

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS

EFFECTO SINÉRGICO DE DISTINTOS EXTRACTOS VEGETALES Y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA, CULICIDAE)

POR

JESICA MARÍA RAMÍREZ VILLALOBOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

ENERO, 2020

EFFECTO SINÉRGICO DE DISTINTOS EXTRACTOS VEGETALES Y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (L.)
(DIPTERA, CULICIDAE).

COMITÉ DE TESIS



Dr. Luis Jesús Galán Wong
Presidente



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Secretario



Dra. Laura María Trejo Ávila
Vocal 1



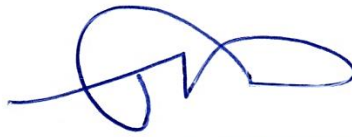
Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal 2



Dr. Benito Pereyra Alferéz
Vocal 3

EFFECTO SINÉRGICO DE DISTINTOS EXTRACTOS VEGETALES Y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (L.)
(DIPTERA, CULICIDAE).

Dirección de Tesis



Dr. Luis Jesús Galán Wong

Director

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT 2019) con clave de proyecto CT729-19.

DEDICATORIA

A la persona que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, que me escucha, me cuida, me anima cuando estoy triste y me hace seguir adelante cuando siento que ya no puedo más. ¡Gracias por todo Roberto!

“El pez más grande del río es grande
porque nunca se ha dejado atrapar”

Big Fish

“Solo es imposible si lo crees”

Tim Burton

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (CVU No. 725244, con la cual me fue posible desarrollar mis estudios de Maestría.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Luis J. Galán Wong por darme la oportunidad y su confianza para llevar a cabo este proyecto.

De forma especial agradezco a la Dra. María Guadalupe Rojas Verde, quien siempre me brindó su ayuda y asesoría desde el inicio del proyecto, sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este trabajo. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Carlos Hernández Luna por su asesoría y ayuda para la elaboración de extractos vegetales.

A la Dra. Catalina Rivas Morales y el Dr. Sergio García por su ayuda con las pruebas fitoquímicas.

A la Dra. Norma Zamora Avilés por siempre estar dispuesta a brindarme su ayuda y compartirme sus conocimientos.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por su apoyo y asesoría durante toda mi estancia en el Instituto de Biotecnología.

A la Dra. Laura María Trejo Ávila, Dr. Hugo Alberto Luna Olvera y Dr. Benito Pereyra Alferéz por la revisión del documento.

A Isela Miroslava Mendoza García por su amistad, apoyo incondicional y por las fotografías que son parte de esta tesis.

A Anabel Díaz de León por ayudarme en la parte experimental y por su amistad.

A Lucero García y Ana Vázquez del L6 por ayudarme con la cría de mosquitos y por brindarme su amistad.

Agradezco a Krista Villegas y Zhalia Del Ángel por su ayuda y contribución en la parte experimental, fueron clave para la conclusión de este trabajo. Les estaré siempre agradecida.

A Jemima Rangel por su valiosa amistad, por escucharme y darme ánimos cuando lo necesité.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Mosquitos como problema de salud pública.....	3
2.2 Biología de <i>Aedes aegypti</i>	4
2.2.1 Taxonomía	5
2.2.2 Descripción de la especie.....	6
2.2.3 Ciclo biológico.....	8
2.3 Control del mosquito.....	11
2.4 Bioplaguicidas.....	14
2.4.1 Bioplaguicidas botánicos	15
2.4.2 Bioplaguicidas microbianos.....	16
2.5 <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
2.5.1 Taxonomía	19
2.5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	20
2.5.3 Mecanismo de acción.....	21
2.5.4 Toxinas.....	23
2.5.4.1 δ -endotoxinas	23
2.5.5 Otros factores de virulencia	24

2.6 Sinergismo entre <i>Bt</i> y extractos vegetales	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 Lugar de trabajo	30
6.2 Cepas bacterianas.....	30
6.3 Extractos vegetales.....	30
6.4 Mantenimiento de la colonia de <i>Ae. aegypti</i>	31
6.5 Actividad larvicida de extractos vegetales comerciales y metanólicos contra <i>Ae. aegypti</i>	32
6.5.1 Ensayos preliminares	32
6.5.2 Determinación de CL ₂₅ , CL ₅₀ y CL ₉₀	32
6.6 Efecto pupicida de extractos seleccionados	32
6.7 Identificación de los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales.....	33
6.8 Efecto sinérgico de <i>Bti</i> y extractos vegetales.....	34
6.9 Análisis de datos	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Rendimiento de extractos vegetales elaborados	36
7.2 Actividad larvicida de extractos vegetales.....	36
7.3 Actividad pupicida de extractos vegetales.....	38
7.4 Pruebas fitoquímicas.....	40
7.5 Toxicidad del complejo espora-cristal de cepas de <i>Bti</i> contra larvas de <i>Ae. aegypti</i> ..	41

7.6 Combinación de extractos vegetales y <i>Bti</i>	41
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIONES.....	51
10. PERSPECTIVAS.....	52
11. BIBLIOGRAFÍA.....	53
12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....	65
13. ANEXOS	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de <i>Bt</i> de acuerdo con el antígeno H.	19
2	Extractos vegetales comerciales utilizados y su composición.	29
3	Plantas utilizadas para la elaboración de extractos vegetales metanólicos.	30
4	Rendimiento de extractos metanólicos elaborados.	35
5	Concentraciones letales CL ₂₅ , CL ₅₀ y CL ₉₀ de actividad larvicida a las 24 y 48 h empleando diferentes extractos metanólicos.	37
6	Porcentaje de mortalidad y aberraciones morfológicas en pupas de <i>Ae. aegypti</i> tratadas con extractos vegetales metanólicos a 50 ppm a las 24 h y 48 h.	38
7	Porcentaje de mortalidad y aberraciones morfológicas en pupas de <i>Ae. aegypti</i> tratadas con extractos vegetales metanólicos a 500 ppm a las 24 h y 48 h.	38
8	Resultado del análisis fitoquímico preliminar de extractos vegetales metanólicos.	39
9	Concentraciones letales CL ₂₅ , CL ₅₀ y CL ₉₀ de actividad larvicida con las cepas Bt-UNL y Bt-QAM a las 24 h.	40
10	Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de <i>P. americana</i> y cepas de <i>Bti</i> sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> a las 24 h de exposición.	42
11	Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de <i>H. longipes</i> y cepas de <i>Bti</i> sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> a las 24 h de exposición.	42
12	Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de <i>P. nigrum</i> y cepas de <i>Bti</i> sobre larvas del de <i>Ae. aegypti</i> a las 24 h de exposición.	43
13	Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de <i>C. longa</i> y cepas de <i>Bti</i> sobre larvas de <i>Ae. aegypti</i> a las 24 h de exposición.	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Distribución mundial de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Ae. albopictus</i> .	6
2	Hembra de <i>Ae. aegypti</i> alimentándose de sangre.	7
3	Ciclo biológico del mosquito <i>Ae. aegypti</i> .	8
4	Huevos de <i>Ae. aegypti</i> .	8
5	Larva de <i>Ae. aegypti</i> .	9
6	Pupa de <i>Ae. aegypti</i> .	9
7	Macho y hembra de <i>Ae. aegypti</i> .	10
8	Métodos de control disponibles contra <i>Aedes sp.</i>	11
9	Microfotografía de <i>Bt</i> en microscopio electrónico de transmisión.	17
10	Mecanismo de acción de las toxinas Cry de <i>Bt</i> , de acuerdo con el modelo de unión secuencial.	21
11	Mecanismo de acción de las toxinas de <i>Bt</i> , de acuerdo con el modelo de señalización.	22
12	Espectro de acción de las δ -endotoxinas Cry y Cyt.	23
13	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Ae. aegypti</i> tratadas con extractos vegetales a una concentración de 50 ppm a las 24 y 48 h.	36
14	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Ae. aegypti</i> tratadas con extractos vegetales a una concentración de 500 ppm a las 24 y 48 h.	36
15	Aberraciones morfológicas de pupas de <i>Ae. aegypti</i> después de 48 h de exposición con extractos vegetales.	39
16	Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de <i>P. americana</i> y cepas de <i>Bti</i> a las 24 y 48 h.	40
17	Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de <i>H. longipes</i> y cepas de <i>Bti</i> a las 24 y 48 h.	41
18	Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de <i>P. nigrum</i> y cepas de <i>Bti</i> a las 24 y 48 h.	41
19	Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de <i>C. longa</i> y cepas de <i>Bti</i> a las 24 y 48 h.	41

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
OMS	Organización mundial de la salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
UV	Luz ultravioleta
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
Ppm	Partes por millón
Mbar	Milibar
Rpm	Revoluciones por minuto
CL₂₅	Concentración letal al 25%
CL₅₀	Concentración letal media
CL₉₀	Concentración letal al 90%
IC	Índice de confianza
NaOH	Hidróxido de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
FeCl₃	Cloruro férrico
CHCl₃	Cloroformo
C₄H₈O₂	Metanol
C.C.	Factor de co-toxicidad
F.S.	Factor de sinergismo
ANOVA	Análisis de varianza

RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) representa un riesgo para la salud pública, ya que es transmisor de distintas enfermedades humanas como el dengue, chikungunya, zika y fiebre amarilla. El control de este insecto se basa principalmente en el uso de insecticidas químicos, sin embargo, estos son tóxicos para organismos no blanco, contaminan el ambiente y favorecen la selección de insectos resistentes. Por lo que alternativas más sustentables como la combinación de extractos vegetales y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) para potenciar la actividad insecticida podría ser una buena opción para el control de *Ae. aegypti*. Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto sinérgico de extractos vegetales y cepas de *Bti* para el control de *Ae. aegypti*. Se realizaron pruebas preliminares para evaluar la actividad larvicida de tres extractos vegetales comerciales y nueve extractos metanólicos a concentraciones de 50 y 500 ppm, de los cuales se seleccionaron los extractos metanólicos de *Persea americana*, *Heliopsis longipes*, *Piper nigrum* y *Curcuma longa* por presentar la mayor actividad larvicida. Posteriormente se determinaron las concentraciones letales CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ de actividad larvicida para los extractos vegetales seleccionados y dos cepas de *Bti* (Bt-UNL y Bt-QAM), donde el extracto de *P. nigrum* y la cepa Bt-UNL presentaron mayor actividad con CL₅₀ de 2.19 y 0.006 ppm a las 24 h respectivamente. Después se determinó la actividad pupicida de los extractos, siendo *P. americana* el único tratamiento con el cual se logró obtener 100% de mortalidad (500 ppm a las 24 h). Se realizó un análisis fitoquímico preliminar, en el cual se reconocieron los siguientes metabolitos secundarios: esteroides y/o triterpenos, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, saponinas, fenoles y/o taninos, fenoles y/o flavonoides, azúcares, alcaloides y quinonas. Siendo el extracto de *H. longipes* el único que presentó todos los metabolitos secundarios evaluados. Al combinar las CL₅₀ y CL₂₅ de los extractos vegetales y las cepas de *Bti*, se logró potenciar la actividad larvicida siendo la mejor combinación CL₂₅ Bt-QAM+ CL₂₅ *C. longa* presentando efecto sinérgico con valores de 94 para el factor de co-toxicidad y 1.9 para el factor de sinergismo. La potenciación de la actividad larvicida mediante la combinación de *Bti* y extractos vegetales es una buena alternativa para el control de *Ae. aegypti*.

ABSTRACT

The mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) represents a risk to public health, as it is a transmitter of diverse human diseases such as dengue, chikungunya, zika and yellow fever. Control of this insect is mainly based on the use of chemical insecticides, but nevertheless, these are toxic to no target organisms, pollute the environment and favor the resistant insects selection. For this reason, more sustainable alternatives such as the combination of plant extracts and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) to enhance insecticidal activity could be a good option for *Ae. aegypti* control. Therefore, the aim of the study was to evaluate the synergistic effect of plant extracts and *Bti* strains for *Ae. aegypti* control. Preliminary tests to evaluate the larvicidal activity of three commercial plant extracts and nine methanolic extracts at concentrations of 50 and 500 ppm were performed, from which the methanolic extracts of *Persea americana*, *Heliopsis longipes*, *Piper nigrum* and *Curcuma longa* were selected by present the greatest larvicidal activity. Subsequently, the lethal concentrations LC₂₅, LC₅₀ and LC₉₀ of larvicidal activity were determined for the selected plant extracts and two *Bti* strains (Bt-UNL and Bt-QAM), were *P. nigrum* extract and the Bt-UNL strain showed greater activity against larvae with LC₅₀ of 2.19 and 0.006 ppm at 24 h respectively. Later, the pupicidal activity of extracts was determined, *P. americana* was the only treatment to reach 100% mortality (500 ppm at 24 h). A preliminary phytochemical analysis was performed, in which the following secondary metabolites were identified: steroids and / or triterpenes, coumarins, sesquiterpenic lactones, saponins, phenols and / or tannins, phenols and / or flavonoids, sugars, alkaloids and quinones. The extract of *H. longipes* was the only one that presented all the secondary metabolites evaluated. By combining LC₅₀ and LC₂₅ of plant extracts and *Bti* strains, it was possible to enhance the larvicidal activity being the best combination LC₂₅ Bt-QAM + LC₂₅ *C. longa* presenting synergistic effect with values of 94 for the co-toxicity factor and 1.9 for the synergism factor. The potentiation of larvicidal activity through the combination of *Bti* and plant extracts is a good alternative for the control of *Ae. aegypti*.

1. INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) es vector de los agentes etiológicos de diversas enfermedades en humanos, siendo el dengue, chikungunya, zika y fiebre amarilla las que generan mayor impacto, ya que inciden en los ámbitos económico, social y ambiental, generando problemas de salud pública (Muñoz *et al.* 2014; Mora y Pérez 2016). El control de vectores se ha realizado durante las últimas décadas empleando principalmente insecticidas químicos; sin embargo, su uso indiscriminado puede favorecer la selección de insectos resistentes, además de generar efectos negativos sobre el medio ambiente y ser tóxicos para organismos no blanco (Harve y Kamath 2004).

Por tal motivo en los programas de control integrado de plagas los bioplaguicidas están ganando interés debido a que presentan ventajas asociadas con seguridad ambiental, especificidad, eficacia, biodegradabilidad y sustentabilidad (Kumar y Singh 2015). A nivel mundial el uso de los bioplaguicidas aumenta 16% anual, lo que representa aproximadamente el 8% del comercio de pesticidas en el mundo (Jouzani *et al.* 2017). Las formulaciones derivadas de materiales naturales como bacterias, animales, plantas o minerales ofrecen una poderosa herramienta para crear una nueva generación de productos sustentables (Aneja *et al.* 2016).

De los bioplaguicida microbianos que existen a nivel mundial cerca del 90% son derivados de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) la cual se caracteriza por sintetizar durante la fase de esporulación proteínas cristalinas denominadas δ -endotoxinas que son tóxicas para diferentes insectos de los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera y Malófaga (Kumar y Singh 2015; Jouzani *et al.* 2017; Portela *et al.* 2013).

En 1976 Goldberg y Margalit descubren a *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*), la cual presenta actividad tóxica contra larvas de dípteros como mosquitos y moscas (Ramírez y Ramírez 2012). Como agente de biocontrol *Bti* ha demostrado alta eficiencia en contra de organismos blanco con efectos no adversos para otros invertebrados o vertebrados (Boyce *et al.* 2013). Sin embargo, la aplicación de formulaciones a base de esta variedad para el control de *Ae. aegypti* no ha sido frecuente, a pesar del desarrollo biotecnológico que ha generado

bioinsecticidas de varias generaciones de *Bt* y de su uso en el control biológico de otras especies de mosquitos acuáticos vectores y otras plagas agrícolas (Ochoa y Arrivillaga 2009).

Por otra parte, las plantas pueden producir fitoquímicos que pueden ser usados como insecticidas para erradicar larvas, pupas y mosquitos adultos o como repelentes para protección de las picaduras de mosquito (Govindarajan 2009). Las larvas de los tres géneros de mosquitos más importantes desde el punto de vista médico *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* son susceptibles en menor o mayor medida a una extensa cantidad de compuestos fitoquímicos (Shaalán *et al.* 2005).

Los compuestos de origen vegetal pueden ser una alternativa al uso de insecticidas sintéticos ya sea solos o en combinación con bioplaguicidas microbianos como *Bti* (Govindarajan 2009). La mezcla de estos componentes podría potenciar la actividad insecticida, permitiendo el desarrollo de bioinsecticidas más efectivos y la disminución del principio activo necesario para lograr niveles satisfactorios de eficiencia (Shaalán *et al.* 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 Mosquitos como problema de salud pública

Desde tiempos remotos, la mordida de mosquito se ha asociado con enfermedades humanas. En 1878, los mosquitos fueron los primeros artrópodos formalmente incriminados como hospederos intermediarios de parásitos de vertebrados y en la actualidad son considerados el enemigo público número uno según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya que las enfermedades transmitidas por estos prevalecen en más de 100 países al rededor del mundo, infectando alrededor de 700, 000, 000 personas cada año a nivel mundial (Foster y Walker 2019; Ciccía *et al.* 2000; Ghosh *et al.* 2012).

Las enfermedades transmitidas por mosquitos van en aumento, ampliando su rango geográfico a nuevas zonas. La propagación de las infecciones de África y Asia a otros continentes se ha generado por viajes extensos, comercio, crecimiento de la población en zonas de alto riesgo, globalización de vectores, urbanización, cambio climático, así como la evolución del genoma de los virus (Mukhtar *et al.* 2016).

Aproximadamente 30 de las 400 especies de mosquitos conocidos son capaces de transmitir patógenos humanos como virus, protozoarios y nematodos. Se sabe que no transmiten bacterias patógenas a los humanos, con la excepción de la transmisión mecánica de los agentes causales de la tularemia (*Francisella tularensis*) y ántrax (*Bacillus anthracis*). La malaria, fiebre amarilla, dengue y filariasis son las enfermedades más importantes transmitidas por estos. Siendo los tres géneros más importantes de mosquitos vectores *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* (Zhang *et al.* 2017; Ramírez y Ramírez 2012; Foster y Walker 2019; Narkhede *et al.* 2017).

La alimentación de sangre humana por parte de los mosquitos compromete la piel, lo que puede generar infecciones secundarias por bacterias. Su mordedura introduce a través de la saliva proteínas que estimulan una reacción de la histamina, causando alergias en humanos que incluyen reacciones locales en la piel y sistémicas como el angioedema, además de permitir la adquisición y transmisión de microorganismos que causan enfermedades en humanos, animales domésticos y animales salvajes (Foster y Walker 2019; Govindarajan *et al.* 2012).

El control de las enfermedades es costoso y las epidemias ocasionan un importante impacto negativo en el desarrollo socioeconómico de los países, ya que afecta al sistema de salud con gastos médicos directos, e indirectamente reduciendo la productividad y el turismo, particularmente en países con clima tropical y subtropical (Rodríguez 2002; Govindarajan *et al.* 2012; Fernández 2019).

2.2 Biología de *Aedes aegypti*

Se estima que hace 500 años el mosquito *Ae. aegypti* ancestral, habitaba en los bosques sub-Saharianos en África, ponía sus huevos en los huecos de los árboles y se alimentaba de huéspedes mamíferos no humanos. Se ha planteado la hipótesis de que, a medida que los asentamientos humanos se expandieron en los bordes del bosque, los contenedores de almacenamiento de agua de los humanos proporcionaron un hábitat larvario alternativo ideal para evitar los efectos de las estaciones secas. Con una proximidad más cercana a los humanos, estos surgieron como una fuente alterna de sangre para el mosquito y es probable que la domesticación de *Ae. aegypti* ocurriera in situ en África occidental (Brady y Hay 2019).

Durante los siglos XV al XVII *Ae. aegypti* comenzó una dispersión cosmopolita, lo que coincide con el tráfico de esclavos de África occidental hacia Europa y el Nuevo mundo, por lo que se cree que las larvas de *Ae. aegypti* fueran transportadas en contenedores dentro de los barcos que transportaban esclavos. De esta forma pudo acompañar al hombre en sus viajes a través del globo, generalmente a lo largo de rutas comerciales y turísticas (Sanabria *et al.* 2009; López y Neira 2016; Brady y Hay 2019). Análisis recientes usando polimorfismos de nucleótido único o SNPs (del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms) sugieren que luego de la introducción de *Ae. aegypti* al Nuevo Mundo ocurrió una expansión hacia el Pacífico, Asia y Australia (Gómez 2018).

