

¡Error! No se encuentran entradas de índice.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Departamento de Biotecnología

INSTITUTO DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
Consejo Superior de Investigaciones Científicas-
Universidad Politécnica de Valencia



TESIS DOCTORAL

“Aplicación de compuestos fototóxicos a la esterilización
fotoquímica de la mosca de los frutos *Ceratitis capitata*
Wiedemann”

Presentada por:
M^a Dolores Planes Ferrer

Dirigida por:
D. Eduardo Primo Yúfera
D. Miguel Ángel Miranda Alonso

Valencia, julio del 2000

D. EDUARDO PRIMO YÚFERA, Profesor Emérito del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, y

D. MIGUEL ÁNGEL MIRANDA ALONSO, Catedrático de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de compuestos fototóxicos a la esterilización fotoquímica de la mosca de los frutos (*Ceratitis capitata* Wiedeman)” realizada por M^a Dolores Planes Ferrer para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos suficientes para su lectura y defensa.

Y para que así conste a efectos oportunos, firman este certificado.

Valencia, 10 de julio del 2000

Fdo. Prof. Eduardo Primo Yúfera

Fdo. Dr. M. Ángel Miranda Alonso

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar el presente trabajo, deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Eduardo Primo Yúfera, como director del presente trabajo, por brindarme la oportunidad de conseguir junto a él el grado de doctor, así como por las enseñanzas recibidas, su atención y su colaboración prestada.

Al Dr. Miguel Ángel Miranda Alonso, como codirector de este trabajo, por su eficaz ayuda.

Al director del Instituto de Tecnología Química, Dr. Avelino Corma Canós, a su vice-director, Dr. Jaime Primo Millo y a su gerente Dra. Amparo Mifsud Corts, por poner a mi alcance los equipos y medios técnicos del Instituto.

A la Dra. Pilar Moya Sanz por su ayuda en las técnicas aplicadas.

Al Dr. Juan Pedro Navarro Aviñó por enseñarme el manejo del espectrofluorímetro.

A D. Manuel Adelantado Mateu por su ayuda en la realización de los espectros de RMN.

A la Conselleria d'Agricultura Pesca i Alimentació por concederme la beca para realizar esta tesis.

Al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas y al Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia por dejarme utilizar el espectrofluorímetro y las centrífugas.

Deseo agradecer y recordar a todos mis compañeros del Instituto de Tecnología Química con los que he estado trabajando estos años, por su amistad y apoyo mostrados durante todo este tiempo.

Por último, aunque no por ello menos importante a mi familia que en todo momento me apoyó y confió en mí, así como a mis amigos el Dr. Jordi Payá Bernabeu y Dña. Josefa Roselló Caselles que me apoyaron para su realización.

INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA

La mosca de la fruta o mosca del Mediterráneo se clasifica del siguiente modo (**Chinery, 1988**):

- CLASE: Insecta o hexápoda
- ORDEN: Diptera
- SUBORDEN: Cyclorrhapha
- SUPERFAMILIA: Schizophora
- SERIE: Acaliptrata
- FAMILIA: Tephritidae
- SUBFAMILIA: Trypetidae
- TRIBU: Trypetini
- GÉNERO: *Ceratitis*
- ESPECIE: *C. capitata*

Ceratitis capitata Wiedemann, apareció en la era terciaria. Es un insecto holometábolo cuya fase de desarrollo es: huevo, larva, pupa y adulto.

1.2. IMPORTANCIA DE LA PLAGA. DATOS ECONÓMICOS

La mosca de la fruta es originaria de África occidental y desde hace un siglo se propaga en todas las regiones subtropicales y templado-cálidas del mundo. Abunda en la cuenca Mediterránea, especialmente en España, África del Norte, Italia y el Mediodía de Francia (**Bovey, 1984**).

C. capitata es una de las plagas de la fruta más destructivas del mundo y la causante de importantes pérdidas económicas (**Weems, 1981**). Esto se debe a su amplia distribución, a su tolerancia a los climas cálidos, mejor que la mayoría de las especies de moscas de la fruta y por su amplio rango de huéspedes, que maduran en estaciones diferentes.

La mosca de la fruta ataca más de 260 diferentes tipos de frutos, flores, vegetales y frutos secos, aunque prefiere las frutas maduras carnosas. Los huéspedes varían en las diferentes regiones y en las diferentes estaciones y puede estar activa durante casi todo el año.

Debido a esta plaga, la citricultura española tiene grandes dificultades para la exportación de frutos a nuevos mercados extracomunitarios (Estados Unidos y Japón), que no permiten su importación sin un periodo de cuarentena.

En cada país, se adoptan medidas legales para el control en la frontera, cuyo objetivo es impedir la introducción de frutos infectados. Estos controles no proporcionan resultados absolutos, ya que son difíciles, sobre todo cuando los frutos albergan únicamente los huevos del parásito. Por esta razón se practica la desinsectación por diversos procesos de fumigación, por ejemplo bromuro de metilo, o frío en cámaras, los cuales tienen problemas de contaminación o suponen importantes gastos adicionales.

En E.E.U.U. se han hecho estudios sobre el impacto económico de la plaga. Sólo en el estado de California, un embargo podría ocasionar pérdidas económicas de 1,233 millones de dólares y unas pérdidas de 14,189 puestos de trabajo (**Batkin, 1995**).

En la Comunidad Valenciana se hacen tratamientos colectivos cuya finalidad es mantener la plaga a niveles bajos de población. La campaña combina tratamientos terrestres y tratamientos aéreos. Durante 1998, el gasto de la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació para combatir la mosca del Mediterráneo fue de 136,400,607 pesetas para tratamientos terrestres y 178,084,828 pesetas para tratamientos aéreos. Se aplicó en una superficie de 205,419 Ha G.V. (*) (1998). La Conselleria entregó gratuitamente a los agricultores con variedades tempranas de cítricos, 5 litros de malation 50% líquido emulsionable por cada 12 ha, para tratamientos terrestres.

(*) Datos proporcionados por la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació de la Generalitat Valenciana.

La evolución de los tratamientos aéreos, en los últimos años, es claramente ascendente, (se amplió de 2,443 miles de litros en 1988 a 4,503 miles de litros en 1998). A los gastos de tratamientos hay que añadir los gastos de las campañas de información a los agricultores y los de los estudios y prospecciones sobre los residuos de plaguicidas.

1.3. MEDIOS DE LUCHA ACTUALES

La lucha contra esta plaga es difícil debido al carácter intermitente de los ataques. Su detección se lleva a cabo con diversos tipos de trampas que permiten prever la aparición de la plaga.

En los años 60 se emplearon pulverizaciones con lindano y DDT, pero en la actualidad la lucha se realiza con insecticidas organofosforados (malation para agríos y frutales) mezclados con sustancias atractivas, sobre todo proteínas hidrolizadas (**Cañizo et al., 1981**). Estos compuestos se aplican en tratamientos aéreos de bandas alternadas (25 m de anchura de tratamiento y 50 m sin tratar), combinados con tratamientos terrestres, totales o por parcheo (pulverizando 1 m² de la copa del árbol orientada hacia el sur). En árboles frutales como los melocotoneros, cuando la fruta no está receptiva se hace por parcheo y cuando ésta empieza a colorearse se hace una aplicación total sin cebo. En los cítricos se aplica por parcheo.

La dosis en los tratamientos varía; en clausellina y okitsu se utiliza 0.3% de malation al 50% y 0.3% de proteínas (para evitar el manchado de la fruta); para el resto de frutales 0.5% de malation al 50% y 0.5% de proteínas. Se hacen aplicaciones cada 10 días en tratamientos terrestres cuando la fruta es receptiva y en los tratamientos aéreos se realizan 2 ó 3 al año dependiendo del número de capturas. La efectividad de los tratamientos es mayor cuando se efectúa sobre grandes superficies (**Bovey, 1984**).

En los tratamientos aéreos se utilizan 20 litros de caldo por hectárea y en los terrestres entre 50-250 litros de caldo por hectárea (dependiendo si es total o por parcheo y si estos son con mochila o con tanque).

1.4. PROBLEMAS DE LA LUCHA ACTUAL

Las pulverizaciones aéreas dan lugar a protestas en núcleos urbanos situados en áreas rurales y también de grupos ecologistas.

Por otra parte, las aplicaciones aéreas con malation y cebo no consiguen erradicar la plaga y son caras; por ello, las autoridades sanitarias y de agricultura buscan otros métodos, para erradicar la *C. capitata* y otras especies de moscas de la fruta, que eviten las consecuencias negativas para el medio ambiente.

1.5. NECESIDADES DE NUEVOS MÉTODOS

Para mantener una agricultura productiva, capaz de alimentar a la creciente población mundial, es necesario combatir eficazmente las plagas y no se puede renunciar a la lucha contra ellas, para lo cual se buscan métodos no contaminantes. Por esta razón, todos los países avanzados están desarrollando vías alternativas que sustituyan el uso masivo de los insecticidas tradicionales. Algunos de estos métodos se usan actualmente en mayor o menor escala, como son los siguientes:

1.5.1. Suelta de moscas estériles

La técnica de insectos estériles (SIT) se basa en criar un gran número de moscas y esterilizarlas con rayos gamma. Luego, estas moscas estériles son liberadas en las zonas infectadas. La población disminuye cuando gran cantidad de hembras copula con los machos estériles soltados, los cuales tienen que competir con los salvajes. Para que el método sea efectivo hay que tratar la zona

infectada primero con malation mezclado con cebo, después de una semana de este tratamiento se sueltan, desde el suelo, 2,584 machos estériles/ha y por semana y desde aviones se lanzan 646 machos estériles/ha y por semana. Se tratan unas 190,000 ha alrededor del área infectada.

Este método tiene una serie de inconvenientes, siendo los más importantes:

- a) La capacidad limitada de producción de moscas estériles; se producen 700 millones de moscas estériles por semana entre Hawai, Méjico y Guatemala (**Batkin, 1995**).
- b) Los problemas que derivan de una disminución de la capacidad de competición con los machos salvajes, debido a las características especiales de cría y esterilización.
- c) Las dificultades del sexado de la población, para evitar que la suelta de moscas sea mixta (machos y hembras), de modo que machos estériles copulen con hembras estériles y disminuyan la efectividad del tratamiento.
- d) El elevado coste de los tratamientos.

Actualmente, la división de Técnicas Nucleares en Alimentación y Agricultura de la FAO ha desarrollado un programa de investigación cuyos resultados permitan el sexado de los insectos en gran número (**Hendrichs et al., 1995**).

1.5.2. Combinación de la SIT con la suelta de parásitos de *C. capitata*

Para mejorar la efectividad del sistema, se ha ensayado, en EEUU, la suelta del braconido *Diachasmimorpha tryoni* Cameron, previa a la suelta de moscas estériles (**Wong et al., 1992**). No obstante, esta técnica no se ha generalizado. También se han ensayado contra *C. capitata*, los parásitos *Biosteres arisanus* Sonan y *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Himenóptero: BRACONIDAE).

1.5.3. Nuevas perspectivas

1.5.3.1. IGRs

Un método alternativo, que se está estudiando en nuestro laboratorio, puede ser la autoesterilización de moscas en el campo, colocando trampas localizadas, con atrayentes específicos para machos y hembras, junto con IGRs esterilizantes mezclados con un cebo. Se están ensayando quimioesterilizantes que actúan sobre los insectos, impidiendo la formación de los ovarios, la formación de espermatozoides o la síntesis de quitina, produciendo pérdidas de fecundidad o fertilidad, o malformaciones en el desarrollo larvario. Estos IGRs, miméticos de hormonas, presentan baja toxicidad para los mamíferos. Algunos datos publicados, indican la posibilidad de este método.

Moscas adultas de *C. capitata* alimentadas con 3000 ppm de diflubenzuron en el cebo, producen malformaciones e inhiben la ovoposición (Sarasua y Santiago, 1983). La adición de ciromacina al agua de bebida (1.0×10^4 ppm), durante 12 días afecta a la fecundidad (producción de huevos) y fertilidad de *C. capitata* (Budia y Viñuela, 1996; Jiménez-Peydro et al., 1995).

Son conocidos otros IGRs para reducir la fecundidad y la eclosión de los huevos de la familia Tephritidae, en especies como *Dacus oleae* Gmelin (Fytizas, 1976), y *Rhagoletis pomonella* Walsh (Duan et al., 1995; Langley y Hall, 1986).

También se han probado 10 IGRs, entre ellos lufenuron, triflumuron, etc. en *C. capitata* (Casaña et al., 1999). El lufenuron a 5000 ppm en el cebo reduce a cero la eclosión de huevos.

1.5.3.2. Los compuestos fototóxicos

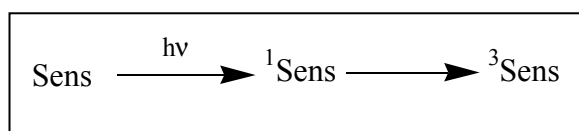
Otra línea de trabajo para la búsqueda de métodos menos contaminantes, se basa en la utilización de compuestos de baja toxicidad que, en presencia de la

luz, se hacen entomotóxicos; son los llamados compuestos fototóxicos (**Liquido et al., 1995**).

Todos ellos son sistemas de dobles enlaces conjugados.

1.6. MECANISMOS DE FOTOTOXICIDAD

Las oxidaciones fotosensibilizadas se inician mediante la absorción de luz por un sensibilizador, (colorantes, porfirinas, poliquinonas, furanocumarinas, α -tertienilo, etc.). El sensibilizador (Sens) pasa a un estado electrónico excitado por absorción de un fotón; el producto resultante está en un estado singlete de vida corta ($^1\text{Sens}$), o pasa a un estado triplete de vida larga ($^3\text{Sens}$).



Existen, fundamentalmente, dos tipos de mecanismo de oxidación fotosensibilizada (**Gollnick, 1968**): Tipo I y tipo II (Figura 1), aunque algunos fototóxicos siguen un mecanismo mixto.

En el proceso tipo I, el sensibilizador excitado, singlete o triplete, (Sens^*) reacciona con un sustrato para dar radicales que con el O_2 dan radicales peroxidantes (HOO , HO , O_2). Estos radicales, sobre todo el anión superóxido, pueden producir efectos patógenos de consideración en la estructura celular.

Las furanocumarinas, como la xantotoxina (8-metoxipsoraleno), reaccionan según este modelo.

En los procesos del tipo II, el sensibilizador excitado reacciona con oxígeno formando oxígeno singlete molecular ($^1\text{O}_2$), hiperoxidante el cual es altamente reactivo y puede oxidar a lípidos, proteínas o ácidos nucleicos produciendo la distorsión de membranas, inactivación de enzimas y muerte de las células, (**Primprikar y Coign, 1986; Heitz, 1987; Arnason et al., 1995; Daub**

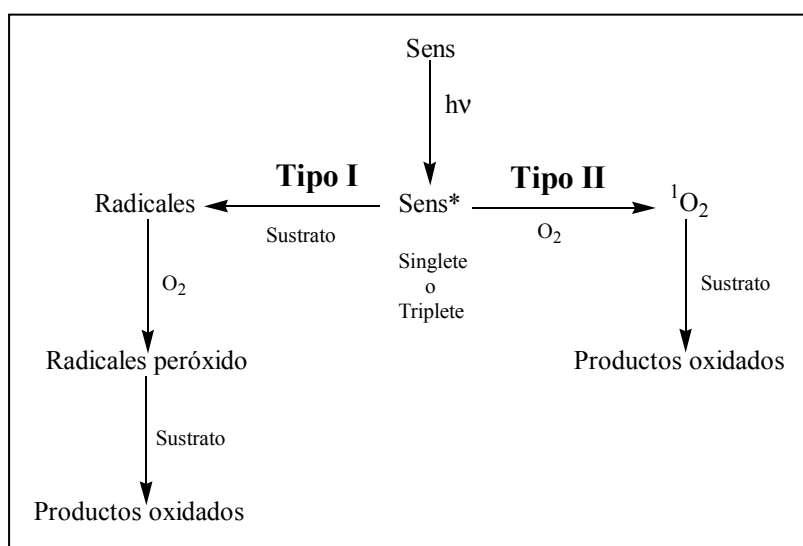
et al., 1995; Liquido et al., 1995). También estas reacciones pueden provocar modificaciones del ADN, tanto por mecanismos fotodinámicos como por mecanismos de fotoformación de radicales sin O_2 . Las formas activadas interaccionan con el ADN formando enlaces covalentes con bases pirimidínicas (Heitz, 1987; Marchant y Cooper, 1987; Heitz, 1987; Potapenko, 1991).

Son ejemplos de sensibilizadores de este tipo: el α -tertienilo, los colorantes xanténicos, las porfirinas, etc. (Foote, 1987).

Los mecanismos tipo I y II están siempre en competición. La preferencia de estas reacciones depende de las estructuras químicas del sensibilizador y del sustrato, así como de las condiciones de reacción.

Un ejemplo de fotosensibilizador mixto es el fenil-heptatriino.

Figura 1. Mecanismos de oxidación fotosensibilizada



Los compuestos fototóxicos más liposolubles son más efectivos porque tienen una mayor penetración para alcanzar el ADN y la pared mitocondrial. Otros se localizan en la membrana plasmática, causando cambios de permeabilidad para Ca^{++} y K^+ y salida de plasma (Valzeno y Tarr, 1995).

La resistencia de los insectos a la acción fototóxica puede deberse, principalmente, a una captación de los radicales oxidantes por antioxidantes de los insectos o a la degradación rápida de los colorantes por enzimas.

Entre los captadores de radicales, el glutatión, la catequina, la epicatequina, los carotenoides, los flavonoides y otros reductores, como la cisteína, con grupos tiol (R-SH), tienen un papel metabólico esencial. Son compuestos capaces de reducir tales grupos con formación de enlaces S-S.

Otro mecanismo de defensa es la desintoxicación por enzimas, que aceleran su degradación metabólica, principalmente por tres mecanismos:

- Oxidación por monoxidasas mixtas, P-450.
- Destrucción de $^1\text{O}_2$ por superóxido dismutasa y catalasa.
- Destrucción de radicales peróxido por la glutatión transferasa (GST) y glutatión reductasa (Lee y Berenbaum, 1993).

1.7. LOS INSECTICIDAS FOTOTÓXICOS

1.7.1. Desarrollo histórico

El primer estudio documentado en el que se consideró la luz como la causante de un aumento de la toxicidad fue debido a **Marcacci (1988)**, el cual encontró que algunos alcaloides eran más efectivos contra plantas, semillas y huevos de anfibios, en presencia de la luz solar que en oscuridad.

A principios del siglo XX, **Raab (1900)** publicó un trabajo acerca de los efectos de la acridina en presencia de luz sobre microorganismos. **Jodlbauer y von Tappeiner (1904)** demostraron que, para este efecto, se requería oxígeno e inventaron el término "acción fotodinámica".

Barbieri (1928), con larvas de *Anopheles sp.* y *Culex sp.*, vio que, con la aplicación de luz, la acción de la eritrosina B era tóxica. Posteriormente **Schildmacher (1950)** trató 3 especies de larvas de mosquito (*Anopheles*

maculipennis Meig, *Anopheles superpictus* Meig y *Aedes aegypti* L.) con una serie de soluciones de colorantes y exposición a la luz solar.

Más tarde, **Spikes y Glad (1964)** definieron la acción fotodinámica como la causante de daños celulares o moleculares.

Hayes y Schechter (1970), cuantificaron la toxicidad del azul de metileno sobre larvas de mariposas (*Laspeyresia pomonella* L.) con bajos y largos periodos de exposición solar.

A partir de 1970, se van conociendo las actividades fototóxicas de diversos compuestos, sobre distintas especies de insectos.

1.7.2. Compuestos aleloquímicos

Muchos fototóxicos son producidos por plantas, como mecanismos de su defensa, siendo más abundantes en climas secos, sobre todo de los desiertos (**Heitz, 1995**). En la página 16 se dan las estructuras de los más importantes, cuyas actividades se describen a continuación.

1.7.2.1. Tiofenos y análogos

El α -tertienilo (α -T.T) es producido como un metabolito secundario de muchos géneros de *Asteraceae*, tales como *Echinops*, *Centaurea*, *Eclipta*, *Berkleya*, *Flaveria*, *Porophyllum*, *Dycsodia* (**Kagan, 1991**) y ha sido ensayado como nematocida (**Gommers y Geerligs, 1973**). Su mecanismo de acción por oxígeno singlete ha sido estudiado con detalle (**Bakker et al., 1979; Gommers et al., 1980**) y posteriormente, **Reyftmann et al. (1985)** mostraron que el α -T.T exhibe un estado triplete excitado de larga vida que le permite reaccionar muy favorablemente con el O_2 , produciendo 1O_2 .

El α -T.T se degrada a la luz solar, con una vida media de 4 h y se activa con UV-A (300-400 nm). Peroxida lípidos de membrana, proteínas y ADN y baja los niveles de glutatión-SH (**Hasspieler et al., 1990**).

La CL_{50} del α -T.T por IP en ratas es 110 mg/Kg (límites entre 84-153) a las 24 h, n = 100. Altas concentraciones de α -T.T son fotosensibles para la piel aunque no es mutagénico (**Arnason et al., 1995**).

Sobre *Manduca sexta* (L.) Sphingidae el α -T.T con iluminación, produce retraso en la formación pupal y la ausencia de emergencia de los adultos (**Downum et al., 1984**).

Kagan et al. (1984b) mostraron el primer ejemplo de inactivación de acetilcolinesterasa "in vivo" por un producto fotoactivo. El α -T.T, así como 3 isómeros del mismo, produjeron la inhibición de esta enzima en larvas de mosquito *Aedes* con irradiación UV.

El ciano- α -T.T se ha ensayado en campo para controlar poblaciones de *Culex sp.* y *Aedes sp.* (**Fields et al., 1991**) y es 3 veces más fototóxico que α -T.T. El fenil-heptatriino es un potente fototóxico con un sistema conjugado, es semejante al del α -T.T y ha sido ensayado frente *Aedes* (**Wat et al., 1981; Arnason et al., 1981a; Arnason et al., 1981b**). Estos poliinos necesitan al menos 3 enlaces triples para ser fototóxicos (**Marchant, 1987**) y con grupos aromáticos son más activos (**Marles et al., 1991**). Su toxicidad sobre larvas del mosquito *Aedes* condujo a su aplicación como larvicida comercial en charcas.

Kagan y Cha (1983) vieron que el fenil-heptatriino y el α -T.T tienen actividad ovicida sobre los huevos de *C. capitata* y de *Drosophila melanogaster* Meig en oscuridad, y que con luz UV, la toxicidad se multiplicaba por 37 y 4333 veces, respectivamente.

Otros compuestos poliacetilénicos, también tienen actividad ovicida para huevos recién puestos de la mosca de la fruta, la cual se potencia mediante irradiación con UV-A (**Kangan et al., 1984**).

Otros investigadores han estudiado la acción de poliacetilenos y derivados tiofénicos sobre diversas especies; bacterias y levaduras (**McLachlan et al., 1986**), peces de agua dulce (**Kagan et al., 1986**), larvas de *Aedes* (**Kagan et al., 1986; Arnason et al., 1986**) y larvas de lepidópteros (**Iyengar et al., 1990**).

Towers et al. (1984) patentaron la utilización de poliacetilenos sobre el control de plagas (algas, hongos, nemátodos o invertebrados herbívoros).

1.7.2.2. Quinonas (Hipericina y cercosporina)

Es conocido desde hace tiempo que los animales de granja, al comer algunas plantas del género *Hypericum*, se hacían sensibles a la luz. Esta sensibilidad producía inflamación en la piel (**Horsley, 1934**) y estos efectos se debían a la hipericina.

La cercosporina se aisló de los hongos *Cercospora belicota* Sacc. (**Balis y Payne, 1971**) y *Cercospora personata* Sacc. que manchan las hojas del cacahuete (**Venkataramani, 1967**) y cuando la cercosporina se aplica a ratones, larvas de insectos, hongos y bacterias y estos se exponen a la luz, se produce mortalidad alta (**Samuels y Knox, 1989**).

Yamazaki et al. (1975) observaron la semejanza entre las estructuras y actividades de la hipericina y la cercosporina.

En consecuencia la cercosporina se ha usado como fungicida (**Tuveson, 1986**).

Daub (1982) observó que la mortalidad de las células está en relación con la concentración de cercosporina, con la intensidad luminosa, con el rango de luz y con los captadores de radicales y que los carotenoides producen resistencia de los hongos a la cercosporina. Posteriormente, **Daub y Hangarter (1983)** observaron que la cercosporina produce radicales peróxido así como oxígeno singlete bajo la exposición de luz en presencia de oxígeno.

Fields et al. (1991) observaron que la hipericina se activa a 540-610 nm y la vitamina E o los carotenoides anulan la fototoxicidad por captura de los peróxidos formados.

1.7.2.3. Furanocumarinas

A las furanocumarinas se han atribuido ciertas respuestas fototóxicas en el ganado (**Ivie, 1978**).

Berenbaum (1978) observó que al suministrar la furanocumarina lineal xantotoxina a las larvas de *Spodoptera eridania* Cramer, se observaba una débil toxicidad que aumentaba cuando se iluminaban con luz UV. También observó que las larvas que no habían muerto, sufrían un retraso en la pupación.

La actividad biológica de las furanocumarinas es debida a la intercalación de la molécula en la doble hélice de ADN donde, bajo la activación de luz UV, se forman enlaces covalentes con las bases de pirimidina (**Scott et al., 1976**). **Song y Tapley (1979)** demostraron que el mecanismo de acción fototóxica es del tipo I. **Berenbaum y Feeny (1981)** publicaron que las furanocumarinas angulares, como la angelicina, reducen la velocidad de crecimiento y la fecundidad de las larvas de *Papilio polyxenes* Fabr., mientras que la xantotoxina es poco tóxica para estos insectos. Los autores interpretan que las formas angulares de las furanocumarinas se desarrollaron evolutivamente más tarde, para proteger a las plantas de los herbívoros.

Ivie et al. (1983), en un artículo sobre el metabolismo de las furanocumarinas en larvas de *P. polyxenes*, mostraron que los insectos detoxifican estos compuestos en el intestino medio, antes de la absorción. Más tarde, se publicó que los incrementos de fototoxicidad de las furanocumarinas angulares con respecto a las lineales son debidas a la velocidad más lenta de apertura metabólica del anillo furano de los derivados angulares (**Bull et al., 1984; Ivie et al., 1986**).

