la dieta convencional fue de 97.6%, valor que no fue diferente al alcanzado por las larvas de tercer estadio desarrolladas en dietas adicionadas con cualquiera de los ácidos empleados para disolver el quitosán (Cuadro 4). Por otra parte, la transformación a pupa de las larvas de tercer estadio desarrolladas en las dietas adiciona-

**Cuadro 4.** Transformación (%) de larvas de tercer estadio de *A. ludens* a pupas cultivadas en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con diferente concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	86.1 c	90.4 b	83.9 c
0.50	84.1 c	88.4 bc	87.9 bc
1.00	77.5 d	65.3 e	85.1 d
2.00	18.0 h	49.3 g	58.0 f

Control 97.6 a

Control de ácidos 96.8 a

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

das con diferentes pesos de quitosán de diferente viscosidad estuvo en el intervalo de 18.0 a 90.4%. La menor transformación se observó en la dieta adicionada con 2% de quitosán de baja viscosidad. Las diferencias encontradas fueron significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=46.83$ ;  $p<0.0001$ ; concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=439.32$ ;  $p<0.0001$ ).

### Transformación de pupa a adulto

En los diferentes tratamientos estudiados el intervalo de transformación de pupa a adulto fue de 97.3 a 100%, sin diferencias significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=0.63$ ;  $p=0.5317$ ; concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=0.18$ ;  $p=0.913$ ).

### Transformación global: desde larvas de primer estadio hasta adultos

La transformación desde larva hasta adulto en la dieta convencional y en la dieta adicionada con los diferentes ácidos empleados para disolver el quitosán tuvo un promedio de 96.5 individuos de 100 larvas iniciales (Cuadro 5). Por otro lado, en las dietas adicionadas con quitosán de diferentes viscosidades, y a concentraciones variables, la transformación estuvo en el intervalo de 18.1 hasta 90.0 individuos de 100 larvas iniciales. La transformación presentó un comportamiento inverso a la concentración y a la viscosidad del quitosán. De esta forma, la menor transformación se encontró en las dietas adicionadas con 2% de quitosán de baja viscosidad. Las diferencias encontradas en la transformación global fueron significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=48.65$ ;  $p<0.0001$ ; concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=417.99$ ,  $p<0.0001$ ).

**Cuadro 5.** Transformación global (desde larva inicial hasta adulto) de larvas de primer estadio de *A. ludens* cultivadas en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con distinta concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	84.9 bc	90.0 b	87.8 bc
0.50	83.0 c	87.8 b	83.4 c
1.00	76.2 d	65.0 e	83.8 c
2.00	18.1 h	48.9 g	58.0 f

Control 96.9 a

Control de ácidos 96.0 a

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

### Índice de inhibición del quitosán

Considerando los porcentajes de larvas sobrevivientes (%LS), de transformación de larva a pupa (%LP) y de pupa a adulta (%PA) se calculó el índice de inhibición del quitosán (IIQ). La expresión matemática para dicho índice fue:  $IIQ = \{1 - [(\%LS * \%LP * \%PA) / 100]\}$ . Dado que tanto en la dieta convencional como en la dieta adicionada con ácidos orgánicos, la transformación desde larva hasta adulto tampoco tiene 100% de eficiencia, es decir existe un porcentaje de muerte en las etapas de desarrollo de los inmaduros de *A. ludens*, dicho porcentaje se debe tomar en consideración al calcular el IIQ. Para este estudio la inhibición promedio (o muerte “natural”) en las dietas sin quitosán fue del orden de 0.033. Así que a los valores de IIQ obtenidos se les restó dicho valor y se obtuvo el IIQ real. En la Figura 1 se muestran los valores del IIQ real en las dietas adicionadas con quitosán. En la misma figura se observa que el IIQ se incrementa conforme aumenta la concentración de quitosán. Así mismo, se encontró un mayor IIQ para el quitosán de menor viscosidad. El IIQ real estuvo en el rango de 0.13 a 0.91 y el valor más grande fue para la dieta adicionada con 20 g L-1 de quitosán de baja viscosidad.