Esta especie está muy asociada con los asentamientos humanos, deposita sus huevos en recipientes situados en hábitats domésticos y peridomésticos como jarras de agua, jarrones y residuos de plástico. Se ha propagado por la mayoría de las ciudades y los pueblos tropicales y subtropicales y por ello representa una amenaza para la salud de millones de personas (OMS 2017).

El mosquito *Ae. aegypti* es el principal vector de cuatro arbovirus humanos: dengue, Zika, chikungunya y fiebre amarilla. Estas patologías arbovirales se encuentran entre las enfermedades infecciosas emergentes más importantes y constituyen problemas de salud pública a nivel global (López y Neira 2016). Actualmente estas enfermedades se mantienen en áreas tropicales del Tercer Mundo y están distribuidas en áreas urbanas de Asia, el Pacífico, África, América Latina y el Caribe (Pérez 2017). Adicionalmente, se ha sugerido su papel como vector potencial del virus de la encefalitis equina venezolana, el virus mayaro y estudios de competencia vectorial *in vitro* han mostrado que es también susceptible al virus del occidente del Nilo (Gómez 2018).

Desde su entrada a México en 1978, el virus Dengue y su vector han sido actores de epidemias cíclicas con intervalos de 3-5 años, así como una dispersión geográfica en la mayoría del territorio (Fernández 2019). En 2018 según los datos reportados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en México fueron notificados 12,706 casos confirmados de dengue y 45 casos fatales, donde los estados de Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nuevo León y San Luis Potosí concentraron el 82% de los casos (OPS 2019).

2.2.1 Taxonomía

Cuando a principios del siglo XX W. Reed y C. Finlay realizaron sus trabajos sobre la transmisión de la fiebre amarilla en Cuba el mosquito vector de esa enfermedad viral era conocido como *Culex fasciatus*. Poco después los entomólogos argumentaron que debido a la estructura de sus escamas no podía ser incluido en el género *Culex* y se le llamó *Stegomyia fasciata Theobald*, nombre que fue cambiado por *Aedes calopus Meig* o *Aedes argenteus Poiret* y finalmente se adoptó el que se usa actualmente, *Aedes aegypti* Linn. Su clasificación sistémica es la siguiente (Bobadilla 2001; Carrada *et al.* 1984):

Orden: Díptera

Suborden: Nematocera

Familia: Culicidae

Subfamilia: Culicinae

Tribu: Culicini

Género: *Aedes*

Especie: *aegypti*

Se conocen tres variedades principales: *Ae. aegypti* var. *aegypti*; *Ae. aegypti* var. *formosus*, y *Ae. aegypti* var. *queenslandensis*. La variante *aegypti* es la más distribuida en el mundo y es la que existe en México; se sabe que la var. *queenslandensis* es parecida a la *aegypti* en casi todos los aspectos. La var. *formosus* está confinada a ciertas regiones africanas y difiere en su taxonomía y biología selvática (Carrada 1984).

2.2.2 Descripción de la especie

El mosquito *Ae. aegypti* es una especie tropical y subtropical ampliamente distribuida por el mundo (Figura 1). Se encuentra distribuida entre la franja geográfica del paralelo 35° al Norte y 35° al Sur, que corresponden a una isotérmica de verano de 10 °C. Aún cuando el mosquito se ha encontrado hasta los 45° de latitud norte, estas invasiones que ocurren durante la estación cálida no sobreviven el invierno (Nelson 1986). Verticalmente se encuentra a menos de 1000 metros de altitud, aunque existen registros arriba de esta elevación (Bobadilla 2001). Es altamente susceptible a temperaturas extremas y climas cálidos secos, en términos generales, se le ha encontrado en áreas geográficas con una temperatura media anual mayor a los 16.9°C (Ibáñez y Gómez 1995; Gómez 2018).

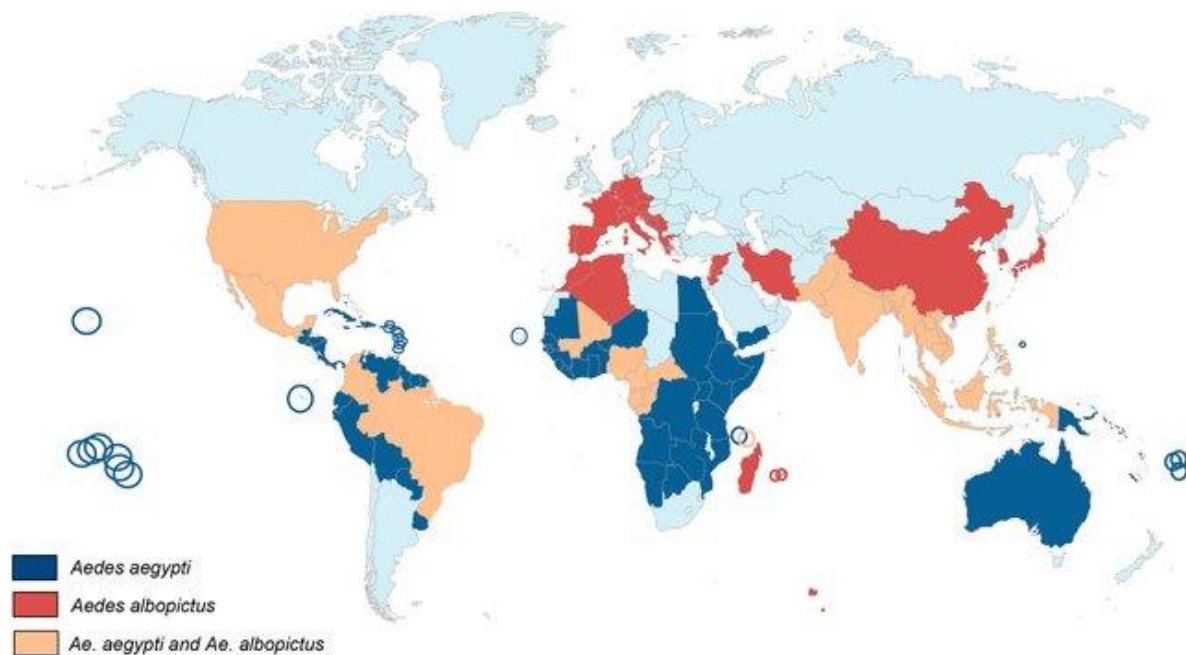


Figura 1. Distribución mundial de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Houé *et al.* 2019).

Los factores responsables más importantes de la distribución de esta especie pueden dividirse en dos grandes grupos: los factores intrínsecos (inherentes a la especie) y los factores

extrínsecos (relativos al ambiente que inciden sobre la especie). Dentro de los factores intrínsecos está la capacidad de diapausa (interrupción temporal del desarrollo) en estado de huevo; la plasticidad genética favorecida por su ciclo de vida rápido y alta tasa generacional; así como al menos en América la preferencia de la hembra por ovipositar en cuerpos de agua relativamente pequeños manufacturados por el hombre. Los factores extrínsecos más significativos son la urbanización, el crecimiento poblacional, el movimiento de las poblaciones humanas y con ello el desplazamiento de productos infestados con huevos del mosquito; así como el cambio climático que incrementa la temperatura y precipitaciones, lo que influye en la biología y distribución de *Ae. aegypti* (López y Neira 2016; Ibáñez y Gómez 1995; Gómez 2018).

Es un mosquito doméstico, que rara vez se encuentra a más de 90 metros de una habitación humana, el adulto puede ser reconocido fácilmente porque en el dorso lleva un dibujo en forma de lira, con dos líneas paralelas medias y una línea plateada curva a cada lado del tórax (Carrada *et al.* 1984). Las hembras se alimentan casi exclusivamente de sangre humana, pero pueden hacerlo de otros hospederos incluyendo bovinos, porcinos, gatos, ratas y pollos, representando menos del 1% de la ingesta de sangre. La alimentación de humanos generalmente ocurre con una o dos horas de intervalo, con preferencia por morder en pies y talones (Figura 2) (Mukhtar *et al.* 2016).



Figura 2. Hembra de *Ae. aegypti* alimentándose de sangre (López y Neira 2016).

2.2.3 Ciclo biológico

El desarrollo del ciclo biológico de *Ae. aegypti* se da bajo condiciones climáticas particulares, con una temperatura entre los 25 y 32°C y con una mínima cantidad de precipitación (Ordoñez *et al.* 2019). Esta especie es holometábola, pasa por una metamorfosis completa que comprende los estadios de huevo, larva, pupa (crisálida) y adulto. Completa sus estadios en diferentes ambientes, los huevos, larvas y pupas en ambiente acuático y el adulto es terrestre (Figura 3) (Mukhtar *et al.* 2016; Foster 2019).

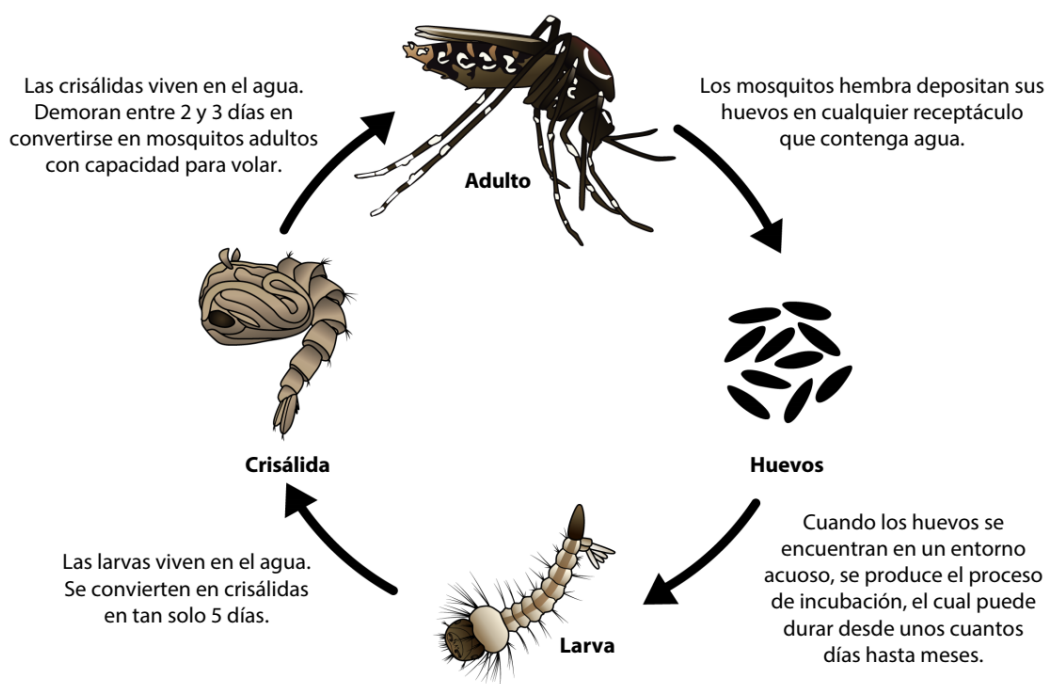


Figura 3. Ciclo biológico del mosquito *Ae. aegypti* (CDC 2019).

Huevo: son de forma ovoide, tienen la superficie de aspecto reticulado y miden aproximadamente 1 mm de largo por 0.25 mm de diámetro. En el momento de la postura son blancos, pero adquieren rápidamente un color negro brillante (Figura 4). Los huevos son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario generalmente se completa en 48 h si el ambiente es húmedo y cálido. Una vez que se ha completado el desarrollo embrionario, los huevos son capaces de resistir largos periodos de desecación, que pueden prolongarse por más de un año si se mantienen en condiciones húmedas (CDC 2019; Munstermann 1997).



Figura 4. Huevos de *Ae. aegypti*.

Larva: esta fase es el periodo de alimentación y crecimiento, el cual consta de 4 estadios o instar que se diferencian entre sí por el tamaño de la larva (Figura 5). Pasan la mayor parte del tiempo alimentándose de cualquier material orgánico acumulado en las paredes y el fondo del recipiente. El desarrollo larvario desde la eclosión hasta la pupación puede ser de tan solo 5 días, pero comúnmente dura de 7 a 14 días. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales son desfavorables, hay escasez de alimento o si existe una aglomeración de insectos, el periodo se prolonga (Nelson 1986; Pérez *et al.* 2004; Carrada *et al.* 1984).



Figura 5. Larva de *Ae. aegypti*.

Pupa: el periodo de pupa dura alrededor de 48 a 72 h durante las cuales no se alimenta, hasta que termina su transformación y eclosiona liberando al mosquito adulto. Las pupas de los mosquitos son diferentes a los de otros insectos holometabólicos porque reaccionan inmediatamente a estímulos externos y se desplazan activamente en forma de saltos (Figura 6) (Nelson 1986; Pérez *et al.* 2004).



Figura 6. Pupa de *Ae. aegypti*.

Adulto: es la fase reproductiva del insecto. Dentro de las 24 h posteriores a su emergencia, ambos sexos pueden aparearse y las hembras pueden tener una alimentación sanguínea. Ambos sexos se alimentan de néctar o líquidos dulces, aunque las hembras necesitan de la sangre para el desarrollo de los huevos. Generalmente, el intervalo entre la alimentación sanguínea y la postura es de 3 días en condiciones óptimas de temperatura. La hembra grávida es atraída hacia recipientes oscuros con agua y paredes internas húmedas, sobre las cuales deposita sus huevos. Presentan dimorfismo sexual, donde los machos se diferencian de las hembras porque sus antenas están cubiertas de pelos más largos y densos dándoles el aspecto de plumas (Figura 7) (Nelson 1986; Carrada *et al.* 1984).

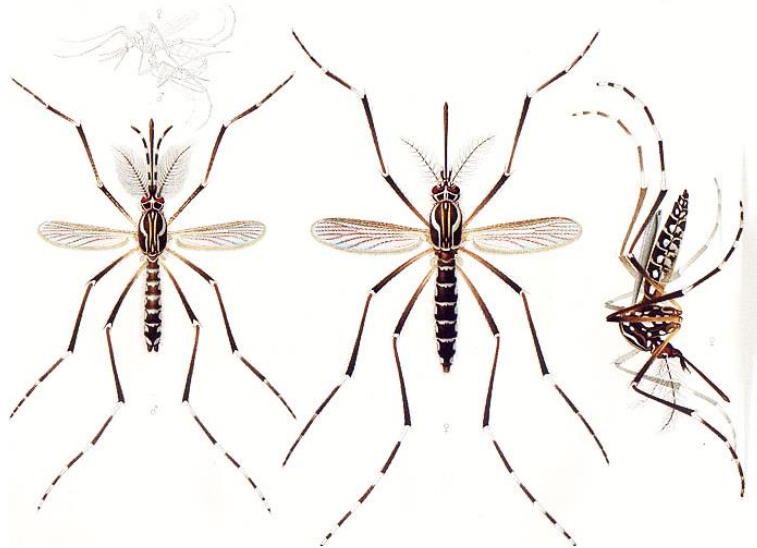


Figura 7. Macho (izquierda) y hembra (derecha) de *Ae. aegypti* (Goeldi 1905).

2.3 Control del mosquito

El control del mosquito tiene como finalidad la disminución de la emergencia de enfermedades transmitidas por estos. Para lo cual se identifican los sitios con mayor riesgo y se concentran los esfuerzos en estas áreas para reducir al vector (Rodríguez 2002). Los cuatro objetivos principales de esta estrategia son prevenir las picaduras de mosquito, mantener las poblaciones de mosquitos a densidades aceptables, minimizar el contacto de los mosquitos con los vertebrados y reducir la longevidad de los mosquitos hembras. Todas estas acciones minimizan los efectos molestos y dañinos de las picaduras, e interrumpen la transmisión de los patógenos (Foster 2019).

La ejecución correcta de los programas de control de mosquitos puede reducir eficazmente la transmisión de virus transmitidos por estos; sin embargo, es complejo, caro y se ve entorpecido por la propagación de la resistencia a los insecticidas. Por lo que la OMS recomienda adoptar enfoques integrados que tengan en cuenta todas las etapas del ciclo de vida del mosquito y permitan la participación plena de las comunidades (OMS 2019). Para el manejo integrado de vectores los métodos disponibles de control pueden ser divididos en cinco categorías: ambientales, mecánicos, biológicos, químicos y genéticos (Figura 8) (Baldacchino *et al.* 2015).

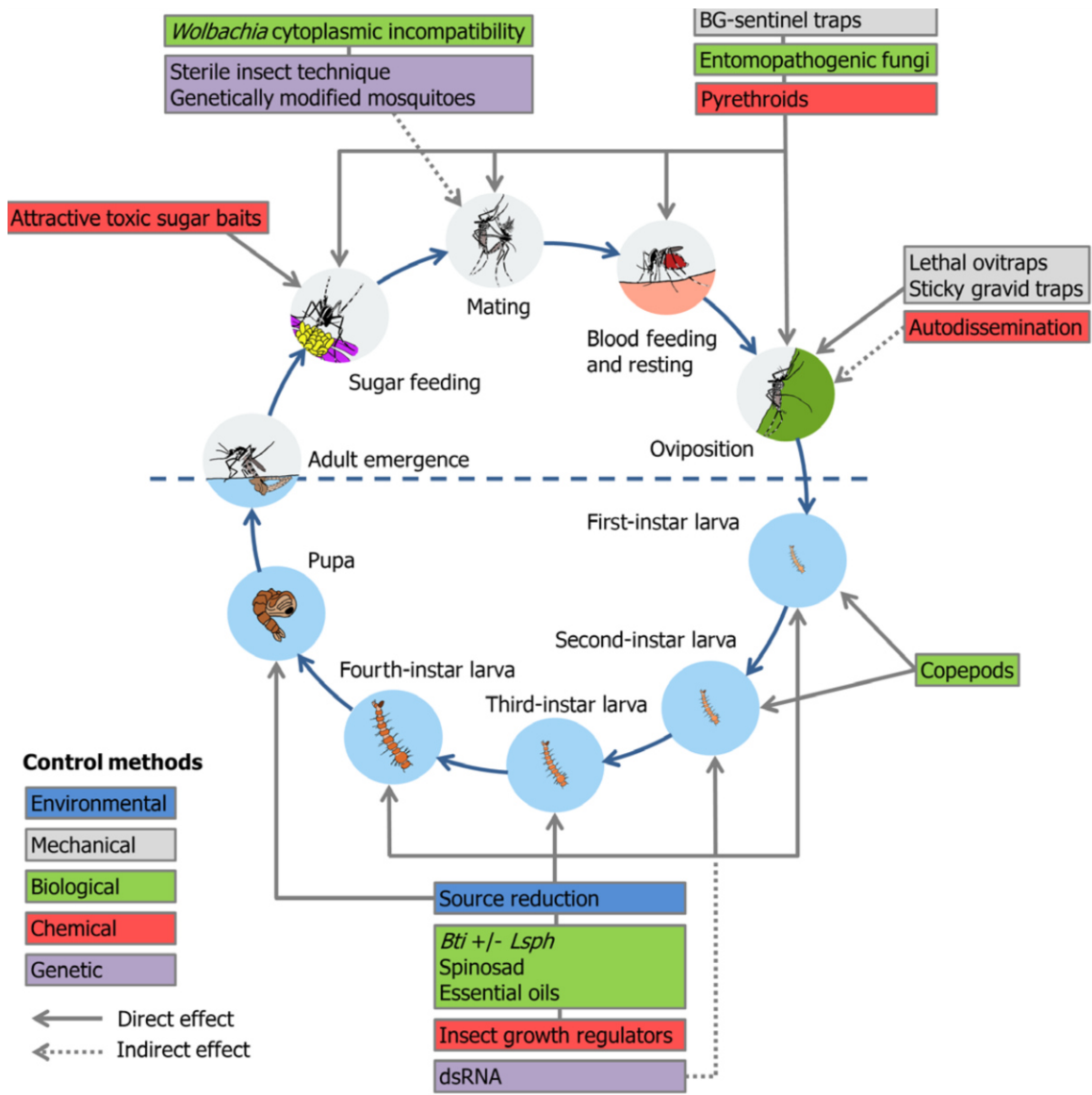


Figura 8. Métodos de control disponibles contra *Aedes sp.* (*Bti*: *Bacillust huringiensis* var. *israelensis*; *Lsph*: *Lysinibacillus sphaericus*; dsRNA: double-stranded RNA) (Baldacchino *et al.* 2015).