Ashwood-Smith et al. (1984) publicaron que las larvas de *P. polyxenes* son capaces de degradar xantotoxinas a compuestos biológicamente inactivos por oxidación enzimática. Estudios en vivo sobre la inactivación de xantotoxinas en larvas de *P. polyxenes* y en *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, mostraron que la

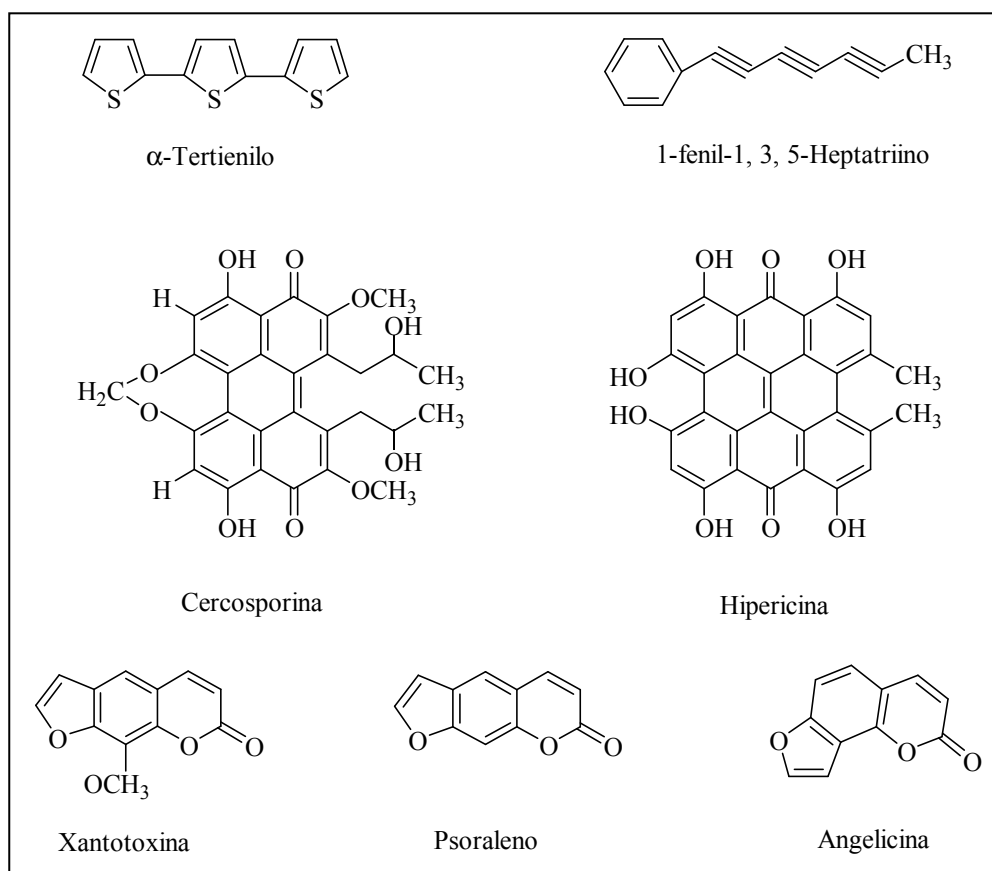
degradación del compuesto, en los primeros estadios larvarios, era 6 veces más rápida que en los estadios más avanzados (Bull et al., 1986).

Los fotoderivados del psoraleno, que son aldehídos fenólicos, son tóxicos y pueden ser responsables del efecto sobre el ADN. Producen la muerte en larvas de lepidópteros y retraso en la pupación (Berenbaum, 1987).

Los estudios más recientes indican que el 8-metoxipsoraleno impide la eclosión de huevos en *D. melanogaster* (Weaver, 1987) y que la xantotoxina aplicada a larvas del quinto estadio de *M. sexta* produce lesiones cuticulares (Lee y Berenbaum, 1993).

También se ha observado la actividad fototóxica de una serie de derivados cumáricos frente a *Fusarium sp.* (Borges, 1995).

Figura 2. Estructura de algunos compuestos aleloquímicos



1.7.3. Colorantes

A comienzos de 1971, un grupo de científicos de la Universidad de Virginia, demostraron el efecto fototóxico de algunos colorantes sobre adultos de *Musca domestica* L. Consideraron, como variables, la fuente e intensidad de luz, el tiempo de exposición, y la concentración de colorantes en la dieta y encontraron un alto porcentaje de mortalidad (**Yoho et al., 1971; 1973; 1976; Fondren et al., 1978; Fondren y Heitz, 1978b; 1979; Crouse y Heitz, 1982**).

Pimprikar et al. (1980; 1980a) ensayaron la eritrosina B, en pulverizaciones en el suelo de granjas avícolas, contra larvas de *M. domestica*. Con un tratamiento semanal, durante 4 semanas, redujeron la población de larvas en un 90%.

Los colorantes, por sí mismos y sin luz, también tienen efecto sobre el desarrollo de *M. domestica*; las larvas que crecen en medio de agar con colorantes en oscuridad, sufren un retraso en la pupación o ausencia de pupación, menor peso de pupas y ausencia de emergencia de adultos. Los adultos que emergen de larvas tratadas tienen un 75% de mortalidad con 24 h de luz solar (**Sakurai y Heitz 1982; Koehler y Patterson, 1986**).

Otros resultados demostraron los efectos sobre las cucarachas *Periplaneta americana* L. y *Blatta orientalis* L. (**Weaver, 1987**).

En *Musca autumnalis* De Geer (**Fondren y Rebeiz, 1978a**), estudiaron el TL_{50} (h) de algunos colorantes a la concentración de 5.0×10^{-3} M, irradiando a 40 Wm^{-2} durante 3 h, obteniendo tiempos entre 1.5 y 9.3 h.

También se han publicado datos sobre la fototoxicidad de colorantes en larvas de mosquito (**Pimprikar et al., 1979; Carpenter y Heitz, 1980; Lemke et al., 1986**), en larvas de *Pieris brassicae* L. (**Lavialle y Dumortier, 1978**) y en moscas de la fruta como en *Anastrepha ludens* Loew (**Moreno y Mangan, 1995**).

La eritrosina B y el rosa de Bengala tienen poder ovicida y los huevos de mosquito tratados no eclosionan o dan larvas anormales (**Pimprikar y Coign, 1986**).

La eritrosina B fue registrada por la compañía química Hilton-Davis, como insecticida fototóxico contra *M. domestica*, en granjas.

Otros estudios realizados con larvas de mosquito demostraron que las formas insolubles de los colorantes, dispersadas con emulgentes, son 60 veces más activas (**Heitz, 1987; Carpenter et al. (1985); Respicio et al. 1985**) estudiaron el efecto de eritrosina B y eritrosina B-fluoresceína, en forma ácida, dispersadas con emulgentes comerciales o con SDS, en *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, siendo más activas que las formas solubles en agua.

En larvas de *M. domestica* se ha estudiado el efecto de la eritrosina B con adición de antioxidantes (β -caroteno y α -tocoferol) viendo que la toxicidad era menor que con eritrosina B sola (**Robinson y Bentson, 1985**).

Algunas mezclas de colorantes causan efectos sinérgicos en insectos. Por ejemplo la uranina, que no es fototóxica, cuando se añade a colorantes tóxicos, como eritrosina B causa un mayor porcentaje de mortalidad en larvas de *Aedes triseriatus* Say y *M. domestica* (**Carpenter et al., 1981; 1984**).

También se ha estudiado la toxicidad de floxina B-uranina en 6 especies de insectos beneficiosos. Se vio que no había mortalidad por contacto, pero sí por ingestión (**Dorwell, 1997**).

Respecto a la acción fototóxica de colorantes sobre la *C. capitata*, no se había publicado ningún trabajo hasta que, recientemente, se ha sentido la necesidad de sustituir la lucha basada en pulverizaciones terrestres o aéreas con insecticidas fosforados y cebos, por otros tratamientos no contaminantes.

En esta situación, en los últimos años han aumentado los trabajos sobre este problema. El Departamento de Agricultura de los E.E.U.U. (ARS) ha ensayado la mezcla equimolecular de uranina-floxina B como fototóxico contra la *C. capitata*, por ingestión, usando cebos con atrayentes alimentarios. Los

resultados han sido satisfactorios y han comenzado experiencias en gran escala, de pulverizaciones aéreas colorante + cebo (**Liquido et al., 1995**).

Al mismo tiempo, se ha estudiado, en los E.E.U.U., la acción de la combinación floxina B-uranina, sobre otros tefrítidos que son plagas importantes (**Liquido et al., 1995a; Moreno y Mangan, 1995; Mangan y Moreno, 1995**).

En esta tesis, se hace un estudio comparativo entre diferentes colorantes (rosa de Bengala, floxina B, eritrosina B, eosina amarilla, azul de metileno, naranja de acridina, rojo neutro y uranina) respecto a su actividad fototóxica frente a los adultos de *C. capitata*, utilizando placas atrayentes con cebo alimenticio más colorante.

En la figura 3 se dan las estructuras de los colorantes utilizados.

Además, se ha estudiado el efecto sinérgico o antagonista de combinaciones de dos colorantes en diversas proporciones molares y también la posibilidad de aumentar la mortalidad mediante aditivos oxidantes (azodicarbonamida (AZO) o peróxido de benzoilo (PBenz)).

En la figura 4 se dan las estructuras de los aditivos ensayados.

Figura 3. Estructura de los colorantes ensayados

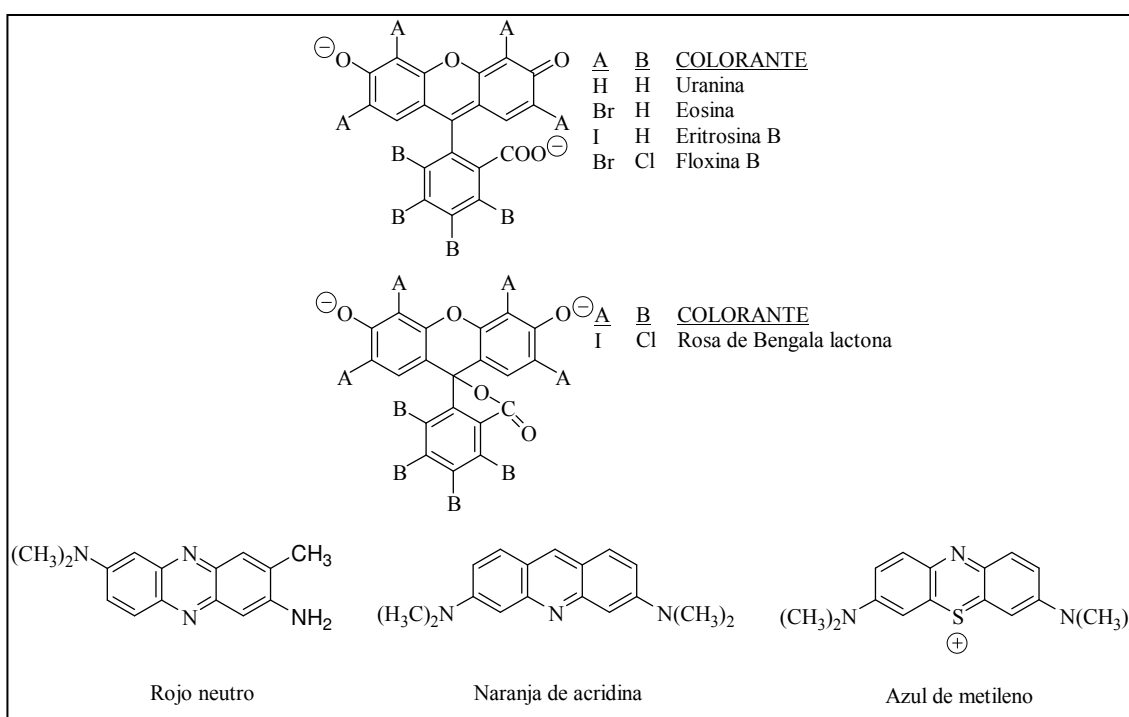
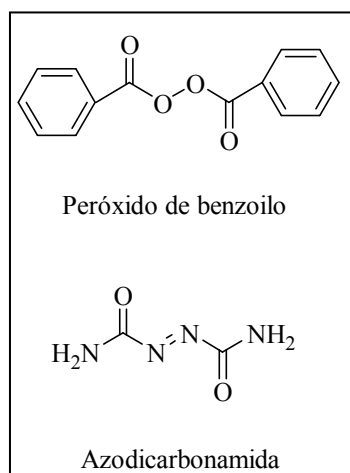


Figura 4. Aditivos



1.7.4. Tetrapirroles cíclicos fotoactivados

Las porfirinas, intermediarias de la síntesis de hemo o de clorofila, son fototóxicos muy activos. Si se aumentan los niveles de estos tetrapirroles en las células de los insectos, se produce la muerte de éstos al recibir la luz.

La actividad fototóxica de las porfirinas y los mecanismos de acción fotodinámica fueron estudiados por primera vez por **Rebeiz et al. (1984)**. Demostraron que, en las plantas, se puede inducir la acumulación de tetrapirroles por tratamientos químicos y que aquellas pueden ser destruidas rápidamente a la luz por la acción fototóxica.

El precursor metabólico que puede causar la acumulación de los tetrapirroles cíclicos activables fotodinámicamente es el ácido δ -aminolevulínico (ALA), un aminoácido de 5 carbonos. Este compuesto, unido a ciertos moduladores como el 2, 2'-dipiridilo (DPY) o a varios derivados de las fenantrolinas, causan la acumulación de niveles altos de protoporfirina IX (PROTO) en células animales y vegetales, y esta acumulación hace a las células más susceptibles a la luz (**Rebeiz et al., 1995**).

Posteriormente, Rebeiz demostró que el sistema actúa también como entomofototóxico. Ensayaron ALA y DPY, en larvas de *Trichoplusia ni* Hubner y *Heliothis zea* Boddie, por aspersión y por ingestión. Vieron que la acumulación

de tetrapirroles causaba la muerte de las larvas tratadas cuando se exponían a la luz, probablemente por la formación de oxígeno singlete. También estudió cuantitativamente la acumulación de porfirinas en larvas **(Rebeiz et al., 1988)**.

Con *T. ni*, se han ensayado otros moduladores del metabolismo de porfirinas, obteniendo los mejores resultados con 1,10-fenantrolina **(Rebeiz et al., 1990)** y también la relación entre estructura y actividad en fenantrolinas **(Gut et al., 1993)** y en análogos de DPY **(Gut et al., 1994)**.

Rebeiz et al. (1995) observaron que la protoporfirina formada en las larvas desaparece en pocas horas.

Algunos herbicidas, en plantas, producen acumulación de protoporfirinógeno que pasa a protoporfirina fotoherbicida. En algunas especies, una enzima foliar destruye el protoporfirinógeno y la planta se hace resistente al herbicida; esta destrucción es inhibida con ditioeritrol, β -mercaptoetanol y ácido ascórbico. También se ha observado que la adición de EDTA impide la transformación de protoporfirina en protohemo **(Jacobs, 1994; 1996)**.

Frente a *C. capitata*, el equipo de Jori en la Universidad de Padua ha estudiado el efecto de la ingestión directa de hematoporfirina (HP) e irradiación posterior, obteniendo una mortalidad elevada. También han ensayado la HP con *Bactrocera oleae* Gmelin y *Stomoxys calcitrans* L. **(Ben Amor et al., 1998; 1998a; 2000)**.

En esta tesis se estudia la actividad del ácido δ -aminolevulínico, a distintas concentraciones, con modulador 1,10-fenantrolina, manteniendo una proporción $\frac{3}{4}$ molar de éste con respecto al ALA, y con dos intensidades de irradiación de 40 y 400 Wm^{-2} .

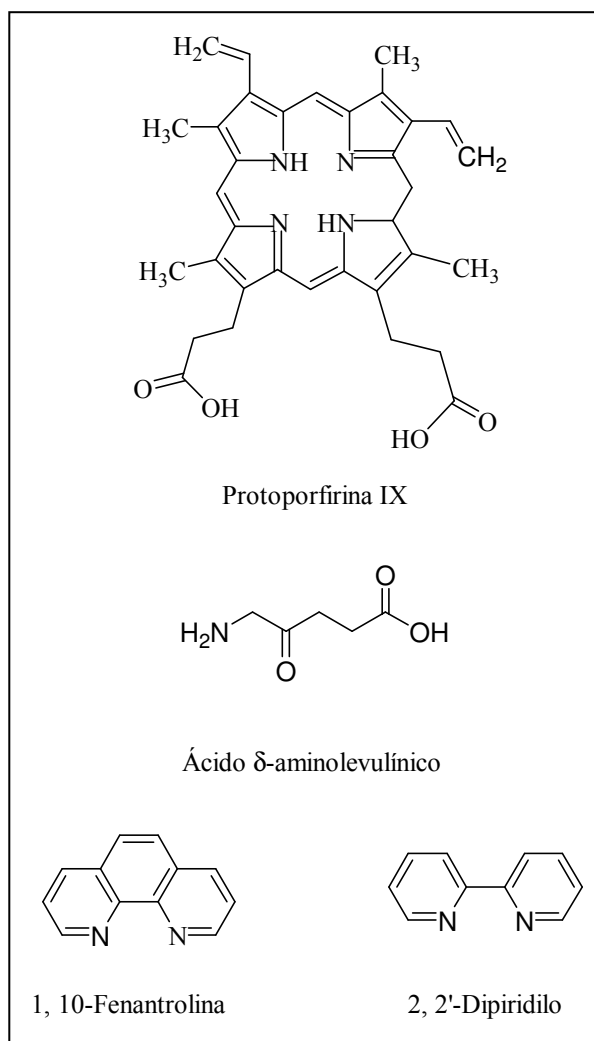
Una vez estudiada la actividad de este precursor se ha valorado el efecto de añadir algunos aditivos, sobre la mortalidad, como ya se hizo con los colorantes.

También hemos estudiado la variación de las concentraciones de protoporfirina cuando las moscas ingieren ALA-Oph en oscuridad y su degradación post-comida en oscuridad o con luz del insectario (2 Wm^{-2}). Las

mismas curvas se han estudiado con ingestión de protoporfirina, deduciendo consecuencias sobre la eficacia de ambas posibilidades.

En la figura 5 se dan las estructuras de la protoporfirina y sus precursores.

Figura 5. Protoporfirina IX y sus precursores



MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INSECTOS

La *C. capitata* se cría en insectario en las siguientes condiciones: 25-27°C; 55-65% de humedad relativa y fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad).

Las larvas se alimentan con una mezcla de salvado de trigo: sacarosa: levadura de cerveza: nipasol: nipagín: agua: ácido clorhídrico 35% (20: 5: 2.5: 0.5: 0.5: 10: 0.1, p/p).

Las moscas adultas que emergen se mantienen en las mismas condiciones del insectario y se alimentan con fructosa, autolisado de levadura (4:1, p/p) y agua (en frascos de cristal con una tira amarilla de tela porosa). Se utilizan moscas de 5-6 días para los ensayos.

2.2. PRODUCTOS QUÍMICOS

Naranja de acridina base (75%); rojo neutro (Basic Red 5, C.I. 50040); azul de metileno (85%) (Basic Blue 9, C.I. 52015); rosa de Bengala (lactona 95%) y tween-80, se obtienen de Aldrich (Madrid, España). Floxina B (80%) (C.I. 45410; Cianosina); uranina (C.I. 45350); eritrosina B (ácido 95%) (C.I. 4543:2); eosina Y (ácido 99%) (C.I. 45380:2); 1,10-fenantrolina monohidrato (Oph); ácido δ -aminolevulínico (clorhidrato) (ALA); protoporfirina IX (95%) (PP) y autolisado de levadura se obtienen de Sigma (Madrid, España). Azodicarbonamida (AZO) y peróxido de benzoilo (PBenz) se obtienen de Fluka (Madrid, España); agar purísimo de Panreac (Barcelona, España); licor de maíz de Hispano Química, S.A. (Valencia, España), fructosa de Santiveri (Barcelona, España) y glucosa-fructosa de Roquette Laisa España, S.A. (Barcelona, España).

Los colorantes se usan en la forma no salina insoluble en agua, excepto el azul de metileno.

2.3. ENSAYOS DE FOTOTOXICIDAD

2.3.1 Ensayos por ingestión con colorantes

Las moscas, inmediatamente después de su eclosión, se introducen en grupos de 20 (sexos mezclados), en cajas de metacrilato (10x10x10 cm) manteniéndolas en las condiciones del insectario.

Las moscas se mantienen en ayunas durante 10 h (sólo con H₂O). En 4 cajas se introduce la comida con colorante y, en otras 4, la comida sin colorante; las cajas se mantienen durante 14 h en oscuridad.

Las moscas de 2 cajas con comida tratada y las de 2 cajas con comida no tratada se pasan a placas Petri de Ø 9 cm, sólo con agua, para irradiarlas durante 8 h.

Las otras cuatro cajas, se mantienen en oscuridad sólo con agua, durante estas 8 h.

Las moscas irradiadas se llevan a las cajas de metacrilato (10x10x10 cm), se colocan en el insectario con las no irradiadas, y se alimentan con comida normal. Se estudia la mortalidad a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h después del periodo de ingestión.

La comida cebo consiste en fructosa: autolisado de levadura, 4:1, p/p (2 g/caja) y se ofrece en placas transparentes de plástico de Ø 1 cm. El H₂O se coloca en viales de vidrio de 9 ml con una tira amarilla de tejido poroso.

Los colorantes se disuelven previamente en etanol + 2% de tween-80, la disolución se mezcla con el alimento (1 ml disolución/1 g de comida) y se evapora el disolvente con nitrógeno.

Se hacen 5 repeticiones, con moscas de generaciones diferentes.

La irradiación se realiza bajo 16 lámparas de luz fluorescente blanca (Philips PL-C, 26 W) con una iluminación uniforme en todas las placas. La intensidad de la irradiación en superficie es de 40 Wm⁻² (medida con un radiómetro Graseby Optronics 371R).

2.3.2. Ensayos por ingestión con ALA-Oph

Las moscas, inmediatamente después de su eclosión, se introducen en grupos de 30 (sexos mezclados), en cajas de metacrilato (10x10x10 cm) manteniéndolas en las condiciones del insectario y en ayunas, durante 10 h (sólo con H₂O).

En 6 cajas se introduce la comida con ALA-Oph y en otras 6 comida sin tóxico. Todas las cajas se mantienen durante 14 h en oscuridad.

Las moscas de 3 cajas con comida tratada y las de 3 cajas con comida no tratada se pasan a cajas (10x10x5 cm) con la cara superior de metacrilato y el resto de caras de malla metálica de Ø 8 mm; inmediatamente se irradian, durante 6 h.

Las otras seis cajas, se mantienen en oscuridad sólo con agua, durante estas 6 h.

Las moscas irradiadas se llevan a las cajas de metacrilato (10x10x10 cm), se colocan en el insectario con las no irradiadas, y se alimentan con comida normal. Se cuenta la mortalidad a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h, desde el fin del periodo de ingestión.

La comida cebo consiste en licor de maíz (corn steep liquor): jarabe de fructosa-glucosa: agar: H₂O, (40%: 40%: 1%: 19%), (2 g/caja), y se ofrece en placas transparentes de plástico de Ø 1 cm. El H₂O de bebida se coloca en viales de vidrio de 9 ml con una tira amarilla de tejido poroso.

ALA-Oph se disuelven previamente en agua + 2% de tween-80 y la disolución se mezcla con el alimento (1 ml disolución/1 g de comida).

Se hacen 5 repeticiones, con moscas de generaciones diferentes.

La irradiación se realiza bajo 1 ó 4 lámparas halógenas de cuarzo (Osram, 400 W, 3300 lumen, modelo HQIT), con una iluminación uniforme en todas las cajas. La intensidad de la irradiación en superficie es de 40 Wm⁻² y 400 Wm⁻² respectivamente, (medidas con un radiómetro Graseby Optronics 371R).

Bajo nuestras condiciones de irradiación, la temperatura, a los niveles de las cajas, nunca excede de 32°C, mediante una ventilación con aire frío que renueva el ambiente de la zona irradiada. El aire frío producido por un aparato de aire acondicionado se canaliza hacia la zona de irradiación, mediante tubos de plástico.

Para determinar la actividad fototóxica, en función del tiempo de ingestión en oscuridad o en el insectario, después de la fase de ayuno, 3 cajas se irradian durante 6 h y en otras 12 cajas se introduce comida con ALA-Oph o con protoporfirina, manteniéndolas en oscuridad o en el insectario (2 Wm⁻²). A las 3, 6, 9 y 12 h del comienzo de la ingestión, las moscas de 3 cajas se pasan a otras de (10x10x5 cm) e inmediatamente se irradian, durante 6 h. Después de la irradiación se procede como se ha descrito anteriormente.

En las experiencias con protoporfirina, ésta se disuelve en 0.1 M NaOH y se neutraliza con HCl hasta pH = 7.

Para medir la actividad fototóxica, en tiempos diferentes después de la ingestión (síntesis y eliminación de la PP por las moscas), la comida tratada con ALA-Oph o PP se sitúa en las cajas en oscuridad o en el insectario (2 Wm⁻²), durante 12 h. A las 0, 3, 6, 9 y 12 h, después del final del periodo de ingestión, las moscas se pasan a otras planas e inmediatamente se irradian, durante 6 h.

Las moscas irradiadas se colocan en el insectario y se alimentan con comida normal. Se cuenta la mortalidad a las 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h desde el comienzo de la irradiación.

2.4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PP EN MOSCAS

Para la extracción y valoración de PP se ha seguido el método de **Rebeiz (1988)**. 10 moscas se extraen en un homogeneizador manual con acetona: 0.1 N NH₄OH (9:1, v/v) (6 ml de disolvente/1 g de tejido). Después de la homogeneización, el extracto se limpia de lipoproteínas y restos de moscas por centrifugación a 39,000 g durante 10 minutos a 0°C. Los pigmentos apolares se

extraen de la solución 3 veces con un volumen igual de hexano. En la fracción acuosa-acetónica se determina la protoporfirina por fluorimetría cuantitativa, con alícuotas diluidas con acetona: 0.1 N NH_4OH (9:1, v/v).

La concentración de PP se mide por la fluorescencia emitida de las alícuotas, en un espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS50B) acoplado a un ordenador, (Excitación: 400 nm, rendija Ex.: 10 nm; emisión: 620 nm, rendija Em.: 18 nm).

La concentración de PP se determina, por interpolación, con una línea de calibración de fluorescencia con concentraciones conocidas de protoporfirina. Los resultados son expresados como nmoles/mosca.

La solución stock de PP se prepara disolviendo una cantidad conocida en NaOH 0.1 M y neutralizando con HCl hasta $\text{pH} = 7$.

2.5. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LOS FOTOTÓXICOS A LA LUZ SOLAR

Los colorantes (1.0×10^{-2} M) se disuelven en etanol; la PP (1.0×10^{-2} M) en NaOH 0.1 M neutralizando con HCl hasta $\text{pH} = 7$.

Los compuestos se exponen a la radiación solar, en tubos Pyrex (20 cm largo x 2 cm diámetro) o en tubos de RMN (17.8 cm largo x 0.5 cm diámetro), recibiendo la dosis de 6.3 Kwhm^{-2} día, (media diaria de junio-agosto).