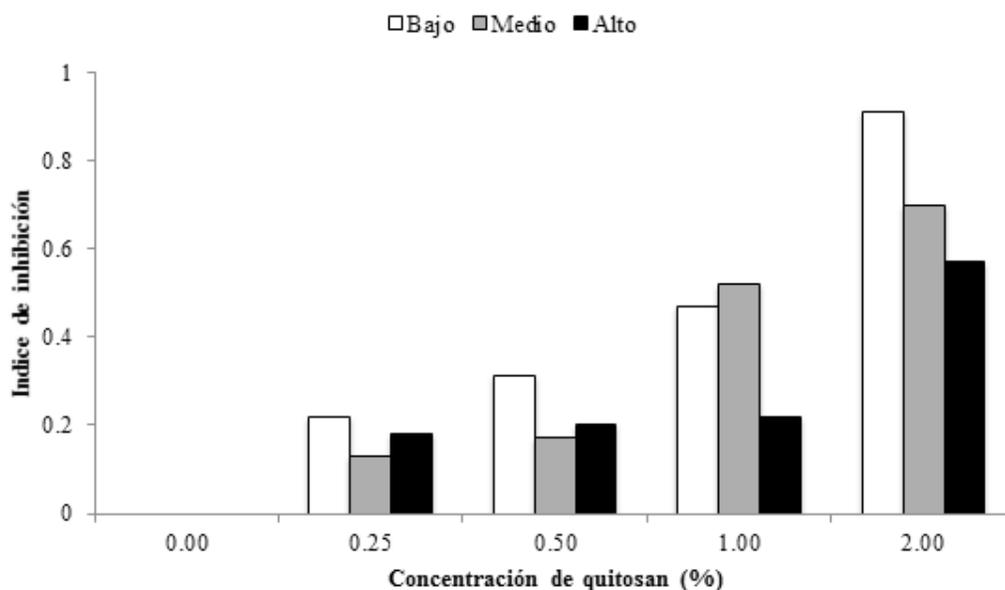
### Efecto del quitosán en el desarrollo de larvas de segundo estadio

En el Cuadro 6 se muestra el porcentaje de larvas que lograron alcanzar el tercer estadio de desarrollo cultivadas en dietas adicionadas con quitosán de distinta viscosidad y en diferentes concentraciones, en la dieta convencional y en la dieta convencional adicionada de los ácidos orgánicos. La sobrevivencia de las larvas fue menor conforme se incrementó la cantidad de quitosán en la dieta y en quitosán de menor viscosidad. El intervalo de larvas de tercer estadio en las dietas adicionadas con quitosán estuvo entre 88.1 (dieta adicionada con 2% de quitosán de baja viscosidad) y 97.2%. En las dietas de referencia el promedio

**Cuadro 6.** Promedio de larvas sobrevivientes (%) que alcanzaron el tercer estadio de desarrollo cuando se crecieron, a partir del segundo estadio, en dieta artificial adicionada con diferentes concentraciones de quitosán de diversas viscosidades

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	95.3 ab	97.2 a	94.1 abc
0.50	95.2 ab	94.1 abc	96.5 a
1.00	89.1 de	90.5 cde	93.0 abcd
2.00	88.1 e	88.6 de	91.3 bcde
Control	98.7 a	Control de ácidos 98.3 a	

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).



**Figura 1.** Índice de inhibición del desarrollo de larvas de *A. ludens* de primer estadio cultivadas en dietas adicionadas con quitosán. El valor del índice se calculó de acuerdo con lo explicado en el escrito.

de larvas que alcanzaron el tercer estadio fue de 98.5%. Las diferencias encontradas fueron significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=3.41$ ;  $p=0.0351$ , concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=30.19$ ,  $p<0.0001$ ).