Métodos ambientales: se basa en la reducción de los criaderos de mosquitos y es comúnmente el primer método de control contra las especies que se reproducen en contenedores artificiales. Los cambios en el hábitat de las larvas pueden limitar los sitios disponibles para la oviposición de los huevos, eclosión o desarrollo de las larvas. Lo que incluye la remoción temporal de los contenedores con agua, trituración de llantas de desecho, el uso de barreras físicas como tapas o espumas de plástico, entre otras (Baldacchino *et al.* 2015; Foster 2019).

Métodos mecánicos: se ha sugerido el uso de trampas con cebos de olor para la captura masiva de poblaciones adultas de mosquitos, donde el principal blanco son las hembras grávidas. Estos métodos aprovechan la predisposición de las hembras por dejar sus huevos en contenedores pequeños. La adición de un larvicida dentro de la trampa o un adhesivo en la superficie permite su uso por tiempos prolongado sin el riesgo de convertirse en un sitio de reproducción (Mackay *et al.* 2013; Baldacchino *et al.* 2015).

Métodos biológicos: existen diferentes estrategias para el biocontrol, su objetivo principal es ser seguros para el medio ambiente y sustentables, tienen como blanco diferentes estadios del ciclo biológico del mosquito. Estos métodos incluyen organismos que matan mosquitos como las bacterias *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) y *Lysinibacillus sphaericus*; hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*; además de predadores naturales de larvas como peces y copépodos. En los métodos biológicos también se incluyen los compuestos derivados de las plantas y la liberación de mosquitos inoculados con la bacteria endosimbionte *Wolbachia* (Benelli 2016; Baldacchino *et al.* 2015).

Métodos genéticos: estos se basan en la liberación masiva de mosquitos macho estériles que portan un gen letal dominante o un sistema genético que permite a los machos alterados solo dejar como descendencia machos, de esta forma el gen puede continuar extendiéndose, disminuyendo la población natural de hembras (Foster y Walker 2019).

Métodos químicos: durante las últimas décadas los insecticidas químicos han sido los más utilizados para el control de vectores (Muñoz *et al.* 2014). Estos tienen actividad contra larvas y adultos. En los compuestos larvicidas se encuentran los aceites minerales, organofosforados y reguladores del crecimiento de insectos, los cuales son aplicados en el agua donde las larvas se desarrollan. Los adulticidas como los organofosforados, carbamatos, piretrinas y piretroides sintéticos se aplican sobre paredes y sitios de reposo de los mosquitos adultos (Parra *et al.* 2007; Foster y Walker 2019). Sin embargo, está bien documentado que este tipo de compuestos han facilitado el desarrollo de poblaciones de mosquitos resistentes, son tóxicos y afectan el medio ambiente al contaminar el suelo, agua y aire (Govindarajan *et al.* 2012; Narkhede *et al.* 2017).

En México desde los años 70s se han utilizado productos químicos para mantener controladas las poblaciones de mosquitos (Ponce *et al.* 2003). Sin embargo, los intentos por controlar a *Ae. aegypti* han tenido poca fortuna (Rodríguez 2009). Esto debido a la falta de percepción de los gobiernos, que olvidan que la prevención por reinfestaciones depende no sólo de la instalación de la vigilancia entomológica, sino también de la ejecución de acciones larvicidas y adulticidas como respuesta al hallazgo del mosquito (Schmunis y Días 2000).

Las operaciones de combate al mosquito deben desarrollarse, en lo posible, con un empleo mínimo de insecticidas; seleccionándose aquellos productos más seguros, de alta eficacia, con grado de toxicidad muy bajo y con posibilidad mínima o nula de contaminación del ambiente (Rodríguez 2002). La problemática más grave, es que los grandes brotes epidémicos ocurren en países pobres o en vías de desarrollo, por lo que les es imposible adquirir las nuevas, mejoradas y perfeccionadas formulaciones insecticidas, recurriendo entonces a las antiguas y baratas trayendo como consecuencia problemas medioambientales y de resistencia (Parra *et al.* 2007). Por lo que es necesario seguir realizando investigaciones tanto en laboratorio como en campo, de tal forma que el uso y aplicación de otras estrategias de control puedan ser consideradas como una alternativa debidamente normada por los organismos gubernamentales de cada país (Vázquez *et al.* 2007).

2.4 Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas son definidos como organismos vivos y o sus productos naturales que previenen, controlan o suprimen las poblaciones de plagas y que poseen menos efectos negativos al medio ambiente y a la salud humana (Méndez 2017).

Son clasificados en tres diferentes categorías: (1) protectores incorporados en la planta: hace referencia al material genético incorporado en las plantas por medio de la biotecnología, obteniendo de esta forma protección en contra de diversas pestes u otros estresores químicos; (2) pesticidas microbianos: estos incluyen a las bacterias, hongos, protozoarios, o virus como ingrediente activo, los cuales pueden ser naturales o modificados genéticamente; (3) pesticidas bioquímicos: son químicos naturales o extractos vegetales que controlan a las plagas a través de diferentes mecanismos incluyendo interferencia con el apareamiento, funcionan como atrayentes, son toxicidad entre otros (Senthil 2015; Sudakin 2003).

2.4.1 Bioplaguicidas botánicos

El metabolismo primario de las plantas sintetiza compuestos esenciales y de presencia generalizada en todas las especies vegetales, sin embargo, los productos finales del metabolismo secundario como los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles o taninos entre otros, pueden tener diferentes funciones biológicas, dentro de las que destaca, la actividad insecticida. Los metabolitos secundarios pueden actuar como atrayentes, repelentes, inhibidores de la alimentación, tóxicos, así como reguladores del crecimiento lo que puede afectar los procesos fisiológicos del insecto, de esta manera las plantas evitan ser consumidas por herbívoros (Ruiz *et al.* 2015; Vázquez *et al.* 2007; Rizwan-ul-Haq *et al.* 2009). No se ha identificado un patrón de máxima producción, ni órganos especiales para el almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que la mayor concentración de este tipo de compuestos se encuentre en flores, frutos y semillas (Vázquez *et al.* 2007).

Entre las ventajas del uso de bioiplaguicidas botánicos se incluye que son seguros para humanos y animales, descomposición rápida de las moléculas tóxicas en el medio ambiente, y pocos efectos adversos para los organismos no blanco, en comparación con los insecticidas químicos (Prasanna *et al.* 2012; Parra *et al.* 2007; Sakthivadivel y Daniel 2008).

Los compuestos de origen botánico han sido extensamente usados para la actividad larvicida en la agricultura, pero es muy limitado su uso en salud pública. Casi todos los materiales vegetales con actividad biológica contra larvas son efectivos a concentraciones altas (>50 ppm), lo que los hace costosos y económicamente no viables para su uso para el control de larvas de mosquito en campo (Harve y Kamath 2004).

A consecuencia de legislaciones ambientales más estrictas, el incremento de la resistencia de los insectos a los pesticidas sintéticos y la preocupación de los consumidores se ha visto un mayor interés por el uso de insecticidas botánicos (Harve y Kamath 2004). Por lo que el estudio de la actividad biológica de algunos compuestos presentes en las plantas ofrece una oportunidad para descubrir insecticidas nuevos y eficientes para el control de plagas (Vázquez *et al.* 2007).

2.4.2 Bioplaguicidas microbianos

Las especies que se utilizan en la formulación de plaguicidas microbianos deben ser efectivas, tener una alta especificidad y patogenicidad contra una o más plagas de importancia económica o social, lo cual permite asegurar un buen mercado (Nava *et al.* 2012).

Los productos a base de microorganismos presentan como principales ventajas (Fernández y Juncosa 2002):

- Son más específicos que los productos sintéticos.
- Son amigables con el medio ambiente.
- Los insectos tienden a desarrollar menor resistencia a productos microbianos que a productos químicos.

Las principales barreras con las que se encuentran los productos formulados a base de microorganismos son (Fernández y Juncosa 2002):

- Efectividad de control en general menor que los productos químicos.
- Generalmente su acción no es inmediata.
- Dificultades de producción a nivel comercial.
- Problemas técnicos como la sensibilidad a factores ambientales (temperatura, radiación UV, humedad) que presentan la mayoría de estos productos.

Los bioplaguicida a base de bacterias son probablemente los más empleados y resultan más económicos que los otros métodos de bioregulación de plagas (Ondarza 2017). Siendo los productos a base de *Bacillus thuringiensis* los más comercialmente explorados y exitosos, representando el 90% de los bioplaguicidas microbianos que se encuentran disponibles comercialmente a nivel mundial (Damalas y Koutroubas 2018).

Entre las ventajas y desventajas del uso de *Bt* como bioinsecticida se encuentran las siguientes (Galán 2017):

Ventajas:

- Rendimiento. Aunque cada kilogramo es más caro, se necesitan apenas unos gramos por hectárea frente a 4 kilos de los insecticidas químicos.
- Alta toxicidad. Se necesita una pequeña cantidad para acabar con las plagas.
- Especificidad. Solamente mata al organismo blanco.
- No produce infecciones. Está demostrado que una larva infectada no perjudica a otros insectos, animales o incluso humanos.
- Tiempo limitado de permanencia en el medio ambiente. Después de 3 o 4 semanas de aplicado, ya no se encuentran rastros del bioinsecticida.
- Pocos casos de resistencia. Hay pocos casos reportados y sólo en condiciones extraordinarias existen ciertos grados de resistencia.

Desventajas:

- Aplicación con dificultad.
- No es fácil producirlo.
- Poca difusión y aceptación por parte de los productores.
- No se ha podido controlar su calidad. En ocasiones funciona y en ocasiones no.
- Variabilidad en la resistencia de los insectos.
- Localidad. Su uso puede estar limitado a faunas de determinada región.

2.5 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, de flagelación peritrica, que posee la característica de desarrollar esporas (Sauka y Benintende 2008). Es nativo del suelo y catalogado como cosmopolita ya que ha sido aislado de ecosistemas como bosques tropicales y templados, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas, arena y cuevas en los cinco continentes (Portela *et al.* 2013). Se encuentra de forma natural en el intestino de las orugas de diferentes tipos de polillas y mariposas, así como en las superficies oscuras de las plantas (Osman *et al.* 2015).

La principal diferencia entre *Bt* y otros bacilos estrechamente relacionados es la formación, durante el proceso de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la espora (Figura 9). Algunos de estos cristales paraesporales denominados como δ -endotoxinas (proteínas Cry o Cyt) le confieren la capacidad patogénica contra larvas de diferentes órdenes de insectos en su mayoría lepidópteros, dípteros y coleópteros (Palma *et al.* 2014). Al sintetizar el cristal durante la esporulación, la bacteria puede asegurar su supervivencia. Ya que un insecto muerto le puede proveer los nutrientes suficientes que permitan que las esporas puedan germinar (De Maagd 2001).

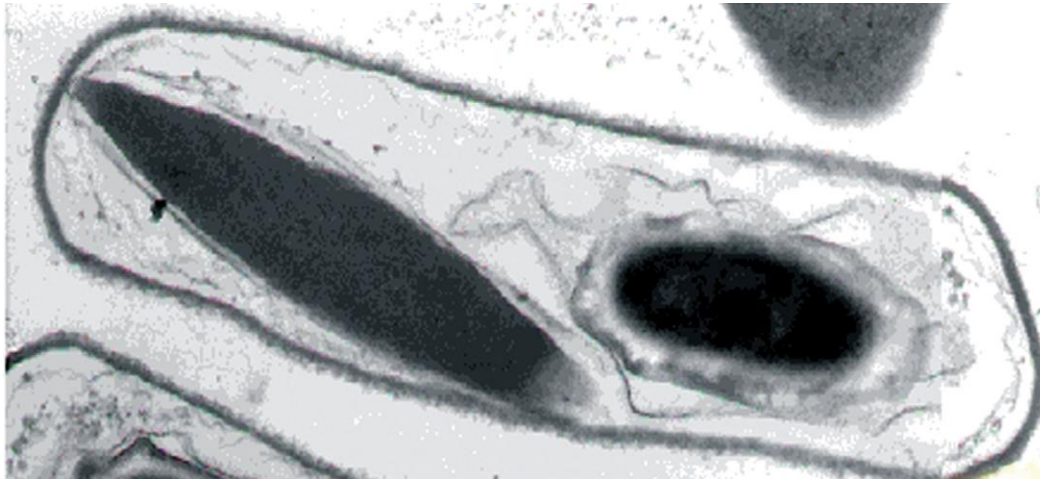


Figura 9. Microfotografía de *Bt* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso (Modificado de Soberón y Bravo 2007).

Las propiedades insecticidas de *Bt* fueron reconocidas muchos años antes de que la bacteria fuera identificada, hay reportes que sugieren que las esporas de esta bacteria ya habían sido utilizadas en el antiguo Egipto (Osman *et al.* 2015). En la era moderna fue aislado por primera vez en 1901 en Japón por el bacteriólogo Ishiwata Shigetane, quien consideró a la bacteria como responsable de la enfermedad de sotto del gusano de seda *Bombyx mori*. Ishiwata nombró al agente causal como *Bacillus sotto*, que significa suave y flácido, en referencia a la apariencia de las larvas infectadas (Galán 2017; Osman *et al.* 2015). Sin embargo, la primera descripción válida fue realizada hasta 1911 por el científico Alemán Ernst Berliner, quien redescubre a la bacteria al aislarla de larvas enfermas de la polilla *Anagasta kuehniella*,

nombrándola *Bacillus thuringiensis*, que deriva de Thuringia, el pueblo alemán donde las polillas fueron encontradas (Sansinenea 2012; Melo *et al.* 2016).

Las toxinas de *Bt* comenzaron a utilizarse comercialmente en Francia en 1938 y para 1958 su uso se había extendido a los Estados Unidos. El panorama de los productos a base de esta bacteria logró expandirse gracias a los aportes del Dr. Howard T. Dulmage, quien en 1970 aísla la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, la cual presentaba toxicidad 200 veces mayor que las cepas antecesoras. Dulmage desarrolla las bases para los procedimientos de fermentación y formulación de los cultivos de *Bt* para su comercialización, además de un sistema estandarizado para calibrar la potencia de las diferentes preparaciones y el establecimiento de las unidades tóxicas internacionales, permitiendo la comparación de los diferentes productos desarrollados. A partir de los años 80 *Bt* se convierte en un plaguicida de interés mundial (Ochoa y Arrivillaga 2009).

2.5.1 Taxonomía

Bacillus thuringiensis pertenece a la familia Bacillaceae, siendo miembro del grupo de *Bacillus cereus*, el cual comprende a las especies *B. anthracis*, *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *B. cytotoxicus*, *B. mycooidesare*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. toyonensis*. La clasificación sistemática de *Bt* es la siguiente (Wei *et al.* 2019):

Reino: Procariota

Phylum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia Bacillaceae

Género: *Bacillus*

Para la clasificación de esta especie el método más comúnmente utilizado es la serotipificación del antígeno flagelar H. Se han caracterizado al menos 69 serotipos H y 82 variedades serológicas (serovar) (Tabla 1). Existen, además, cepas de *Bt* que no pueden clasificarse utilizando esta metodología, ya que no pueden formar flagelos (Sauka y Benintende 2008; Lecadet *et al.* 1999).

Tabla 1. Clasificación de *Bt* de acuerdo con el antígeno H (Lecadet *et al.* 1999).

Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar	Antígeno H	Serovar
1	<i>thuringiensis</i>	19	<i>tochigiensis</i>	44	<i>higo</i>
2	<i>finitimus</i>	20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	45	<i>roskildiensis</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	46	<i>chanpaisis</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	21	<i>colmeri</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	22	<i>shandongiensis</i>	48	<i>baleárica</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	23	<i>japonensis</i>	49	<i>muju</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	50	<i>navarrensis</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
5a, 5b	<i>galleriae</i>	25	<i>coreanensis</i>	52	<i>kim</i>
5a, 5c	<i>anadensis</i>	26	<i>silo</i>	53	<i>asturiensis</i>
6	<i>entomocidus</i>	27	<i>mexicanensis</i>	54	<i>poloniensis</i>
7	<i>aizawai</i>	28a, 28b	<i>monterrey</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	28a, 28c	<i>jegathesan</i>	56	<i>rongseni</i>
8a, 8c	<i>ostriniae</i>	29	<i>amagiensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	30	<i>medellin</i>	58	<i>argentiniensis</i>
9	<i>tolworthi</i>	31	<i>toguchini</i>	59	<i>ibérica</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	32	<i>cameroun</i>	60	<i>pingluonsis</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	33	<i>leesis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	34	<i>konkukian</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	35	<i>seoulensis</i>	63	<i>bolivia</i>
12	<i>thompsoni</i>	36	<i>malaysiensis</i>	64	<i>azorensis</i>
13	<i>pakistaní</i>	37	<i>andaluciensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>
14	<i>israelensis</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>	66	<i>graciosensis</i>
15	<i>dakota</i>	39	<i>brasiliensis</i>	67	<i>vazensis</i>
16	<i>indiana</i>	40	<i>huazhongensis</i>	68	<i>thailandensis</i>
17	<i>tohokuensis</i>	41	<i>soonchen</i>	69	<i>pahangi</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	42	<i>jinghongiensis</i>		
18a, 18c	<i>yosoo</i>	43	<i>guiyangiensis</i>		

2.5.2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

La primera variedad de *Bt* reportada con toxicidad contra larvas de dípteros fue *Bti* la cual fue aislado por primera vez en la ribera de un río en Israel en 1976 por Goldberg y Margalit (Ben 2014; Ochoa y Arrivillaga 2009). Desde principios de los 80, los insecticidas basados en *Bti* han sido utilizados comercialmente como agentes de biocontrol, demostrando alta eficiencia a concentraciones muy bajas en contra de los organismos blanco, principalmente larvas de mosquito y mosca (Land y Miljand 2014; Boyce *et al.* 2013).

Bti es seguro para los humanos y otros organismos no blanco, presenta residuos mínimos en los hábitats tratados, es biodegradable y presenta vida de anaquel prolongada (Poopathi 2012). En un estudio realizado en 2001 llevado a cabo en un río de Pensilvania (EUA) durante 8 años se demostró que la aplicación de *Bti* no tiene efecto en la composición y densidad de las poblaciones de peces y macroinvertebrados no blanco, ni siquiera en ciertas

especies de quironómidos que previamente se habían reportado como sensibles a *Bt*. Por otro lado, la aplicación de *Bti* sí redujo las poblaciones de la larva de la mosca negra (Diptera: Simuliidae), uno de los blancos de esta bacteria (Ochoa y Arrivillaga 2009).

Su actividad se atribuye a la producción de inclusiones compuestas de las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba. Las cuales difieren unas de otras en su toxicidad variable hacia diferentes géneros de mosquito (Zhang *et al.* 2017). *Bti* tiene un efecto tóxico elevado contra larvas de más de 15 especies de mosquitos y 40 especies de moscas. Siendo altamente tóxica contra los géneros de mosquito *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* que son las especies transmisoras de enfermedades humanas con mayor importancia (Gad y Al-Dakhil 2018).

2.5.3 Mecanismo de acción

Aunque el mecanismo de acción de las toxinas Cry contra diversos insectos ha sido ampliamente investigado, aún hay muchas controversias. Existen diferentes modelos en la literatura que buscan explicarlo entre ellos el modelo de unión secuencial y el de señalización (Zhang *et al.* 2017; Ibrahim *et al.* 2010).

El modelo de unión secuencial es conocido como el mecanismo clásico. Ha sido detallado en estudios con la proteína Cry1Ab en *Manduca sexta*. Postula que las propiedades tóxicas provienen de inclusiones cristalinas producidas durante la esporulación de *Bt*. Los cristales y sus subunidades son protoxinas inertes y no se encuentran biológicamente activas. Son activadas cuando son ingeridas por larvas de mosquito, y su modo de acción puede ser trazado como sigue: la δ -endotoxinas es ingerida, la digestión con proteasas es activada, y después las toxinas Cry entran en contacto con los receptores N-aminopeptidasa y cadherina en la superficie de la membrana (Figura 10A). La afinidad entre las toxinas y ciertos tipos de receptores dan como resultado la proteólisis de la proteína Cry. Lo que causa cambios estructurales en las cadenas y forma oligómeros que funcionan como “pre-poros” (Figura 10B y C). El receptor N-aminopeptidasa ancla el pre-poro en la bicapa lipídica (Figura 10D). Así el cambio en la formación del poro afecta la integridad de la membrana (Figura 10E), evidencia electrofisiológica y bioquímica sugiere que los poros ocasionan un desbalance osmótico que causa la muerte y lisis de la célula; el intestino se paraliza, el insecto deja de alimentarse, hay diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. Muchas larvas de mosquitos

mueren a pocas horas de la ingestión (Land y Miljand 2014; Melo *et al.* 2016; Soberón y Bravo 2007).