Se toman muestras periódicas (de 0 a 67 días). La degradación de los colorantes y ALA, se mide por dos métodos:

- UV-V; para los colorantes.
- RMN; para ALA.

Con UV-V, se mide la disminución de la absorbancia máxima, a distintos tiempos de exposición solar. Los espectros de absorbancia se registran en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC, en un rango de λ 450-750 nm para los colorantes y de 330-750 nm para la PP.

Con RMN, se mide la variación de las señales de ^1H y ^{13}C del ALA según el tiempo de irradiación. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C son registrados en un espectrómetro Varian Geminis 300, en D_2O . Los desplazamientos químicos aparecen expresados en δ (ppm), mientras que las constantes de acoplamiento se indican en Hz. Se usa TMS como patrón interno standard.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todas las mortalidades observadas se corrigieron con los controles de mortalidad del blanco (**Abbott, 1925**). Los porcentajes de mortalidad se evaluaron con el análisis de la varianza (**Duncan, 1951**), utilizando el criterio de los intervalos de la mínima diferencia significativa (Fisher; LSD) con un error de primera especie ($P < 0.05$).

La concentración letal CL_{50} y el tiempo letal TL_{50} se estima con el análisis Probit (**Finney, 1971**).

Para hallar el factor de sinergia (FOS) en mezclas de colorantes se aplicó la fórmula de **Sun y Johnson (1960)**, simplificada por **Steward (1998)**:

$$\text{CL}_{50} \text{ esperada de la mezcla} = \frac{\text{Proporción de A} + \text{Proporción de B}}{\left(\frac{\text{Proporción de A}}{\text{CL}_{50} \text{ de A}} \right) + \left(\frac{\text{Proporción de B}}{\text{CL}_{50} \text{ de B}} \right)}$$

$$\text{FOS} = \frac{\text{CL}_{50} \text{ esperada de la mezcla}}{\text{CL}_{50} \text{ real}}$$

RESULTADOS

3.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FOTOTOXICIDAD (MORTALIDAD) DE DIFERENTES COLORANTES, FRENTE A *C. capitata*

Los resultados comparativos de la mortalidad de los colorantes ensayados, en un rango de concentraciones entre 4.0×10^{-2} M y 1.6×10^{-4} M, se dan en la tabla 1. El orden de fototoxicidad es el que aparece en la tabla cuando se consideran cada una de las concentraciones ensayadas y diferentes tiempos de observación de la mortalidad entre 3 y 72 h. Los valores se expresan en porcentajes de mortalidad de adultos (machos + hembras) de *C. capitata* en las mismas condiciones de iluminación.

De los 8 colorantes ensayados, rosa de Bengala resultó ser el más fototóxico, seguido, en orden decreciente, por floxina B, eritrosina B, eosina amarilla, azul de metileno, naranja de acridina, rojo neutro y uranina.

Considerando la rapidez del efecto, rosa de Bengala ha producido 100% de mortalidad a las 3 h a concentración de 1.0×10^{-2} M. Mientras que, con esta concentración, floxina B y eritrosina B dieron el 100% de mortalidad a las 6 h y 12 h respectivamente.

A la concentración de 2.5×10^{-3} M sólo rosa de Bengala, ha producido 100% de mortalidad a las 12 h, mientras que floxina B y eritrosina B dieron mortalidades menores.

Al comparar los efectos de los distintos colorantes a las 72 h, se observa que, a la concentración de 2.5×10^{-3} M y mayores, se ha obtenido 100% de mortalidad con rosa de Bengala y floxina B y algo menor con eritrosina B, pero la diferencia no es significativa ($P < 0.05$). A concentraciones menores aparecieron diferencias, manteniéndose la mayor mortalidad con rosa de Bengala.

Con azul de metileno sólo se observó 100% de mortalidad, a las 72 h, con la concentración de 1.0×10^{-2} M y mayores y con eosina amarilla con la concentración de 4.0×10^{-2} M.

Los demás colorantes ensayados no dieron 100% de mortalidad a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Rosa de Bengala, a la concentración de 6.2×10^{-4} M y superiores, ha producido una toxicidad propia no dependiente de la irradiación, con una mortalidad pequeña pero significativamente diferente de la mortalidad natural.

También con naranja de acridina, se observó toxicidad sin irradiación, aunque inferior a la de rosa de Bengala.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad dependiente del tiempo en adultos de *C. capitata*

COLORANTES	CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *							BSI *
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	72 h	
Rosa de Bengala	4.0×10^{-2}	100 a	-	-	-	-	-	8.8 \pm 1.2 a	
Floxina B		100 a	-	-	-	-	-	0 e	
Eritrosina B		100 a	-	-	-	-	-	0 e	
Eosina A	1.0×10^{-2}	53.4 \pm 4.2 c	90.0 \pm 1.5 b	92.9 \pm 2 a	100 a	-	-	1.8 \pm 0.1 d	
Azul de metileno		78.2 \pm 2.8 b	100 a	-	-	-	-	1.8 \pm 0.3 d	
Naranja de acridina		0 d	36.6 \pm 2.6 c	53.5 \pm 1.5 b	57.0 \pm 4.4 b	78.6 \pm 2.8 a	82.3 \pm 2.7 a	4.3 \pm 0.6 c	
Rojo neutro		0 d	1.0 \pm 0.0 d	6.1 \pm 0.3 c	11.3 \pm 1.2 c	24.2 \pm 1.7 b	31.1 \pm 1.7 b	2.0 \pm 0.4 d	
Uranina		0 d	0 d	0 d	3.6 \pm 0.6 d	4.4 \pm 0.4 c	5.4 \pm 0.9 c	0 e	
Rosa de Bengala		100 a	-	-	-	-	-	8.3 \pm 0.7 a	
Floxina B		96.4 \pm 2.7 ab	100 a	-	-	-	-	0 c	
Eritrosina B	94.4 \pm 5.6 b	95.4 \pm 5.6 b	100 a	-	-	-	0 c		
Eosina A	40.4 \pm 3.5 d	82.8 \pm 2.3 c	84.7 \pm 3.5 c	86.2 \pm 4.1 b	89.8 \pm 4.1 b	94.0 \pm 2.8 b	0 c		
Azul de metileno	68.2 \pm 5.3 c	83.4 \pm 2.4 c	91.0 \pm 2.7 b	92.8 \pm 3.0 a	94.9 \pm 1.7 a	100 a	1 \pm 0.1 c		
Naranja de acridina	0 e	4.9 \pm 0.0 d	7.0 \pm 2.0 d	20.1 \pm 2.1 c	38.1 \pm 3.2 c	51.9 \pm 3.3 c	3.3 \pm 0.6 b		
Uranina	0 e	0 e	0 e	4.0 \pm 0.4 d	4.0 \pm 0.4 d	4.0 \pm 0.4 d	0 c		
Rosa de Bengala	2.5×10^{-3}	70.6 \pm 3.6 a	91.2 \pm 4.3 a	100 a	-	-	-	7.5 \pm 0.5 a	
Floxina B		66.1 \pm 3.1 b	83.0 \pm 3.9 b	90.0 \pm 3.9 b	91.8 \pm 3.6 a	95.4 \pm 2.6 a	100 a	0 c	
Eritrosina B		67.2 \pm 3.7 b	81.9 \pm 2.1 b	83.9 \pm 5.8 c	86.1 \pm 3.9 b	95.4 \pm 5.5 a	96.0 \pm 3.5 a	0 c	
Eosina A		21.2 \pm 1.2 c	36.9 \pm 2.1 c	46.1 \pm 4.0 d	57.0 \pm 6.5 c	67.4 \pm 2.5 b	76.0 \pm 2.6 b	0 c	
Azul de metileno		0 d	0 d	0 f	12.8 \pm 2.6 e	41.4 \pm 5.3 c	53.2 \pm 6.6 c	0 c	
Naranja de acridina		0 d	0 d	1.8 \pm 0.7 e	17.0 \pm 1.6 d	20.7 \pm 1.4 d	21.3 \pm 1.7 d	2.0 \pm 0.3 b	
Uranina		0 d	0 d	0 f	0 f	0 e	1.0 \pm 0.0 e	0 c	
Rosa de Bengala	6.2×10^{-4}	47.0 \pm 2.5 a	71.6 \pm 1.3 a	78.5 \pm 1.9 a	81.5 \pm 2.3 a	85.2 \pm 1.6 a	89.4 \pm 2.9 a	6.3 \pm 0.3 a	
Floxina B		47.3 \pm 2.6 a	72.2 \pm 1.9 a	75.0 \pm 4.3 b	79.0 \pm 1.3 a	84.5 \pm 3.7 a	91.5 \pm 3.7 a	0 c	
Eritrosina B		23.6 \pm 4.3 b	27.0 \pm 3.9 b	29.7 \pm 3.2 c	32.5 \pm 4.8 b	49.6 \pm 4.2 b	58.7 \pm 4.8 b	0 c	
Eosina A		0 c	0 c	6.1 \pm 1.1 d	6.7 \pm 1.1 d	20.7 \pm 1.6 c	21.9 \pm 0.8 c	0 c	
Azul de metileno		0 c	0 c	0 e	6.0 \pm 0.9 d	20.0 \pm 2.5 cd	25.0 \pm 1.2 c	0 c	
Naranja de acridina		0 c	0 c	0 e	15.0 \pm 1.8 c	17.0 \pm 1.6 d	18.2 \pm 1.9 d	1.6 \pm 0.1 b	
Uranina		0 c	0 c	0 e	0 e	0 e	0 e	0 c	
Rosa de Bengala	1.6×10^{-4}	0	0	6.6 \pm 1.5 a	11.0 \pm 1.1 a	24.6 \pm 2.6 a	41.5 \pm 1.6 a	2.1 \pm 0.2 a	
Floxina B		0	0	2.9 \pm 0.5 b	7.7 \pm 2.1 b	14.0 \pm 1.6 b	33.9 \pm 1.9 b	0 c	
Eritrosina B		0	0	1.8 \pm 0.7 b	3.0 \pm 0.7 c	14.9 \pm 3.1 b	16.0 \pm 2.7 c	0 b	
BSC		0.4 \pm 0.0	1.5 \pm 0.4	2.8 \pm 0.8	4.5 \pm 0.9	6.5 \pm 0.8	7.3 \pm 0.5		
B		0	0.7 \pm 0.2	1.1 \pm 0.6	2.1 \pm 0.7	3.2 \pm 0.3	4.5 \pm 0.4		

* Cada valor es la media de 5 repeticiones \pm DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de dos jaulas con 10 machos + 10 hembras por jaula.

En cada columna y para cada concentración, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + colorante.

Irradiación: 40 Wm⁻² durante 8 h.

BSI - % Mortalidad con colorantes y sin irradiación, a las 72 h. Media de 8 medidas (10 machos + 10 hembras) por 5 repeticiones.

BSC - % Mortalidad del blanco sin colorante y con irradiación. Media de 8 medidas (10 machos + 10 hembras) por 5 repeticiones.

B - % Mortalidad sin colorante y sin irradiación. Media de 8 medidas (10 machos + 10 hembras) por 5 repeticiones.

Los valores de mortalidad están corregidos con el test **Abbott (1925)**.

3.2. CL₅₀ DE LOS COLORANTES

Se ha calculado la CL₅₀ a diferentes tiempos de observación de la mortalidad, con los colorantes solos. Los resultados se dan en la tabla 2.

La comparación de los valores es más representativa con los resultados obtenidos a las 72 h, ya que, a tiempos cortos, la variabilidad es mayor. Rosa de Bengala, floxina B y eritrosina B han dado los menores valores de CL₅₀.

Tabla 2. CL₅₀ de los colorantes frente a *C. capitata*

COLORANTES	CL ₅₀ (M) dependiente del tiempo en <i>C. capitata</i>					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Rosa de Bengala	2.0x10 ⁻³	8.9x10 ⁻⁴	5.7x10 ⁻⁴	5.0x10 ⁻⁴	3.0x10 ⁻⁴	2.3x10 ⁻⁴
Floxina B	2.3x10 ⁻³	1.0x10 ⁻³	8.2x10 ⁻⁴	6.6x10 ⁻⁴	4.8x10 ⁻⁴	2.8x10 ⁻⁴
Eritrosina B	3.4x10 ⁻³	2.7x10 ⁻³	2.1x10 ⁻³	1.6x10 ⁻³	1.1x10 ⁻³	8.6x10 ⁻⁴
Eosina Y	3.3x10 ⁻²	1.3x10 ⁻²	7.7x10 ⁻³	4.1x10 ⁻³	2.6x10 ⁻³	1.9x10 ⁻³
Azul de metileno	2.0x10 ⁻²	8.0x10 ⁻³	7.2x10 ⁻³	5.8x10 ⁻³	3.7x10 ⁻³	2.4x10 ⁻³
Naranja de acridina		4.6x10 ⁻²	3.8x10 ⁻²	2.9x10 ⁻²	2.1x10 ⁻²	1.7x10 ⁻²
Rojo neutro				2.0x10 ⁻¹	1.6x10 ⁻¹	1.2x10 ⁻¹
Uranina				3.0x10 ⁻¹	2.9x10 ⁻¹	2.0x10 ⁻¹

Valores obtenidos con el método Probit (Finney, 1971), partiendo de los datos de la tabla 1.

3.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FOTOTOXICIDAD (MORTALIDAD) DE DIFERENTES COMBINACIONES DE COLORANTES, FRENTE A *C. capitata*

Los resultados comparativos de la mortalidad de las diferentes combinaciones, ensayadas en proporciones molares (50:50) y (90:10), se dan en la tabla 3.

Las concentraciones estudiadas están comprendidas entre 1.0x10⁻² M y 1.6x10⁻⁴ M y los tiempos de observación de la mortalidad entre 3 y 72 h. Los valores se expresan en porcentajes de adultos muertos (machos + hembras) de *C. capitata* con las mismas condiciones de iluminación.

De las 11 combinaciones ensayadas, las de rosa de Bengala con floxina B, con eritrosina B y con uranina y las de floxina B con eritrosina y uranina en proporción molar (0.5:0.5), han sido las más fototóxicas: a concentraciones de 1.0×10^{-2} M, han dado el 100% de mortalidad a las 3 h y a 1.2×10^{-3} M esta mortalidad se alcanzó a las 48 h.

La combinación eritrosina-uranina ha resultado menos fototóxica y la menos efectiva ha sido eritrosina B-azul de metileno, la cual sólo ha dado 100% de mortalidad a la concentración más alta ensayada y a partir de 24 h.

La toxicidad propia, independiente de la irradiación, ha sido baja con estas combinaciones. La combinación eritrosina B-azul de metileno fue la de mayor toxicidad intrínseca, aunque inferior a la del rosa de Bengala solo.

Los datos obtenidos con proporción molar (90:10), también son interesantes por que no se han encontrado diferencias significativas en la mortalidad a 72 h entre floxina B-rosa de Bengala (50:50) y floxina B-rosa de Bengala (90:10), a concentraciones superiores a 6.2×10^{-4} M. Lo mismo sucede con las combinaciones floxina B-eritrosina (50:50) y (90:10).

Estos datos resaltan el interés de las combinaciones con concentraciones bajas de rosa de Bengala, que es el colorante más activo.

La combinación floxina B-eritrosina B (90:10) ha dado mayor fototoxicidad que la inversa (10:90), aunque, a concentraciones superiores a 6.2×10^{-4} M, las diferencias de fototoxicidad no son significativas a tiempos largos. Estos resultados parecen indicar que las actividades sinérgicas recíprocas son diferentes, en algunos casos.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad dependiente del tiempo, en adultos de *C. capitata*, por ingestión de diferentes concentraciones de combinaciones de 2 colorantes

COLORANTES	CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *						BSI *
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	1.0x10 ⁻²	100 a	-	-	-	-	-	2.0 \pm 0.2 c
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)		100 a	-	-	-	-	-	5.6 \pm 1.2 b
Rosa de Bengala-uranina (50:50)		100 a	-	-	-	-	-	4.0 \pm 0.4 c
Eritrosina B-floxina B (50:50)		100 a	-	-	-	-	-	3.0 \pm 0.7 d
Eritrosina B-uranina (50:50)		96.9 \pm 2.9 b	97.5 \pm 3.9 ab	100 a	-	-	-	2.0 \pm 0.1 e
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)		89.2 \pm 2.4 c	98.2 \pm 2.3 a	99.0 \pm 2.5 b	100 a	-	-	7.5 \pm 0.8 a
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)		100 a	-	-	-	-	-	1.0 \pm 0.0 f
Floxina B-eritrosina B (90:10)		100 a	-	-	-	-	-	0 g
Eritrosina B-floxina B (90:10)		95.7 \pm 0.7 b	96.0 \pm 0.5 b	96.9 \pm 1.7 c	98.5 \pm 2.6 b	100	-	0 g
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)		100 a	-	-	-	-	-	0 g
Floxina B-uranina (50:50)	100 a	-	-	-	-	-	0 g	
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	2.5x10 ⁻³	100 a	-	-	-	-	-	0 c
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)		97.9 \pm 2.1 ab	100 a	-	-	-	-	0 c
Rosa de Bengala-uranina (50:50)		93.9 \pm 1.8 c	94.8 \pm 1.7 cd	100 a	-	-	-	0 c
Eritrosina B-floxina B (50:50)		93.1 \pm 3.2 c	93.9 \pm 1.6 d	100 a	-	-	-	3.0 \pm 0.2 a
Eritrosina B-uranina (50:50)		88.8 \pm 3.3 d	90.3 \pm 3.5 de	93.2 \pm 2.4 c	94.0 \pm 1.9 c	94.7 \pm 2.6 b	95.3 \pm 2.9 a	0 c
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)		68.3 \pm 3.4 f	83.5 \pm 2.9 f	86.2 \pm 2.7 d	87.1 \pm 1.2 d	88.0 \pm 3.4 c	89.8 \pm 3.3 b	0 c
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)		100 a	-	-	-	-	-	0 c
Floxina B-eritrosina B (90:10)		95.8 \pm 3.3 bc	97.1 \pm 1.9 bc	97.9 \pm 1.5 a	100 a	-	-	0 c
Eritrosina B-floxina B (90:10)		84.9 \pm 4.1 e	94.1 \pm 3.3 d	95.7 \pm 2.7 b	97.5 \pm 1.6 b	100 a	-	0 c
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)		85.7 \pm 2.1 de	88.4 \pm 1.6 e	93.7 \pm 2.1 bc	98.8 \pm 1.6 ab	100 a	-	0 c
Floxina B-uranina (50:50)	98.0 \pm 2.7 ab	99.0 \pm 2.8 a	100 a	-	-	-	2.0 \pm 0.2 b	
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	1.2x10 ⁻³	86.6 \pm 2.4 b	93.6 \pm 2.5 a	94.5 \pm 1.3 ab	100 a	-	-	0 c
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)		91.6 \pm 2.3 a	92.5 \pm 2.4 a	95.8 \pm 1.9 a	97.5 \pm 1.7 a	100 a	-	0 c
Rosa de Bengala-uranina (50:50)		81.2 \pm 3.8 bc	86.3 \pm 3.5 b	88.8 \pm 2.8 de	100 a	-	-	0 c
Eritrosina B-floxina B (50:50)		84.7 \pm 4.7 b	88.2 \pm 2.3 b	92.1 \pm 4.0 bc	100 a	-	-	2.5 \pm 0.4 a
Eritrosina B-uranina (50:50)		19.2 \pm 3.8 e	47.7 \pm 3.2 d	61.9 \pm 1.1 g	67.0 \pm 2.0 d	78.7 \pm 5.3 c	80.2 \pm 2.5 c	0 c
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)		0 f	12.4 \pm 1.4 e	16.3 \pm 3.3 h	28.7 \pm 2.4 e	40.1 \pm 5.1 d	52.6 \pm 3.4 d	0 c
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)		30.9 \pm 2.3 d	78.2 \pm 2.5 c	84.6 \pm 1.7 ef	94.1 \pm 2.0 b	97.0 \pm 1.3 a	100 a	0 c
Floxina B-eritrosina B (90:10)		85.4 \pm 3.2 b	88.4 \pm 2.6 b	91.6 \pm 3.1 bcd	100 a	-	-	0 c
Eritrosina B-floxina B (90:10)		78.5 \pm 2.8 c	79.0 \pm 3.5 c	84.6 \pm 1.7 f	85.6 \pm 3.0 c	97.0 \pm 1.6 a	100 a	0 c
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)		84.7 \pm 2.3 b	85.7 \pm 2.4 b	90.3 \pm 2.0 cd	91.6 \pm 2.9 b	92.8 \pm 3.0 b	94.1 \pm 3.4 b	0 c
Floxina B-uranina (50:50)	80.1 \pm 2.0 c	85.1 \pm 2.0 b	89.1 \pm 2.8 cd	100 a	-	-	2.0 \pm 0.2 b	
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	6.2x10 ⁻⁴	32.2 \pm 3.3 d	64.9 \pm 2.8 cd	71.2 \pm 2.9 d	78.6 \pm 2.6 d	87.0 \pm 3.5 cd	91.3 \pm 3.7 bc	0 b
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)		75.5 \pm 2.7 a	85.5 \pm 2.7 a	90.8 \pm 4.9 a	94.3 \pm 4.7 a	95.1 \pm 3.9 a	96.7 \pm 5.2 a	0 b
Rosa de Bengala-uranina (50:50)		45.8 \pm 2.5 c	62.4 \pm 2.0 de	73.0 \pm 2.9 cd	85.2 \pm 4.8 bc	94.3 \pm 2.1 ab	94.5 \pm 1.8 ab	0 b
Eritrosina B-floxina B (50:50)		48.1 \pm 5.7 c	66.7 \pm 3.5 c	76.2 \pm 2.7 c	83.6 \pm 2.8 c	90.1 \pm 4.4 abc	92.0 \pm 2.2 b	2.0 \pm 0.2 a
Eritrosina B-uranina (50:50)		0 g	0 h	5.5 \pm 0.6 g	7.7 \pm 1.5 h	26.2 \pm 4.1 f	41.4 \pm 3.7 f	0 b
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)		0 g	0 h	6.5 \pm 0.9 g	22.7 \pm 2.2 g	29.1 \pm 2.1 f	44.1 \pm 2.6 f	0 b
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)		19.9 \pm 1.1 f	61.3 \pm 1.9 e	71.3 \pm 1.9 d	72.7 \pm 2.9 e	84.3 \pm 1.9 d	88.1 \pm 3.0 c	0 b
Floxina B-eritrosina B (90:10)		59.1 \pm 3.4 b	76.8 \pm 3.1 b	81.9 \pm 2.5 b	86.4 \pm 4.7 b	88.8 \pm 3.6 bcd	89.6 \pm 0.4 c	0 b
Eritrosina B-floxina B (90:10)		28.3 \pm 2.1 e	38.6 \pm 2.6 g	43.4 \pm 5.2 f	57.2 \pm 3.1 f	72.2 \pm 2.4 e	82.7 \pm 4.6 d	0 b
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)		23.2 \pm 3.6 f	46.7 \pm 2.4 f	56.6 \pm 1.7 e	70.0 \pm 3.2 e	73.3 \pm 3.7 e	76.6 \pm 2.0 e	0 b
Floxina B-uranina (50:50)	27.7 \pm 1.4 e	84.4 \pm 3.6 a	85.3 \pm 4.0 b	88.7 \pm 2.6 b	94.9 \pm 2.8 a	97.3 \pm 1.8 a	2.0 \pm 0.2 a	
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	3.1x10 ⁻⁴	5.1 \pm 0.4 e	26.9 \pm 0.8 d	41.7 \pm 3.5 c	56.6 \pm 0.8 b	75.7 \pm 2.4 b	88.5 \pm 1.7 ab	0 b
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)		41.2 \pm 1.6 a	60.0 \pm 1.9 a	64.6 \pm 1.8 a	68.5 \pm 1.8 a	75.7 \pm 1.9 b	84.7 \pm 1.1 bc	0 b
Rosa de Bengala-uranina (50:50)		12.2 \pm 0.5 d	22.2 \pm 0.4 e	36.1 \pm 3.1 e	49.6 \pm 0.5 c	81.1 \pm 4.9 a	88.8 \pm 2.2 a	0 b
Eritrosina B-floxina B (50:50)		27.6 \pm 0.8 c	42.5 \pm 3.1 b	48.3 \pm 4.4 b	56.1 \pm 4.7 b	66.1 \pm 1.5 d	74.6 \pm 6.2 d	2.0 \pm 0.2 a
Eritrosina B-uranina (50:50)		0 f	0 h	0 i	6.2 \pm 1.1 g	8.6 \pm 1.2 i	17.4 \pm 2.5 g	0 b
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)		0 f	0 h	7.8 \pm 0.6 h	10.1 \pm 1.3 f	12.5 \pm 2.2 i	25.5 \pm 3.0 f	0 b
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)		5.5 \pm 0.8 e	37.7 \pm 3.0 c	39.8 \pm 1.6 cd	44.8 \pm 2.4 c	71.8 \pm 2.2 c	81.4 \pm 2.9 c	0 b
Floxina B-eritrosina B (90:10)		0 f	10.9 \pm 1.7 f	20.7 \pm 1.8 f	34.9 \pm 2.8 d	52.7 \pm 2.1 f	72.7 \pm 3.9 d	0 b
Eritrosina B-floxina B (90:10)		0 f	6.9 \pm 1.9 g	11.0 \pm 0.4 g	26.5 \pm 2.1 e	48.0 \pm 4.1 g	62.3 \pm 3.2 e	0 b
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)		0 f	6.7 \pm 1.3 g	8.2 \pm 0.6 gh	9.7 \pm 1.8 f	16.6 \pm 1.1 h	22.8 \pm 1.8 f	0 b
Floxina B-uranina (50:50)	15.2 \pm 1.6 b	29.5 \pm 2.6 d	38.0 \pm 2.0 de	45.7 \pm 2.5 c	60.6 \pm 4.1 e	82.0 \pm 2.3 c	2.0 \pm 0.2 a	
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	1.6x10 ⁻⁴	0 b	0 c	0 d	1.0 \pm 1.3 fg	11.2 \pm 1.8 d	37.9 \pm 1.6 a	0 b
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)		1.6 \pm 1.0 a	2.5 \pm 1.0 b	3.6 \pm 0.3 c	4.3 \pm 1.4 e	15.6 \pm 0.9 c	35.6 \pm 3.6 a	0 b
Rosa de Bengala-uranina (50:50)		0 b	0 c	1.9 \pm 0.2 d	2.9 \pm 0.2 ef	15.7 \pm 1.9 c	23.4 \pm 1.6 bc	0 b
Eritrosina B-floxina B (50:50)		0 b	0 c	5.2 \pm 0.5 b	12.3 \pm 2.3 bc	18.5 \pm 2.0 b	23.7 \pm 3.3 b	1.0 \pm 0.0 a
Eritrosina B-uranina (50:50)		0 b	0 c	0 f	2.7 \pm 0.9 ef	7.9 \pm 1.5 e	8.5 \pm 1.3 f	0 b
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)		0 b	0 c	0 f	0 g	4.4 \pm 1.1 f	7.5 \pm 1.4 f	0 b
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)		0 b	0 c	0 f	0 g	6.0 \pm 1.5 ef	12.2 \pm 2.5 e	0
Floxina B-eritrosina B (90:10)		0 b	0 c	2.4 \pm 0.5 d	10.9 \pm 1.7 c	16.9 \pm 3.5 bc	20.7 \pm 4.4 cd	0 b
Eritrosina B-floxina B (90:10)		0 b	0 c	1.0 \pm 0.1 e	6.6 \pm 0.3 d	10.1 \pm 0.8 d	20.1 \pm 1.8 d	0 b
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)		0 b	0 c	0 f	0 g	6.1 \pm 2.0 ef	8.6 \pm 1.5 f	0 b
Floxina B-uranina (50:50)	0 b	9.3 \pm 1.6 a	13.8 \pm 1.6 a	17.7 \pm 2.4 a	24.6 \pm 2.4 a	36.6 \pm 2.1 a	1.0 \pm 0.1 a	
BSC		0	0	0.5 \pm 0.1	2.9 \pm 0.9	6.3 \pm 0.5	6.6 \pm 0.8	
B		0	0	0	2.3 \pm 0.5	3.2 \pm 0.3	3.3 \pm 0.6	

* Cada valor es la media de 5 repeticiones \pm DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de dos jaulas con 10 machos + 10 hembras por jaula.