### Tiempo requerido para que las larvas alcancen el tercer estadio de desarrollo

Las larvas de segundo estadio cultivadas en dietas adicionadas de quitosán, requirieron mayor tiempo para alcanzar el tercer estadio. Así mismo, conforme se incrementó la concentración de quitosán las larvas requirieron mayor tiempo para alcanzar el tercer estadio de desarrollo (Cuadro 7). Las larvas cultivadas en dietas adicionadas con 2% de quitosán de baja, media y alta viscosidad requirieron, respectivamente, 1.8, 1.7 y 1.5 veces más tiempo para alcanzar el citado estadio.

### Peso de larva de tercer estadio

Con excepción de las larvas que se cultivaron en dieta con 0.25% de quitosán de mediana viscosidad (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=4.8$ ;  $p=0.0093$ , concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=21.38$ ,  $p<0.0001$ ), las diferencias en los pesos de las larvas de tercer estadio no fueron estadísticamente significativas (Cuadro 8).

### Transformación de larvas de tercer estadio a pupas

La transformación de larva a pupa en las dietas adicionadas con quitosán estuvo en el rango de 0.89 a 0.98 veces el promedio de los tratamientos control. La transformación disminuyó conforme se incrementó la concentra-

**Cuadro 7.** Promedio de tiempo (días) requerido para que las larvas de segundo estadio de *A. ludens* alcanzaran el tercer estadio de desarrollo al cultivarse en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con diferente concentración. Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	12	12	11
0.50	11	12	11
1.00	16	15	13
2.00	18	17	15
Control 10 a	Control de ácidos 10 a		

**Cuadro 8.** Peso promedio alcanzado por una larva de tercer estadio de *A. ludens* al cultivarse, a partir del segundo estadio de desarrollo, en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con distinta concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	26.60 a	25.99 b	26.58 a
0.50	26.38 a	26.58 a	26.19 ab
1.00	27.67 a	27.40 a	26.63 a
2.00	27.66 a	27.52 a	27.02 a
Control 27.4 a	Control de ácidos 27.1 a		

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

ción de quitosán (Cuadro 9). Las diferencias observadas fueron significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F= 4.77$ ;  $p= 0.0095$ , concentración de quitosán  $gl= 3$ ;  $F = 27.28$ ;  $p<0.001$ ).

### Transformación de pupa a adultos

El intervalo de transformación de pupas a adultos, de las larvas cultivadas en dieta adicionada con quitosán, fue de 98.89 a 99.89%, sin diferencia estadística.

### Transformación global desde larva de primer estadio hasta adulto

La transformación desde larva de primer estadio hasta adulto en las dietas adicionadas con quitosán fue de 86.1 a 98.25% (Cuadro 10). La menor transformación se observó en la dieta adicionada con 2% de quitosán de baja viscosidad (sin diferencia estadística con las dietas adicionadas de 2% de quitosán de mediana y alta viscosidad. Las diferencias encontradas fueron significativas (tipo de quitosán  $gl=2$ ;  $F=5.73$ ;  $p = 0.0038$ , concentración de quitosán  $gl=3$ ;  $F=26.81$ ;  $p<0.0001$ ).

**Cuadro 9.** Transformación de larvas de tercer estadio de *A. ludens* a pupas (número de individuos/100 larvas) cultivadas en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con distinta concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	94.0 bc	95.7 b	92.7 bc
0.50	93.6 bc	93.4 bc	95.3 b
1.00	87.8 de	89.3 cde	92.1 bcd
2.00	86.5 e	87.9 de	90.5 cde
Control 97.6 a	Control de ácidos 96.3 a		

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

**Cuadro 10.** Transformación global (desde larva inicial hasta adulto) de larvas de *A. ludens* cultivadas a partir del segundo estadio en dietas adicionadas con quitosán de diferente viscosidad y con distinta concentración

Concentración (%)	Viscosidad		
	Baja	Media	Alta
0.25	93.2 b	95.2 b	92.6 b
0.50	93.0 b	92.9 b	95.2 b
1.00	86.8 c	88.8 c	91.5 b
2.00	86.1 c	91.5 b	89.6 c
Control	96.9 a	Control de ácidos 96.0 a	

Tratamientos con letras iguales indican que no hay diferencia significativa (Duncan,  $\alpha < 0.05$ ).