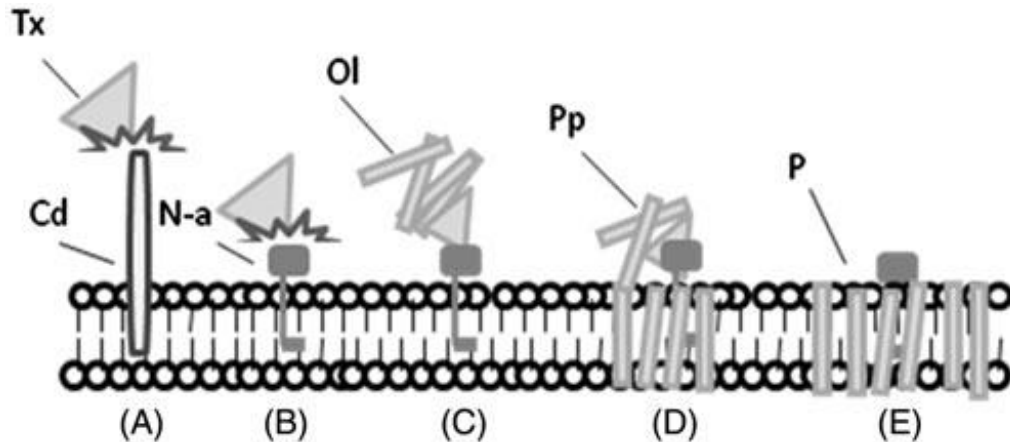


Figura 10. Mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bt*, de acuerdo con el modelo de unión secuencial. A) La toxina Cry (Tx) se une a los receptores de cadherina (Cd) en la membrana plasmática. B) Las toxinas Cry se unen a los receptores N-aminopeptidasas (N-a). C) proteólisis de la proteína por oligomerización (OI). D) Formación de pre-poros (Pp). E) Formación de poros (P) que afectan la integridad de la membrana (Modificado de Melo *et al.* 2016).

El modelo de señalización tiene similitudes con el modelo anterior; sin embargo, en este se asignan otras causas para la muerte celular. De acuerdo con esta teoría, las proteínas Cry afectan a la célula de dos maneras: primero por la formación de poros en la membrana, como se menciona en el modelo de unión secuencial; segundo, por la producción de reacciones sucesivas que alteran el metabolismo celular. De acuerdo con esta hipótesis, las toxinas Cry se unen a los receptores cadherinas y N-aminopeptidasas (Figura 11A), simultáneamente hay una activación de los canales de Mg^{+2} en la membrana plasmática (Figura 11B). La apertura de estos canales provoca un movimiento anormal de los iones en el citosol (Figura 11C), estimulando el proceso de apoptosis (Melo *et al.* 2016).

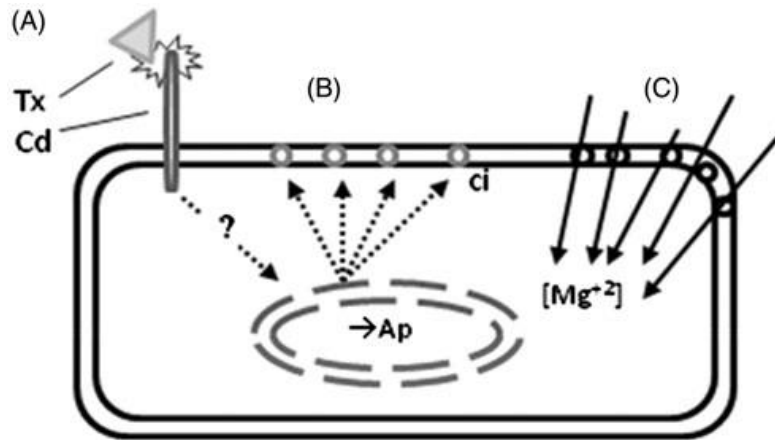


Figura 11. Mecanismo de acción de las toxinas de *Bt*, de acuerdo con el modelo de señalización. A) La toxina Cry (Tx) se une a los receptores de cadherina (Cd) en la membrana plasmática. B) Estimulación de apoptosis (Ap) con la activación de canales iónicos en la membrana plasmática. C) Movimiento de los iones de magnesio, culminando con muerte celular (Modificado de Melo *et al.* 2016).

2.5.4 Toxinas

Bacillus thuringiensis produce tres clases principales de proteínas insecticidas, las proteínas Cry (proteínas cristalinas) y Cyt (toxinas citolíticas) denominadas como δ -endotoxinas se producen durante la fase de esporulación; y las Vip (proteínas insecticidas vegetativas) durante la fase vegetativa (Zhang *et al.* 2017; Palma *et al.* 2014). De acuerdo con la base de datos de Crickmore *et al.* (2018) (<http://www.btnomenclature.info/>) hasta octubre de 2019, existen 74 familias de proteínas Cry con 818 secuencias reportadas, 3 familias para las Cyt con un total de 40 secuencias y 156 secuencias que codifican para proteínas Vip agrupadas en 4 familias.

2.5.4.1 δ -endotoxinas

Las toxinas Cry y Cyt pertenecen a la clase de toxinas conocidas como formadoras de poro, las cuales son secretadas como proteínas solubles en agua, sufren cambios conformacionales en orden de insertarse o translocarse en la membrana celular de su hospedero (Bravo *et al.* 2007). Se ha reportado toxicidad por parte de las proteínas Cry hacia lepidópteros, coleópteros, himenópteros, dípteros, nematodos, algunos caracoles y a células cancerígenas de diferentes orígenes. En contraste las toxinas Cyt presentan actividad predominantemente en contra del orden Díptera, (Figura 12); adicionalmente algunas toxinas Cyt son capaces de establecer sinergia para la actividad insecticida con otras proteínas de *Bt* (Palma *et al.* 2014).

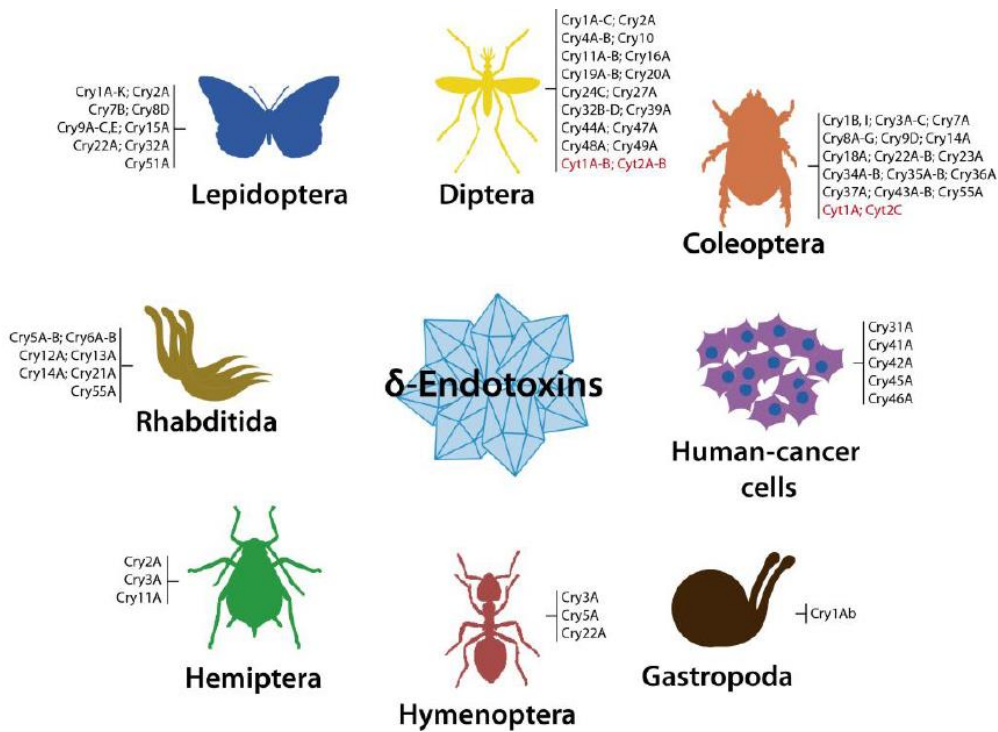


Figura 12. Espectro de acción de las δ -endotoxinas Cry y Cyt (Palma *et al.* 2014).

2.5.5 Otros factores de virulencia

Para muchos insectos la acción de las δ -endotoxinas es suficiente para provocar la muerte del insecto, mientras que para otros la espora tiene que estar presente. La germinación de las esporas permite la expresión y producción de otros factores de virulencia que le permiten sobrevivir y multiplicarse en el huésped, evadir su sistema inmune y producir septicemia (Raymond *et al.* 2010; Sauka y Benintende 2008). Incluyendo las proteínas insecticidas secretadas (Sip), α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinasas y fosfolipasas. Las esporas por sí mismas contribuyen a la patogenicidad, con frecuencia actuando en sinergia con las proteínas cristalinas. Todos estos factores podrían tener un rol en la patogénesis del insecto bajo condiciones naturales, ayudando a la bacteria a desarrollar la enfermedad o la muerte de las larvas de los insectos (Maagd *et al.* 2001).

2.6 Sinergismo entre *Bt* y extractos vegetales

Los compuestos fitoquímicos que tienen sinergia con los productos a base de *Bt*, podrían usarse en las formulaciones microbianas para el control de plagas; y por otra parte permitirán el desarrollo de estrategias para la rotación de *Bt* e insecticidas de origen botánico para

mitigar la resistencia de los insectos a las toxinas *Bt*, ya que se considera que las mezclas complejas que presentan sinergismo tienen mayor efecto y más duradero que los compuestos orgánicos puros solos (Nathan *et al.* 2006; Chang *et al.* 2014).

Estudios de sinergismo, antagonismo y adición de toxicidad que involucran la mezcla de fitoquímicos, se han realizado en plagas agrícolas más que en plagas de importancia médica. Existen pocos estudios de la actividad insecticida contra mosquito que combinen los efectos fitoquímicos con los insecticidas o agentes de control microbiológico (Shalan *et al.* 2005), algunos de estos serán mencionados a continuación.

Se ha visto que los productos derivados de la planta de neem (*Azadirachta indica*) tienen efectos tóxicos en las larvas de las especies de mosquitos *Aedes* spp. y *Anopheles* spp. Sin embargo, cuando son utilizados solos, se necesitan concentraciones elevadas para obtener una alta mortalidad en *Ae. aegypti*. Pero combinándolo con *Bti*, se pueden obtener efectos aditivos o inclusive sinérgicos (Schmutterer 1990).

Murugan *et al.* (2002) al combinar el aceite esencial de *A. indica* y *Pongamia pinnata* con *Bti* observaron efecto sinérgico donde la mortalidad de larvas, pupas y adultos de *C. quinquefasciatus* incrementó al aumentar la concentración de los aceites esenciales y *Bti* cuando fueron evaluados solos o combinados.

Prasanna *et al.* (2012) reportaron que el extracto metanólico del alga *Sargassum wightii* en combinación con *Bti* afectó la duración de la fase larvaria, la emergencia de los adultos y generó interferencia en el sistema intestinal, dando como resultados mortalidad y efectos inhibidores del crecimiento en *An. sondaicus*.

Subramaniam *et al.* (2012) reportaron que al combinar el extracto metanólico de hoja de *Momordica charantia* y *Bti* se obtuvieron las CL_{50} de 85.09 ppm, 90.51 ppm, 111.91 ppm, y 137.61 ppm para larvas de los instar I al IV respectivamente y 154.40 ppm para las pupas de *An. stephensi*, siendo más tóxica la combinación, que los componentes de forma individual.

El equipo de trabajo de Mahesh *et al.* (2012) utilizando el extracto de hoja de *Solanum xanthocarpum* más *Bti* en una relación 2:1, obtuvieron mayor actividad larvicida y pupicida donde la CL_{50} fue de 126.81, 137.62, 169.14, 238.27, y 316.02 ppm para larvas del I al IV instar y pupas de *C. quinquefasciatus*.

Mansour *et al.* (2012) reportaron que al combinar las CL₂₅ de diferentes aceites esenciales (*Anethum graveolens*, *Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Curcuma longa*, *Cuminum cyminum*, *Foeniculum vulgare*, *Melia azedarach*, *petroselinum crispum* y *Piper nigrum*) y *Bti* se potenciaba la toxicidad contra larvas y adultos de *C. pipens*.

El grupo de Zahran *et al.* (2013) al combinar la azadiractina el compuesto bioactivo presente en semillas de *A. indica* con *Bti*, encontraron efecto sinérgico en todas las combinaciones evaluadas, en donde la concentración CL₂₅ *Bti* + CL₂₅ azadiractina presentó 89% de mortalidad en larvas del 3° instar de *C. pipens*.

En un estudio realizado por Panneerselvam *et al.* (2013), se encontró que al combinar el extracto de éter de petróleo de hojas de *Catharanthus roseus* con *Bt* en una relación 60/2.5 g/L, se obtuvo una mejor eficiencia larvicida obteniéndose mortalidades de 97, 92, 88 y 82% contra los cuatro estadios larvarios de *An. stephensi*.

Chang *et al.* (2014) encontraron que los principales constituyentes de los aceites esenciales de corteza de cassia, capullo de clavo y el anís de estrella, los cuales son (*E*)- cinamaldehído, eugenol y (*E*)- anetol, al ser combinados con *Bti* en una relación 1:1 mostraron acción sinérgica contra larvas de *Ae. albopictus* y *An. sinensis*, siendo la combinación con el compuesto (*E*)- cinamaldehído el que presentó mayor toxicidad.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por el mosquito *Ae. aegypti* como el dengue, zika chikungunya y fiebre amarilla impactan de manera importante en los sistemas de salud. Debido a que para muchas de estas enfermedades no hay vacunas disponibles, la disminución de su transmisión se basa en el control del vector principalmente por la aplicación de insecticidas químicos.

Sin embargo, el uso excesivo de insecticidas sintéticos que son utilizados en los programas de control de vectores favorece la aparición de insectos resistentes, desequilibrio ecológico, y riesgo para los organismos no blanco. Por lo que hay una constante necesidad por desarrollar insecticidas biológicos, que puedan reducir los riesgos para el humano y otros organismos al minimizar la acumulación de residuos peligrosos en el ambiente.

Aunque *Bti* muestra una alta eficiencia para el combate de diversas especies de mosquito, no se ha utilizado ampliamente para el combate de plagas urbanas, principalmente por ser más costoso que los insecticidas químicos. Por lo que la búsqueda de compuestos que potencialicen la toxicidad de *Bti* como los extractos vegetales, permitirá que la cantidad de principio activo necesario para tener actividad insecticida satisfactoria se disminuyan, además de que estos compuestos podrían ser considerados para su adición en formulaciones, de tal forma que se reduzcan a largo plazo los costos de producción, y con ello poder ofrecer productos más atractivos que puedan competir en el mercado con los insecticidas químicos que actualmente son utilizados para el control de mosquito.

4. HIPÓTESIS

Existe sinergismo entre extractos vegetales y cepas de *Bti* para el control de *Ae. aegypti*.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe sinergismo entre extractos vegetales y cepas de *Bti* para el control de *Ae. aegypti*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad larvica de tres extractos vegetales comerciales y nueve extractos vegetales metanólicos contra *Ae. aegypti*.
2. Determinar el efecto pupicida de extractos vegetales seleccionados.
3. Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales.
4. Determinar la toxicidad del complejo espora-cristal de dos cepas de *Bti* contra larvas de *Ae. aegypti*.
5. Evaluar si existe sinergismo entre los mejores extractos vegetales y *Bti* para el control de larvas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de trabajo

El estudio fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias biológicas, el cual pertenece al departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Cepas bacterianas

Fueron seleccionadas por su toxicidad las cepas de *Bti* Bt-QAM y Bt-UNL las cuales pertenecen a la colección Dulmage del Instituto de Biotecnología de la UANL. Para la obtención del complejo spora-cristal se realizó una extracción por el método de coprecipitación lactosa acetona de Dulmage *et al.* (1970), para lo cual las cepas fueron reactivadas en 300 ml de caldo nutritivo e incubadas por 15 h a 30 °C y 200 rpm, posteriormente el cultivo fue transferido a un fermentador de 9 L, incubándose por 72 h a las mismas condiciones de temperatura y agitación mencionadas anteriormente. Fue realizada una evaluación microscópica hasta observar la formación de los cristales. Las muestras fueron almacenadas en tubos de plástico a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

6.3 Extractos vegetales

Fueron utilizados tres extractos vegetales comerciales que consistieron en: (Citricidal®, *Echinacea* y sangre de drago, la composición se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Extractos vegetales comerciales utilizados y su composición.

Nombre comercial	Nombre científico	Familia	Composición
Citricidal®	<i>Citrus paradisi</i>	Rutaceae	56-60% Extracto de Semilla, 35-39% Glicerina USP y 24% de Ácido Ascórbico
Sangre de drago	<i>Jatropha dioica</i>	Euphorbiaceae	Extracto fluido de raíz 100%
Echinacea	<i>Echinacea purpurea</i>	Asteraceae	Extracto fluido de raíz 20% y parte aérea 80%

Fueron utilizadas las siguientes plantas deshidratadas (Tabla 3): semilla de *Persea americana*, flor de *Calendula officinalis*, raíz de *Taraxacum officinale*, rizoma de *Curcuma longa*, hojas de *Casimiroa edulis*, semilla de *Piper nigrum*, hojas de *Rosmarinus officinalis*, semillas de *Linum usitatissimum* y raíz de *Heliopsis longipes*.

Tabla 3. Plantas utilizadas para la elaboración de extractos vegetales metanólicos.

Familia	Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada
Asteraceae	<i>Calendula officinalis</i>	Caléndula	Flor
	<i>Taraxacum officinale</i>	Diente de león	Raíz
	<i>Heliopsis longipes</i>	Pelitre	Raíz
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Hojas
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Linaza	Semilla
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Aguacate	Semilla
Piperaceae	<i>Piper nigrum</i>	Pimienta	Semilla
Rutaceae	<i>Casimiroa edulis</i>	Zapote blanco	Hojas
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	Cúrcuma	Rizoma

Para la elaboración de extractos vegetales metanólicos se utilizó el método de maceración, para lo cual las plantas deshidratadas fueron trituradas con un mortero, 25 g del material vegetal fue transferido a frascos de color ámbar para posteriormente adicionar metanol al 96% en una relación masa/solvente de 1:10. Las preparaciones se dejaron a temperatura ambiente por cuatro días protegidas de la luz con agitación ocasional, los extractos fueron filtrados usando papel Whatman N° 4, para posteriormente concentrar el extracto en rotavapor (IKA® RV 10) a 40 °C, 50 rpm y 200 mbar. Para obtener el rendimiento de la extracción fue empleada la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso del material vegetal}} \times 100$$

6.4 Mantenimiento de la colonia de *Ae. aegypti*

La colonia de mosquitos se encuentra en condiciones de laboratorio a una temperatura de 28 a 30 °C con 60 a 70% de humedad relativa, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h. Bajo estas condiciones, el ciclo de huevo a adulto se completa de tres a cuatro semanas. Las larvas son alimentadas diariamente con alimento para peces molido y pre-esterilizado. Las pupas fueron retiradas diariamente con pipetas Pasteur de 3 ml y colocadas en cámaras de emergencia de 48 a 72 h para la obtención de los mosquitos adultos, una vez obtenidos, se transfirieron a jaulas metálicas. Los adultos fueron alimentados diariamente de la siguiente manera: los machos con una solución al 10% de miel que se colocó sobre torundas de algodón y las hembras con sangre humana por 10 minutos.

Para estimular la oviposición de las hembras se colocaron dentro de las jaulas, ovitrampas, que consisten en recipientes llenos de agua con tiras de papel filtro dentro. Después de 72 h

las tiras de papel cubiertas de huevos son transferidas a contenedores con agua para perpetuar el ciclo de vida del mosquito.