En cada columna y para cada concentración, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + colorante.

Irradiación: 40 Wm⁻² durante 8 h.

BSI - % Mortalidad con colorantes y sin irradiación a las 72 h Media de 6 medidas (10 machos + 10 hembras) por 6 repeticiones.

BSC - % Mortalidad del blanco sin colorante y con irradiación. Media de 6 medidas (10 machos + 10 hembras) por 6 repeticiones.

B - % Mortalidad sin colorante y sin irradiación. Media de 6 medidas (10 machos + 10 hembras) por 6 repeticiones. Los valores de mortalidad están corregidos con el test Abbott (1925).

3.4. CL₅₀ DE PARES DE COLORANTES

Los valores obtenidos de la CL₅₀, con combinaciones de colorantes se dan en la tabla 4.

Comparando las CL₅₀ a las 72 h, se observa que la combinación rosa de Bengala-eritrosina B (50:50) dio 50% de mortalidad a la concentración de 1.2×10^{-4} M, mientras que las combinaciones rosa de Bengala-floxina B (50:50), rosa de Bengala-uranina (50:50), eritrosina B-floxina B (50:50), floxina B-eritrosina B (90:10) y floxina B-uranina (50:50) han dado CL₅₀ mayores (alrededor de 2.0×10^{-4} M).

Las mezclas eritrosina B-uranina (50:50) y eritrosina B-azul de metileno (50:50) dieron 50% de mortalidad a concentraciones mayores.

Si comparamos las CL₅₀ de floxina B-rosa de Bengala a (50:50) y (90:10), a las 72 h se observa que la combinación (90:10) es muy favorable porque reduciendo la proporción de rosa de Bengala de 0.5 a 0.1 la CL₅₀ sólo se ha multiplicado sólo por 1.5.

La CL₅₀ a las 72 h de las mezclas eritrosina B-floxina B (50:50), (90:10) y floxina B-eritrosina B (90:10), están todas en el orden 10^{-4} M. Como ya se observa en la tabla 3, la combinación floxina B-eritrosina B (90:10) es sólo ligeramente menos tóxica que la combinación (50:50) y la CL₅₀ de la combinación eritrosina B-floxina B (90:10), es mayor que la inversa.

La comparación de la fototoxicidad de colorantes solos y de sus combinaciones también aporta datos de interés.

La CL₅₀ del rosa de Bengala a las 72 h es de 2.3×10^{-4} M y la de la floxina B es de 2.8×10^{-4} M; en cambio la combinación floxina B-rosa de Bengala (90:10) es de 2.4×10^{-4} M. La combinación floxina B-eritrosina B (90:10), ha dado una CL₅₀ de 2.2×10^{-4} M, cuando la CL₅₀ de la floxina B es de 2.8×10^{-4} M y la de la eritrosina B 8.6×10^{-4} M, lo que supone un incremento de la toxicidad de la floxina B de un 21%.

La combinación eritrosina B-floxina B (90:10) ha dado la CL_{50} de 2.7×10^{-4} M, superior a la combinación inversa (floxina B-eritrosina B, 90:10).

Tabla 4. CL_{50} de mortalidad dependiente del tiempo, en adultos de *C. capitata*, por ingestión de diferentes concentraciones de combinaciones de colorantes

COLORANTES	CL_{50} (M) dependiente del tiempo en <i>C. capitata</i>					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Rosa de Bengala-floxina B (50:50)	1.0×10^{-3}	7.4×10^{-4}	7.2×10^{-4}	4.7×10^{-4}	1.8×10^{-4}	1.6×10^{-4}
Rosa de Bengala-eritrosina B (50:50)	5.8×10^{-4}	3.3×10^{-4}	2.5×10^{-4}	2.0×10^{-4}	1.6×10^{-4}	1.2×10^{-4}
Rosa de Bengala-uranina (50:50)	9.1×10^{-4}	7.6×10^{-4}	7.3×10^{-4}	4.1×10^{-4}	2.7×10^{-4}	1.9×10^{-4}
Eritrosina B-floxina B (50:50)	9.7×10^{-4}	6.7×10^{-4}	5.1×10^{-4}	3.5×10^{-4}	2.9×10^{-4}	2.0×10^{-4}
Eritrosina B-uranina (50:50)	2.6×10^{-3}	2.2×10^{-3}	1.4×10^{-3}	1.3×10^{-3}	1.0×10^{-3}	8.7×10^{-4}
Eritrosina B-azul de metileno (50:50)	4.8×10^{-3}	2.4×10^{-3}	2.2×10^{-3}	1.5×10^{-3}	1.4×10^{-3}	1.1×10^{-3}
Floxina B-rosa de Bengala (90:10)	1.9×10^{-3}	6.7×10^{-4}	4.7×10^{-4}	4.0×10^{-4}	3.3×10^{-4}	2.4×10^{-4}
Floxina B-eritrosina B (90:10)	1.0×10^{-3}	7.4×10^{-4}	6.1×10^{-4}	5.1×10^{-4}	3.8×10^{-4}	2.2×10^{-4}
Eritrosina B-floxina B (90:10)	2.6×10^{-3}	2.2×10^{-3}	1.9×10^{-3}	1.2×10^{-3}	6.4×10^{-4}	2.7×10^{-4}
Eritrosina B-rosa de Bengala (90:10)	1.2×10^{-3}	1.0×10^{-3}	8.3×10^{-4}	7.3×10^{-4}	7.1×10^{-4}	6.7×10^{-4}
Floxina B-uranina (50:50)	1.0×10^{-3}	6.1×10^{-4}	4.8×10^{-4}	3.6×10^{-4}	3.0×10^{-4}	2.2×10^{-4}

Valores obtenidos con el método Probit (Finney, 1971), partiendo de los datos de la tabla 3.

3.5. VELOCIDAD DE ACCIÓN DE LOS COLORANTES

3.5.1. TL_{50} de colorantes solos

Los valores de TL_{50} para diferentes concentraciones de los colorantes, se dan en la tabla 5.

El rosa de Bengala, además de resultar el colorante más fototóxico a diferentes concentraciones, ha dado los valores más cortos de TL_{50} . A la concentración de 2.5×10^{-3} M, los más rápidos han sido el rosa de Bengala, floxina B y eritrosina B que alcanzaron el 50% de mortalidad antes de 3 h.

Los TL_{50} más largos registrados corresponden a azul de metileno, eosina amarilla, naranja de acridina y rojo neutro.

Tabla 5. TL₅₀ de los colorantes sobre adultos de *C. capitata*

COLORANTES	CONCENTRACIÓN (M)	TL ₅₀ (h después del periodo de ingestión)
Rosa de Bengala	2.5x10 ⁻³	2.11
	6.2x10 ⁻⁴	5.84
Floxina B	1.0x10 ⁻²	1.97
	2.5x10 ⁻³	2.49
	6.2x10 ⁻⁴	6.88
Eritrosina B	1.0x10 ⁻²	2.04
	2.5x10 ⁻³	2.93
	6.2x10 ⁻⁴	52.78
Eosina A	4.0x10 ⁻²	4.22
	1.0x10 ⁻²	4.24
	2.5x10 ⁻³	31.05
Azul de metileno	4.0x10 ⁻²	2.47
	1.0x10 ⁻²	3.70
	2.5x10 ⁻³	64.61
Naranja de acridina	4.0x10 ⁻²	28.55
	1.0x10 ⁻²	64.01
Rojo neutro	1.6x10 ⁻²	49.93

Valores obtenidos con el método Probit (Finney, 1971), partiendo de los datos de la tabla 1.

3.5.2. TL₅₀ de pares de colorantes

Los valores de TL₅₀ de las mezclas de colorantes a diferentes concentraciones, ensayadas en proporción molar (50:50) y (90:10), se dan en la tabla 6.

A la concentración de 2.5x10⁻³ M, las parejas de acción más rápida han sido: rosa de Bengala-floxina B (50:50); rosa de Bengala-eritrosina B (50:50) y floxina B-rosa de Bengala (90:10). A esta concentración estas parejas dan 98-100% de mortalidad a las 3 h.

Las otras parejas de colorantes que han dado TL₅₀ inferiores a 3 h, son, por este orden de rapidez: floxina B-uranina B (50:50), eritrosina B-uranina (50:50), floxina B-eritrosina B (50:50) y (90:10), rosa de Bengala-uranina (50:50), eritrosina B-floxina B (90:10) y eritrosina B-rosa de Bengala (90:10).

Tabla 6. TL₅₀ de mezclas de colorantes en adultos de *C. capitata*

COLORANTES		DOSIS	TL ₅₀
		(M)	(h después del periodo de ingestión)
Rosa de Bengala-floxina B	(50:50)	1.2x10 ⁻³	3.5
		6.2x10 ⁻⁴	11.5
		3.1x10 ⁻⁴	29.8
Rosa de Bengala-eritrosina B	(50:50)	1.2x10 ⁻³	2.5
		6.2x10 ⁻⁴	3.4
		3.1x10 ⁻⁴	7.4
Rosa de Bengala-uranina	(50:50)	2.5x10 ⁻³	2.2
		1.2x10 ⁻³	3.0
		6.2x10 ⁻⁴	8.2
		3.1x10 ⁻⁴	29.5
Eritrosina B-floxina B	(50:50)	2.5x10 ⁻³	2.1
		1.2x10 ⁻³	3.0
		6.2x10 ⁻⁴	6.8
		3.1x10 ⁻⁴	33.5
Eritrosina B-uranina	(50:50)	1.0x10 ⁻²	1.9
		2.5x10 ⁻³	1.9
		1.2x10 ⁻³	22.2
Eritrosina B-azul de metileno	(50:50)	1.0x10 ⁻²	2.2
		2.5x10 ⁻³	3.9
		1.2x10 ⁻³	61.8
Floxina B-rosa de Bengala	(90:10)	1.2x10 ⁻³	6.9
		6.3x10 ⁻⁴	15.5
		3.1x10 ⁻⁴	32.9
Floxina B-eritrosina B	(90:10)	2.5x10 ⁻³	2.1
		1.2x10 ⁻³	3.0
		6.3x10 ⁻⁴	5.3
		3.1x10 ⁻⁴	47.2
Eritrosina B-floxina B	(90:10)	2.5x10 ⁻³	2.4
		1.2x10 ⁻³	2.7
		6.3x10 ⁻⁴	27.2
		3.1x10 ⁻⁴	51.4
Eritrosina B-rosa de Bengala	(90:10)	2.5x10 ⁻³	2.9
		1.2x10 ⁻³	3.7
		6.2x10 ⁻⁴	29.3
Floxina B-uranina	(50:50)	2.5x10 ⁻³	1.8
		1.2x10 ⁻³	3.4
		6.2x10 ⁻⁴	6.5
		3.1x10 ⁻⁴	35.2

Valores obtenidos con el método Probit (Finney, 1971), partiendo de los datos de la tabla 3.

La mezcla eritrosina B-azul de metileno ha dado los valores más altos de TL_{50} .

Con la concentración de 1.2×10^{-3} M, los TL_{50} más cortos, comprendidos entre 2.5 y 3.5 h han correspondido a las siguientes combinaciones (por orden de rapidez): rosa de Bengala-eritrosina B (50:50); eritrosina B-rosa de Bengala (90:10); rosa de Bengala-uranina (50:50); eritrosina B-floxina B (50:50); floxina B-eritrosina B (90:10); floxina B-uranina (50:50) y rosa de Bengala-floxina B (50:50).

3.6. AUMENTO DE LA FOTOTOXICIDAD DE COLORANTES POR ADICIÓN DE AZODICARBONAMIDA. ENSAYOS CON FLOXINA B-URANINA

La resistencia de la *C. capitata* a la acción fototóxica de los colorantes puede deberse a una captación de los radicales oxidantes por antioxidantes de la mosca.

Entre los captadores de radicales; el glutatión y otros reductores como la cisteína, con grupos tiol (R-SH), tienen un papel metabólico esencial, y parece interesante ensayar como activadores de la actividad fototóxica frente a *C. capitata* compuestos capaces de oxidar tales grupos con formación de enlaces S-S. Para esta oxidación suave hemos utilizado la azodicarbonamida, compuesto de baja toxicidad que se emplea para aumentar la fuerza de la harina de trigo y es capaz de oxidar los grupos -SH a S-S, figura 6.

Se ha ensayado una concentración umbral de floxina B-uranina y otra subletal, con 2 concentraciones de azodicarbonamida, para ver su influencia en el porcentaje de mortalidad. Los resultados se dan en la tabla 7.

Con la concentración de 6.2×10^{-4} M más 1000 ppm de AZO se alcanzó el 100% de mortalidad en 24 h y con 30 ppm de AZO se alcanzó a las 48 h, mientras que, sin aditivo, la mezcla floxina B-uranina (50:50) no alcanzó el 100% de mortalidad a las 72 h.

A concentración más baja, 3.1×10^{-4} M, se alcanzaron mortalidades cercanas al 90% con adición de 1000 ppm de AZO, frente al 79% con floxina B-uranina (50:50).

Figura 6. Acción de la azodicarbonamida

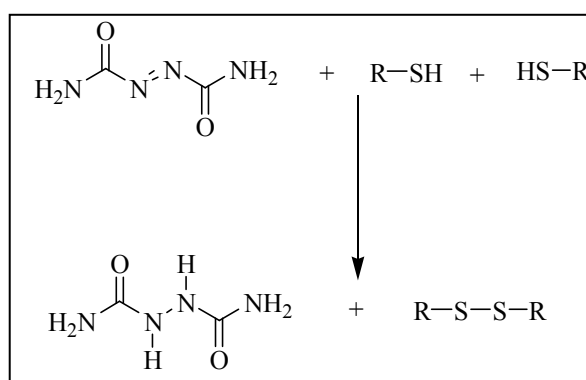


Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de *C. capitata* por ingestión de floxina B-uranina (50:50) con AZO

COLORANTES	CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media ± DS) *						BSI *
		3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	
Floxina B-uranina	6.2×10^{-4}	28.2 ± 1.5 b	85.2 ± 4.6 ab	86.0 ± 4.2 b	90.0 ± 1.6 b	95.0 ± 1.8 b	98.4 ± 2.0 a	2.0 ± 0.2 a
Floxina B-uranina-1000 ppm AZO		70.3 ± 2.2 a	88.0 ± 2.8 a	91.8 ± 3.4 a	100 a	-	-	0 b
Floxina B-uranina-30 ppm AZO		27.6 ± 2.7 b	80.5 ± 3.2 b	83.4 ± 2.2 b	91.0 ± 1.7 b	100 a	-	0 b
Floxina B-uranina	3.1×10^{-4}	14.9 ± 1.2 a	30.2 ± 1.6 b	40.3 ± 2.2 b	47.5 ± 3.5 b	64.6 ± 4.4 b	79.0 ± 2.3 b	2.0 ± 0.2 a
Floxina B-uranina-1000 ppm AZO		14.4 ± 2.6 a	52.0 ± 2.6 a	55.7 ± 2.5 a	66.0 ± 2.9 a	79.8 ± 3.2 a	87.1 ± 3.0 a	0 b
Floxina B-uranina-30 ppm AZO		0 b	16.3 ± 2.8 c	21.2 ± 2.5 c	28.9 ± 2.4 c	54.3 ± 3.1 c	72.9 ± 2.6 c	0 b
BSC		0	0	0.5 ± 0.0	2.0 ± 0.2	4.0 ± 0.5	4.5 ± 0.5	
B		0	0	0	0	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3	

* Cada valor es la media de 5 repeticiones ± DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de dos jaulas con 10 machos + 10 hembras por jaula.

En cada columna y para cada concentración, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + colorante.

Irradiación: 40 Wm^{-2} durante 8 h.

BSI - % Mortalidad con colorantes y sin irradiación a las 72 h. Media de 4 medidas (10 machos + 10 hembras) por 2 repeticiones.

BSC - % Mortalidad del blanco sin colorante y con irradiación. Media de 4 medidas (10 machos + 10 hembras) por 2 repeticiones.

B - % Mortalidad sin colorante y sin irradiación. Media de 4 medidas (10 machos + 10 hembras) por 2 repeticiones.

Los valores de mortalidad están corregidos con el test **Abbott (1925)**.

3.7. FACTOR DE SINERGIA (FOS) EN LOS PARES DE COLORANTES ESTUDIADOS

Con los datos obtenidos de la mortalidad, a las 72 h, producida con los colorantes y las mezclas de estos a diferentes concentraciones, se han calculado los factores de sinergia (FOS), según el método descrito por **Steward (1998)**. Los resultados se dan en la tabla 8.

Tabla 8. Factores de sinergia de mezclas de colorantes

COLORANTES		FOS *
Rosa de Bengala-eritrosina B	(50:50)	3.02
Floxina B-uranina	(50:50)	2.54
Rosa de Bengala-uranina	(50:50)	2.42
Floxina B-eritrosina B	(50:50)	2.11
Eritrosina B-rosa de bengala	(90:10)	2.05
Eritrosina B-uranina	(50:50)	1.97
Floxina B-rosa de Bengala	(50:50)	1.58
Floxina B-eritrosina B	(90:10)	1.36
Floxina B-rosa de Bengala	(90:10)	1.14
Eritrosina B-azul de metileno	(50:50)	1.13
Eritrosina B-floxina B	(90:10)	1.10

* Cálculos basados en los datos de CL_{50} de las tablas 2 y 4.

Todos los valores de FOS obtenidos son superiores a 1, lo que indica que hay efecto sinérgico en las mezclas ensayadas. El mayor lo ha producido la mezcla de rosa de Bengala-eritrosina B (50:50). Las combinaciones que llevan uranina como sinergista y las mezclas de floxina B-eritrosina B (50:50) y eritrosina B-rosa de Bengala (90:10) han dado FOS, que están entre 2 y 2.5.

3.8. DEGRADACIÓN DE LOS COLORANTES FOTOTÓXICOS EXPUESTOS AL SOL (6.3 Kwhm^{-2} y día)

En las figuras de la 7 a la 10 y 12 a 14 se han representado los espectros de absorción de algunos colorantes y de mezclas de ellos a la concentración de $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$, después de distintos tiempos de exposición solar.

En las figuras de la 7 a la 10 se dan las series de espectros de absorción de los colorantes rosa de Bengala, floxina B, eritrosina B y azul de metileno, correspondientes a diferentes periodos de iluminación. Se observa que, en algunos, la degradación produce un corrimiento de la λ máxima y en otros no la produce.

En la figura 11, se ven las pérdidas de absorción, en función del tiempo de exposición para cada uno de los colorantes.

En estas experiencias los colorantes más estables han resultado, la floxina B y la eritrosina B, que se han degradado en alrededor de 65 días y el más inestable el rosa de Bengala con un tiempo de degradación de unos 30 días.

En las figuras 12, 13 y 14, se dan las series de espectros de mezclas de colorantes rosa de Bengala-floxina B, eritrosina B-floxina B, eritrosina B-uranina, para diferentes tiempos de iluminación.

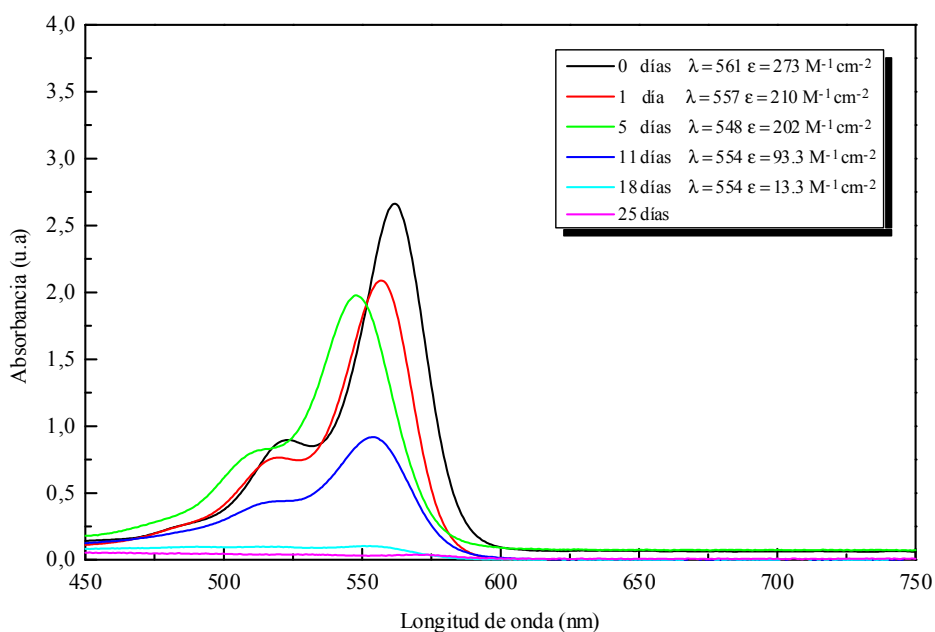
En la figura 15 se ven las pautas de degradación de dichas mezclas.

La degradación de las mezclas aparece equilibrada para los dos componentes excepto con la uranina, ya que no se observa una diferenciación notable de picos, en el proceso de degradación.

Los tiempos de degradación de las mezclas, han sido semejantes a las medias de los tiempos de sus componentes (32 días para rosa de Bengala-floxina B y 67 días para eritrosina B-floxina B).

La degradación de la uranina es más rápida que la de eritrosina B; la primera absorbe en una zona de λ más cortas y su excitación activa al otro colorante fototóxico que le acompaña, lo que es causa de su gran poder sinergizante.

**Figura 7. Espectro de absorción de 1.0×10^{-2} M de rosa de Bengala expuesto al sol (junio-agosto).
Tomamos $10 \mu\text{l}$ de la disolución y se diluye hasta $3000 \mu\text{l}$.**



**Figura 8. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M de floxina B expuesto al sol (junio-agosto).
Tomamos $10 \mu\text{l}$ de la disolución y se diluye hasta $3000 \mu\text{l}$.**

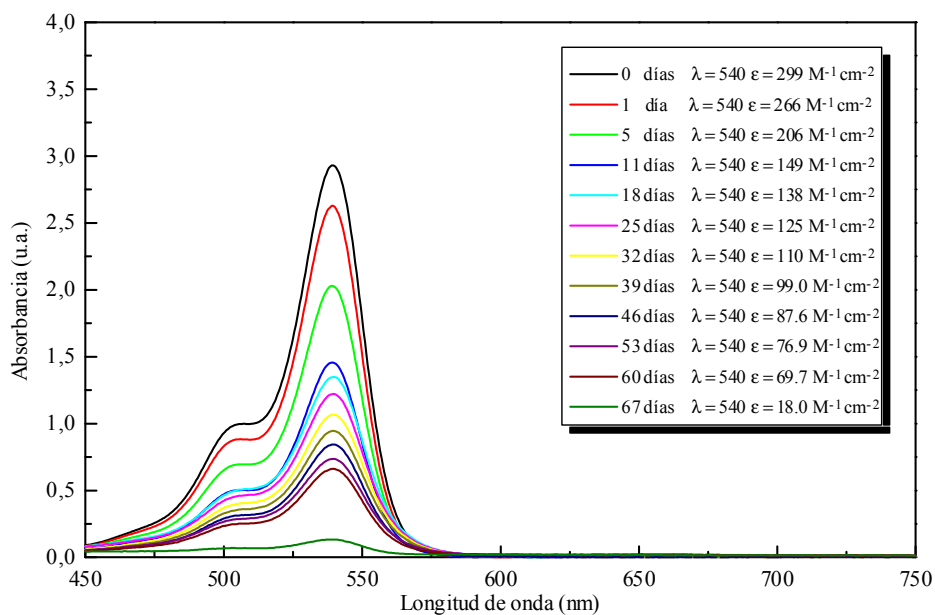


Figura 9. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M de eritrosina B expuesto al sol (junio-agosto). Tomamos 10 μ l de la disolución y se diluye hasta 3000 μ l.

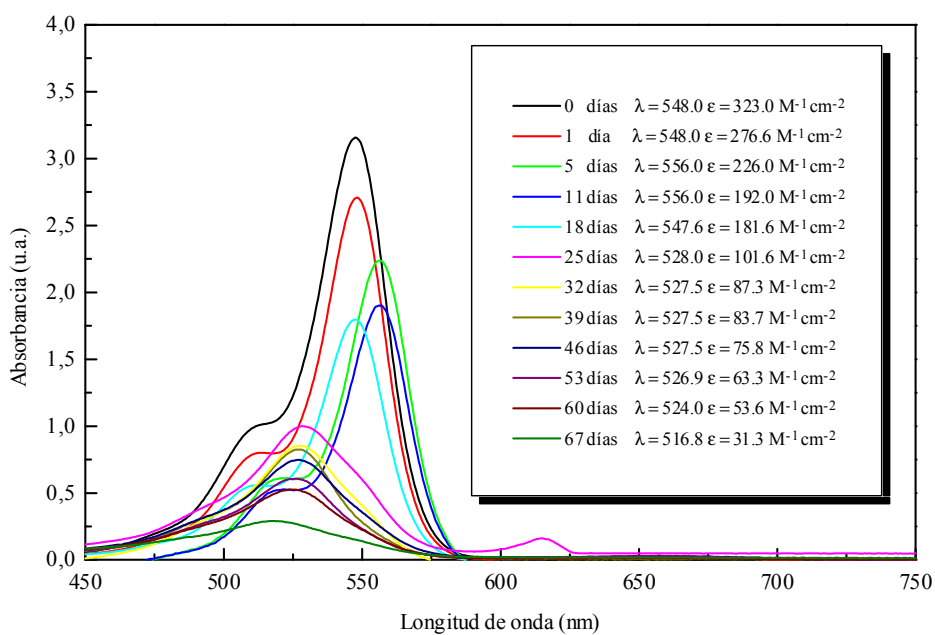


Figura 10. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M del azul de metileno expuesto al sol (junio-agosto). Tomamos 10 μ l de la disolución y se diluye hasta 3000 μ l.