### Índice de inhibición del quitosán

El índice de inhibición del quitosán, calculado como se explicó en la sección de efecto del quitosán sobre larvas de primer estadio, en los diferentes tratamientos de este trabajo fue de 0.031 a 0.198 (Figura 2). El valor mayor se encontró en la dieta adicionada de 2% de quitosán de baja viscosidad.

### Efecto del quitosán en el desarrollo de larvas de tercer estadio

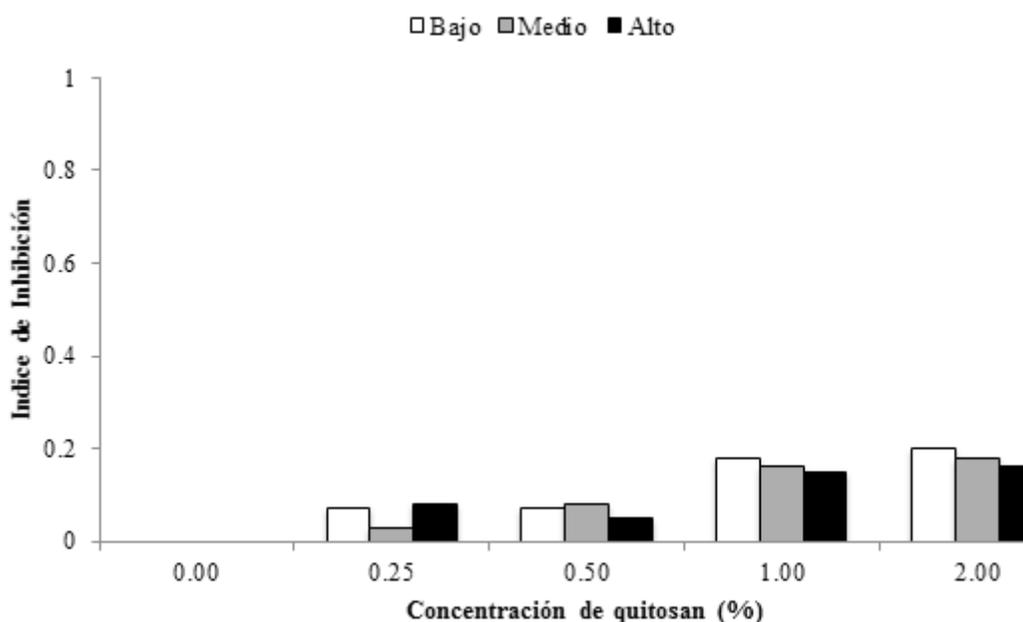
Ninguna de las variables estudiadas, larvas sobrevivientes, tiempo requerido para alcanzar el tercer estadio, peso de larva de tercer estadio, transformación de larvas a pupas, transformación de pupas a adultos y transfor-

mación global, fue modificada cuando las larvas de tercer estadio se cultivaron en dietas adicionadas con quitosán, es decir, los valores promedio de todas las variables fueron estadísticamente iguales. Por lo anterior, tampoco se encontró valor para el índice de inhibición.