6.5 Actividad larvicida de extractos vegetales comerciales y metanólicos contra *Ae. aegypti*

6.5.1 Ensayos preliminares

Se realizaron ensayos preliminares con los extractos comerciales y metanólicos utilizando concentraciones de 50 y 500 ppm. Los bioensayos se realizaron siguiendo los métodos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2005). Se colocaron 25 larvas de *Ae. aegypti* entre el 3° y 4° instar en vasos de plástico, posteriormente se adicionaron las soluciones a probar hasta alcanzar un volumen de 100 mL, realizándose cuatro repeticiones por tratamiento. Para el control negativo se utilizó agua destilada o metanol. Después de 24 y 48 h de exposición se registró el porcentaje de mortalidad. Los extractos vegetales con mayor actividad larvicida fueron seleccionados para los ensayos posteriores.

6.5.2 Determinación de CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀

Para determinar las concentraciones letales CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ de los extractos seleccionados, se probaron diferentes concentraciones hasta obtener un rango de mortalidad entre el 10 y 95%. Siguiendo la misma metodología descrita en la sección anterior para realizar los bioensayos.

6.6 Efecto pupicida de extractos seleccionados

Para determinar la actividad pupicida se siguió la metodología descrita por Chantawee y Soonwera (2018), para lo cual se prepararon soluciones a partir de los extractos vegetales de 50 y 500 ppm. Diez pupas fueron colocadas en vasos con 100 ml de las soluciones evaluadas, realizándose cinco repeticiones por tratamiento. Para el control negativo se utilizó metanol. El porcentaje de mortalidad, así como los estados de muerte observadas en las pupas se registraron a las 24 y 48 h de exposición.

Para determinar los estados de muerte, las aberraciones morfológicas se categorizaron en los siguientes grupos (Chantawee y Soonwera 2018):

Grupo 1: Pupa muerta normal de color café (PC). Las pupas en este grupo eran de color café con una apariencia normal.

Grupo 2: pupa deforme (PD). Este grupo representa a las pupas que murieron de forma anormal.

Grupo 3: Adulto unido a la cubierta de la pupa (AP). En este grupo los adultos emergieron de forma parcial de la cubierta de la pupa antes de morir.

Grupo 4: Adulto normal (AN). En este grupo se encontraban los adultos que emergieron por completo y presentaban una apariencia normal.

6.7 Identificación de los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales

Se les realizó un análisis fitoquímico preliminar de los extractos vegetales para determinar la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios asociados con actividad biológica los cuales consistieron en: esteroides y/o triterpenos, cumarinas, lactonas sesquiterpénicas, saponinas, fenoles y/o taninos, fenoles y/o flavonoides, azúcares, alcaloides y quinonas. Para la realización de las pruebas exceptuando la de alcaloides, 2 ml de los extractos fueron disueltos en etanol en una proporción 3:4.

Esteroles y triterpenos: se utilizó la prueba de Lieberman-Burchard, para lo cual de dos a tres gotas de la muestra se colocaron en placas de porcelana para luego añadir el reactivo que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1 ml de anhídrido acético con 1 mL de cloroformo, la aparición de color azul, violeta o rojo en el lapso de 1 hora determina que la prueba es positiva.

Cumarinas: Se colocó la muestra sobre una placa de porcelana, posteriormente se añadieron unas gotas de NaOH al 10% si aparecía una coloración amarilla que desaparece al adicionar de dos a tres gotas de HCl concentrado la prueba se consideró positiva.

Lactonas sesquiterpénicas: se realizó la prueba de Baljet, para lo cual se utilizaron dos soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse. Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se coloca la muestra en una placa de porcelana y se adiciona de 3 a 4 gotas del reactivo siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

Saponinas: para detectarlas se realizó una redisolución de la muestra en agua a ebullición y se dejó enfriar. Se agitó vigorosamente durante 1 min, en tubos de ensayo de 15 mm de

diámetro exterior, con la consiguiente formación de espuma. La reacción se consideró positiva cuando dicha espuma persistió por 30 min

Compuestos fenólicos y/o taninos: se añadió FeCl_3 diluido en etanol al 5%, la muestra fue positiva cuando se observó una coloración oscura.

Fenoles y/o flavonoides: a un tubo de ensaye que contenía la muestra diluida con etanol se le adiciono algunas limaduras de magnesio. Se sujeto el tubo y se añadió cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. La aparición de coloración naranja indicó que la prueba era positiva.

Azúcares: a la muestra diluida en etanol y agua se le adiciono el reactivo de antrona por las paredes del tubo de ensaye, la prueba se consideró positiva cuando apareció en la interfase un anillo de coloración azul, violeta o morado.

Alcaloides: se realizó la prueba de Dragendorff, para lo cual se colocó una muestra del extracto sobre una placa para cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente la placa se colocó en una cámara cromatográfica al que previamente se le añadió el eluyente, el cual consistió en una mezcla de cloroformo (CHCl_3) y metanol ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) en una relación 9:1 respectivamente, se dejó que el eluyente ascendiera por capilaridad, la placa fue retirada del vaso antes de que el disolvente llegara al otro extremo de la misma, dejándose secar a temperatura ambiente. La placa fue rociada con el reactivo de Dragendorff el cual se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30% con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. La prueba fue positiva para alcaloides al observarse en la placa de CCF coloraciones rojas o naranjas, persistentes por más de 24 h.

Quinonas: si al añadir de dos a tres gotas de H_2SO_4 concentrado se observa una coloración rojiza a púrpura la muestra es positiva.

6.8 Efecto sinérgico de *Bti* y extractos vegetales

Se utilizará los valores obtenidos (ppm) en las concentraciones letales CL_{25} y CL_{50} (24 h) de *Bti* y extractos vegetales para realizar las siguientes combinaciones *Bti*/extracto: $\text{CL}_{25}/\text{CL}_{25}$, $\text{CL}_{25}/\text{CL}_{50}$, $\text{CL}_{50}/\text{CL}_{25}$ y $\text{CL}_{50}/\text{CL}_{50}$. Los tratamientos evaluados fueron probados en larvas

siguiendo la metodología ya descrita para la realización de bioensayos. Los porcentajes de mortalidad fueron registrados después de 24 y 48 h de exposición.

Para determinar el tipo de interacción entre los extractos vegetales y las cepas de *Bti* se siguió la metodología descrita por Zahran *et al.* (2013), para lo cual se determinó el factor de co-toxicidad (C.C.) el cual fue estimado usando la siguiente ecuación:

$$C. C. = \frac{\% \text{ mortalidad observada} - \% \text{ mortalidad esperada}}{\% \text{ mortalidad esperada}} \times 100$$

Donde un factor positivo de 20 o más es considerado como potenciación, un factor negativo de 20 o más indica antagonismo y un valor intermedio entre -20 y +20 indica efecto aditivo.

Se calculó el factor de sinergismo (F.S.) para los tratamientos evaluados siguiendo la metodología propuesta por Mansour *et al.* (2012), para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$F. S. = \frac{\% \text{ mortalidad observada}}{\% \text{ mortalidad esperada}}$$

Donde un valor F.S. igual a 1.0 ± 0.05 indica que no hay efecto sinérgico, un factor mayor a 1.05 indica sinergismo y valores menores a 0.95 se considera antagonismo.

6.9 Análisis de datos

Para determinar las concentraciones letales (CL_{25} , CL_{50} y CL_{90}) se utilizó la función Probit con sus respectivos intervalos de confianza utilizando el programa Polo Plus versión 1:0. Si el porcentaje de mortalidad del control se encontraba entre el 5 y 20%, las mortalidades de los tratamientos fueron corregidos usando la fórmula de Abbott (Abbott 1925). Se utilizó el paquete estadístico IBM® SPSS® versión 20 para evaluar la normalidad de los datos mediante la prueba de Pearson, para determinar las diferencias significativas de la actividad larvicida y pupicida de extractos vegetales solos y en combinación con cepas de *Bti* se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA), las medias fueron separadas por una prueba de Tukey, usado el nivel de probabilidad de $P < 0.05$ para la significancia entre medias.

7. RESULTADOS

7.1 Rendimiento de extractos vegetales elaborados

Se elaboraron nueve extractos vegetales metanólicos de los cuales el extracto con mayor rendimiento fue *C. officinalis* con 12.71%, seguido por *T. officinale* con 11.95%, mientras que *C. edulis* presentó el rendimiento más bajo con 4.44% (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento de extractos metanólicos elaborados.

Extracto	Parte utilizada	Rendimiento
<i>Persea americana</i>	Semilla	9.43%
<i>Calendula officinalis</i>	Flor	12.71%
<i>Taraxacum officinale</i>	Raíz	11.95%
<i>Curcuma longa</i>	Rizoma	7.44%
<i>Casimiroa edulis</i>	Hojas	4.44%
<i>Piper nigrum</i>	Semilla	5.88%
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hojas	10.56%
<i>Linum usitatissimum</i>	Semilla	6.86%
<i>Heliopsis longipes</i>	Raíz	9.71%

7.2 Actividad larvicida de extractos vegetales

Se realizaron bioensayos preliminares para determinar la actividad larvicida de nueve extractos vegetales metanólicos y tres extractos comerciales a dos concentraciones diferentes (50 y 500 ppm). Para la concentración de 50 ppm los extractos con mayor actividad larvicida fueron los extractos metanólicos elaborados a partir de *P. americana*, *H. longipes*, *P. nigrum* y *C. longa* con 100, 100, 100 y 98% de mortalidad a las 24 h y 100 % para los cuatro extractos a las 48 h. Mientras que con los extractos comerciales de *J. dioica* y *E. purpurea* se obtuvieron los porcentajes de mortalidad más bajos con valores de 1% para los dos extractos a las 24 h y 1 y 3% a las 48 h (Figura 13). Al evaluar la concentración de 500 ppm se observó que la mortalidad de larvas aumentaba. Los extractos con los que se obtuvieron mejores resultados a las 24 y 48 h fueron *P. americana*, *H. longipes*, *P. nigrum*, *C. longa* y Citricidal® con 100% de mortalidad para los cinco extractos. La mortalidad más baja se obtuvo con *E. purpurea* con 1% a las 24 y 48 h sin diferencias significativas con el control (Figura 14).

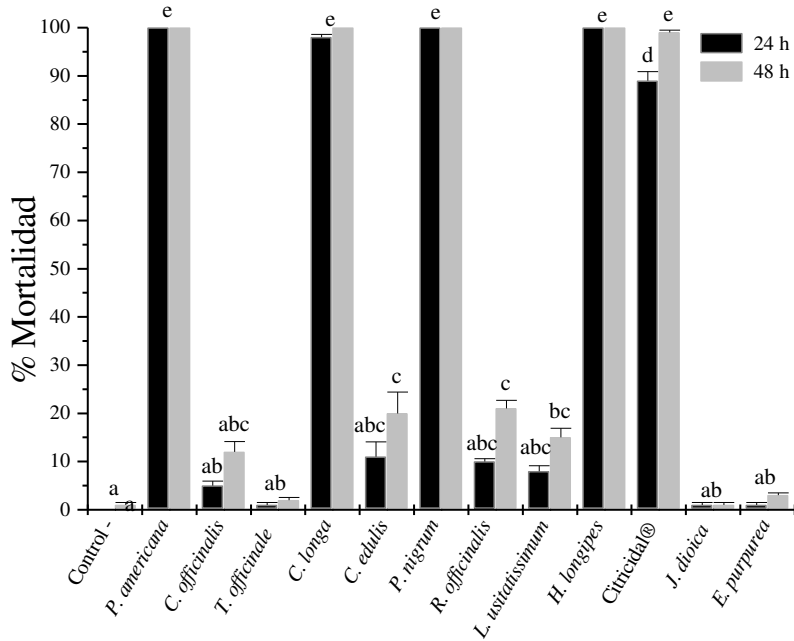


Figura 13. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* tratadas con extractos vegetales a una concentración de 50 ppm a las 24 y 48 h. Los datos están presentados como medias \pm DE y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

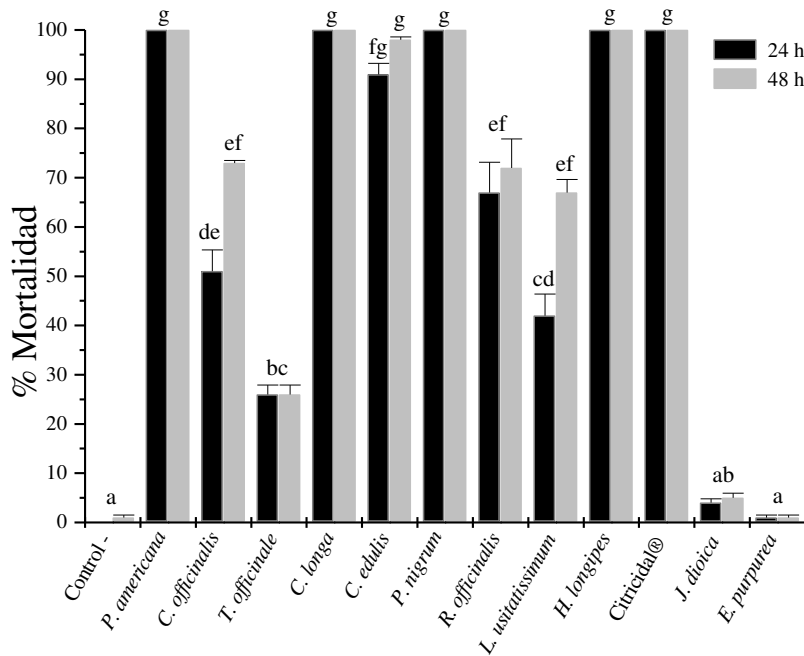


Figura 14. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* tratadas con extractos vegetales a una concentración de 500 ppm a las 24 y 48 h. Los datos están presentados como medias \pm DE y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

Los extractos de *P. americana*, *C. longa*, *P. nigrum* y *H. longipes* fueron seleccionados para continuar con las demás pruebas por ser los más tóxicos contra larvas en los ensayos preliminares a las dos concentraciones evaluadas (50 y 500 ppm). Después se procedió a la realización de bioensayos de dosis-respuesta para determinar las concentraciones letales CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀. El extracto con las concentraciones letales más bajas fue *P. nigrum* con valores de 1.24, 2.19 y 6.47 ppm, mientras que con *C. longa* se obtuvieron los valores más altos con 27.53, 46.15 y 123.20 ppm para la CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ respectivamente a las 24 h (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones letales CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ de actividad larvicida a las 24 y 48 h empleando diferentes extractos metanólicos.

Extracto	Tiempo (h)	CL ₂₅ ^{ac}	IC*95% ^b	CL ₅₀ ^{ac}	IC*95% ^b	CL ₉₀ ^{ac}	IC*95% ^b
<i>P. americana</i>	24	24.94a	19.95-27.17	28.57a	25.69-30.53	36.98 ^a	33.85-46.75
	48	14.00b	8.45-17.35	19.27b	14.62-22.45	35.35b	29.72-51.06
<i>H. longipes</i>	24	13.87b	12.58-14.99	18.72b	17.47-20.14	33.09b	29.35-39.20
	48	10.05b	6.41-12.36	13.97b	10.95-16.48	26.09b	21.27-40.58
<i>P. nigrum</i>	24	1.24c	1.00-1.46	2.19c	1.87-2.58	6.47c	5.05-9.17
	48	0.95c	0.27-1.41	1.46c	0.74-2.07	3.31c	2.30-9.51
<i>C. longa</i>	24	27.53a	20.83-33.16	46.15d	39.08-54.34	123.20d	95.41-188.19
	48	20.05a	10.09-27.62	37.30ad	26.87-48.03	121.26d	83.27-285.07

^a CL=Concentración letal. ^b IC*95%= Intervalo de Confianza 95%. ^c Diferencia estadística significativa en las CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ entre los diferentes extractos vegetales, valor obtenido a partir del solapamiento de los IC*95%, los CL que comparten la misma letra no presentan diferencia significativa.

7.3 Actividad pupicida de extractos vegetales

Se evaluó la toxicidad pupicida de los extractos de *P. americana*, *H. longipes*, *P. nigrum* y *C. longa* a concentraciones de 50 y 500 ppm. Se observó que a la concentración de 50 ppm el extracto de *P. americana* fue más efectivo para el control de pupas presentando 72 y 92% de mortalidad a las 24 y 48 h respectivamente, mientras que *P. nigrum* fue el único extracto que no presentó toxicidad contra pupas, además de que se observó el 100% de adultos emergidos a las 48 h lo cual fue superior al control negativo. Con respecto a los estados de muerte con *P. americana* se obtuvieron 6 y 16% de pupas deformes a las 24 y 48 h, mientras que con *C. longa* 14% de adultos murieron al no poder emerger correctamente del exoesqueleto de la pupa a las 48 h (Tabla 6 y Figura 15).

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad y aberraciones morfológicas en pupas de *Ae. aegypti* tratadas con extractos vegetales metanólicos a 50 ppm a las 24 h y 48 h.

Extracto	Tiempo (h)	% Estados de muerte ^a			% Mortalidad Total	% AN ^b
		PC	PD	AP		
<i>P. americana</i>	24	66b	6a	0a	72b	0a
	48	76b	16b	0a	92c	6ab
<i>H. longipes</i>	24	0a	0a	2a	2a	0a
	48	0a	6a	4a	10a	70c
<i>P. nigrum</i>	24	0a	0a	0a	0a	18b
	48	0a	0a	0a	0a	100d
<i>C. longa</i>	24	0a	0a	0a	0a	2ab
	48	0a	0a	14b	14b	62c
Control	24	0a	0a	0a	0a	0a
	48	0a	0a	0a	0a	68c

^a Estados de muerte: PC=pupa normal muerta, PD= pupa deforme, AP= adulto unido al exoesqueleto de la pupa, AN= adulto normal. ^b %AN=Porcentaje de adultos emergidos normales. Los datos están fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey (P < 0.05).

Con la concentración de 500 ppm se observó actividad pupicida con todos los extractos evaluados, siendo el mejor *P. americana* presentando 100% de mortalidad a las 24 y 48 h, seguido por *H. longipes* con 76 y 94%, mientras que el extracto menos efectivo fue *C. longa* con 10 y 70%. El extracto de *P. nigrum* fue el que presentó mayor porcentaje de pupas deformes con 30%, mientras que con *C. longa* 48% de los adultos murieron al no poder liberarse del exoesqueleto de la pupa a las 48 h (Tabla 7 y Figura 15).

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad y aberraciones morfológicas en pupas de *Ae. aegypti* tratadas con extractos vegetales metanólicos a 500 ppm a las 24 h y 48 h

Extracto	Tiempo (h)	% Estados de muerte ^a			% Mortalidad Total	% AN ^b
		PC	PD	AP		
<i>P. americana</i>	24	94c	6a	0a	100d	0a
	48	94c	6a	0a	100d	0a
<i>H. longipes</i>	24	76c	0a	0a	76d	0a
	48	88c	6a	0a	94d	0a
<i>P. nigrum</i>	24	16ab	16a	10ab	42bc	4a
	48	30b	30a	22b	82d	6 ^a
<i>C. longa</i>	24	6ab	0a	4ab	10ab	0a
	48	12ab	10a	48c	70cd	16 ^a
Control	24	0a	0a	0a	0a	0a
	48	0a	0a	0a	0a	68b

^a Estados de muerte: PC=pupa normal muerta, PD= pupa deforme, AP= adulto unido al exoesqueleto de la pupa, AN= adulto normal. ^b %AN=Porcentaje de adultos emergidos normales. Los datos están fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey (P < 0.05).

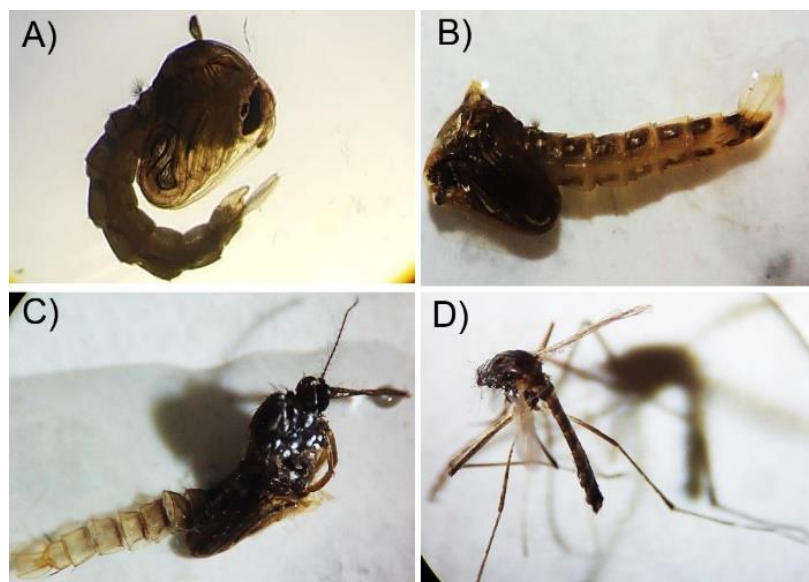


Figura 15. Pupas de *Ae. aegypti* después de 48 h de exposición con extractos vegetales. A) pupa normal. B) pupa deforme (PD). C) adulto unido al exoesqueleto de la pupa (AP). D) adulto normal (AN).