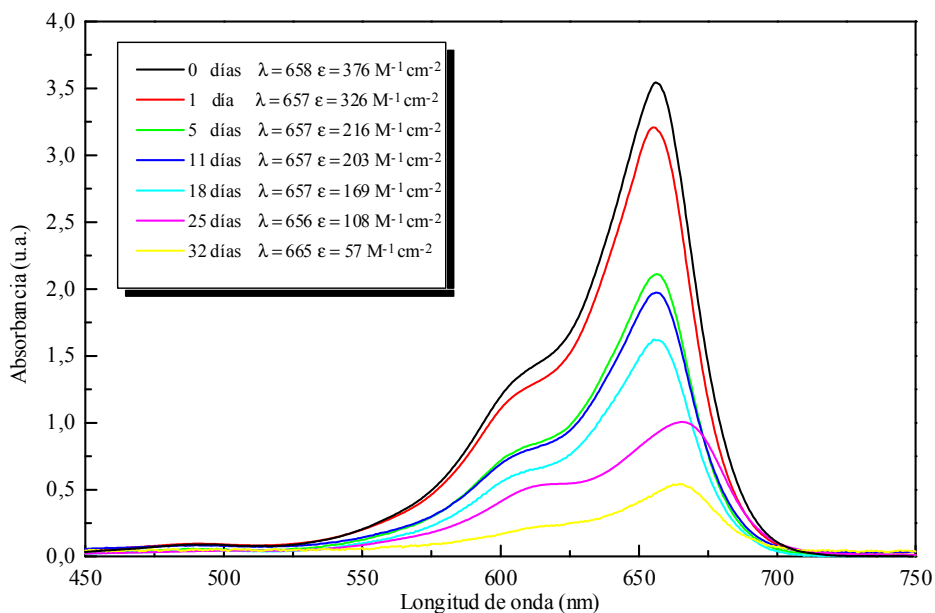


Figura 11. Porcentaje de absorbanza de los colorantes en función del tiempo de exposición al sol

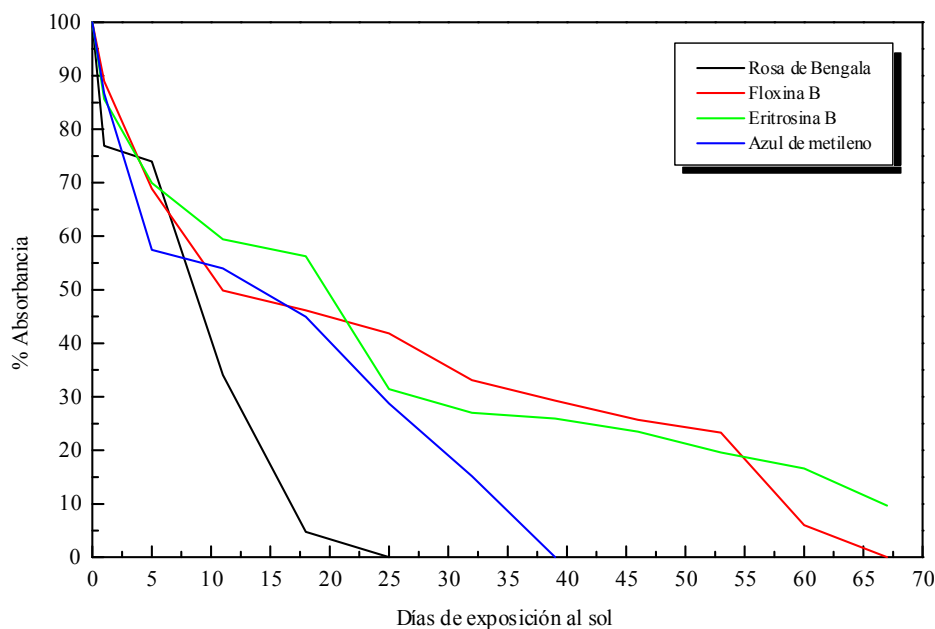
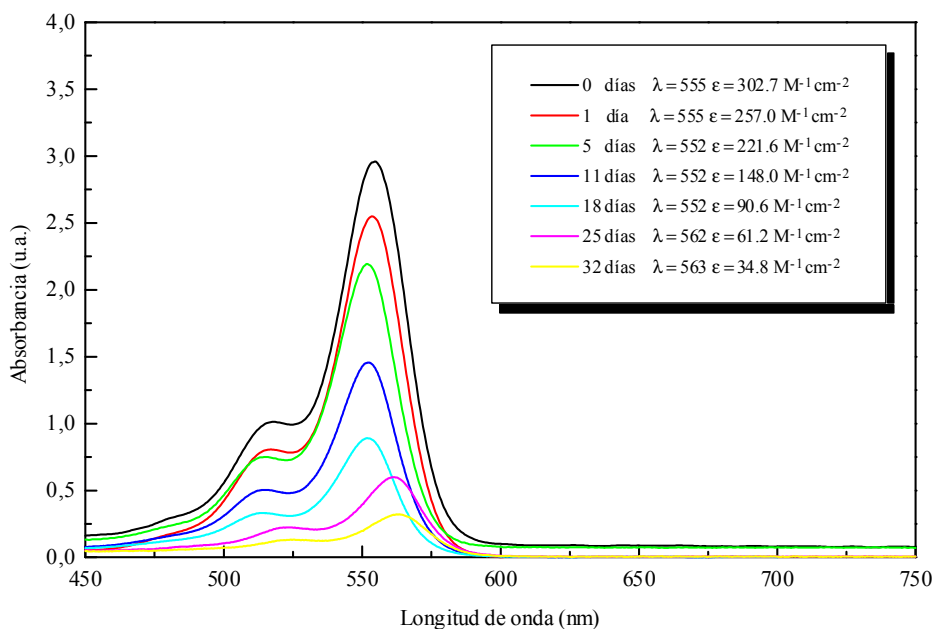
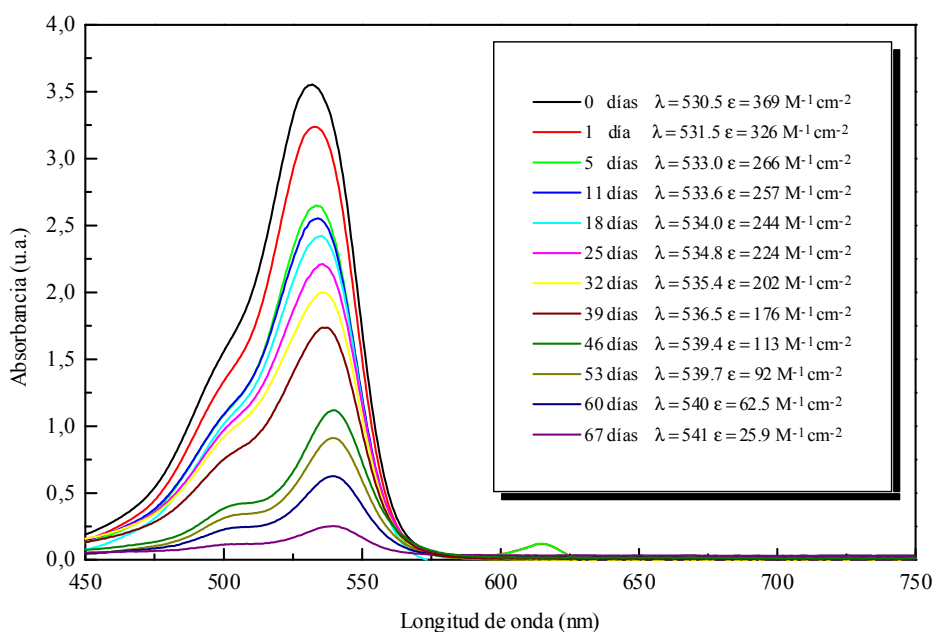


Figura 12. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M de rosa de Bengala-floxina B expuesto al sol (junio-agosto). Tomamos $5 \mu\text{l}$ de la disolución y se diluye hasta $3000 \mu\text{l}$.



**Figura 13. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M de eritrosina B-floxina B expuesto al sol (junio-agosto).
Tomamos 5 μl de la disolución y se diluye hasta 3000 μl .**



**Figura 14. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M de eritrosina B-uranina expuesto al sol (junio-agosto).
Tomamos 10 μl de la disolución y se diluye hasta 3000 μl .**

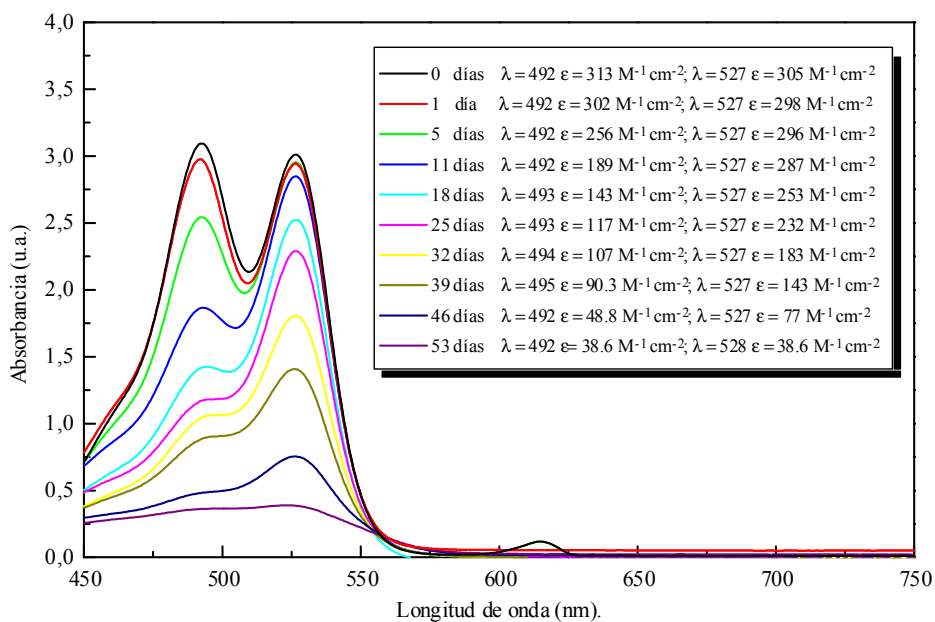
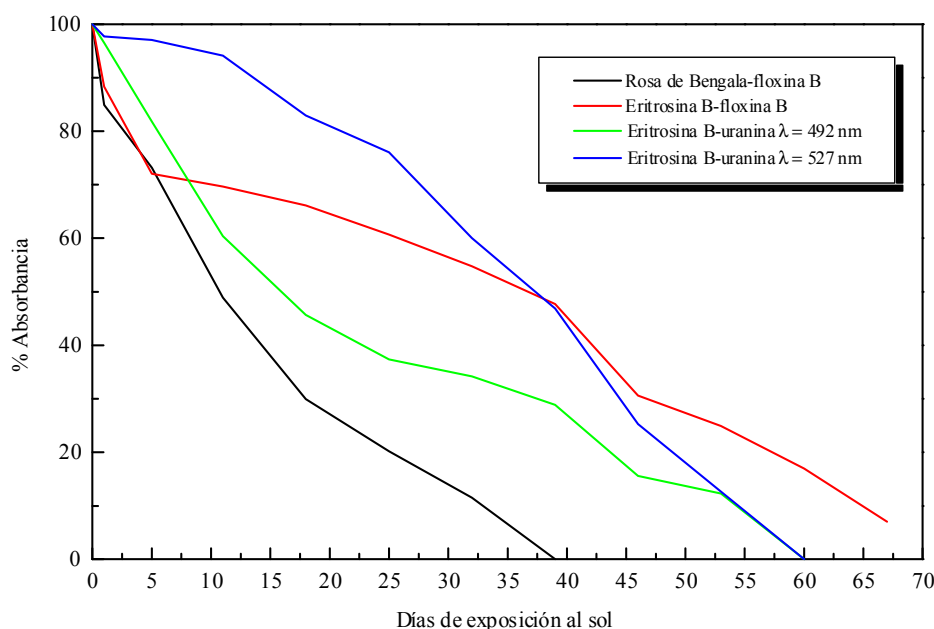


Figura 15. Porcentaje de absorbancia de las mezclas de colorantes en función del tiempo de exposición al sol



3.9. FOTOTOXICIDAD DE ALA-OPH (1:3/4) ENSAYADOS POR INGESTIÓN FRENTE A *C. capitata* CON UNA IRRADIACIÓN BAJA (40 Wm^{-2})

Los resultados de la mortalidad por ALA-Oph, en un rango de concentraciones entre 1 y 1.0×10^{-2} M y una irradiación baja de 40 Wm^{-2} durante 6 h, se dan en la tabla 9, para distintos tiempos de observación de la mortalidad, entre 3 y 72 h. Los valores se expresan en porcentajes de mortalidad de adultos (machos + hembras) de *C. capitata* en las mismas condiciones de iluminación.

La concentración 1.0×10^{-1} M ha sido la más tóxica, con un porcentaje de mortalidad de 81% a las 72 h. Con concentraciones superiores, el porcentaje de mortalidad ha sido menor. Algunas observaciones, sobre la ingestión del compuesto a concentraciones superiores a 1.0×10^{-1} M, parecen indicar que se produce una repelencia a la ingestión del cebo por *C. capitata*. Sin embargo, la mortalidad rápida, a las 3 h, ha sido mayor con la concentración 5.0×10^{-1} M.

Con concentraciones inferiores (5.0×10^{-2} y 1.0×10^{-2} M) se ha observado una disminución importante del porcentaje de mortalidad.

A estas concentraciones ALA-Oph han dado una toxicidad propia, no dependiente de la irradiación, con una mortalidad elevada; a las 72 h, se observó, a concentración 1 M, 74% de mortalidad, la cual disminuyó a menores concentraciones, pero siempre ha sido significativamente diferente de la mortalidad natural. A la concentración de 1.0×10^{-2} M, la mortalidad sin irradiación ha sido del 15%.

La mortalidad natural y la debida a la irradiación sin ALA han sido muy bajas.

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad total con diferentes concentraciones de ALA-Oph (1:3/4) y con irradiación baja (40 Wm^{-2})

CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *						BSI *
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	72 h
I	15.6 \pm 2.7 a	42.2 \pm 1.6 a	51.6 \pm 1.7 a	69.3 \pm 2.3 a	75.6 \pm 3.3 a	77.1 \pm 2.8 a	73.6 \pm 1.9 a
5.0x10⁻¹	22.2 \pm 2.4 b	44.4 \pm 4.3 b	54.4 \pm 2.4 b	72.9 \pm 1.7 b	76.4 \pm 2.0 ab	78.7 \pm 1.7 a	72.7 \pm 2.9 a
1.0x10⁻¹	10.0 \pm 1.8 c	29.6 \pm 1.7 c	48.2 \pm 1.7 c	70.0 \pm 2.5 a	77.3 \pm 2.3 b	80.9 \pm 3.0 b	60.9 \pm 1.7 b
5.0x10⁻²	3.1 \pm 0.9 d	23.3 \pm 2.2 d	35.3 \pm 1.7 d	49.6 \pm 1.7 c	54.4 \pm 2.4 c	60.4 \pm 1.7 c	24.2 \pm 2.0 c
1.0x10⁻²	3.3 \pm 1.8 d	9.1 \pm 1.5 e	13.8 \pm 1.2 e	19.8 \pm 1.5 d	26.4 \pm 2.0 d	33.1 \pm 1.5 d	14.8 \pm 1.5 d
BSC	0	1.5 \pm 0.2	2.3 \pm 0.5	2.8 \pm 0.2	3.6 \pm 0.7	5.1 \pm 1.0	
B	0	0	0	1.8 \pm 0.2	2.8 \pm 0.7	3.5 \pm 1.2	

* Cada valor es la media de 5 repeticiones \pm DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de tres jaulas con 15 machos + 15 hembras por jaula.

En cada columna y para cada dosis, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + ALA-Oph.

Irradiación: 40 Wm^{-2} durante 6 h.

BSI - % Mortalidad a las 72 h en un blanco con ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

BSC - % Mortalidad de un blanco sin ALA-Oph y con irradiación. Media de 5 repeticiones.

B - % Mortalidad sin ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

Los valores de mortalidad están corregidos con el test **Abbott (1925)**.

Se han calculado las CL_{50} a diferentes tiempos de observación de la mortalidad, con ALA-Oph (1:3/4). Los resultados se dan en la tabla 10.

La comparación de las concentraciones es más representativa con los resultados obtenidos a las 72 h, ya que, a tiempos cortos, la variabilidad es mayor. Para dicho tiempo la CL_{50} es del orden de 3.0×10^{-2} M.

Tabla 10. CL₅₀ de mortalidad dependiente del tiempo tras el comienzo de la irradiación, en adultos de *C. capitata* por ingestión de ALA-Oph (1:3/4) con irradiación baja (40 Wm⁻²)

	CL ₅₀ (M) dependiente del tiempo en <i>C. capitata</i>					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
ALA-Oph (1:3/4)	18.8x10 ⁻¹	10.2x10 ⁻¹	7.0x10 ⁻¹	1.4x10 ⁻¹	4.0x10 ⁻²	3.0x10 ⁻²

Valores obtenidos con el método Probit (Finney, 1971), partiendo de los datos de la tabla 9.

La baja fototoxicidad observada en estas experiencias, nos indicó la conveniencia de ensayar dosis de irradiación mayores, más parecidas a la irradiación solar propia de la zona mediterránea, en junio-agosto.

3.10. FOTOTOXICIDAD DE ALA-OPH (1:3/4) ENSAYADOS POR INGESTIÓN FRENTE A *C. capitata* CON UNA IRRADIACIÓN ALTA (400 Wm⁻²)

Los resultados de la mortalidad de ALA-Oph (1:3/4), en un rango de concentraciones entre 1.0x10⁻¹ y 5.0x10⁻³ M y una irradiación alta de 400 Wm⁻² durante 6 h, se dan, en la tabla 11, para distintos tiempos de observación de la mortalidad entre 3 y 72 h. Los valores se expresan como porcentajes de mortalidad de adultos (machos + hembras) de *C. capitata* en las mismas condiciones de iluminación.

La concentración de 1.0x10⁻¹ M ha sido la más fototóxica, con un porcentaje de mortalidad de 95% a las 72 h.

A concentraciones inferiores la mortalidad ha ido bajando, siendo las diferencias significativas (P<0.05).

Si comparamos estos valores con los obtenidos en la tabla 9 observamos que el aumento de la irradiación ha producido un incremento importante de la mortalidad. A 1.0x10⁻¹ M y a las 72 h, la mortalidad ha aumentado desde un 81% con la irradiación baja hasta un 96% con la irradiación alta; a 1.0x10⁻² M aumentó desde 33% a 60%.

La toxicidad propia de ALA-Oph, no dependiente de la irradiación, se ha observado también en esta experiencia, con una mortalidad, a las 72 h del 55%, a la concentración de 1.0×10^{-1} , que va disminuyendo mucho al disminuir la concentración, pero con las concentraciones ensayadas es significativamente diferente de la mortalidad natural. A 1.0×10^{-2} M la mortalidad sin irradiación es del 7%.

Tabla 11. Porcentaje de mortalidad total con diferentes concentraciones de ALA-Oph (1:3/4) con irradiación alta (400 Wm^{-2})

CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *						BSI *
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	72 h
1.0×10^{-1}	47.8 \pm 4.7 a	84.4 \pm 3.3 a	90.4 \pm 5.8 a	90.9 \pm 5.4 a	92.7 \pm 4.2 a	95.6 \pm 3.0 a	54.6 \pm 1.7 a
5.0×10^{-2}	46.9 \pm 4.5 a	64.7 \pm 5.9 b	71.4 \pm 5.8 b	74.2 \pm 5.0 b	76.7 \pm 4.8 b	80.5 \pm 6.6 b	25.0 \pm 2.0 b
1.0×10^{-2}	23.3 \pm 2.8 b	46.0 \pm 2.9 c	55.6 \pm 6.4 c	57.1 \pm 6.6 c	58.2 \pm 6.9 c	59.8 \pm 5.4 c	7.1 \pm 1.5 c
5.0×10^{-3}	13.2 \pm 1.8 c	16.0 \pm 1.9 d	20.6 \pm 2.3 d	22.1 \pm 2.6 d	25.6 \pm 2.9 d	29.6 \pm 3.4 d	2.1 \pm 0.5 d
BSC	0	0	0	1.5 \pm 0.2	2.6 \pm 0.8	3.8 \pm 1.0	
B	0	0	0	0	1.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.2	

* Cada valor es la media de 5 repeticiones \pm DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de tres jaulas con 15 machos + 15 hembras por jaula.

En cada columna y para cada dosis, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes

($P < 0.05$).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + ALA-Oph.

Irradiación: 400 Wm^{-2} durante 6 h.

BSI - % Mortalidad a las 72 h en un blanco con ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

BSC - % Mortalidad de un blanco sin ALA-Oph y con irradiación. Media de 5 repeticiones.

B - % Mortalidad sin ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

Los valores de mortalidad están corregidos con el test **Abbott (1925)**.

Se ha calculado la CL_{50} a diferentes tiempos de observación de la mortalidad, con ALA-Oph. Los resultados se dan en la tabla 12.

Como era de esperar, se observa una disminución de la CL_{50} al aumentar la dosis de irradiación.

Tabla 12. CL_{50} de mortalidad dependiente del tiempo tras el comienzo de la irradiación, en adultos de *C. capitata* por ingestión de ALA-Oph (1:3/4) con irradiación alta (400 Wm^{-2})

	CL_{50} (M) dependiente del tiempo en <i>C. capitata</i>					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
ALA-Oph (1:3/4)	9.0×10^{-2}	3.6×10^{-2}	2.4×10^{-2}	2.1×10^{-2}	1.7×10^{-2}	1.3×10^{-2}

Valores obtenidos con el método Probit (Finney, 1971), partiendo de los datos de la tabla 11.

3.11. INFLUENCIA DE LA PROPORCIÓN OPH SOBRE LA FOTOTOXICIDAD DE ALA PARA *C. capitata* A IRRADIACIÓN BAJA (40 Wm⁻²)

Los resultados de la mortalidad de ALA a la concentración de 1.0×10^{-1} M ALA y 4 proporciones diferentes de Oph, se dan en la tabla 13. Los valores se expresan en % de adultos muertos (machos + hembras) de *C. capitata* con las mismas condiciones de iluminación.

De las 4 proporciones de Oph ensayadas, la de 3/4 ha sido la más fototóxica dando 83% de mortalidad a las 72 h; ésta se reduce a la mitad con 3/8 de Oph y a la cuarta parte con 3/16. Con la proporción 3/2 el porcentaje de mortalidad ha sido del 59%, inferior al obtenido con 3/4. Así pues, para dosis inferiores a 3/4, la mortalidad es directamente proporcional a la proporción de Oph frente a ALA, pero con dosis altas de Oph aparece un efecto repelente.

En los cuatro ensayos se ha producido una toxicidad propia no dependiente de la irradiación, con una alta mortalidad, dependiente de la dosis. La disminución de esta toxicidad, observada con la proporción 3/2 indica también un efecto repelente del Oph.

Tabla 13. Influencia de la proporción de Oph sobre la fototoxicidad de ALA para *C. capitata*. Irradiación a 40 Wm⁻²

CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media ± DS) *						BSI *
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	72 h
ALA-Oph (1:3/2)	12.4 ± 1.6 a	21.0 ± 3.2 a	32.4 ± 1.6 a	48.6 ± 2.6 a	52.9 ± 4.1 a	58.6 ± 2.6 a	37.5 ± 2.6 a
ALA-Oph (1:3/4)	12.0 ± 0.5 a	31.2 ± 1.5 b	50.0 ± 2.0 b	75.3 ± 1.5 b	80.0 ± 2.5 b	83.2 ± 2.5 b	59.3 ± 1.6 b
ALA-Oph (1:3/8)	1.8 ± 0.2 b	11.6 ± 2.1 c	20.0 ± 1.8 c	29.1 ± 2.3 c	35.3 ± 3.0 c	39.3 ± 2.3 c	32.6 ± 1.8 c
ALA-Oph (1:3/16)	0 c	4.9 ± 1.1 d	7.1 ± 1.2 d	10.7 ± 1.4 d	16.0 ± 2.3 d	20.2 ± 3.0 d	16.4 ± 1.3 d
BSC	0	0	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.6 ± 0.7	4.1 ± 1.2	
B	0	0	0	1.0 ± 0.0	1.6 ± 0.5	2.0 ± 1.0	

* Cada valor es la media de 5 repeticiones ± DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de tres jaulas con 15 machos + 15 hembras por jaula.

En cada columna y para cada dosis, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + ALA-Oph.

Irradiación: 40 Wm⁻² durante 6 h.

ALA = 1.0×10^{-1} M.

BSI - % Mortalidad a las 72 h en un blanco con ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

BSC - % Mortalidad de un blanco sin ALA-Oph y con irradiación. Media de 5 repeticiones.

B - % Mortalidad sin ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

Los valores de mortalidad están corregidos con el test **Abbott (1925)**.

3.12. EFECTO DE SINERGIZANTES SOBRE LA FOTOTOXICIDAD DEL ALA-OPH (IRRADIACIÓN 40 Wm⁻²)

Con el objeto de aumentar la fototoxicidad de la mezcla ALA-Oph (1.0x10⁻¹: 0.75x10⁻¹ M) se han ensayado aditivos como se hizo en el caso de los colorantes. Se han utilizado la azodicarbonamida y el peróxido de benzoilo que son capaces de oxidar los grupos -SH a S-S y disminuir la resistencia a los radicales oxidantes.

Los resultados se dan en la tabla 14.

La azodicarbonamida y el peróxido de benzoilo, han producido una disminución de la mortalidad, mayor a la dosis más alta ensayada. Este efecto difiere del que se ha observado para la azodicarbonamida en el caso de los colorantes y es difícilmente interpretable. Podría atribuirse a una interferencia con el metabolismo del ALA, pero, en cualquier caso, exigiría un estudio profundo.