### DISCUSIÓN

El retraso en el desarrollo, e incluso la muerte, de las larvas de *A. ludens* de primero y segundo estadio de madurez cuando se cultivaron en dietas adicionadas con quitosán, indudablemente se debe a la presencia de esta molécula. Dicho efecto puede ser resultado de las propiedades físicas y/o biológicas únicas que esta molécula posee (Hongpattarakere y Riyaphan, 2008) y no de un efecto de toxicidad, ya que dicha molécula es considerada como segura para la alimentación humana pues la dosis oral letal media, en ratones, de esta molécula es mayor a 16 g d-1 kg-1 de peso (Arai, Kinumaki y Fujita, 1968), mayor que el de la sacarosa,

Cuando el quitosán se disuelve en ácidos diluidos, la viscosidad de la disolución se incrementa de forma proporcional a su concentración. Debido a lo anterior, al adicionar distintas disoluciones de quitosán a la dieta de cultivo de



**Figura 2.** Índice de inhibición del desarrollo de larvas de *A. ludens* cultivadas a partir del segundo estadio, en dietas adicionadas de quitosán. El valor del índice se calculó de acuerdo con lo explicado en el escrito.

larvas de *A. ludens* se incrementó su viscosidad (se supone que al aumentar la concentración de quitosán en la solución se incrementó la viscosidad de la dieta, lo que se comprobó empíricamente ya que no se determinó instrumentalmente). A pesar de lo anterior, no se observó modificación en el desplazamiento de las larvas de primero y segundo estadio. El desplazamiento de las larvas (desde la superficie de la dieta hasta el fondo del contenedor) es un indicador de que la dieta tiene las condiciones físicas (pH, temperatura, viscosidad, porosidad y humedad) y el contenido de nutrientes (proteínas, carbohidratos, vitaminas) adecuadas para su desarrollo. Sin embargo, el quitosán tiene alta carga positiva y en solución se comporta como un poli-electrolito que interactúa con moléculas aniónicas (Ying, Huang y Qun, 2001), como las proteínas, por lo que es posible que durante el desplazamiento de las larvas de primero y segundo estadio se haya formado una capa de quitosán sobre el cuerpo de la larva, lo que pudo haber modificado el intercambio de gases, fenómeno ampliamente demostrado cuando los frutos se recubren con este material (Trejo, Aragón y Miranda 2001). Al modificarse el intercambio de gases la velocidad de desarrollo de las larvas será, larvas de primer estadio < larvas de segundo estadio < larvas de tercer estadio, situación que se puede deducir de los Cuadros 2 y 7.

Otra posibilidad es que las proteínas y otros nutrientes eléctricamente negativos formaran complejos con el quitosán, lo que limitaría el acceso a estos nutrientes tan importantes para el desarrollo de la larva, sobre todo porque las proteínas son la base para la supervivencia de la larva y los posteriores procesos de transformación a pupa y adulto (Jacome, Aluja, Liedo y Nestel, 1995). Así que a mayor concentración de quitosán en la dieta, menor disponibilidad de nutrientes y por tanto mayor número de larvas muertas y menor transformación a pupas. Esto último, como consecuencia probable de la baja acumulación de nutrientes en las larvas.

Alternativamente, la muerte observada en larvas de primero y segundo estadio puede ser resultado de la actividad biológica del

quitosán. En este sentido, las larvas pueden no poseer la(s) enzima(s) de degradación de esta molécula (posiblemente, las larvas sobrevivientes sí cuentan con esta información genética), por lo que al estar en el sistema digestivo de la larva, la microbiota (Ben-Yosef, Jurkevitch & Yuval, 2008) se viera alterada, ya que el quitosán posee actividad antifúngica (Salvador et al., 1999) y antibacteriana (Vishu, Varadaraj, Lalitha & Tharanathan, 2004). Así que, con la posible muerte de la microbiota benéfica de su tracto digestivo, las larvas no tienen acceso a factores sintetizados por los microorganismos y que son necesarios para su supervivencia.