7.4 Pruebas fitoquímicas

De acuerdo con los resultados en las diferentes pruebas fitoquímicas realizadas se identificó que el extracto de *H. longipes* presentó todos los metabolitos evaluados. Para *P. americana* solo las saponinas se encontraban ausentes. El extracto de *P. nigrum* fue positivo para esteroides y/o triterpenos, cumarinas, fenoles y/o taninos, alcaloides y quinonas. Para *C. longa* se identificó la presencia de esteroides y/o triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, fenoles y/o taninos, fenoles y/o flavonoides, alcaloides y quinonas (Tabla 8).

Tabla 8. Resultado del análisis fitoquímico preliminar de extractos vegetales metanólicos.

Metabolitos secundarios	Prueba cualitativa	<i>Persea americana</i>	<i>Helopsis longipes</i>	<i>Piper Nigrum</i>	<i>Curcuma longa</i>
Esteroides y/o triterpenos	Lieberman-Burchard	+	+	+	+
Cumarinas	NaOH y HCl	+	+	+	-
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet	+	+	-	+
Saponinas	Espuma	-	+	-	-
Fenoles y/o taninos	FeCl ₃	+	+	+	+
Fenoles y/o flavonoides	Shinoda	+	+	-	+
Azúcares	Antrona	+	+	-	-
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+	+
Quinonas	H ₂ SO ₄	+	+	+	+

(+) =Presente. (-) = Ausente

7.5 Toxicidad del complejo espora-cristal de cepas de *Bti* contra larvas de *Ae. aegypti*

Se evaluó la toxicidad de las cepas Bt-UNL y Bt-QAM contra larvas de *Ae. aegypti*, siendo la cepa Bt-UNL la que presentó la mayor actividad larvicida obteniéndose concentraciones letales CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ de 0.004, 0.006 y 0.01 ppm respectivamente a las 24 h de exposición (Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones letales CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ de actividad larvicida con las cepas Bt-UNL y Bt-QAM a las 24 h.

CEPA	CL ₂₅ ^{ac}	IC* 95% ^b	CL ₅₀ ^{ac}	IC* 95% ^b	CL ₉₀ ^{ac}	IC* 95% ^b
Bt-UNL	0.004a	0.003-0.005	0.006a	0.006-0.007	0.01 ^a	0.01-0.011
Bt-QAM	0.031b	0.027-0.034	0.042b	0.040-0.045	0.064b	0.060-0.070

^a CL=Concentración letal. ^b IC* 95%= Intervalo de Confianza 95%. ^c Diferencia estadística significativa en las CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀ entre los diferentes extractos vegetales, valor obtenido a partir del sobrelapamiento de los IC*95%, los CL que comparten la misma letra no presentan diferencia significativa.

7.6 Combinación de extractos vegetales y *Bti*

Se realizaron diferentes combinaciones entre las concentraciones letales CL₂₅ y CL₅₀ de dos cepas de *Bti* y cuatro extractos vegetales dando como resultado 32 combinaciones distintas. El tratamiento con mayor porcentaje de mortalidad fue Bt-QAM y *H. longipes* en una combinación CL₅₀/CL₂₅ obteniéndose 99 y 100% de mortalidad, seguido por Bt-QAM y *C. longa* con 97 y 98% con la combinación CL₂₅/CL₅₀ a las 24 y 48 h respectivamente (Figura 16 - 19).

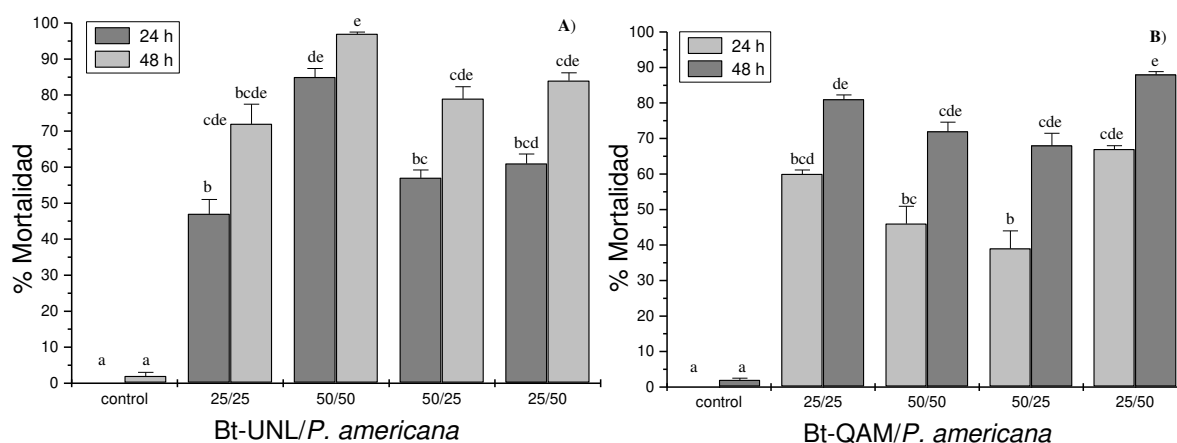


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de *P. americana* y cepas de *Bti* a las 24 y 48 h. A) Bt-UNL en combinación con *P. americana*. B) Bt-QAM en combinación con *P. americana*. Los datos están presentados como medias \pm DE, y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

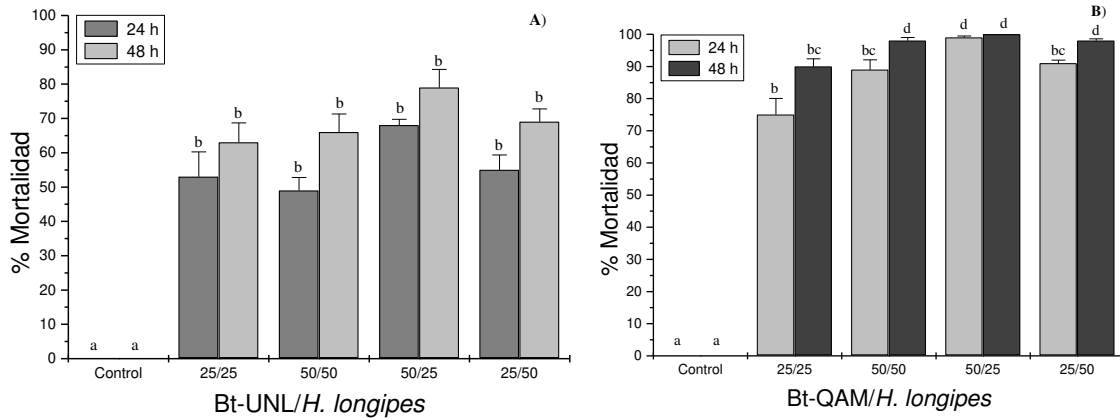


Figura 17. Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de *H. longipes* y cepas de *Bti* a las 24 y 48 h. A) Bt-UNL en combinación con *H. longipes*. B) Bt-QAM en combinación con *H. longipes*. Los datos están presentados como medias \pm DE, y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

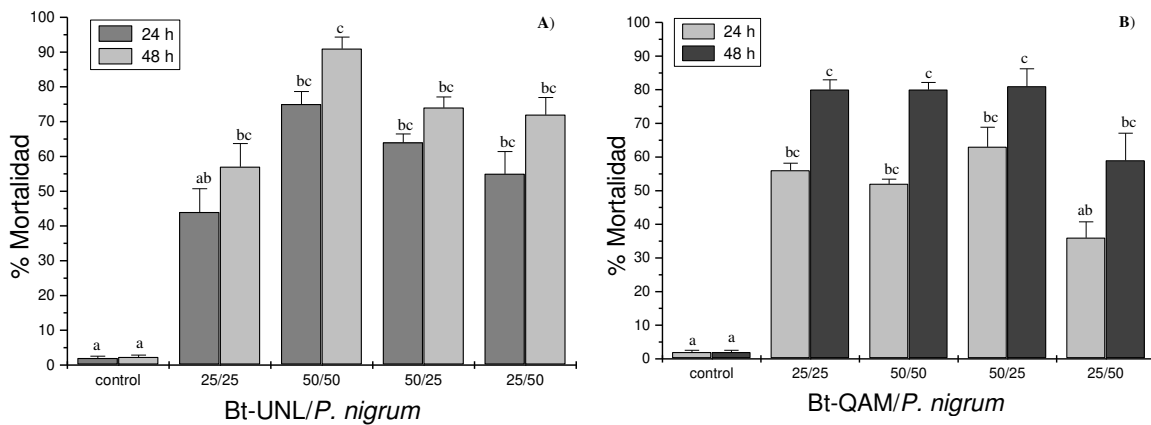


Figura 18. Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de *P. nigrum* y cepas de *Bti* a las 24 y 48 h. A) Bt-UNL en combinación con *P. nigrum*. B) Bt-QAM en combinación con *P. nigrum*. Los datos están presentados como medias \pm DE, y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

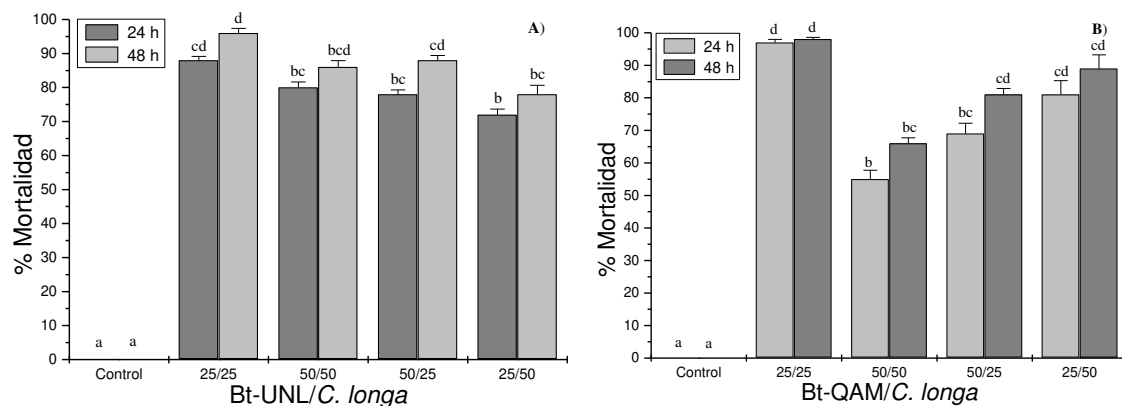


Figura 19. Porcentaje de mortalidad de larvas tratadas con diferentes combinaciones de *C. longa* y cepas de *Bti* a las 24 y 48 h. A) Bt-UNL en combinación con *C. longa*. B) Bt-QAM en combinación con *C. longa*. Los datos están presentados como medias \pm DE, y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

Se determinó el tipo de interacción y efecto sinérgico que existe entre las cepas de *Bti* y los extractos vegetales metanólicos a las 24 h. Se observó que con la cepa Bt-QAM se obtuvieron siete interacciones de potenciación y efecto sinérgico a comparación de la cepa Bt-UNL con la que solo se obtuvo en una ocasión. La combinación con la que se obtuvieron los mejores resultados fue Bt-QAM y *C. loga* en una proporción CL₂₅/CL₂₅, con la cual se observó potenciación y efecto sinérgico con valores para el C.C. de 95 y F.C. de 1.94. Con la combinación CL₅₀ Bt-QAM+ CL₅₀ *P. americana* se obtuvieron los valores más bajos para el C.C. (-54) y F. S. (0.46), mostrando un efecto antagónico (Tabla 10-13).

Tabla 10. Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de *P. americana* y cepas de *Bti* sobre larvas de *Ae. aegypti* a las 24 h de exposición.

Combinación ^a	% Mortalidad		C. C. ^b	Tipo de interacción ^c	F. S. ^d	Efecto ^e
	Esperado	Observado				
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>P. americana</i>	50	47	-6	AD	0.94	A
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>P. americana</i>	50	60	20	P	1.2	S
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>P. americana</i>	100	85	-15	AD	0.85	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>P. americana</i>	100	46	-54	A	0.46	A
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>P. americana</i>	75	57	-24	A	0.76	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>P. americana</i>	75	39	-48	A	0.52	A
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>P. americana</i>	75	61	-18.66	AD	0.81	A
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>P. americana</i>	75	67	-10.66	AD	0.89	A

^a CL=Concentración letal. ^b C.C.=factor de co-toxicidad. ^c Tipo de interacción: A=antagónico, AD=aditivo, P=potenciación. ^d F.S. = factor de sinergismo. ^e Efecto: A=antagónico, NE=no hay efecto, S=sinérgico.

Tabla 11. Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de *H. longipes* y cepas de *Bti* sobre larvas de *Ae. aegypti* a las 24 h de exposición.

Combinación ^a	% Mortalidad		C. C. ^b	Tipo de Interacción ^c	F. S. ^d	Efecto ^e
	Esperado	Observado				
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>H. longipes</i>	50	53	6	AD	1.06	S
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>H. longipes</i>	50	75	50	P	1.5	S
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>H. longipes</i>	100	49	-51	A	0.49	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>H. longipes</i>	100	89	-11	AD	0.89	A
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>H. longipes</i>	75	68	-9.3	AD	0.91	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>H. longipes</i>	75	99	32	P	1.32	S
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>H. longipes</i>	75	55	-26.7	A	0.73	A
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>H. longipes</i>	75	91	21.3	P	1.21	S

^a CL=Concentración letal. ^b C.C.=factor de co-toxicidad. ^c Tipo de interacción: A=antagónico, AD=aditivo, P=potenciación. ^d F.S. = factor de sinergismo. ^e Efecto: A=antagónico, NE=no hay efecto, S=sinérgico.

Tabla 12. Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de *P. nigrum* y cepas de *Bti* sobre larvas de *Ae. aegypti* a las 24 h de exposición.

Combinación ^a	% Mortalidad		C. C. ^b	Tipo de Interacción ^c	F. S. ^d	Efecto ^e
	Esperado	Observado				
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>P. nigrum</i>	50	44	-12	AD	0.88	A
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>P. nigrum</i>	50	56	12	AD	1.12	S
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>P. nigrum</i>	100	75	-25	A	0.75	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>P. nigrum</i>	100	52	-48	A	0.52	A
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>P. nigrum</i>	75	64	-14.66	AD	0.85	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>P. nigrum</i>	75	63	-16	AD	0.84	A
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>P. nigrum</i>	75	55	-26.66	A	0.73	A
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>P. nigrum</i>	75	36	-52	A	0.48	A

^a CL=Concentración letal. ^b C.C.=factor de co-toxicidad. ^c Tipo de interacción: A=antagónico, AD=aditivo, P=potenciación. ^d F.S. = factor de sinergismo. ^e Efecto: A=antagónico, NE=no hay efecto, S=sinérgico.

Tabla 13. Tipo de interacción y efecto sinérgico de las combinaciones entre el extracto de *C. longa* y cepas de *Bti* sobre larvas de *Ae. aegypti* a las 24 h de exposición.

Combinación ^a	% Mortalidad		C. C. ^b	Tipo de Interacción ^c	F. S. ^d	Efecto ^e
	Esperado	Observado				
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>C. longa</i>	50	88	76	P	1.6	S
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>C. longa</i>	50	97	94	P	1.94	S
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>C. longa</i>	100	80	-20	A	0.8	A
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>C. longa</i>	100	55	-45	A	0.55	A
CL ₅₀ Bt-UNL+ CL ₂₅ <i>C. longa</i>	75	78	4	AD	1.04	NE
CL ₅₀ Bt-QAM+ CL ₂₅ <i>C. longa</i>	75	69	-8	AD	0.92	A
CL ₂₅ Bt-UNL+ CL ₅₀ <i>C. longa</i>	75	72	-4	AD	0.96	NE
CL ₂₅ Bt-QAM+ CL ₅₀ <i>C. longa</i>	75	81	8	AD	1.08	S

^a CL=Concentración letal. ^b C.C.=factor de co-toxicidad. ^c Tipo de interacción: A=antagónico, AD=aditivo, P=potenciación. ^d F.S. = factor de sinergismo. ^e Efecto: A=antagónico, NE=no hay efecto, S=sinérgico.

8. DISCUSIÓN

Las plantas y los insectos han coexistido en la tierra por mucho tiempo, lo que ha permitido el desarrollo de estrategias ofensivas y defensivas por parte de las plantas para evitar el ataque de depredadores. Un ejemplo de estas estrategias es la producción de compuestos que son tóxicos para los insectos (Senthil 2015). Se han reportado más de 400 especies de plantas con actividad larvicida contra diferentes especies de mosquitos, siendo el género *Aedes* susceptible en mayor o menor medida a muchos compuestos fitoquímicos (Pavela *et al.* 2019).

De los 12 extractos vegetales que fueron evaluados 11 de ellos mostraron actividad larvicida, siendo la concentración más elevada (500 ppm) con la que se obtuvieron los mejores resultados con mortalidades de 5-100%, lo que es consistente con otros estudios en donde al aumentar la concentración de los extractos aumenta la mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* (Sanabria *et al.* 2009; Govindarajan 2009; Soonwera y Phasomkusolsil 2016). La toxicidad contra larvas fue diferente dependiendo de la especie de planta que fue evaluada, lo que concuerda con Ghosh *et al.* (2012) quien menciona que la eficacia de los extractos vegetales depende de la especie, la parte de la planta utilizada, la edad de la planta, la técnica para la extracción, el solvente utilizado, así como la especie de mosquito en la que se evalúe. Los compuestos o extractos que presentan actividad larvicida como los obtenidos en este trabajo pueden actuar por absorción a través de la cutícula o el tracto respiratorio o por ingestión a través del tracto gastrointestinal. Una vez en el interior de la larva el tóxico alcanza el sitio de acción causando un efecto sistémico por difusión en los diferentes tejidos, lo que conlleva a la muerte de la larva en minutos o en horas según la dosis que se utilice y la toxicidad del producto (Leyva *et al.* 2017).

Los extractos que fueron seleccionados a partir de los ensayos preliminares por presentar 100% de mortalidad en larvas con la concentración más baja (50 ppm) a las 48 h fueron: *P. americana*, *H. longipes*, *P. nigrum* y *C. longa*. En un estudio realizado por Agrela *et al.* (2014) se evaluó la actividad larvicida del extracto metanólico de semilla de *P. americana*, contra *Ae. aegypti* obteniéndose una CL₅₀ y CL₉₅ de 5.7 y 4.5 ppm a las 24 h, lo que contrasta con la CL₅₀ (28.57 ppm) y CL₉₀ (36.98 ppm) obtenidas en este estudio, la diferencia podría deberse al sitio de colecta de las semillas, fenómeno que fue reportado por Torres *et al.* (2014)

al observar que la CL₅₀ de extractos etanólicos de *P. americana* variaban dependiendo del origen del material vegetal. Lo que explica porque en un estudio donde el material vegetal fue obtenido del estado de Nuevo León se obtuvieron CL₅₀ y CL₉₅ de 20.39 y 41.64 ppm muy similar a lo obtenido en este trabajo (Ramos *et al.* 2007). En un estudio realizado por Hernández *et al.* (2015), el extracto etanólico de *H. longipes* presentó una CL₅₀ de 4.07 ppm en larvas de *Ae. aegypti* a las 48 h, la cual contrasta con lo encontrado en este estudio donde la CL₅₀ fue de 13.97 ppm, la diferencia podría ser atribuida al solvente utilizado. Para el extracto de *P. nigrum* la CL₅₀ a las 24 h fue de 2.19 ppm similar a la obtenido por Grzybowski *et al.* (2013) quienes reportaron una CL₅₀ de 1.84 ppm con el extracto etanólico de *P. nigrum* contra larvas de *Ae. aegypti*. El extracto de *C. longa* fue el que presentó la CL₅₀ más alta con 23.299 ppm a las 24 h de exposición, el equipo de trabajo de Abdelgaleil *et al.* (2019) reportaron una CL₅₀ (23.63 ppm) similar a la obtenida en este estudio al evaluar la actividad larvicida del extracto metanólico de *C. longa* contra *C. pipiens*.