Tabla 14. Efecto de sinergizantes sobre la fototoxicidad del ALA-Oph con irradiación 40 Wm⁻²

CONCENTRACIÓN (M)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media ± DS) *							BSI *
	3 h	6h	12 h	24 h	48 h	72 h	72 h	
1.0x10 ⁻¹ M ALA-0.75x10 ⁻¹ M Oph	9.5 ± 0.8 ab	30.4 ± 1.0 a	49.3 ± 1.8 a	72.0 ± 2.0 a	78.8 ± 2.8 a	82.5 ± 2.8 a	58.0 ± 2.3 a	
1.0x10 ⁻¹ M ALA-0.75x10 ⁻¹ M Oph-1.0x10 ⁻¹ M AZO	4.9 ± 1.7 bc	18.4 ± 2.8 b	37.3 ± 4.0 c	69.1 ± 4.1 a	74.4 ± 3.0 a	75.1 ± 2.8 b	23.7 ± 1.8 c	
1.0x10 ⁻¹ M ALA-0.75x10 ⁻¹ M Oph-1.0x10 ⁻² M AZO	11.0 ± 1.4 a	15.7 ± 1.7 b	23.3 ± 1.9 d	33.3 ± 3.0 c	46.7 ± 3.3 c	60.0 ± 3.2 c	25.0 ± 2.2 c	
1.0x10 ⁻¹ M ALA-0.75x10 ⁻¹ M Oph-1.0x10 ⁻¹ M PBenz	3.1 ± 0.9 c	4.0 ± 1.4 c	11.8 ± 2.8 e	25.8 ± 2.4 d	31.1 ± 3.3 d	36.9 ± 3.2 d	13.6 ± 2.2 d	
1.0x10 ⁻¹ M ALA-0.75x10 ⁻¹ M Oph-1.0x10 ⁻² M PBenz	26.2 ± 4.1 d	36.2 ± 5.3 a	42.9 ± 4.7 b	51.4 ± 4.8 b	60.0 ± 4.0 b	71.4 ± 4.5 b	37.6 ± 2.3 b	
BSC	0	1.3 ± 0.2	2.6 ± 0.5	3.2 ± 0.3	4.6 ± 0.7	6.1 ± 1.5		
B	0	0	0	0.2 ± 0.0	2.6 ± 0.7	3.6 ± 1.2		

AZO - Azodicarbonamida.

PBenz - Peróxido de benzoilo.

* Cada valor es la media de 5 repeticiones ± DS con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de tres jaulas con 15 machos + 15 hembras por jaula.

En cada columna y para cada dosis, los valores medios no seguidos por la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Las moscas se mantienen 10 h sin comida y 14 h con cebo + ALA-Oph.

Irradiación: 40 Wm⁻² durante 6 h.

BSI - % Mortalidad a las 72 h en un blanco con ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

BSC - % Mortalidad de un blanco sin ALA-Oph y con irradiación. Media de 5 repeticiones.

B - % Mortalidad sin ALA-Oph y sin irradiación. Media de 5 repeticiones.

Los valores de mortalidad están corregidos con el test **Abbott (1925)**.

3.13. CONCENTRACIÓN DE PROTOPORFIRINA (PP) EN *C. capitata* A DIFERENTES TIEMPOS, DURANTE LA INGESTIÓN DE CEBO CON 1.0×10^{-1} M DE ALA Y 0.75×10^{-1} M DE OPH EN OSCURIDAD Y CON ILUMINACIÓN. RELACIÓN CON LA FOTOTOXICIDAD

Los resultados obtenidos en oscuridad se dan en la figura 16. La cantidad de PP por mosca se ha multiplicado por 4 en las 3 primeras horas de ingestión en oscuridad y luego se mantiene en los niveles alcanzados.

Estos datos pueden interpretarse como debidos al establecimiento de un temprano equilibrio entre la biosíntesis de PP y su degradación metabólica y, en parte también, a una mayor ingestión en las primeras horas.

La curva nos indica que, para alcanzar la máxima concentración por mosca, no son necesarios tiempos largos de ingestión, lo que es un factor favorable para la aplicación en campo de cebos con ALA.

En la figura 17, se dan los datos obtenidos cuando la ingestión de cebo tratado se realiza en las condiciones normales de iluminación del insectario (Fotoperiodo 16:8 h, L/O; iluminación, 2 Wm^{-2}). También en esta experiencia, el aumento de la concentración de PP en las moscas se ha producido en las primeras 3 h; pero el techo alcanzado es inferior, con un incremento por un factor cercano a 3, lo que significa que la concentración final de PP ha disminuido un 32%.

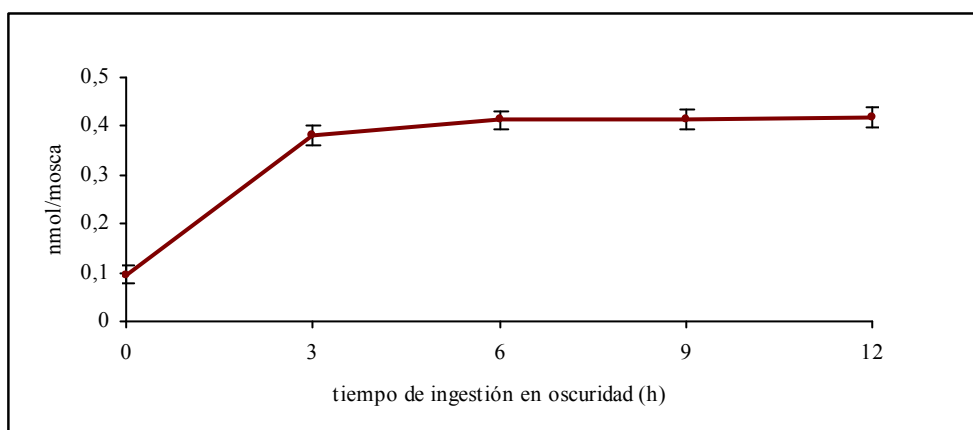
En las tablas 15 y 16 se dan la mortalidad obtenida cuando se irradian las moscas tras 4 periodos crecientes de ingestión.

En las curvas 16 y 17, se observa que el aumento de porfirina por mosca entre 3 y 12 h de ingestión, ha sido pequeño; en cambio, la mortalidad acumulada 72 h después de la irradiación, es mucho mayor cuando el periodo de ingestión es de 12 h.

Estos datos indican que otro u otros factores, dependientes del tiempo, influyen en la mortalidad, como pueden ser la difusión de ALA y porfirina a órganos más sensibles del insecto o la formación de otros metabolitos tóxicos.

Por otra parte, la mortalidad obtenida, cuando el cebo tratado se ofrece en la oscuridad, es mayor, para cada tiempo de ingestión, que cuando se ofrece con luz (Tablas 15 y 16).

Figura 16. Concentración de PP en *C. capitata* a diferentes tiempos, durante la ingestión de ALA y Oph en oscuridad



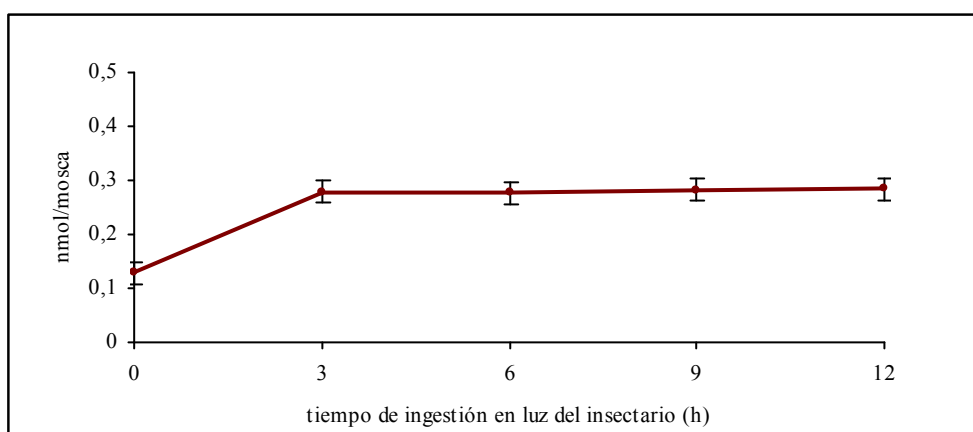
Valores medios de 3 repeticiones. 3 jaulas por repetición, con 10 moscas/jaula (5 machos + 5 hembras).

Moscas sin comida durante 10 h; exposición a comida tratada en oscuridad durante 12 h (1.0×10^{-1} M ALA y 0.75×10^{-1} M Oph).

El valor de PP se ha medido con Ex: 400 nm, rendija Ex: 10 nm; Em: 631 nm, rendija Em: 18 nm.

La concentración de PP se determinó por interpolación con una línea de calibración de fluorescencia obtenida con conocidas concentraciones de PP.

Figura 17. Concentración de PP durante la ingestión de ALA y Oph en luz del insectario (2 Wm^{-2})



Valores medios de 3 repeticiones. 3 jaulas por repetición, con 10 moscas/jaula (5 machos + 5 hembras).

Moscas sin comida durante 10 h; exposición a comida tratada en luz del insectario durante 12 h (1.0×10^{-1} M ALA y 0.75×10^{-1} M Oph).

El valor de PP se ha medido con Ex: 400 nm, rendija Ex: 10 nm; Em: 631 nm, rendija Em: 18 nm.

La concentración de PP se determinó por interpolación con una línea de calibración de fluorescencia obtenida con conocidas concentraciones de PP.

Tabla 15. Mortalidad tras la irradiación después de diferentes periodos de ingestión de ALA-Oph en oscuridad, (irradiación a 400 Wm^{-2} , durante 6 h)

TI (h)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
0	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	1.1 \pm 0.5 a	1.1 \pm 0.5 a
3	5.0 \pm 1.0 b	21.9 \pm 1.5 b	25.3 \pm 2.7 b	28.8 \pm 2.1 b	58.9 \pm 2.5 b	60.0 \pm 2.8 b
6	11.5 \pm 2.4 c	35.7 \pm 1.6 c	48.9 \pm 3.5 c	55.5 \pm 1.5 c	67.2 \pm 4.0 c	78.0 \pm 3.2 c
9	25.0 \pm 1.7 d	49.7 \pm 2.6 d	58.9 \pm 2.3 d	67.5 \pm 2.3 d	78.9 \pm 2.4 d	85.0 \pm 3.6 d
12	48.9 \pm 2.0 e	71.5 \pm 3.2 e	83.2 \pm 2.1 e	88.5 \pm 2.1 e	90.2 \pm 2.1 e	94.0 \pm 2.4 e

TI - Tiempo de ingestión de comida tratada.

Media de 5 repeticiones con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de 3 jaulas con (15 machos + 15 hembras) por jaula.

Se expusieron a comida tratada durante 0, 3, 6, 9 y 12 h.

ALA = 1.0×10^{-1} M; Oph = 0.75×10^{-1} M.

Tras cada periodo de ingestión las moscas se irradiaron con 400 Wm^{-2} durante 6 h.

* Porcentaje de mortalidad: recuento a distintos tiempos tras el comienzo de cada irradiación. Valores acumulados.

Tabla 16. Mortalidad tras la irradiación después de diferentes periodos de ingestión de ALA-Oph en luz del insectario (2 Wm^{-2}), (irradiación a 400 Wm^{-2} , durante 6 h)

TI (h)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
0	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	2.5 \pm 1.5 a	3.3 \pm 0.3 a	7.5 \pm 1.5 a	9.2 \pm 3.0 a
3	5.2 \pm 0.9 b	10.0 \pm 1.7 b	16.7 \pm 2.8 b	25.7 \pm 1.6 b	34.8 \pm 2.5 b	42.9 \pm 2.8 b
6	7.9 \pm 1.7 c	20.8 \pm 1.3 c	25.4 \pm 2.5 c	37.9 \pm 2.9 c	50.4 \pm 2.8 c	58.4 \pm 4.4 c
9	9.6 \pm 2.8 d	25.8 \pm 1.6 d	37.1 \pm 3.3 d	51.3 \pm 1.5 d	58.3 \pm 4.0 d	62.9 \pm 1.2 d
12	11.7 \pm 1.2 d	26.7 \pm 1.2 d	40.0 \pm 3.8 d	51.5 \pm 2.6 d	59.4 \pm 2.1 d	67.8 \pm 1.4 e

TI - Tiempo de ingestión de comida tratada.

Media de 5 repeticiones con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de 3 jaulas con (15 machos + 15 hembras) por jaula.

Se expusieron con comida tratada durante 0, 3, 6, 9 y 12 h con luz del insectario (2 Wm^{-2}).

ALA = 1.0×10^{-1} M; Oph = 0.75×10^{-1} M.

Tras cada periodo de ingestión las moscas se irradiaron con 400 Wm^{-2} durante 6 h.

* Porcentaje de mortalidad: recuento a distintos tiempos tras el comienzo de cada irradiación. Valores acumulados.

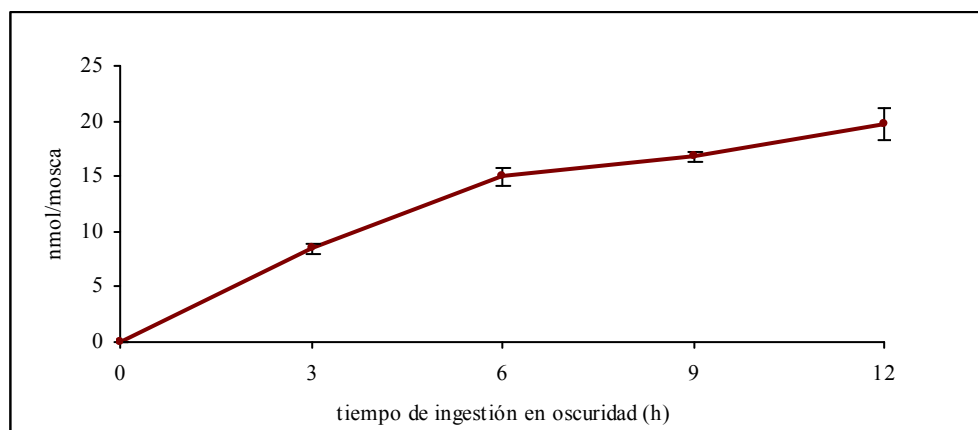
3.14. CONCENTRACIÓN DE PP EN *C. capitata* A DIFERENTES TIEMPOS, DURANTE SU INGESTIÓN EN OSCURIDAD Y EFECTO FOTOTÓXICO

La ingestión directa de la hematoporfirina, ha sido ensayada por el grupo de Jori en la Universidad de Padua. Parece interesante comparar el efecto de la ingestión de protoporfirina con el de su antecesor metabólico el ALA.

En la figura 18 se observa la acumulación de PP por su ingestión, a la concentración de 1.25×10^{-2} M en oscuridad. Esta concentración de PP es la equivalente metabólica de 1.0×10^{-1} M de ALA (1/8).

La acumulación de porfirina ha aumentado rápidamente durante las 6 primeras horas y, a partir de este tiempo, hay un incremento con menor pendiente. La concentración alcanzada por mosca es mucho mayor que con ALA.

Figura 18. Acumulación de PP, en *C. capitata* durante la ingestión de PP en oscuridad



Valores medios de 3 repeticiones. 3 jaulas por repetición, con 10 moscas/jaula (5 machos + 5 hembras).

Moscas sin comida durante 10 h; exposición a comida tratada en oscuridad durante 12 h (1.25×10^{-2} M PP).

El valor de PP se ha medido con Ex: 400 nm, rendija Ex: 10 nm; Em: 631 nm, rendija Em: 18 nm.

La concentración de PP se determinó por interpolación con una línea de calibración de fluorescencia obtenida con conocidas concentraciones de PP.

En la tabla 17 se dan los resultados de mortalidad obtenidos por irradiación, a diferentes tiempos tras el periodo de ingestión en oscuridad. Se observa que, a mayor tiempo de ingestión en oscuridad, ha habido un incremento en el porcentaje de mortalidad.

La ingestión de ALA o PP, en concentraciones metabólicoequivalentes produce concentraciones muy diferentes de PP en las moscas. A las 12 h de ingestión en oscuridad, las moscas tratadas con PP, tienen 50 veces más porfirina que las tratadas con concentraciones 8 veces mayores de ALA-Oph (equimetabólicas); sin embargo, la mortalidad observada por irradiación, tras la ingestión de ambos compuestos, no ha resultado tan diferente. Concentraciones por mosca de $0.4 \mu\text{g}$ producidas por ingestión de ALA-Oph, han dado

mortalidades semejantes a las obtenidas con 15 $\mu\text{g}/\text{mosca}$ por ingestión de protoporfirina.

A las 9 h de ingestión las mortalidades con ALA y PP son semejantes recuento a las 72 h. En cambio, a las 12 h de ingestión, con PP se alcanza el 100% de mortalidad al fin de la irradiación (6 h) y, con ALA, el 94% a las 72 h.

Tabla 17. Mortalidad tras la irradiación después de diferentes periodos de ingestión de PP en oscuridad (irradiación a 400 Wm^{-2} , durante 6 h)

TI (h)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
0	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	0.0 \pm 0.0 a	1.1 \pm 0.0 a
3	42.2 \pm 3.1 b	48.9 \pm 2.1 b	53.3 \pm 2.8 b	55.7 \pm 1.6 b	57.8 \pm 1.9 b	58.9 \pm 1.6 b
6	50.0 \pm 1.7 c	61.1 \pm 1.9 c	62.2 \pm 1.8 c	63.3 \pm 1.9 c	68.9 \pm 3.9 c	71.1 \pm 2.0 c
9	65.6 \pm 3.3 d	70.8 \pm 2.4 d	84.2 \pm 2.1 d	84.2 \pm 2.1 d	85.8 \pm 2.5 d	87.5 \pm 3.7 d
12	73.3 \pm 2.5 e	100 e	-	-	-	-

TI - Tiempo de ingestión de comida tratada.

Media de 5 repeticiones con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de 3 jaulas con (15 machos + 15 hembras) por jaula.

Se expusieron a comida tratada durante 0, 3, 6, 9 y 12 h.

PP = 1.25×10^{-2} M.

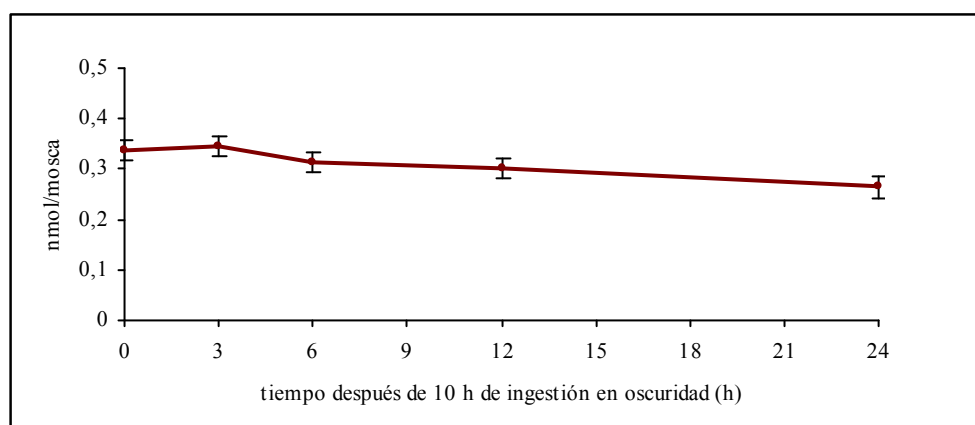
Tras cada periodo de ingestión las moscas se irradiaron con 400 Wm^{-2} durante 6 h.

* Porcentaje de mortalidad: recuento a distintos tiempos tras el comienzo de cada irradiación. Valores acumulados.

3.15. EVOLUCIÓN DE LA PROTOPORFIRINA EN *C. capitata*, TRAS LA INGESTIÓN DE ALA Y OPH EN OSCURIDAD, Y SU INFLUENCIA EN LA FOTOTOXICIDAD

En la figura 19 se observa la evolución de la protoporfirina en moscas después de la ingestión de 1×10^{-1} M de ALA y 0.75×10^{-1} M Oph durante 10 h en oscuridad.

Se observa que ha habido un escaso descenso de la concentración en mosca, durante las 24 h posteriores al periodo de ingestión, lo que puede explicarse por una compensación entre la síntesis y la degradación de la protoporfirina, después de la ingestión, puesto que una cantidad de ALA todavía se puede estar transformando en protoporfirina y ésta, a su vez, se está degradando.

Figura 19. Evolución de PP, en *C. capitata* tras la ingestión de ALA y Oph

Valores medios de 3 repeticiones. 3 jaulas por repetición, con 10 moscas/jaula (5 machos + 5 hembras).

Moscas sin comida durante 10 h; exposición a comida tratada en oscuridad durante 10 h (1.0×10^{-1} M ALA y 0.75×10^{-1} M Oph).

Tras la ingestión se mantienen, por periodos, hasta 24 h en el insectario (Fotoperiodo 16:8 h, L/O; iluminación, 2 Wm^{-2}) y con comida normal.

El valor de PP se ha medido con Ex: 400 nm, rendija Ex: 10 nm; Em: 631 nm, rendija Em: 18 nm.

La concentración de PP se determinó por interpolación con una línea de calibración de fluorescencia obtenida con conocidas concentraciones de PP.

En la tabla 18 se muestra el porcentaje de mortalidad registrado cuando se irradian las moscas en distintos tiempos tras el periodo de ingestión en oscuridad.

Tabla 18. Mortalidad tras la irradiación después de diferentes periodos entre el fin de la ingestión de ALA-Oph en oscuridad y la irradiación a 400 Wm^{-2} , durante 6 h

TII (h)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *						
	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
3	0.0 \pm 0.0 a	9.2 \pm 1.3 a	20.8 \pm 1.8 a	54.2 \pm 1.1 a	63.3 \pm 1.1 a	81.7 \pm 1.6 a	81.7 \pm 1.2 a
6	0.0 \pm 0.0 a	30.8 \pm 1.7 b	60.0 \pm 2.7 b	69.2 \pm 1.1 b	80.0 \pm 0.6 b	83.3 \pm 1.3 b	85.8 \pm 3.7 b
12	54.2 \pm 2.4 b	83.3 \pm 2.1 c	88.3 \pm 2.7 c	95.8 \pm 1.0 c	96.0 \pm 0.7 c	96.3 \pm 0.6 c	96.7 \pm 0.4 c
24	62.5 \pm 1.7 c	77.2 \pm 2.2 d	80.8 \pm 1.0 d	87.5 \pm 2.1 d	95.0 \pm 1.4 c	96.7 \pm 0.4 c	98.3 \pm 0.6 c
B	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

TII - Tiempo entre periodo de ingestión e irradiación.

Media de 5 repeticiones con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de 3 jaulas con (15 machos + 15 hembras) por jaula.

Se expusieron a comida tratada durante 10 h en oscuridad. Luego se mantienen en el insectario hasta su irradiación.

ALA = 1.0×10^{-1} M; Oph = 0.75×10^{-1} M

* Porcentaje de mortalidad: recuento a distintos tiempos tras el comienzo de cada irradiación. Valores acumulados.

B - % Mortalidad en moscas sin tratar.

Se observa que, cuando el tiempo transcurrido entre el fin de la ingestión y el comienzo de la irradiación aumenta desde 3 a 12 h, la mortalidad registrada en distintos tiempos tras la irradiación ha aumentado significativamente.

Sin embargo, cuando las moscas se irradian 24 h después del fin de la ingestión, hay un ligero descenso de la mortandad o un cambio no significativo.

A las 72 h después del inicio de la irradiación, cuando ésta se realiza 24 h después del fin de la ingestión, el ALA-Oph produce una mortalidad del 98%, mientras que si se irradian 3 h después de la ingestión la mortalidad es del 82%.

Este aumento de la mortalidad cuando transcurre un tiempo entre la ingestión y la irradiación, es un factor favorable para su aplicación en campo.

Este efecto no es debido a una mayor concentración de porfirina en las moscas y podría atribuirse a una letalidad intrínseca prolongada (no fotoactiva) del ALA-Oph o de sus metabolitos, o a una difusión más completa de la PP a los órganos sensibles de la *C. capitata*.

Se ha observado que ALA y Oph producen mortalidad por toxicidad a la baja luminosidad del insectario (2 Wm^{-2}) después de la comida. Después de 12 h del final del periodo de ingestión se observó una mortalidad del 54% y al cabo de 24 h fue del 62%. Se ha observado una gran variabilidad, a tiempos cortos después de la irradiación.

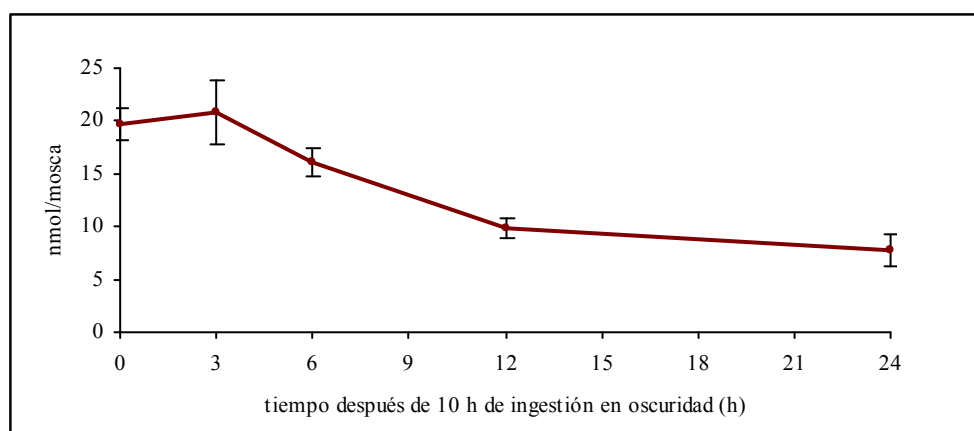
3.16. EVOLUCIÓN DE LA PP, EN *C. capitata* TRAS SU INGESTIÓN EN OSCURIDAD, Y SU INFLUENCIA EN LA FOTOTOXICIDAD

Los resultados obtenidos se dan en la figura 20.

Se observa que hay una caída del 60% en la concentración de PP en las moscas, tras 24 h del fin del periodo de ingestión, mantenidas en el insectario y que esta caída es bastante regular lo que indica un proceso continuo de degradación-excreción.

Al comparar las figuras 19 y 20 destaca el hecho de que tras la ingestión de ALA-Oph la concentración de porfirina en mosca cae poco y decae fuertemente cuando las moscas ingieren la PP.

Esta diferencia puede explicarse porque, en el segundo caso no hay un proceso de biosíntesis que compense la degradación de porfirina.

Figura 20. Evolución de PP, en *C. capitata* tras su ingestión

Valores medios de 3 repeticiones. 3 jaulas por repetición, con 10 moscas/jaula (5 machos + 5 hembras).

Moscas sin comida durante 10 h; exposición a comida tratada en oscuridad durante 10 h (1.25×10^{-2} M PP).

Tras la ingestión se mantienen, por periodos, hasta 24 h en el insectario (Fotoperiodo 16:8 h, L/O; iluminación, 2 Wm^{-2}) y con comida normal.