La actividad antifúngica y antibacterial, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, expresada por este biopolímero, ha hecho que se emplee en la preservación de alimentos (Trejo et al., 2001), de semillas (Thobunluepop, Pan-in, Pawelzik & Vearasilp, 2009) e induce la formación de barreras de defensa que limitan la incidencia de patógenos en vegetales (Abeer, Ghoneem, El-Metwally & El-Hai, 2009; El-Ghaouth, Smilanick, Brown, Wisniewski & Wilson, 2000). La actividad antimicrobiana de esta molécula depende del grado de desacetilación (Rhoades y Roller, 2000), peso molecular (No, Park, Lee & Meyers, 2002), disolvente empleado (Qin, Li, Xiao, Liu, Zhu & Du, 2006) y especie de microorganismo (Tin, Sakharkar, Lim & Sakharkar, 2009).

Dado que en tercer estadio de desarrollo las larvas de *A. ludens* disminuyen ostensiblemente la adquisición de alimento (de hecho, no se observa tránsito de alimento en el sistema digestivo) y tienen poca movilidad, el efecto como barrera y/o antibiótica del quitosán ya no es observable.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo se encontró que el quitosán, disuelto en diferentes ácidos orgánicos, tiene capacidad para impedir el desarrollo de larvas de *A. ludens*, de primero y segundo estadio, pero no en larvas de tercer estadio. La sensibilidad mostrada por las larvas de primero y segundo, mayor en las primeras que en las

segundas, es un indicador de que es necesario el contacto interno para que el quitosán ejerza restricción en el desarrollo de las larvas. No se descarta la posibilidad de que el quitosán pueda ser tóxico para larvas de *A. ludens*.