El extracto de *P. nigrum* es el más prometedor para ser utilizado como larvicida ya que fue el único que presentó CL₅₀ menor a 10 ppm, por lo que tiene el potencial para ser implementado en nuevas formulaciones insecticidas que puedan competir con los sintéticos sin presentar las mismas desventajas (inducción de resistencia, impacto en el ambiente y efectos en la salud humana) (Pavela *et al.* 2019)

En cuanto a la actividad pupicida el extracto de *P. americana* fue el mejor al presentar toxicidad elevada a las dos concentraciones evaluadas (50 y 500 ppm). En un estudio realizado por de Carvalho (2010) se reportó una CL₅₀ de 75.2 ppm contra pupas *Ae. albopictus* al utilizar extracto etanólico de *P. americana*, mientras que en este estudio se obtuvo 72% de mortalidad con 50 ppm. En un estudio realizado por Briones y Garbo (2016) fue requerido 3546.1 ppm del extracto etanólico de *P. nigrum* para alcanzar el 50% de mortalidad en pupas de *Ae. aegypti*, mientras que en este estudio con el extracto metanólico se logró alcanzar 82% de mortalidad con 500 ppm, sin embargo, se observó que a 50 ppm el 100% de los mosquitos emergieron a las 48 h, mayor a lo observado en el control (68%), por lo que *P. nigrum* no es adecuado para el control de pupas ya que permite la proliferación de adultos que es la forma infectiva del mosquito (Baldacchino *et al.* 2015). Hernández *et al.* (2015) menciona que los extractos crudos de *H. longipes* tienen actividad insecticida contra

larvas y adultos de diferentes especies de mosquito causando toxicidad y parálisis, Hwang y Mulla (1980) reportaron que las alcanidas obtenidas de forma comercial presentan toxicidad contra pupas de *C. pipiens* y *C. quinquefasciatus* con $CL_{50} > 10$ ppm, este tipo de compuestos se encuentra en la raíz de plantas del género *Heliopsis*, aunque pueden estar presentes en otros géneros de plantas (García *et al.* 2004), en este trabajo con *H. longipes* se logró obtener 96% de mortalidad con 500 ppm a las 48 h. Con el extracto de *C. longa* se obtuvo 70% de pupas muertas con 500 ppm a las 48 h, mientras que con el aceite esencial de *C. longa* al 1% Phukerd y Soonwera (2013) reportaron 8.4 h como tiempo letal medio para pupas de *Ae. aegypti*.

Con respecto a los estados de muerte se encontró que con *P. nigrum* 30% de las pupas que murieron presentaron deformidades cuando se expusieron a 500 ppm del extracto a las 48 h, a las mismas condiciones con *C. longa* 48% de adultos murieron con las alas plegadas incapaces de liberarse del exoesqueleto de la pupa, en contraste Chantawee y Soonwera (2018) reportaron 40.7% de pupas deformes de *Ae. aegypti* con el aceite esencial de *Anethum graveolens* y 8.3% de adultos muertos que no pudieron emerger con *Alpinia galanga* a las 72 h de exposición. El efecto observado en pupas y adultos podría deberse a la presencia de metabolitos secundarios capaces de regular el crecimiento de los insectos, los cuales tienen un efecto pronunciado en el tiempo de desarrollo, emergencia de adultos, fecundidad, fertilidad y eclosión de los huevos. La emergencia de los adultos es comúnmente afectada por los compuestos fitoquímicos, siendo capaces de producir anomalías morfológicas en pupas y muerte en los adultos al ser incapaces de emerger de la pupa, lo que indica un efecto en la inhibición de la metamorfosis, probablemente debido a la alteración del control hormonal y/o interferencia en la síntesis de quitina durante el proceso de muda (Shaan *et al.* 2005; Leyva *et al.* 2017).

La actividad larvicida de la semilla de *P. americana* se ha relacionado con la presencia de compuestos como triterpenos, lactonas sesquiterpénicas y esteroides, entre los esteroides el B-sitosterol es el compuesto bioactivo más abundante en la semilla de esta planta, el cual se ha evaluado contra larvas de *Ae. aegypti* con CL_{50} de 11.5 ppm, el mecanismo de acción de este compuesto no ha sido investigado a profundidad, se cree que la actividad insecticida se debe a la inhibición de la alimentación de las larvas (Pavela *et al.* 2019; Ramos *et al.* 2007). Al

realizar el análisis fitoquímico preliminar el extracto de *P. americana* fue positivo para esteroides, triterpenos y lactonas sesquiterpénicas, por lo que la actividad larvicida podría deberse a la presencia de este tipo de compuestos. Adicionalmente *P. americana* fue positivo para taninos, flavonoides, alcaloides y quinonas los cuales también han sido relacionados con actividad insecticida, por lo que es probable que la actividad larvicida se deba a la combinación exacta de los diferentes componentes presentes en el extracto más que a ciertos compuestos en particular (Pavela *et al.* 2019).

En la raíz de *H. longipes* se ha registrado la presencia de azúcares, flavonoides y terpenos (Cilia *et al.* 2008), lo que concuerda con lo obtenido en este estudio, en donde se detectó la presencia de este tipo de compuestos. La actividad insecticida de *H. longipes* ha sido atribuida a la presencia de compuestos nitrogenados como la afinina la cual es la principal alcaloide presente en las raíces de esta especie, su efecto larvicida ha sido correlacionado con alteraciones en la actividad muscular y locomotora (Pavela *et al.* 2019; García *et al.* 2004). Con las pruebas fitoquímicas que fueron realizadas no es posible determinar la presencia de compuestos como las alcaloides, por lo que es necesario confirmar su presencia por técnicas cromatográficas. *H. longipes* fue el único extracto con presencia de saponinas, lo cual se confirma con la prueba de antrona ya que estos compuestos químicamente son glicósidos y dan positivas a las pruebas para carbohidratos (Amaya y Gutiérrez 2004). Las saponinas son conocidas por sus propiedades detergentes, los mecanismos de acción que se han descrito son la inhibición de la alimentación, regulación del crecimiento de los insectos (prolongación de los estadios y metamorfosis fallida) y toxicidad por efectos citotóxicos y hemolíticos, por lo que este tipo de compuestos podría estar contribuyendo a la actividad larvicida que fue observada (Chaieb 2010).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados involucrados en la defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos. Los alcaloides presentes en *P. nigrum* son piperina, piperlongumina, pipericida y retrofractamida A, estos compuestos han sido evaluados contra larvas de mosquitos, donde la pipericida y retrofractamida A fueron los compuestos bioactivos más potentes como larvicida mostrando CL_{50} de 0.028 y 0.039 respectivamente contra *Ae. aegypti*, la piperina el alcaloide más abundante en los extractos de pimienta presentó CL_{50} de 5.1 ppm. Las piperamidas presentan múltiples modos de acción entre ellos: neutralización

del sistema de detoxificación del insecto al interactuar con enzimas como la oxidorreductasa y monooxigenasa; o por neurotoxicidad al activar los receptores acetilcolina de tipo nicotínico, inhibidores de la alimentación y disrupción del desarrollo embrionario (Pavela *et al.* 2019). En las pruebas fitoquímicas *P. nigrum* fue positivo para alcaloides, por lo que compuestos como las piperamidas podrían estar presentes en el extracto metanólico. También se observó la presencia de esteroides, triterpenos, cumarinas, taninos y quinonas, compuestos que ya han sido reportado anteriormente para la especie (Ahmad *et al.* 2012).

Se ha reportado previamente que el rizoma de *C. longa* presenta actividad biológica contra larvas y adultos de diferentes especies de mosquitos incluyendo *Ae. aegypti* (Ali *et al.* 2015; Kemabonta *et al.* 2018), esta propiedad insecticida se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos curcuminoides como la curcumina, demethoxycurcumina y bisdemethoxycurcumina, además de terpenoides como ar-turmerona y 8-hydroxyl-arturmerona. Los curcuminoides pueden actuar como fotosensibilizadores, en presencia de luz visible y oxígeno desencadenan una serie de reacciones fotoquímicas conduciendo a la destrucción selectiva de varios objetivos biológicos como membranas, pared celular, mitocondrias, proteínas y ácidos nucleicos, lo que genera mortalidad en larvas de mosquito (De Souza *et al.* 2019). El extracto metanólico de *C. longa* presentó compuestos fenólicos y terpenos, lo que podría explicar la actividad larvicida. Se detectó la presencia de lactonas sesquiterpénicas, alcaloides y quinonas, lo que concuerda con lo reportado en otros estudios (Freire y Vistel 2015).

Como agente de control biológico *Bti* ha demostrado alta eficiencia en contra de organismos blanco, principalmente las larvas de mosquito de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*. Su actividad larvicida se debe a la presencia de las toxinas Cry4, Cry11, Cry10, Cyt1 y Cyt2 las cuales se unen a receptores en el intestino de las larvas, generando poros en la membrana lo que provoca la lisis osmótica de las células, ocasionando la muerte del insecto en pocos días después de la ingestión de las toxinas (Ben 2014). Al evaluar la actividad larvicida del complejo espóra-cristal de las cepas de *Bti* Bt-QAM y Bt-UNL se observó que las concentraciones letales (CL₂₅, CL₅₀ y CL₉₀) eran diferentes, siendo Bt-UNL la cepa con mayor toxicidad con CL₅₀ de 0.006 ppm, en contraste Kovendan *et al.* (2011) reporta menor toxicidad con valores CL₅₀ de 10.2127 y 10.6229 ppm para larvas de los instar III y IV

respectivamente. La diferencia entre la toxicidad de diferentes cepas de *Bt*, está relacionado con la diversidad genética de la especie, la cual difiere según la región geográfica de donde las cepas son aisladas, adicionalmente la producción de proteínas Cry dependen tanto del medio de cultivo como de la cepa, las diferentes fuentes de nutrientes pueden afectar la velocidad de síntesis de las δ -endotoxinas y el tamaño de los cristales lo que a su vez impactará en la toxicidad del complejo espora-cristal (Huerta 2013).

El control de mosquitos a través de insecticidas químicos no solo favorece la resistencia, sino que además genera impacto negativo en el ambiente. Por lo que enfoques sinérgicos tales como la aplicación de mezclas botánicas y pesticidas microbianos proporcionarán un mejor efecto en la reducción de la población de vectores transmisores de enfermedades y la magnitud de la epidemiología (Ghosh *et al.* 2012). En este estudio se combinaron los extractos de *P. americana*, *H. longipes*, *P. nigrum* y *C. longa* con dos cepas de *Bti*. Se observó que de las 32 combinaciones evaluadas solo 9 de ellas presentaron efecto sinérgico, donde 7 correspondían a combinaciones con la cepa Bt-QAM, las cepas de *Bt* evaluadas no tienen la misma capacidad para establecer sinergismo con los extractos vegetales, lo que concuerda con lo reportado por Buentello (2016) en donde se evaluó la interacción de aceites esenciales con cuatro cepas diferentes de *Bt* y solo la cepa HD567 presentó interacción de sinergismo contra de adultos de *Anastrepha ludens*. La combinación con la que se obtuvieron los mejores resultados fue CL₂₅ Bt-QAM+ CL₂₅ *C. longa* presentando efecto sinérgico con un valor de 94 para el factor de co-toxicidad (C.C.), en un estudio realizado por Mansour *et al.* (2012) se encontraron datos muy parecidos, en donde la combinación CL₂₅ *C. longa* (aceite esencial) + CL₂₅ *Bti* presentó interacción de potenciación con C.C. de 70.6 al ser evaluado en larvas de *C. pipiens*. Se sabe que las endotoxinas de *Bti* causan inanición y muerte, por lo que la exposición de los insectos con ambos estresores al mismo tiempo podría conducir a efectos más dañinos, que explicarían el efecto sinérgico que fue observado. Los peores resultados se obtuvieron con *P. nigrum*, ya que la interacción con *Bti* fue antagónica en siete combinaciones de un total de ocho, en contraste Mansour *et al.* (2012) reportaron potenciación al combinar la CL₂₅ del aceite esencial de *P. nigrum* y *Bti* con C.C. de 82.8, esta diferencia podría ser debido a la cepa utilizada, la especie de mosquito evaluada o al tipo de compuestos presentes en el aceite esencial.

9. CONCLUSIONES

- De los 12 extractos vegetales que fueron evaluados los que presentaron mayor actividad larvica fueron los extractos metanólicos de *P. americana*, *C. longa*, *P. nigrum* y *H. longipes*.
- El extracto de *P. nigrum* tiene mayor potencial para ser utilizado como larvica ya que presentó mayor toxicidad con valores CL_{50} de 2.19 ppm a las 24 h.
- Para el control de pupas el mejor extracto fue *P. americana*, con el cual se logró obtener el 100% de mortalidad.
- La actividad insecticida de *P. americana* podría deberse a la presencia de triterpenos, esteroides y lactonas sesquiterpénicas; compuestos nitrogenados para *H. longipes*; alcaloides para *P. nigrum* y compuestos fenólicos para *C. longa*.
- De las dos cepas de *Bti* que fueron evaluadas la más tóxica fue Bt-UNL con una CL_{50} de 0.006 ppm.
- Al combinar los extractos vegetales con cepas de *Bti*, se logró potenciar la actividad larvica, siendo la mejor combinación CL_{25} Bt-QAM+ CL_{25} *C. longa* presentando efecto sinérgico con una F.S. de 1.94.

10. PERSPECTIVAS

Determinar las concentraciones letales del extracto de *P. americana* para el control de pupas ya que presenta mayor potencial para ser utilizado como pupicida.

Encontrar la combinación de extractos vegetales y cepas de *Bti* que logren potenciar la actividad pupicida.

Determinar si existe sinergismo entre los extractos vegetales para el control de larvas y pupas.

Purificar e identificar los compuestos bioactivos responsables de la actividad larvicida y pupicida presentes en los extractos vegetales.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol 18: 265-267.
- Abdelgaleil SAM, Zoghroban AAM, El-Bakry AM, Kassem SMI. 2019. Insecticidal and antifungal activities of crude extracts and pure compounds from rhizomes of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). Journal of Agricultural Science and Technology 21(4): 1049-1061.
- Agrela IF, Hidalgo Y, Herrera F. 2014. Efecto larvicida de extractos metanólicos obtenidos de semillas y hojas de *Persea americana* (Laurales: Lauraceae) (aguacate) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Boletín de Malariología y Salud Ambiental 54(2): 199-207.
- Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Farooq S, Ali M, Khan MA. 2012. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2(3): 1945–1953.
- Ali A, Wang YH, Khan IA. 2015. Larvicidal and biting deterrent activity of essential oils of *Curcuma longa*, ar-turmerone, and curcuminoids Against *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* (Culicidae: Diptera). Journal of Medical Entomology 52(5): 979–986.
- Amaya ECA, Gutiérrez PNE. 2004. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico del fruto de *Sapindus saponaria* (Pacún), Universidad de El Salvador, San Salvador.
- Aneja KR, Khan SA, Aneja A. 2016. Biopesticides an eco-friendly pestmanagement approach in agriculture: status and prospects. Kavaka 47: 145-154.
- Baldacchino F, Caputo B, Chandre F, Drago A, de la Torre A, Montarsi F, Rizzoli A. 2015. Control methods against invasive *Aedes* mosquitoes in Europe: a review. Pest Management Science 71(11): 1471–1485.
- Ben DE. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins 6(4): 1222-1243.
- Benelli G, Jeffries CL, Walker T. 2016. Biological control of mosquito vectors: past, present, and future. Insects 7(4): 52.

- Bobadilla UMC. 2001. Estado de la susceptibilidad de poblaciones larvarias de *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) a insecticidas de uso común y alternativos en el estado de Veracruz. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.
- Boyce R, Lenhart A, Kroeger A, Velayudhan R, Roberts B, Horstick O. 2013. *Bacillus thuringiensis israelensis (Bti)* for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Tropical Medicine & International Health* 18(5): 564-577.
- Brady OJ, Hay SI. 2019. The global expansion of dengue: how *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annual Review of Entomology* 65(1): 1945-1953.
- Bravo A, Gill SS, Soberon M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49(4): 423-435.
- Briones AV, Garbo AG. 2016. Bioactivity of the aqueous and ethanolic extracts/pellet form of Philippine *Piper nigrum* L. on the duration of egg, larval and pupal development stages of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4(6): 196-202.
- Buentello WS. 2016. Evaluación del efecto tóxico del conjunto cristal parasporal-aceite esencial en la “mosca mexicana de la fruta”, *Anastrepha ludens* L. (Diptera: tephritidae). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León.
- Carrada BT, Vásquez VL, López GI. 1984. Ecología del dengue y el *Aedes aegypti*: investigación preliminar. *Salud pública Méx* 26(1): 63-76.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2019. Dengue. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dengue/>.
- Chaieb I. 2010. Saponins as insecticides: a review. *Tunisian Journal of Plant Protection* 5(1): 39-50.
- Chang KS, Shin EH, Yoo DH, Ahn YJ. 2014. Enhanced toxicity of binary mixtures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and three essential oil major constituents to wild *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology* 51(4): 804-810.

- Chantawee A, Soonwera M. 2018. Efficacies of four plant essential oils as larvicide, pupicide and oviposition deterrent agents against dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* Linn. (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 8(4): 217.
- Ciccia G, Coussio J, Mongelli E. 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology* 72(1-2): 185–189.
- Cilia LVG, Aguirre RJR, Reyes AJA, Juárez FBI. 2008. Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (83): 81-87.
- Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. 2018. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [Online]. Disponible en: <http://www.btnomenclature.info/>
- Damalas CA, Koutroubas SD. 2018. Current status and Recent Developments in Biopesticide Use. *Agriculture* 8(1): 1-6.
- de Carvalho GHF. 2010. Toxicological effects of ethanolic extract of seed and bark of *Persea americana* (Lauraceae), on larvae and pupae of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera, Culicidae). *Vita et Sanitas* 4(1): 21-33.
- De Maagd R. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17(4): 193–199.
- De Souza LM, Inada NM, Venturini FP, Carmona VCC, Pratavieira S, de Oliveira KT, Bagnato VS. 2019. Photolarvicidal effect of curcuminoids from *Curcuma longa* Linn. against *Aedes aegypti* larvae. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22(1): 151-158.
- Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 15-20.
- Fernández CJR, Juncosa R. 2002. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro?. *Phytoma* 141: 14-19.
- Fernández SI. 2019. Artrópodos vectores: tránsito de patógenos endémicos y emergentes y sus tendencias epidemiológicas en el México del siglo XXI. *Revista biomédica* 30(2): 31-32.

- Foster WA, Walker ED. 2019. Mosquitoes (Culicidae). *Medical and Veterinary Entomology* 261–325.
- Freire GRA, Vistel VM. 2015. Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L. *Revista Cubana de Química* 27(1): 9-18.
- Gad AA, Al-Dakhil AA. 2018. Efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) and four plant extracts on the mortality and development of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28(1): 62.
- Galán WLJ. 2017. Microbiología y biotecnología avanzada. Ediciones del Instituto de Biotecnología: Monterrey, Nuevo León, pp. 227-231.
- García CA, Chávez ER, Molina TJ. 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana* 69: 115-131.
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research* 135(5): 581–598.
- Goeldi EA. 1905. Os mosquitos no Pará. Reunião de quatro trabalhos sobre os mosquitos indigenas, principalmente as especies que molestan o homem. *Memorias do Museu Goeldi (Museu Paraense) de Historia Natural e Ethnographie, Brasil* 1–154.
- Gómez GGF. 2018. *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 70(1): 55-70.
- Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswari M, Yogalakshmi K. 2012. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. *Parasitology research* 110(5): 2023-2032.
- Govindarajan M. 2009. Bioefficacy of *Cassia fistula* Linn. (Leguminosae) leaf extract against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 13(2): 99-103.
- Grzybowski A, Tiboni M, Silva MA, Chitolina RF, Passos M, Fontana JD. 2013. Synergistic larvicidal effect and morphological alterations induced by ethanolic extracts of *Annona*

muricata and *Piper nigrum* against the dengue fever vector *Aedes aegypti*. Pest management science 69(5): 589-601.

Harve G, Kamath V. 2004. Larvicidal activity of plant extracts used alone and in combination with known synthetic larvicidal agents against *Aedes aegypti*. Indian journal of experimental biology 42(12): 1216.