El valor de PP se ha medido con Ex: 400 nm, rendija Ex: 10 nm; Em: 631 nm, rendija Em: 18 nm.

La concentración de PP se determinó por interpolación con una línea de calibración de fluorescencia obtenida con conocidas concentraciones de PP.

En la tabla 19 se da la mortalidad registrada cuando se irradian las moscas, en distintos tiempos, tras el periodo de ingestión de PP en oscuridad. Se observa que, a mayor lapso de tiempo después de la ingestión, el porcentaje de mortalidad disminuye.

Irradiando después de 3 h del fin de la ingestión, se alcanza el 100% de mortalidad a las 8 h tras el comienzo de la irradiación, mientras que irradiando a las 24 h, sólo se alcanza el 96% a las 72 h.

Estos datos indican una tendencia opuesta a la observada con ingestión de ALA-Oph; en este caso, cuando el lapso de tiempo entre ingestión e irradiación es mayor aumenta la mortalidad dentro de unos límites (Tabla 18).

Tabla 19. Mortalidad tras la irradiación después de diferentes periodos entre el fin de la ingestión de PP en oscuridad y la irradiación a 400 Wm^{-2} , durante 6 h

TII (h)	% MORTALIDAD DESDE EL COMIENZO DE IRRADIACIÓN (media \pm DS) *					
	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
3	98.3 \pm 2.4 a	100.0 a	-	-	-	-
6	91.1 \pm 3.8 b	97.8 \pm 3.8 b	100.0 a	-	-	-
12	71.1 \pm 6.9 c	83.3 \pm 3.3 c	90.0 \pm 5.8 b	95.6 \pm 7.7 a	97.8 \pm 3.8 a	100.0 a
24	48.9 \pm 3.8 d	71.1 \pm 5.1 d	82.2 \pm 6.9 c	83.3 \pm 6.7 b	93.3 \pm 3.7 b	95.6 \pm 3.8 b
B	0.0 \pm 0.0 e	0.0 \pm 0.0 e	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 c	0.0 \pm 0.0 d	0.0 \pm 0.0 e

TII - Tiempo entre periodo de ingestión e irradiación.

Media de 5 repeticiones con distintas generaciones de moscas.

Cada repetición es la media de 3 jaulas con (15 machos + 15 hembras) por jaula.

Se expusieron a comida tratada durante 10 h en oscuridad.

PP= 1.25×10^{-2} M.

Tras cada periodo de ingestión las moscas se irradiaron con 400 Wm^{-2} durante 6 h.

* Porcentaje de mortalidad: recuento a distintos tiempos tras el comienzo de cada irradiación. Valores acumulados.

B - % Mortalidad en moscas sin tratar.

3.17. DEGRADACIÓN DE LA PP Y DEL ALA EXPUESTOS AL SOL (6.3 Kwhm^{-2})

En la figura 21, se ven los espectros de absorción, en función del tiempo de exposición para la PP a la concentración de 1.0×10^{-2} M.

Se ha observado una λ máxima alrededor de 400 nm.

En la figura 22 se ven las pérdidas de absorción en función del tiempo. El primer día de exposición hay una pérdida de absorción del 18%, el quinto día es del 27% y a los 11 días de exposición solar la PP está totalmente degradada.

Para comprobar la estabilidad del ALA se hicieron espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN durante 25 días de exposición al sol en julio.

No se han observado cambios en los espectros de ^1H RMN durante dicho periodo (Figuras 23-24). Tampoco se han visto cambios en los de ^{13}C RMN (Figura 25-26).

**Figura 21. Espectros de absorción de 1.0×10^{-2} M de protoporfirina expuesta al sol (junio-agosto).
Tomamos $10 \mu\text{l}$ de la disolución y se diluye hasta $3000 \mu\text{l}$.**

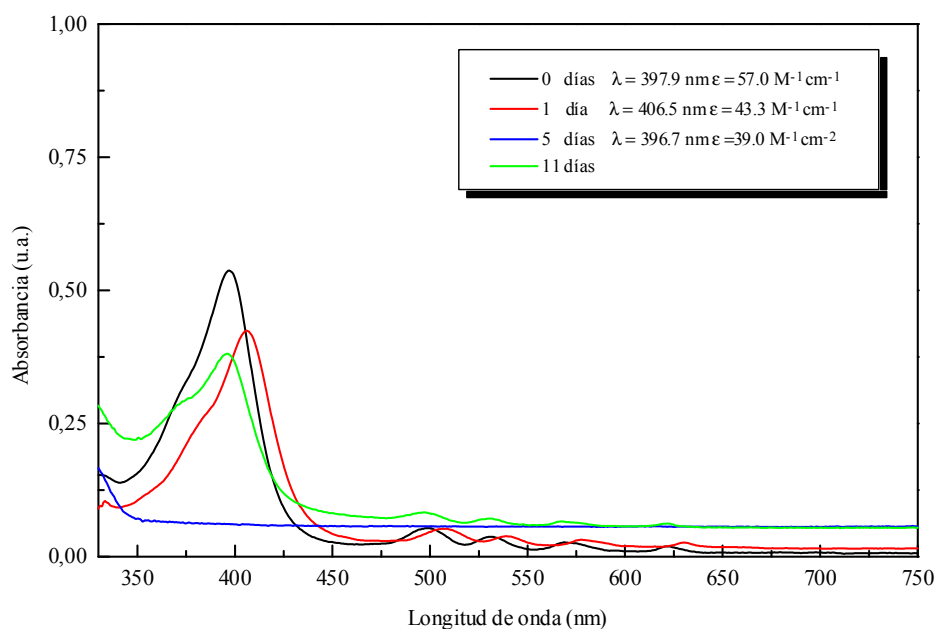


Figura 22. Porcentaje de absorción de la PP en función del tiempo de exposición al sol

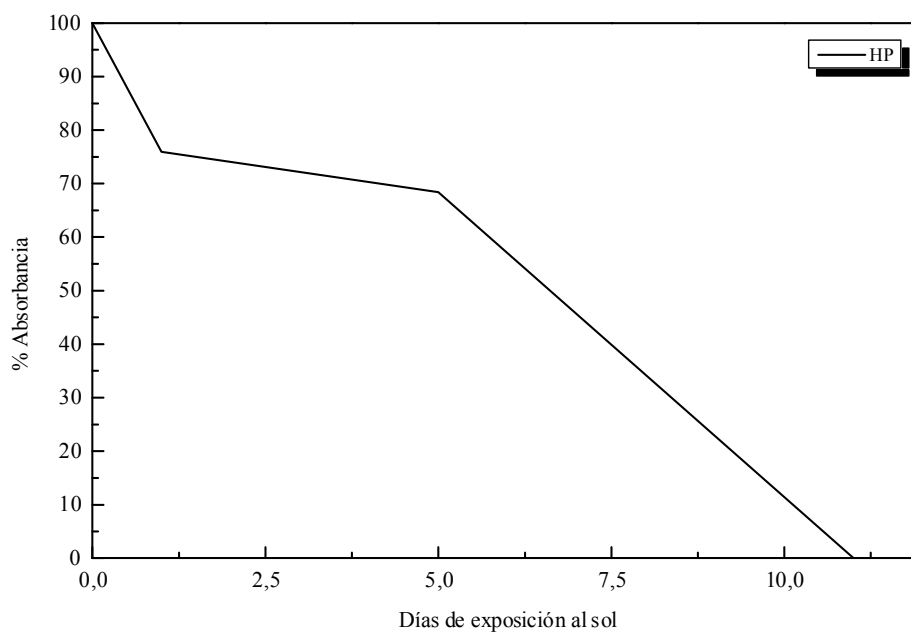


Figura 23. Espectro de ^1H RMN del ALA a los 0 días de exposición al sol (junio-agosto)

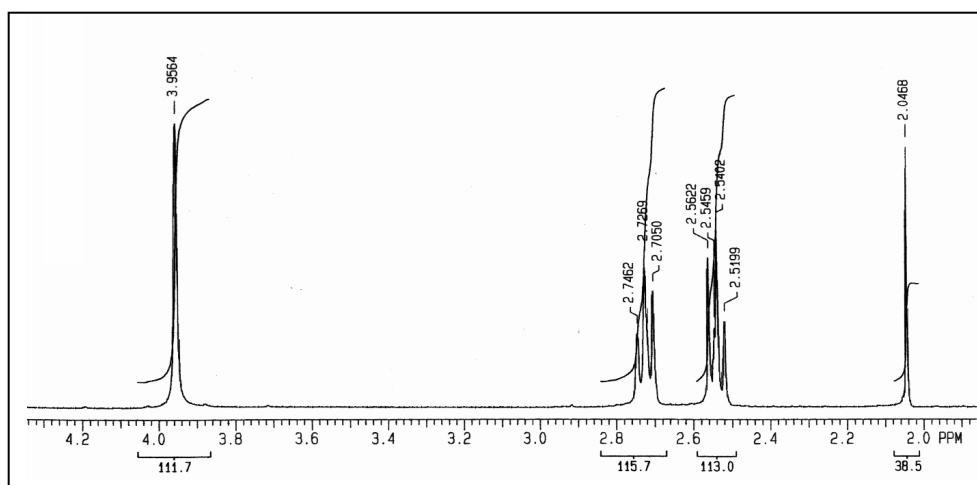


Figura 24. Espectro de ^1H RMN del ALA a los 25 días de exposición al sol (junio-agosto)

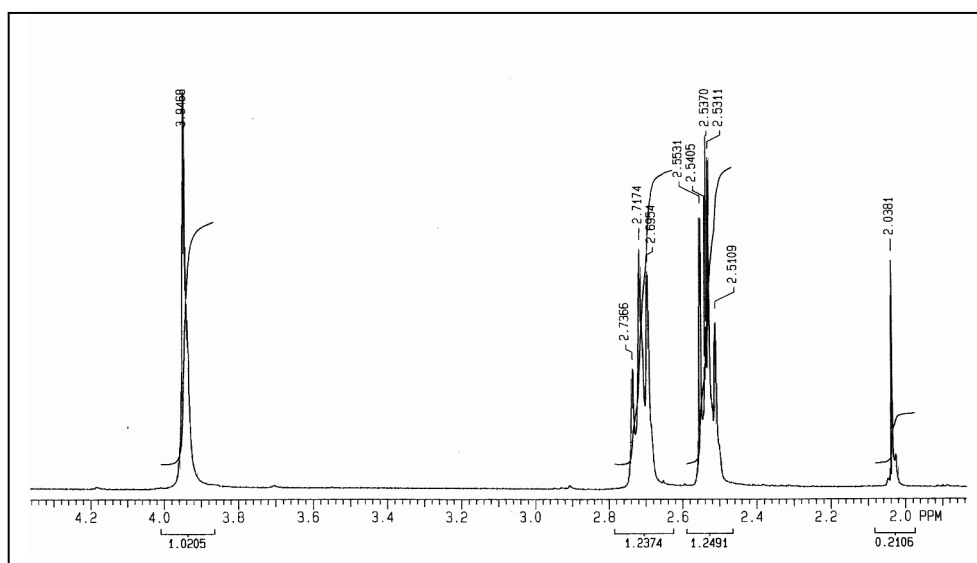
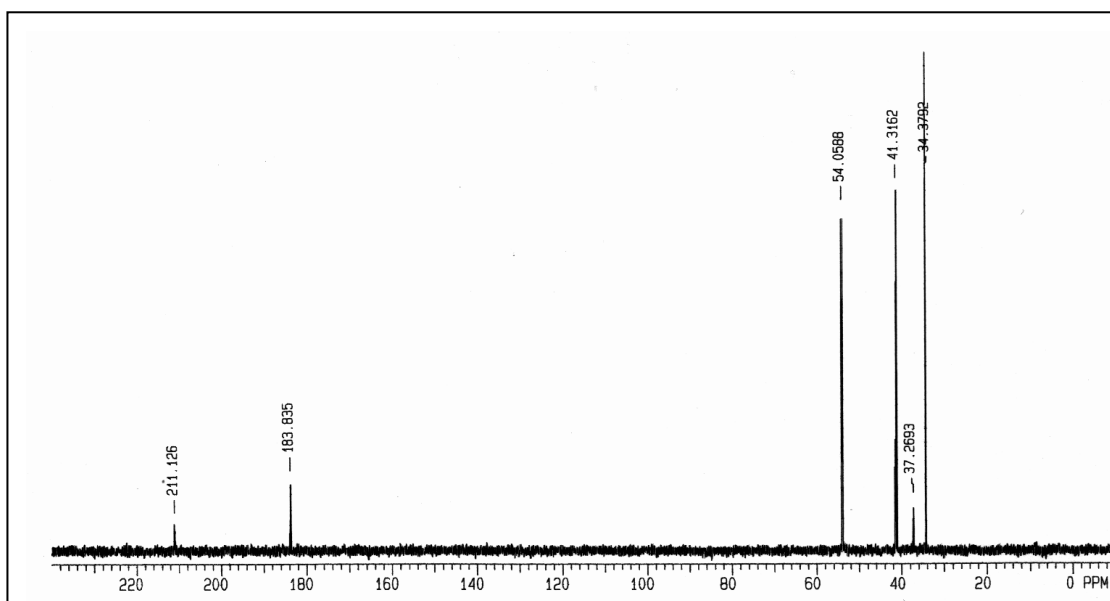
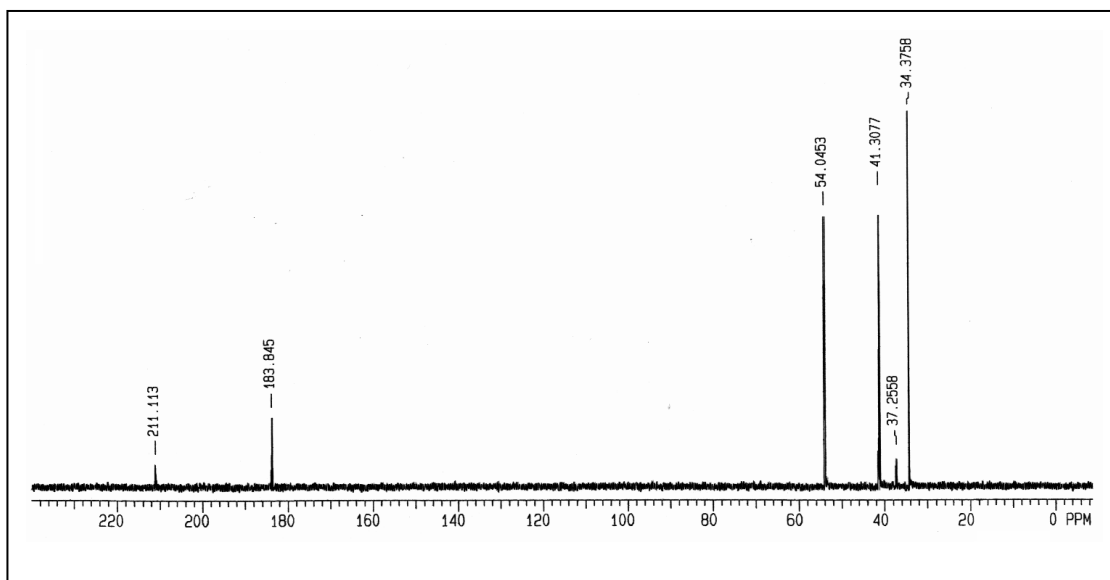


Figura 25. Espectro de ^{13}C RMN del ALA a los 0 días de exposición al sol (junio-agosto)**Figura 26. Espectro de ^{13}C RMN del ALA a los 25 días de exposición al sol (junio-agosto)**

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la comparación de la fototoxicidad de los 8 colorantes ensayados por ingestión, hay que señalar la mayor efectividad del rosa de Bengala que ha dado los índices de mortalidad más elevados (mortalidad del 100 % a las 12 h y a una concentración de 2.5×10^{-3} M) y una CL_{50} a las 72 h de 2.3×10^{-4} M.

También el rosa de Bengala ha dado los valores más cortos de TL_{50} , es decir ha sido el más rápido con un tiempo de 2.11 h a 2.5×10^{-3} M.

El rosa de Bengala a la concentración de 6.2×10^{-4} M y superiores produce una toxicidad propia no dependiente de la irradiación con una mortalidad pequeña pero significativamente distinta de la mortalidad natural, y paralelamente, también es el menos inocuo para vertebrados; por esto tienen gran interés los datos de fototoxicidad de las mezclas sinérgicas de otros colorantes con rosa de Bengala, sobre todo con proporciones menores de éste.

Las combinaciones de rosa de Bengala con floxina B, con eritrosina B y con uranina, en proporción molar 0.5:0.5, han sido las más fototóxicas, alcanzando el 100% de mortalidad a las 48 h a la concentración de 1.2×10^{-3} M.

Cabe resaltar el interés de las combinaciones de floxina B-rosa de Bengala en proporción (90:10). No se han encontrado diferencias significativas en la mortalidad a las 72 h entre floxina B-rosa de bengala (50:50) y (90:10) a la concentración de 6.2×10^{-4} M y superiores y lo mismo sucede con las combinaciones floxina B-eritrosina B (50:50) y (90:10). Estos resultados indican el interés de las combinaciones con concentraciones bajas de rosa de Bengala, que es el colorante más activo, aunque es también el más degradable por la luz y el que no está autorizado como aditivo en alimentos.

En la comparación de la fototoxicidad de estos colorantes solos y en combinación, vemos que la CL_{50} del rosa de Bengala a las 72 h es de 2.3×10^{-4} M y la correspondiente combinación floxina B-rosa de Bengala (90:10) es de 2.4×10^{-4} M; la CL_{50} de floxina B es de 2.8×10^{-4} M.

En E.E.U.U. se está empleando la combinación equimolecular floxina B-uranina como fototóxico contra *C. capitata*, por ingestión, en cebos con atrayente alimentario. Los resultados han sido satisfactorios y han comenzado experiencias

en gran escala, en pulverizaciones aéreas de colorante + cebo alimentario (**Liquido et al., 1995a**). Al mismo tiempo, se ha estudiado, la acción de la combinación floxina B-uranina, sobre otros tefrítidos que son plagas importantes (**Moreno y Mangan, 1995; Mangan y Moreno, 1995**).

En los ensayos comparativos descritos en las tablas 3 y 4 se puede observar que la mezcla floxina B-rosa de Bengala (50:50), es más fototóxica que la mezcla floxina B-uranina (50:50) con CL_{50} , a las 72 h, de 1.6×10^{-4} M y 2.2×10^{-4} M, respectivamente y que las combinaciones floxina B-rosa de Bengala (90:10), y floxina B-uranina (50:50) tienen una actividad similar.

Ha sido posible aumentar la mortalidad mediante la adición de azodicarbonamida, un aditivo que disminuya la destrucción celular de los radicales oxidantes producidos por su capacidad de oxidar grupos -SH del glutatión y otros reductores que son captadores de dichos radicales oxidantes. Ha resultado eficaz con un aumento del 12% de mortalidad con 1000 ppm de AZO y la combinación floxina B-uranina (50:50) a la concentración de 3.1×10^{-4} M.

Cabe resaltar que todos los factores de sinergia obtenidos son superiores a 1 y que el mayor lo ha producido la combinación de rosa de Bengala-eritrosina B (50:50).

La mortalidad producida por ingestión de ALA-Oph (1:0.75), a la concentración de 1.0×10^{-1} M, en un cebo atrayente, abre un camino nuevo para la lucha contra la *C. capitata* que deberá ser confirmado con ensayos en el campo.

El flujo de irradiación de 400 Wm^{-2} durante 6 h, que ha dado índices de mortalidad del 96% (Tabla 11), es comparable con la media solar durante el mes de julio en la zona mediterránea (Media diaria, 7.2 Kwhm^{-2}) y a la de Florida (**Downum et al, 1991**).

La toxicidad intrínseca de la mezcla, ALA-Oph, para *C. capitata* es elevada, del orden del 70% para la concentración 1 M. Por esta causa, a concentraciones altas, el incremento de mortalidad debido a la luz es menor y las diferencias entre dosis de irradiación son menores (Tablas 9 y 11). En cambio a

concentraciones de 5.0×10^{-2} M con dosis de 400 Wm^{-2} durante 6 h, la fototoxicidad es más importante (80%).

La proporción de Oph en la mezcla con ALA ha influido mucho en la mortalidad; en el intervalo entre 1:0.75 y 1:0.18, ésta se reduce en la misma proporción que la Oph. Pero en la proporción 1:1.5 la mortalidad es menor probablemente por un efecto de repelencia a la ingestión. **Rebeiz et al. (1995)**, con larvas de lepidópteros (*T. ni*), han observado un aumento de la mortalidad del 19% al aumentar 4 veces la proporción de Oph. Según los datos obtenidos con *C. capitata* la mortalidad crece 4 veces, con este aumento de Oph, en el intervalo citado.

El aumento de la mortalidad, mediante sinergizantes, de la acción fototóxica del ALA, se ha estudiado por la adición de azodicarbonamida, con objeto oxidar grupos -SH del glutatión y otros reductores que son captadores de radicales oxidantes; la AZO ha producido una disminución de la mortalidad. Este efecto es contrario al que se ha observado con colorantes fototóxicos y podría deberse a una interferencia en el metabolismo del ALA.

Efectos análogos se han obtenido con peróxido de benzoilo.

La concentración de porfirina que se alcanza durante el periodo de ingestión de ALA-Oph, es menor cuando el cebo tratado se ofrece a las moscas en las condiciones de luz del insectario. Esta disminución puede ser un factor desfavorable para la efectividad de los tratamientos durante el día. Por otra parte, la mortalidad acumulada tras la irradiación, después de 3 h de ingestión, ha sido un 37% inferior a la correspondiente tras 12 h de ingestión (Tabla 16) y esta prolongada y creciente actividad es un factor favorable para su aplicación.

Cuando se compara la ingestión en oscuridad de ALA-Oph con la ingestión directa de protoporfirina (PP) con concentraciones teóricamente equimetabólicas (1:8), se observa que, aunque la concentración de porfirina alcanzada en las moscas es mucho mayor con la PP, que con ALA-Oph, la mortalidad a las 72 h tras la irradiación, obtenida después de 9 h de ingestión de PP, es semejante a la obtenida para el mismo tiempo de ingestión de ALA-Oph

en oscuridad, aunque la cantidad de porfirina por mosca es 50 veces menor en el segundo caso (Tablas 15 y 17).

Este resultado podría explicarse por el efecto prolongado de la toxicidad intrínseca del ALA-Oph, por la formación de otros metabolitos entomotóxicos distintos de la porfirina o por la prolongada biosíntesis de PP, tras la ingestión de ALA-Oph.

Los datos obtenidos sobre la degradación o excreción de la PP en las moscas, tras el periodo de ingestión de ALA-Oph o de PP, confirman estas ideas. Después del periodo de ingestión de ALA-Oph, la cantidad de porfirina en las moscas se ha mantenido durante más de 24 h, con una ligera bajada; lo que significa un largo periodo de sensibilidad a la irradiación y un factor favorable para su aplicación en campo. Los ensayos de irradiación indican no sólo que se mantiene la fototoxicidad sino que ésta aumenta cuando el periodo transcurrido entre el fin de la ingestión y el comienzo de la irradiación es mayor. Por ejemplo, irradiando a 400 Wm^{-2} durante 6 h, 24 h después de la ingestión se alcanza el 98% de mortalidad, mientras que con PP equimetabólica se alcanza el 100% irradiando 12 h después de la ingestión y baja a 96% si se irradian 24 h después de la ingestión.

Jori y sus colaboradores de la Universidad de Padua, han estudiado la fototoxicidad de la hematoporfirina y de derivados sustituidos sobre la *C. capitata* (Ben Amor et al. 1998). Sus condiciones experimentales son las siguientes: 48 h de ayuno, 48 h de ingestión, y 2 h de irradiación ($128\text{-}592 \text{ Wm}^{-2}$). Con concentraciones de $1.2 \times 10^{-2} \text{ M}$ obtienen el 100% de mortalidad a las 24 h; con ALA-Oph a $1.0 \times 10^{-1} \text{ M}$ (14 h de ingestión y 400 Wm^{-2} durante 6 h) se obtiene el 91% de mortalidad a las 24 h y el 96% a las 72 h. Estas proporciones experimentales de PP y ALA son aproximadamente equivalentes a su relación metabólica (1:8). Es interesante considerar la duración del efecto del ALA y de la PP.

Tras la ingestión de porfirina, la tasa de éstas en las moscas se reduce en 24 h en más del 50%, lo que puede explicarse por la continua degradación no

compensada por biosíntesis, mientras que con la ingestión de ALA se mantiene con ligera variación. Con el PP, si se irradia 24 h después de la ingestión, la mortalidad disminuye un 5% (medida a las 72 h) respecto al caso de la irradiación inmediata. Con ALA-Oph la mortalidad aumenta un 60% con el mismo retraso en la irradiación, es decir el efecto es inverso para el PP y para el ALA-Oph y más acusado con estos.

Midiendo la mortalidad a tiempos cortos (3 h) tras el comienzo de la irradiación, las diferencias son más drásticas. Así con ALA-Oph la toxicidad aumenta 8 veces al retrasar 21 h la irradiación mientras que con PP disminuye a la mitad.

Utilizando hematoporfirina, Jori y col., (**Ben Amor et al., 1998**), han encontrado un gran descenso de la cantidad de HP por mosca y de la mortalidad por irradiación, cuando se deja un lapso de tiempo de 48 h entre el fin de la ingestión y el comienzo de la iluminación. Cuando este lapso es de 24 h encuentran que la mortalidad se reduce al 50% respecto a la producida por irradiación inmediata.

Los colorantes ofrecen algunas ventajas respecto a ALA y también inconvenientes.

Por una parte necesitan concentraciones más bajas, en el cebo, para alcanzar una alta mortalidad; en cambio, su degradación a la luz solar es mayor y su efectividad, en el campo, será más corta si no se encuentran estabilizantes adecuados.

El ALA ha de usarse a concentraciones más altas pero, en cambio, es muy estable a la luz. Además su precio puede ser menor. La larga duración de su efecto, después de ingerirlo, es otro factor favorable.

En el caso de los colorantes el uso de aditivos sinergizantes (azodicarbonamida) puede aumentar eficazmente, la mortalidad.

Frente al uso directo de las porfirinas, el ALA ofrece las ventajas de su menor coste, mayor estabilidad y mayor periodo de sensibilidad de la *C. capitata* a la luz, después de la ingestión.

Los datos anteriores permiten planificar una experiencia en campo para determinar la eficacia del ALA, como agente fototóxico para la lucha contra la *C. capitata*.

En su aplicación, la especificidad contra la mosca de los frutos y la falta de efectos dañinos para especies beneficiosas, puede incrementarse mediante el uso de atrayentes específicos con cebos fagoestimulantes. La larga duración de la sensibilidad de las moscas a la luz tras la ingestión de ALA-Oph puede favorecer la eficacia de los tratamientos.