## REFERENCIAS

- Abeer, A.; Ghoneem, M.; El-Metwally, A. & El-Hai, M. (2009). Induce systemic resistance in lupine against root rot diseases. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12, 213-221.
- Aluja, M. (1993). Manejo integrado de la mosca de la fruta, México, Trillas, 251 p.
- Arai, K.; Kinumaki, T. & Fujita, T. (1968). Toxicity of chitosan. *Bulletin Tokai Regional Fish Research Laboratory*, 43: 89-94.
- Armstrong, J.W. & Couey, M. (1989). Fruit disinfestation. Fumigation, heat, and cold. In: A.S. Robinson and G. Hooper [eds.]. *World crop pests. Fruit flies. Their Biology, Natural Enemies and control*. Vol. 3B. Elsevier. 411-424 pp.
- Ben-Yosef, M.; Jurkevitch, E. & Yuval, B. (2008). Effect of bacterial on nutritional status and reproductive success of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Physiological Entomology*, 38, 145-154.
- El-Ghaouth, A.; Smilanick, J.; Brown, E.; Wisniewski, M. & Wilson, C.L. (2000). Application of *Candida saitoana* and glycochitosan for the control of postharvest disease of apple and citrus fruit under semi-commercial conditions. *Plant Disease*, 84, 243-248.
- Frías, D.; Hernández, V. & López, L. 2009. Morphological characters and rapid identification methods of fruit fly larvae (Diptera: *Tephritidae*). In: *Proceedings of 7th Meeting of the Working Group of Fruit Flies of the Western Hemisphere*. Mazatlan, Sinaloa, Mexico, pp. 28-31.
- González-Aguilar, G.A.; Monroy-García, I.N.; Goycolea-Valencia, F.; Díaz-Cinco, M.E. & Ayala-Zavala, J.F. (2005). Cubiertas comestibles de quitosán. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada. *Simposio Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas*. Sección: Vegetales frescos cortados. La Habana, Cuba. 121-123.
- González, R.; Aragón, W. & Godínez, J.C. (2006). Inhibición del crecimiento de hongos y del desarrollo larvario de mosca de la fruta en el mango Ataulfo (*Mangifera indica* L.) empleando biorrecubrimientos. *Primer congreso estatal de biotecnología*. Tapachula, Chiapas, México.
- Hernández, E.; Flores, S.; Sosa, M.L. & Ezquivel, H. (2005). Tamaño de unidad muestral y número de repeticiones para la estimación de los parámetros de desarrollo de *Anastrepha obliqua* y *A. ludens* (Diptera: *Tephritidae*). *Folia Entomológica Mexicana*, 44, 155-164.
- Hernández, E.; Mangan, R.; Neck, S.; Rivera, P. & Toledo, J. (2007). Mortalidad de larvas de *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: *Tephritidae*) en mangos utilizando tratamiento hidrotérmico e hidrogenofriado. *Folia Entomológica Mexicana*, 46, 53-64.
- Hongpattarakere, T. & Riyaphan, O. (2008). Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosan prepared from carapace of black tiger shrimp. *Journal of Science Technology*, 30, 1-9.
- Jacome, I.; Aluja, M.; Liedo, P. & Nestel, D. (1995). The influence of adult diet and age on lipid reserves in the tropical fruit fly *Anastrepha serpentina* (Diptera: *Tephritidae*) *Journal of Insect Physiology*, 41, 1079-1086.
- Mangan, R.L. & Ingle, S.J. (1994). Forced hot-air quarantine treatment for grapefruit infested with Mexican fruit fly (Diptera: *Tephritidae*). *Journal of Economic Entomology*, 85, 1574-1579.
- No, H.K.; Park, N.Y.; Lee, S.H. & Meyers, S.P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- Orozco, D.; Schwarz, A. & Pérez, A. (1983). Manual de procedimientos de control de calidad, Programa Mosca del Mediterráneo. SARH. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. 137 pp.
- Qin, C.Q.; Li, H.R.; Xiao, Q.; Liu, Y.; Zhu, J.C. & Du, Y.M. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymer*, 63, 367-374.
- Rhoades, J. & Roller, S. (2000). Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 80-86.
- Rivera, J.P.; Hernández, E.; Toledo, J.; Salvador, M. & Silva, R. (2007). Dieta texturizada con agar para el desarrollo larvario de tres especies de moscas de la fruta (Diptera: *Tephritidae*). *Folia Entomológica Mexicana*, 46, 37-52.
- Salvador, L.; Miranda, P. & Aragón, N. (1999). Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*, 43, 18-23.
- Salvador-Figueroa, M.; Hernández-Ortiz, E.; Ventura-González, C.; Ovando-Medina, I. & Adriano-Anaya, L. 2013. Effect of chitosan coatings on the development of *Anastrepha ludens* (Loew) in mango fruits (*Mangifera indica* L) cv Ataulfo. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 14(1): 14-20.
- Stevens, L. (1991). Manual of standard operating procedures (SOP) for the mass-rearing and sterilization of the Mexican Fruit Fly, *Anastrepha ludens* (Loew). USDA-APHIS, South Central Region, Mission Texas. 39 pp.
- Thobunluepop, P.; Pan-in, W.; Pawelzik, E. & Vearasilp, S. (2009). The perspective effects of various seed coating substances on rice seed variety Khao Dawk Mali 105 storability II: The case study of chemical and biochemical properties. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12, 574-581.
- Thomas, D.B. & Loera-Gallardo, J. (1998). Dispersal and longevity of mass-released, sterilized Mexican fruit flies (Diptera: *Tephritidae*). *Environmental Entomology*, 27: 1045-1052.
- Thomas, D.B., & Mangan, R.L. (1997). Modeling thermal death in the Mexican fruit fly (Diptera: *Tephritidae*). *Journal of Economic Entomology*, 90, 527-534.
- Tin, S.; Sakharkar, K.R.; Lim, C.S. & Sakharkar, M.K. (2009). Activity of chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal Biological Sciences*, 5, 153-160.
- Trejo, V.; Aragón, N. & Miranda, P. 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 45: 1-5.
- Vishu, A.B.; Varadaraj, M.; Lalitha, R. & Tharanathan, R. (2004). Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochemical Biophysics Acta*, 1679, 137-146.
- Ying, X.; Huang, Y. & Qun, C. (2001). Evaluation of protein adsorption on chitosan surfaces with reflectometry interference spectroscopy. *Sensors*, 1, 148-160.