Hernández MA, Arvizu GJL, Carranza AC, Gómez LBE, Alvarado SB, Ramírez CE, Molina, TJ. 2015. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. Journal of Asia-Pacific Entomology 18(2): 227-231.

Houé V, Bonizzoni M, Failloux AB. 2019. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. Emerging microbes & infections 8(1): 542-555.

Huerta CDV. 2013. Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas, para vectores transmisores de enfermedades metaxénicas (dengue). Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Ciencias Biológicas, Lima, Perú.

Hwang YS, Mulla MS. 1980. Insecticidal activity of alkanamides against immature mosquitoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28(6): 1118–1122.

Ibáñez S, Gómez H. 1995. Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. Salud Pública de México 37: 53-63.

Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. Bioengineered bugs 1(1): 31-50.

Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. Applied microbiology and biotechnology, 101(7): 2691-2711.

Kemabonta KA, Adediran OI, Ajelara KO. 2018. The insecticidal efficacy of the extracts of *Piper nigrum* (Black Pepper) and *Curcuma longa* (Turmeric) in the Control of *Anopheles gambiae* Giles (Dip., Culicidae). Jordan Journal of Biological Sciences 11(2): 195-200.

- Kovendan K, Murugan K, Vincent S, Kamalakannan S. 2011. Larvicidal efficacy of *Jatropha curcas* and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against lymphatic filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 109(5): 1251–1257.
- Kumar S, Singh A. 2015. Biopesticides: present status and the future prospects. *J Fertil Pestic* 6(2): 129.
- Land M, Miljand M. 2014. Biological control of mosquitoes using *Bacillus thuringiensis israelensis*: a pilot study of effects on target organisms, non-target organisms and humans. Mistra EviEM, Stockholm, Sweden.
- Lecadet MM, Frachon E, Dumanoir VC, Ripoueteau H, Hamon S, Laurent P, Thiery I. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 86(4): 660–672.
- Leyva M, French L, Pino O, Montada D, Morejón G, Marquetti MDC. 2017. Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Américas. *Revista biomédica* 28(3): 137-178.
- López LMA, Neira M. 2016. Influencia del cambio climático en la biología de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito transmisor de arbovirosis humanas. *Revista Ecuatoriana de Medicina Y Ciencias Biológicas*, 37(2), 11-21.
- Mackay AJ, Amador M, Barrera R. 2013. An improved autocidal gravid ovitrap for the control and surveillance of *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors* 6(1): 225.
- Mahesh KP, Murugan K, Kovendan K, Subramaniam J, Amerasan D. 2012. Mosquito larvicidal and pupicidal efficacy of *Solanum xanthocarpum* (Family: Solanaceae) leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology research* 110(6): 2541-2550.
- Mansour SA, Foda MS, Aly AR. 2012. Mosquitocidal activity of two *Bacillus* bacterial endotoxins combined with plant oils and conventional insecticides. *Industrial Crops and Products* 35(1): 44-52.
- Melo ALDA, Soccol VT, Soccol CR. 2016. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical reviews in biotechnology* 36(2): 317-326.

Méndez VA. 2017. Science within food: up-to-date advances on research and educational ideas. Formatex Research Center: España, pp. 132-143.

Mora GLN, Pérez DAL. 2016. Determinación de la actividad larvica de aceites esenciales, pertenecientes a ocho familias de especies botánicas, frente al *Aedes aegypti*. Universidad Santo Tomás, Bucaramanga, Colombia.

Muktar Y, Tamerat N, Shewafera A. 2016. *Aedes aegypti* as a vector of flavivirus. Journal of Tropical Diseases 4(5): 1-7.

Muñoz JAV, Staschenko E, Ocampo CBD. 2014. Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Revista Colombiana de Entomología 40(2): 198.

Munstermann LE. 1997. Care and maintenance of *Aedes* mosquito colonies. En el libro In The molecular biology of insect disease vectors. Springer: Dordrecht, pp. 13-20.

Murugan K, Thangamathi P, Jeyabalan D. 2002. Interactive effect of botanicals and *Bacillus thuringiensis* subsp *Israelensis* on *Culex quinquefasciatus* Say. Journal of Scientific & Industrial Research 61:1068–1076.

Narkhede CP, Patil CD, Suryawanshi RK, Koli SH, Mohite BV, Patil SV. 2017. Synergistic effect of certain insecticides combined with *Bacillus thuringiensis* on mosquito larvae. Journal of Entomological and Acarological Research 49(1): 22-27.

Nathan SS, Kalavani K, Murugan K. 2006. Behavioural responses and changes in biology of rice leaffolder following treatment with a combination of bacterial toxins and botanical insecticides. Chemosphere 64(10): 1650-1658.

Nava PE, García GC, Camacho BJR, Vázquez MEL. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Ra Ximhai 8(3): 17-29.

Nelson MJ. 1986. *Aedes aegypti*: biología y ecología. Organización Panamericana de la Salud: Washington, pp. 8-11.

Ochoa G, Arrivillaga J. 2009. *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. Boletín de malariología y salud ambiental, 49(2): 181-191.

Ondarza BMA. 2017. Biopesticidas: tipos y aplicaciones en el control de plagas agrícolas. *Agroproductividad* 10(3): 31-36.

Ordoñez SR, Albores MÁG, Loza CAM, Delgado CD, Solís RM, Torres IM. 2019. Análisis de cambio en las condiciones climáticas y su relación con casos de dengue en la parte centro de México. *Digital Ciencia Uaqro* 12(1): 96-105.

Organización Mundial de la Salud. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Geneva, pp. 1-41.

Organización Mundial de la Salud. 2017. Respuesta mundial para el control de vectores 2017–2030. [Online]. Disponible en: http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GV-CR-2017-2030-esp.pdf.

Organización Mundial de la Salud. 2019. ¿Puede el control de los mosquitos detener la transmisión del virus de Zika?. [Online]. Disponible en: <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/articles/mosquito-control/es/>.

Organización Panamericana de la Salud. 2019. Actualización Epidemiológica Dengue. [Online]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=dengue-2158&alias=47785-22-de-febrero-de-2019-dengue-actualizacion-epidemiologica-1&Itemid=270&lang=en.

Osman GEH, Already R, Assaeedi ASA, Organji SR, El-Ghareeb D, Abulreesh HH, Althubiani AS. 2015. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 25(1): 271.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6(12): 3296-3325.

Panneerselvam C, Murugan K, Kovendan K, Kumar PM, Ponarulselvam S, Amerasan D, Hwang JS. 2013. Larvicidal efficacy of *Catharanthus roseus* Linn. (Family: Apocynaceae) leaf extract and bacterial insecticide *Bacillus thuringiensis* against *Anopheles stephensi* Liston. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 6(11): 847-853.

- Parra HGJ, García PC, Cotes TJM. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Medicina* 21(1):47-54.
- Pavela R, Maggi F, Iannarelli R, Benelli G. 2019. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta tropica* 193: 236-271
- Pérez M. 2017. Evaluación del temefos y pyriproxifeno para el control de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. *Horizonte Médico* 17(4): 24-29.
- Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, García I. 2004. Manual de indicaciones técnicas para insectarios. Editorial Ciencias Médicas: La Habana, Cuba, pp. 43-50.
- Phukerd U, Soonwera M. 2013. Larvicidal and pupicidal activities of essential oils from Zingiberaceae plants against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* Say mosquitoes. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44(5): 761-771.
- Ponce G, Flores A E, Badii MH, Fernández I, González T, Rodríguez ML, Chiu JA. 2003. Evaluación de *Bacillus thuringiensis israelensis* (vectobac 12 asâ) sobre la población larval de *Aedes aegypti* en el área metropolitana de Monterrey NL México. *Revista salud pública y nutrición* 4(3).
- Poopathi S. 2012. Current Trends in the Control of Mosquito Vectors by Means of Biological Larvicides. *J Biofertil Biopestici* 3:125.
- Portela DDD, Chaparro GA, López PSA. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova* 11(20): 87-96.
- Prasanna KK, Murugan K, Kovendan K, Naresh KA, Hwang JS, Barnard DR. 2012. Combined effect of seaweed (*Sargassum wightii*) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the coastal mosquito, *Anopheles sunaicus*, in Tamil Nadu, India. *Science Asia* 38 (2012): 141–146.
- Ramírez LM, Ramírez SM. 2012. In Insecticides-Pest Engineering. InTech: China, pp. 239-256.

- Ramos F, Oranday A, Rodríguez ML, Verdes MJ, Flores A, Ponce G. 2007. Efecto larvicida del extracto de hueso de *Persea americana* var. Hass en *Aedes aegypti* (L.). Ciencia UANL 10: 25-28.
- Raymond B, Johnston PR, Nielsen LC, Lereclus D, Crickmore N. 2010. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. Trends in microbiology 18(5): 189-194.
- Realpe M, Montoya D, Orduz S. 1998. *Bacillus thuringiensis*: legado para el siglo XXI. Revista Colombiana de Biotecnología 1(1): 11-27.
- Rizwan-ul-Haq M, Hu QB, Hu M Y, Lin QS, Zhang WL. 2009. Biological impact of harmaline, ricinine and their combined effects with *Bacillus thuringiensis* on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Pest Science 82(4): 327.
- Rodríguez CR. 2002. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. Revista Cubana de Medicina Tropical 54(3): 189-201.
- Rodríguez DJ. 2009. Las enfermedades transmitidas por vector en México. Revista de la Facultad de Medicina 45(003).
- Ruiz GR, Rodríguez PMA, Norzagaray CM. 2015. Toxicity of Mexican native plant extracts against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(4): 287-291.
- Sakthivadivel M, Daniel T. 2008. Evaluation of certain insecticidal plants for the control of vector mosquitoes viz. *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Applied Entomology and Zoology 43(1): 57-63.
- Sanabria L, Segovia E, González N, Alcaraz P, de Bilbao NV. 2009. Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud 7(2).
- Sansinenea E. 2012. *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Springer, Dordrecht: New York, pp. 85.

- Sauka DH, Benintende GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología* 40(2): 124-140.
- Schmunis GA, Días JCP. 2000. La reforma del sector salud, descentralización, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. *Cuadernos de Salud Pública* 16: 117-123.
- Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual review of entomology* 35(1): 271-297.
- Senthil NS. 2015. A review of bio pesticides and their mode of action against insect pests. In: *Environmental Sustainability-Role of Green Technologies*. Springer: Verlag, pp. 49–63.
- Shaan EAS, Canyon D, Younes MWF, Abdel WH, Mansour AH. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment international* 31(8): 1149-1166.
- Soberón M, Bravo A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología* 14: 303-314.
- Soonwera M, Phasomkusolsil S. 2016. Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae. *Parasitology research* 115(4): 1691-1703.
- Subramaniam J, Murugan K, Kovendan K. 2012. Larvicidal and pupicidal efficacy of *Momordica charantia* leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis* against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). *Journal of Biopesticides* 5: 163-169.
- Torres RC, Garbo AG, Walde RZML. 2014. Larvicidal activity of *Persea americana* Mill. against *Aedes aegypti*. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 7(1): 167-170.
- Vázquez LA, Pérez FL, Díaz SR. 2007. Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria biomolecules with insecticidal activity: an alternative to improve the food safety. *Cyta-Journal of Food* 5(4): 306-313.

Wei S, Chelliah R, Park BJ, Kim SH, Forghani F, Cho MS, Oh DH. 2019. Differentiation of *Bacillus thuringiensis* from *Bacillus cereus* group using unique marker based on real-time PCR. *Frontiers in microbiology* 10: 883.

Zahran HEDM, Kawanna MA, Bosly HA. 2013. Larvicidal activity and joint action toxicity of certain combating agents on *Culex pipiens* L. mosquitoes. *Annual Research & Review in Biology* 3(4): 1055-1065.

Zhang Q, Hua G, Adang MJ. 2017. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect science* 24(5): 714-729.

12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Biol. Jesica María Ramírez Villalobos

Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: EFECTO SINÉRGICO DE DISTINTOS EXTRACTOS VEGETALES Y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA, CULICIDAE).

Campo de estudio: Biotecnología ambiental.

Datos personales: Nacida en Guadalajara, Jalisco el 09 de enero de 1991, hija de Francisco Ramírez Maldonado y Otilia Villalobos Sandoval.

Educación: Egresada del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, grado obtenido de Licenciado en Biología en 2015.

Experiencia profesional:

- Estancia de investigación en el Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Bacteriología experimental.
- Estancia de investigación en Cinvestav-Unidad Mérida, Laboratorio de Patología Acuática.
- Auxiliar de laboratorio en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Laboratorio de Fitopatología.
- Analista de microbiología, Laboratorios PISA S.A. de C. V.

13. ANEXOS

Anexo 1

Presentación de cartel: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA DEL CITRICIDAL® CONTRA LARVAS DEL MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE). XLI Congreso Nacional de Control Biológico y XXIX Curso Nacional de Control Biológico. Noviembre, 2018. Puerto Vallarta, Jalisco, México.



LA SOCIEDAD MEXICANA DE CONTROL BIOLÓGICO A.C.

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

**Ramírez Villalobos Jesica María, Fernández Chapa David Daniel, Rangel Heredia Eliana
Jemima, Rojas Verde María Guadalupe, Arévalo Niño Katiushka, Galán Wong Luis
Jesús**

Por su participación como:

PONENTE

con el trabajo titulado:

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA DEL CITRICIDAL®
CONTRA LARVAS DEL MOSQUITO *Aedes aegypti* (DIPTERA, CULICIDAE)**

en modalidad Cartel realizado el 8 y 9 de noviembre de 2018 dentro del marco del XLI Congreso Nacional de Control Biológico y XXIX Curso Nacional de Control Biológico

Puerto Vallarta Jalisco, México.


Dr. Fernando Tamayo Mejía
Presidente de la SMCB

Logos de patrocinadores: SENASICA, SAGARPA, CP, JALISCO, inifap, Universidad Guanajuato.

Anexo 2

Presentación de cartel: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE EXTRACTOS ALMACENADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* DESPUÉS DE MÁS DE TRES DÉCADAS DE ALMACENAMIENTO EN CONTRA DE *Trichoplusia ni* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). XLI Congreso Nacional de Control Biológico y XXIX Curso Nacional de Control Biológico. Noviembre, 2018. Puerto Vallarta, Jalisco, México.



LA SOCIEDAD MEXICANA DE CONTROL BIOLÓGICO A.C.

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Fernández Chapa David, Rangel Heredia Eliana Jemima, Ramírez Villalobos Jessica María, Dra. Arévalo Niño Katiushka, Dr. Galán Wong Luis Jesús

Por su participación como:

PONENTE

con el trabajo titulado:

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD TOXICA DE EXTRACTOS ALMACENADOS DE *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* DESPUÉS DE MAS DE TRES DÉCADAS DE ALMACENAMIENTO EN CONTRA DE *Trichoplusia ni* (LEPIDOPTETIRA: NOCTUIDAE)

en modalidad **Cartel** realizado el 8 y 9 de noviembre de 2018 dentro del marco del XLI Congreso Nacional de Control Biológico y XXIX Curso Nacional de Control Biológico

Puerto Vallarta Jalisco, México.


Dr. Fernando Tamayo Mejía
Presidente de la SMCB

Anexo 3

Presentación de cartel: ACTIVIDAD LARVICIDA DE CITRICIDAL® SOLO Y COMBINADO CON *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* EN CONTRA DE *Aedes aegypti*. VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. Abril, 2019. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

 **UANL**
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Facultad de Ciencias Químicas
Subdirección Académica de Químico Farmacéutico Biólogo



OTORGAN EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

A

Jesica María Ramírez Villalobos, María Guadalupe Rojas Verde,
Luis Jesús Galán Wong.

POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN COMO PONENTES DEL CARTEL:
“Actividad larvicida del Citricidal® solo y combinado con *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* en contra de *Aedes aegypti*”

IMPARTIDA DENTRO DEL
“VI Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina
y IV Simposio Nacional de Microbiología Aplicada”

LLEVADO A CABO EN LA BIBLIOTECA “RAÚL RANGEL FRÍAS”, U.A.N.L.
EL 4 Y 5 DE ABRIL DE 2019

Alere Flammam Veritatis
4 DE ABRIL DE 2019


Dr. Isaías Banderas Rentería
SUBDIRECTOR ACADÉMICO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO


Dr. Eduardo Soto Regalado
DIRECTOR


#SOMOS UNL

Anexo 4

Presentación de cartel: ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Aedes aegypti*. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio, 2019. León, Guanajuato, México.

The certificate features a background with a network of nodes and lines. At the top left is a stylized lion head logo. To its right is the text 'XVIII Congreso Nacional DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA'. Further right is the logo of the 'Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería' and the text 'León, Guanajuato 23 al 28 de junio 2019'. The main title 'CONSTANCIA' is centered in large blue letters. Below it, the names of the participants are listed: 'Jesica María Ramírez Villalobos, María Guadalupe Rojas Verde, Luis Jesús Galán Wong'. The text 'Otorga la presente' is above the title, and 'A:' is below it. The reason for participation is stated: 'Por su participación con la contribución en cartel: ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA AEDES AEGYPTI. En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.' At the bottom, there are three signatures and their corresponding titles: 'Dr. Adelfo Escalante Lozada, Presidente de la SMIBS', 'Dr. Jaime Ortega López, Presidente del Comité Organizador', and 'Dra. Sylvie LeBorgne, Presidenta del Comité Científico'. Logos for 'León', 'mex león', 'GTC', and 'leon-mexico.com' are at the bottom left.

XVIII Congreso Nacional
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

León, Guanajuato
23 al 28 de junio
2019

Otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Jesica María Ramírez Villalobos, María Guadalupe Rojas Verde, Luis Jesús Galán Wong

Por su participación con la contribución en cartel:
ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA AEDES AEGYPTI.

En el XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
23 al 28 de junio de 2019 en León, Guanajuato, México.

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente de la SMIBS

Dr. Jaime Ortega López
Dr. Jaime Ortega López
Presidente del Comité Organizador

Dra. Sylvie LeBorgne
Dra. Sylvie LeBorgne
Presidenta del Comité Científico

León mex león GTC leon-mexico.com

Anexo 5

Presentación de cartel: ACTIVIDAD PUPICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES METANÓLICOS CONTRA *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). XLII Congreso Nacional de Control Biológico y XXX Curso Nacional de Control Biológico. Noviembre, 2019. Boca del Río, Veracruz, México.



La Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C.

Otorga la siguiente

Constancia

a:

Eliana Jemima Rangel Heredia, Jesica María Ramírez Villalobos, María Guadalupe Rojas Verde, Carlos Eduardo Hernández Luna, Krista Cassandra Villegas Torres, Zhalia Gabriela Del Ángel Cruz, Isela Miroslava Mendoza García y Luis Jesús Galán Wong

Por su participación como **PONENTE** en modalidad **Cartel** con el trabajo titulado:

ACTIVIDAD PUPICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES METANÓLICOS CONTRA *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)

realizado el 7 y 8 de noviembre de 2019 dentro del marco del **XLII Congreso Nacional de Control Biológico y XXX Curso Nacional de Control Biológico**, Boca del Río, Veracruz, México.


Dr. Fernando Ramírez Mejía.
Presidente de la Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C.


Dr. Francisco Hernández Rosas.
Presidente del Comité Organizador Local

Anexo 6

Presentación de ponencia oral: ACTIVIDAD LARVICIDA DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EN COMBINACIÓN CON EXTRACTOS VEGETALES METANÓLICOS CONTRA *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). XLII Congreso Nacional de Control Biológico y XXX Curso Nacional de Control Biológico. Noviembre, 2019. Boca del Río, Veracruz, México.



La Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C.
Otorga la siguiente

Constancia

al:

Jesica María Ramírez Villalobos, María Guadalupe Rojas Verde, Carlos Eduardo Hernández Luna, Krista Cassandra Villegas Torres, Zhalia Gabriela Del Ángel Cruz, Isela Miroslava Mendoza García y Luis Jesús Galán Wong

Por su participación como **PONENTE** en modalidad **Oral** con el trabajo titulado:

ACTIVIDAD LARVICIDA DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EN COMBINACIÓN CON EXTRACTOS VEGETALES METANÓLICOS CONTRA *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE)

realizado el 7 y 8 de noviembre de 2019 dentro del marco del **XLII Congreso Nacional de Control Biológico y XXX Curso Nacional de Control Biológico** Boca del Río, Veracruz, México.


Dr. Fernando Tamayo Mejía.
Presidente de la Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C.


Dr. Francisco Hernández Rosas.
Presidente del Comité Organizador Local