CONCLUSIONES

1. Los colorantes xanténicos rosa de Bengala, floxina B y eritrosina B a concentración de 2.5×10^{-3} M, por ingestión en un cebo alimentario, producen una alta mortalidad en la *C. capitata*.
2. De todos los colorantes ensayados el rosa de Bengala es el más efectivo, dando el 100% de mortalidad a las 12 h y a una concentración de 2.5×10^{-3} M tras la iluminación.
3. Las combinaciones de rosa de Bengala con floxina B, con eritrosina B y con uranina, en proporción 0.5:0.5, han sido las más fototóxicas, alcanzando el 100% de mortalidad a las 48 h y a la concentración de 1.2×10^{-3} M tras la iluminación.
4. Hay que destacar el interés de la combinación floxina B-rosa de Bengala en proporción (90:10), que alcanza el 100% de mortalidad a las 48 h y a la concentración de 1.2×10^{-3} M tras la iluminación.
5. La adición de 1000 ppm de AZO a la combinación de floxina B-uranina (50:50) a la concentración de 3.1×10^{-4} M aumenta un 12% el porcentaje de mortalidad.
6. La ingestión de ALA-Oph da lugar, a la biosíntesis de porfirina, fototóxica para la *C. capitata*.
7. La mortalidad producida por ingestión de ALA-Oph (1:0.75), a concentraciones de 1.0×10^{-1} M, en un cebo atrayente, abre un camino nuevo para la lucha contra la *C. capitata* que deberá ser confirmado con ensayos en campo.
8. La concentración de porfirina en nmol/mosca, aumenta en las 3 primeras horas del periodo de ingestión y luego se mantiene prácticamente constante; esto es un factor favorable para su aplicación en campo.

En cambio, en la administración de protoporfirina, con el cebo, hay un aumento continuo de concentración de PP en las moscas, a lo largo del periodo de ingestión.

9. La concentración alcanzada suministrando protoporfirina es 50 veces superior a la alcanzada suministrando ALA en cantidades equimetabólicas.

10. La mortalidad tras la irradiación, después de la ingestión de ALA-Oph, es semejante, pero algo inferior, a la obtenida con PP, aunque la cantidad de porfirina por mosca es mucho mayor en el segundo caso.
11. La concentración de porfirina en las moscas se mantiene prácticamente constante tras 24 h después de la ingestión de ALA; en cambio decae rápidamente tras la ingestión de PP. Esto supone un factor favorable para la efectividad en el campo de la aplicación del ALA.
12. La estabilidad a la luz del ALA es mucho mayor que la de los colorantes ensayados y de las porfirinas.
13. Tanto los colorantes rosa de Bengala, floxina B y eritrosina B y sus combinaciones como el ácido δ -aminolevulínico, han dado resultados prometedores para su aplicación en el campo, para la lucha contra la *C. capitata* mediante métodos respetuosos con el medio natural.

Los colorantes tienen la ventaja de exigir concentraciones más bajas en los cebos pero son menos estables a la luz solar.

El ALA, exige concentraciones molares mayores pero su estabilidad es mayor y la duración de la sensibilidad de las moscas a la luz es más prolongada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, W. E. (1925).** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Arnason, T, Chan, G. F. Q., Wat, C. K., Downum, K., and E., Towers, G. H. N. (1981a).** Oxygen requirement for near-UV mediated cytotoxicity of alpha-terthienyl to *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Photochem. Photobiol.* 33, 821-824.
- Arnason, T., Swain, T., Wat, C. K., Graham, E. A., Partington, S., Towers, G. H. N. and Lam, J. (1981b).** Mosquito larvicidal activity of polyacetylenes from species in the Asteracea. *Biochem. Syst. Ecol.* 9, 63-68.
- Arnason, J. T., Philogene, J. R., Berg, C., MacEachern, A., Kaminski, J., Leitch, L. C., Morand, P. and Lam, J. (1986).** Phototoxicity of naturally occurring and synthetic thiophene and acetylene analogues to mosquito larvae. *Phytochemistry.* 25 (7), 1609-1611.
- Arnason, J. T., Durst, T., Kobaisy, M., Marles, R. J., Szenasy, E., Guillet, G., Kacew, S., Hasspieler, B. and Downe, E. R. (1995).** Fate of phototoxic terthiophene insecticides in organisms and the environment. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 144-151.
- Ashwood-Smith, M. J., Ring, R. A., Liu, M., Phillips, S. and Wilson, M. (1984).** Furocoumarin resistance in the larvae of *Phytomyza spondylii* (Diptera: Agromyzidae) feeding on *Heracleum lanatum* is associated with the enzymatic breakdown of 8-methoxypsoralen. *Can. J. Zool.* 62 (10), 1971-1976.
- Balis, C. and Payne M. G. (1971).** Triglycerides and cercosporin from *Cercospora beticola*: Fungal growth and cercosporin production. *Phytopathology.* 61, 1477-1484.
- Barbieri, A. (1928).** Sensibilizadores fluorescentes como larvicidas. Acción fotodinámica de la luz. *Riv. Malariol.* 7, 456-463.
- Bakker, J., Gommers, F. J., Nieuwenhuis, I. and Wynberg, H. J. (1979).** Photoactivation of the nematocidal compound alpha-terthienyl from roots of

marigolds (*Tagetes* species). A possible singlet oxygen role. *J. Biol. Chem.* 254, 1841-1844.

Batkin, H. J. (1995). Impact of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), on California Agriculture. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 70-80.

Ben Amor, T., Tronchin, M., Bortolotto, L., Verdiglione, R. and Jori, G. (1998). Porphyrins and related compounds as photoactivable insecticides I. Phototoxic activity of hematoporphyrin toward *Ceratitis capitata* and *Bactrocera oleae*. *Photochem. Photobiol.* 67 (2), 206-211.

Ben Amor, T., Bortolotto, L. and Jori, G. (1998a). Porphyrins and related compounds as photoactivable insecticides 2. Phototoxic activity of meso-substituted porphyrins. *Photochem. Photobiol.* 68 (3), 314-318.

Ben Amor, T., Bortolotto, L. and Jori, G. (2000). Porphyrins and related compounds as photoactivable insecticides 3. Laboratory and fields studies. *Photochem. Photobiol.* 71 (2), 124-128.

Berenbaum, M. (1978). Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: A case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science.* 201, 532-534.

Berenbaum, M. (1995). Phototoxicity of plant secondary metabolites: Insects and mammalian perspectives. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 29, 119-134.

Berenbaum, M. and Feeny, P. (1981). Toxicity of angular furanocoumarins to Swallowtail butterflies: Escalation in a coevolutionary arms race?. *Science.* 212, 927-929.

Berenbaum, M. R. (1987). Charge of the light brigade: phototoxicity as a defense against insects. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 339; Washington, DC, pp 206-216.

Borges, M. L., Matos, O. C., Pais, I., Seixas de Melo, J., Ricardo, C. P., Macanita, A. and Becker, S. (1995). Evaluation of a broad variety of coumarins, chromones, their furomologues and thione analogues as phototoxins activated by UVA and visible light. *Pestic. Sci.* 44, 155-162.

- Bovey, R. (1984).** La defensa de las plantas, en Omega, S. A. (Ed.), Barcelona.
- Budia, F. and Viñuela, E. (1996).** Effects of cyromazine on adult *C. capitata* (Diptera: Tephritidae) on, mortality and reproduction. J. Econ. Entomol. 86, 826-831.
- Bull, D. L., Ivie, G. W., Beier, R. C., Prior, N. W. and Oertli, E. H. (1984).** Fate of photosensitizing furanocoumarins in tolerant and sensitive insects. J. Chem. Ecol. 10, 893-911
- Bull, D. L., Ivie, G. W., Beier, R. C. and Prior, N. W. (1986).** In vitro metabolism of a linear furanocoumarin (8-methoxyppсорalen, xanthotoxin) by mixed-function oxidases of larvae of black swallowtail butterfly and fall armyworm. J. Chem. Ecol. 12 (4), 883-890.
- Cañizo, R., Moreno, R. y Garijo, C. (1981).** Guía práctica de plagas. Mundi-Prensa (Eds.). Madrid.
- Carpenter, T. L. and Heitz, J. R. (1980).** Light-dependent latent toxicity of rose bengal to *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. Environ. Entomol. 9, 533-537.
- Carpenter, T. L., Mundie, T. G., Ross, J. H. and Heitz, J. R. (1981).** Synergistic effect of fluorescein on rose Bengal-induced, Light-dependent toxicity. Environ. Entomol. 10, 953-955.
- Carpenter, T. L., Johnson, L. H., Mundie, T. G. and Heitz, J. R. (1984).** Joint toxicity of xanthene dyes to the house fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol. 77, 308-312.
- Carpenter, T. L., Respicio, N. C. and Heitz, J. R. (1985).** Evaluation of dispersible formulations of erythrosin B for field control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). J. Econ. Entomol. 78, 232-237.
- Casaña-Giner, V., Gandía-Balager, A., Mengod-Puerta, C., Primo-Millo, J. and Primo-Yúfera, E., (1999).** Insect growth regulators as chemosterilants for *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 92 (2), 303-308.
- Chinery, M., 1988.** Guía de campo de los insectos de España y Europa; Omega S.A. (Ed.), Barcelona.
- Crouse, N. N. and Heitz, J. R. (1982).** U. S. Patent 4,320,140.

- Daterman, W. C. and Hodgson, E. (1978).** Detoxication mechanisms in insects. In Biochemistry of insects; M. Rockstein (Eds.), pp 541-577.
- Daub, M. E. (1982).** Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species Fungal phytopathogen, *Cercospora beticola*, *Cercospora nicotianae*, tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell line. Phytopathology. St. Paul, Minn., American Phytopathological Society. 72 (4), 370-374. ill.
- Daub, M. E. and Hangarter, R. P. (1983).** Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. Plant-Physiol. Rockville: American Society of Plant Physiologists. 73 (3), 855-857.
- Daub, M. E., Jenns, A. E. and Ehrenshaft, M. (1995).** Fungal resistance to photosensitizers that generate singlet oxygen. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 201-216.
- Dorwell, R. V. (1997).** Laboratory toxicity of a photo activated dye mixture to six species beneficial insects. Appl. Ent. 121, 271-274.
- Downum, K. R., Rosenthal, G. A. and Towers, H. N. (1984).** Phototoxicity of the allelochemical, α -terthienyl, to larvae of *Manduca sexta* (L.) (Sphingidae). Pest. Biochem. Physiol. 22, 104-109.
- Downum, K. R., Swain, L. A. and Faleiro, L. J. (1991).** Influence of light on plant allelochemicals: A synergistic defense in higher plants. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 17(4), 1-11.
- Duan, J. J., Prokopy, R. J., Yin, C. M., Bergweiler, C. and Oouchi, H. (1995).** Effects of pyriproxyfen on ovarian development and fecundity of *Rhagoletis pomonella* flies. Entomol. Exp. Appl. 77, 17-21.
- Duncan, D. B. (1951).** A significance test for differences between ranked treatments in an analysis of variance. Va. J. Sci. 2, 171-189.
- Fields, P. G., Arnason, J. T., Philogene B. J. R. and Aucoin, R. R. (1991).** Phototoxins as insecticides and natural plant defences. Mem. Ent. Soc. Canada 159, 29-38.

- Finney, D. J. (1971).** Probit Analysis. Cambridge University Press: Cambridge, England.
- Fondren, J. R. and Rebeiz, J. R. (1978a).** Xanthene dye induced toxicity in the adult face fly, *Musca autumnalis*. Environ. Entomol. 7, 843-846.
- Fondren, J. E. and Heitz, J. R. (1978b).** Light intensity as a critical parameter in the dye-sensitized photooxidation of the house fly, *Musca domestica*. Environ. Entomol. 7, 891-894.
- Fondren, J. E. and Heitz, J. R. (1979).** Dye-sensitized house fly toxicity produced as a function of variable light sources. Environ. Entomol. 8, 432-436.
- Fondren, J. E., Norment, B. R. and Heitz, J. R. (1978).** Dye-sensitized photooxidation in the house fly, *Musca domestica*. Environ. Entomol. 7, 205-208.
- Foote, C. S. (1987).** Tipe I and tipe II mechanisms of photodynamic action. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 339; Washington, DC, pp 22-38.
- Fytizas, E. (1976).** Effect of TH6040 on *Daucus oleae* Gmel. (Diptera: Trypetidae) metamorphosis. Z. Angew. Entomol. 81, 440-444.
- Gollnick, K. (1968).** Advan. Photochem. 6, 1-122.
- Gommers, F. J. and Geerligs, J. W. G. (1973).** Lethal effect of near ultraviolet light on *Pratylenchus penetrans* from roots of tagetes. Nematologia. 19, 389-393.
- Gommers, F. J., Bakker, J. and Smits, L. (1980).** Effects of singlet oxygen generated by the nematicidal compound alpha-terthienyl from Tagetes on the nematode *Aphelenchus avenae*. Nematologia. 26 (3), 369-375.
- Gut, L. J., Lee K., Juvik, J. A., Rebeiz, C. C., Bouton, C. E. and Rebeiz, C. A. (1993).** Porphyrin insecticides. IV: Structure-activity study of substituted phenanthrolines. Pest. Sci. 39, 19-30.
- Gut, L. J., Lee K., Juvik, J. A., Rebeiz, C. C. and Rebeiz, C. A. (1994).** 8. Porphyrin insecticides. 8: Structure-activity study of substituted pyridyls. Pestic. Biochem. Physiol. 50, 1-14.

- Hasspieler, B. M., Arnason, J. T. and Downe, A. E. R. (1990).** Modes of action of the plant-derived phototoxin α -terthienyl in mosquito larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38, 41-47.
- Hayes, D. K. and Schechter, M. S. (1970).** Survival of codling moth larvae treated with methylene blue under short-and long-day photoperiods. *J. Econ. Entomol.* 63, 997.
- Heitz, J. R. (1982).** Xanthene dyes as pesticides. In *Insecticide mode of action*. J. R. Coats (Ed.), pp 429-457.
- Heitz, J. R. (1987).** Development of photoactivated compounds as pesticides. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Series 339; Washington, DC, pp 1-21.
- Heitz, J. R. (1995).** Pesticidal applications of photoactivated molecules. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 1-16.
- Hendrichs, J., Franz, G. and Rendon, P. (1995).** Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *J. Appl. Entomol.* 119, 371-377.
- Hodgson, E. and Levi, P. E. (1998).** Interactions of piperonyl butoxide with cytochrome P450. In *Piperonyl butoxide. The insecticide synergist*. D. G. Jones (Ed.). Academic press; London, pp 41-53.
- Horsley, C. H. J. (1934).** Investigation into the action of St. John's wort. *J. Pharmacol.* 50, 310-322.
- Ivie, G. W. (1978).** In *Effects of poisonous plants on livestock*, R. Keeler, K. Van Kampen, L. James (Eds.). Academic, New York, pp 475-485.
- Ivie, G. W., Bull, D. L., Beier, R. C., Pryor, N. W. and Oertli, E. H. (1983).** Metabolic detoxification: Mechanism of insects resistance to plant psoralens. *Science*, 221, 374-376.
- Ivie, G. W., Bull, D. L., Beier, R. C., Pryor, N. W. and Oertli, E. H. (1986).** Comparative metabolism of (^3H) psoralen and (^3H) isopsoralen by black

swallowtail butterfly (*Papilio polyxenes* Fabr.) caterpillars. J. Chem. Ecol. 11, 869-882.

Iyengar, S., Arnason, J. T., Philogene, B. J. R., Werstiuk, N. H. and Morand, P. (1990). Comparative metabolism of the phototoxic allelochemical α -terthienyl in three species of lepidopterans. Pestic. Biochem. Physiol. 13 (34), 154-164.

Jacobs, J. M., Wehner, J. M. and Jacobs, N. J. (1994). Porphyrin stability in plant supernatant fractions: Implications for the action of porphyrinogenic herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 50, 23-40.

Jacobs, J. M., Jacobs, N. J. and Duke, S. O. (1996). Protoporphyrinogen destruction by plant extracts and correlation with tolerance to protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Pestic. Biochem. Physiol. 55, 77-83.

Jiménez-Peydro, R., Gimeno-Martos, C., López-Ferrer, J., Serrano-Delgado, C. and Moreno-Mari, J. (1995). Effects of the insect growth regulator cyromazine on the fecundity, fertility and offspring development of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt., Tephritidae). J. Appl. Entomol. 119, 135-438.

Jodlbauer, A. and von Tappeiner, H. (1904). Muench. Med. Wochenschr. 26, 1139-1141.

Kagan, J. and Cha, G. (1983). The photooxidative activity of plant components towards *Drosophila melanogaster*. Experientia. 39, 402-403.

Kagan, J., Prakash, I., Dhawan, S. N. and Jaworski, J. A. (1984). Photobiochem. Photobiophys. 8, 25-33.

Kagan, J., Hasson, M. and Grynspan, F. (1984b). Biochem. Biophys. Acta. 802, 442-447.

Kagan, J., Bennett, W. J., Kagan, E. D., Maas, J. L., Sweeney, S. A., Kagan, I. A., Seigneurie, E. and Bindokas, V. (1986). α -Tertienilo as a photoactive insecticide: Toxic effects on nontarget organisms. In Light-Activated Pest

Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Series 339; Washington, DC, pp 177-191.

Kagan, J. (1991). Naturally occurring di- and trithiophenes. Fortschr-Chem-Org-Naturst-Prog-Chem-Org-Nat-Prod. Wien : Springer-Verlag. 56, 87-169.

Koehler, P. G. and Patterson, R. S. (1986). Toxicity of erythrosin B to the house fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol. 79, 1023-1026.

Langley, P.A. and Hall, M. J. R. (1986). Tsetse control by autosterilization. Parasit. Today. 2, 125-126.

Langley, P.A. and Hall, M. J. R. (1997).

Lavialle, M. and Dumortier, B. (1978). Effect photodynamique du bleu de methylene sur les larves de *Pieris brassicae* (L.). C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 287, 875-878.

Lee, K. and Berenbaum, M. R. (1993). Food utilization and antioxidant enzyme activities of black swallowtail in response to plant phototoxins. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 23, 79-89.

Lemke, L. A., Koehler, P. G., Patterson, R. S., Feger, M. B. and Eickhoff, T. (1986). Field development of photooxidative dyes as insecticides. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 339; Washington, DC, pp 156-167.

Liquido, N. J., McQuate, G. T. and Cunningham, R. T. (1995). Light-activated toxicity of phloxine B and uranine to mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), adults. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 82-106.

Liquido, N. J., McQuate, G. T. and Cunningham, R. T. (1995a). Light-activated toxicity of phloxine B and uranine in methyleugenol to oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), males. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 107-114.

- Mangan, R. L. and Moreno, D. S. (1995).** Development of phloxine B and uranine bait for control of Mexican fruit fly. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 115-126.
- Marcacci, A. (1988).** Sur l'action des alcaloides dans le règne végétale et animal. *Arch. Ital. Biol.* 9, 2.
- Marchant, Y. Y. and Cooper, G. K. (1987).** Structure and function relationships in polyacetylene photoactivity. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Series 339; Washington, DC, pp 241-254.
- Marles, R. J., Arnason, J. T., Compadre, R. L., Compadre, C. M., Soucy-McLachlan, D., Arnason, T. and Lam, J. (1986).** Structure-function relationships in the phototoxicity of acetylenes from the Asteraceae. *Biochem. Syst. and Ecol.* 14 (1), 17-23.
- Breau, C., Mehta, B., Morand, P., Redmond, R. W. and Scaiano, J. C. (1991).** Quantitative structure-activity relationship analysis of natural products: Phototoxic thiophenes. In *Modern Phytochemical Methods*. N. H. Fischer et al. (Eds.), pp 371-396.
- Marley, K. A., Larson, R. A. and Davenport, R. (1995).** Alternative mechanisms of psoralen phototoxicity. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Series 616; Washington, DC, pp 179-188.
- Moreno, D. S. and Mangan, R. L. (1995).** Responses of the mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to two hydrolyzed proteins and incorporation of phloxine B to kill adults. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 257-279.
- Potapenko, A. Y. (1991).** New trends in photobiology (Invited review). Mechanisms of photodynamic effects of furocoumarins. *Photochem. Photobiol. B: Biol.* 9, 1-33.

- Primrikar, G. D. and Coign, M. J. (1986).** Multiple mechanism of dye-induced toxicity in insects. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 339; Washington, DC, pp 134-155.
- Primrikar, G. D., Norment, B. R. and Heitz, J. R. (1979).** Toxicity of rose bengal to various instars of *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes triseriatus*. *Environ. Entomol.* 8, 856-859.
- Primrikar, G. D., Noe, B. L., Norment, B. R. and Heitz, J. R. (1980).** Small- and large-scale field tests of erythrosin B for house fly control in caged layer chicken houses. *Environ. Entomol.* 9, 53-58.
- Primrikar, G. D., Noe, B. L., Norment, B. R. and Heitz, J. R. (1980a).** Ovicidal, larvicidal, and biotic effects of xanthene derivatives in the house fly, *Musca domestica* L. *Environ. Entomol.* 9, 785-788.
- Primrikar, G. D. (1995).** Potential markets for the photoactivated pesticides. In *Light-Activated Pest Control*; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 616; Washington, DC, pp 127-134.
- Raab, O. (1900).** Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. *Biol. Zentralbl.* 39, 524-546.
- Rebeiz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J., and Wu, S. M. (1984).** Photodynamic herbicides: I. Concept and phenomenology. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 390-401.
- Rebeiz, C. A., Juvick, J. A. and Rebeiz, C. C. (1988).** Porphyrin insecticides. I. Concepts and phenomenology. *Pestic. Biochem. Physiol.* 30, 11-27.
- Rebeiz, C. A., Juvick, J. A., Rebeiz, C. C., Bouton, C. E. and Gut, L. J. (1990).** Porphyrin insecticides. 2. 1,10-Phenanthroline, a potent porphyrin insecticide modulator. *Pestic. Biochem. Physiol.* 36, 201-207.
- Rebeiz, C. A., Gut, L. J., Lee, K., Juvick, J. A., Rebeiz and C. C., Bouton (1995).** Photodynamics of porphyrin insecticides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 (4), 329-366.

- Respicio, N. C., Carpenter, T. L. and Heitz, J. R. (1985).** The joint action of coprecipitated free-acid formulation of erythrosin B and fluorescein against *Culex pipiens quinquefasciatus* Say larvae. J. Econ. Entomol. 78, 30-34.
- Reyftmann, J. P., Kagan, J., Santus, R. and Morliere, P. (1985).** Photochem. Photobiol. 41, 1-7.
- Robinson, J. R. and Bentson, E. P. (1985).** Enhancement of dye-sensitized phototoxicity to house fly larvae in vivo by dietary ascorbate. Pest. Biochem. Physiol. 24, 375-378.
- Samuels, R. and Knox, P. (1989).** Insecticidal activity of hypericin towards *Manduca sexta* larvae. Journal of Chemical Ecology. 15 (3), 855-862.
- Sakurai, H. and Heitz, J. R. (1982).** Growth inhibition and photooxidative toxicity in the house fly, *Musca domestica* L., caused by Xanthene dye in larval growth medium and after injection. Environ. Entomol. 11, 467-470.
- Sarasua, M. J. and Santiago-Álvarez, C. (1983).** Effect of difluorbenzuron on the fecundity of *Ceratitis capitata*. Entomol. Exp. Appl., 33, 223-225.
- Schildmacher, H. (1950).** Über photosensibilisierung von stechmückenlarven durch fluoreszierende farbstoffe. Biol. Zentralbl. 69, 468-477.
- Scott, B. R., Pathak and M. A., Mohn, G. R. (1976).** Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. Mutat. Res. 39, 29-74.
- Song, P. -S. and Tapley, K. J., Jr. (1979).** Photochemistry and photobiology of psoralens. Photochem. Photobiol. 29, 1177-1197.
- Spikes, J. D. and Glad, B. W. (1964).** Photodynamic action. Photochem. Photobiol. 3, 471-487.
- Steward, D (1998).** The evaluation of synergistic action in the laboratory and field, pp 173-198, in Piperonyl butoxide. The insecticide synergist. D. G. Jones (Ed.). Academic press; London.
- Sun, Y. -P. and Johnson, E. R. (1960).** Analysis of join action of insecticides against house flies. J. Econ. Entomol. 53 (5), 887-892.

- Swain, L. A. and Downum, K. R. (1991).** Phototoxic metabolites of tropical plants. In ACS Symp-Ser-Am-Chem-Soc. Washington, D.C. The Society. (449), pp 361-370.
- Towers, G. H. N., Arnason, J. T., Wat, C. K. and Lambert, J. D. H. (1984).** Can. Pat. 1,173,743.
- Tuveson, R. W. (1986).** Using bacterial mutants and transforming DNA to define phototoxic mechanisms. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Series 339; Washington, DC, pp 192-205.
- Valzeno, D. P. and Tarr, M. (1995).** Mechanisms of cellular photomodification, pp 24-33, in Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Series 616; Washington, DC, pp 24-33.
- Venkataramani, (1967).** Isolation of cercosporin from *Cercospora personata*. Phytopathol. Z. 58, 379-382.
- Wat, C. -K., Prasad, S. K., Grahan, E. A., Partington, S., Arnason, T. and Towers, G. H. N. (1981).** Photosensitization of invertebrates by natural polyacetylenes. Biochem. Syst. And Ecol. 9, 59-62.
- Weaver, J. E. (1987).** Physiological effects of photodynamic action: Special reference to insects. In Light-Activated Pest Control; J. R. Heitz and K. Downum (Eds.). ACS Symposium Ser. 339; Washington, DC, pp 122-133.
- Weems, Jr., H. V. (1981).** Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* Wiedemann. Ent. Circ. N° 4, Plant Industry, Florida Dept. Agric. 6p.
- Wong, T. T. Y., Ramadan, M. M., Herr, J. C. and McInnis, D. O. (1992).** Suppression of a Mediterranean fruit fly (Diptera: Terphritidae) population with concurrent parasitoid and sterile fly releases in Kula, Maui, Hawaii. J. Econ. Entomol. 85, 1671-1681.
- Yamazaki, S., Okubo, A., Akiyama, Y. and Fuwa, K. (1975).** Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. Agricult. Biol. Chem. 39 (1), 287-288.

Yoho, T. P., Butler, L. and Weaver, J. E. (1971). Photodynamic effect of light on dye-fed house flies: preliminary observations of mortality. *J. Econ. Entomol.* 64, 972-973.

Yoho, T. P., Weaver and J. E. Butler, L. (1973). Photodynamic action in insects. 1. Levels of mortality in dye-fed light-exposed house flies. *Environ. Entomol.* 2, 1092-1096.

Yoho, T. P., Butler, L. and Weaver, J. E. (1976). Photodynamic killing of house flies fed food, drug, and cosmetic dye additives. *Environ. Entomol.* 5, 203-204.

