

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



“EFECTIVIDAD DE UN BIO-INSECTICIDA FÚNGICO CON ADICIÓN DE  
ATRAYENTES, APLICADO EN TRAMPAS PARA EL CONTROL DE  
*Aedes aegypti* (L.)”

Por:

Q.B.C. Maribel Domínguez Gámez

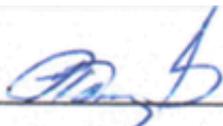
Como requisito para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología.

Diciembre del 2020.

## **LUGAR DE TRABAJO**

El desarrollo experimental del presente trabajo se elaboró en la unidad de Formulación de Biológicos de Laboratorio de Inmunología y Virología, del departamento de Microbiología e Inmunología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Patricia Tamez Guerra.

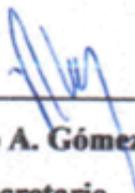
## COMITÉ DE TESIS



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**

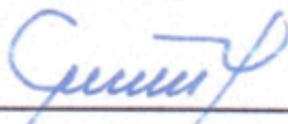
**Presidente**



---

**Dr. Ricardo A. Gómez Flores**

**Secretario**



---

**Dra. Guadalupe González Ochoa**

**Vocal 1**



---

**Dr. José Alberto Valadez Lira**

**Vocal 2**



---

**Dra. María Julissa Ek Ramos**

**Vocal 3**



---

**Dra. Norma Zamora Avilés**

**Director externo**

**EFFECTIVIDAD DE UN BIO-INSECTICIDA FÚNGICO CON ADICIÓN DE  
ATRAYENTES, APLICADO EN TRAMPAS PARA EL CONTROL DE *Aedes*  
*aegypti* (L.).**

**Dirección de Tesis**



---

**Dra. Patricia Tamez Guerra**

Director



---

**Dra. Norma Zamora Avilés**

Director externo

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras, **Dra. Patricia Tamez Guerra** y la **Dra. Norma Zamora Avilés**, por su apoyo constante, sus enseñanzas y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, la confianza brindada hacia mi persona y proporcionarme espacio para la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis por su colaboración, apoyo y consejo que me brindaron a lo largo de este proyecto, al **Dr. Ricardo Gómez Flores**, **Dra. Julissa Ek-Ramos** y al **Dr. José Alberto Valadez Lira**. Y muy en especial a la **Dra. Guadalupe González Ochoa** por su apoyo incondicional, su confianza puesta en mí, y ser mi ejemplo a seguir en el campo de la investigación, sabe que la quiero muchísimo, muchas gracias.

Al **Dr. César Iván Romo Sáenz** por compartirme sus conocimientos, por su apoyo para poder concluir este proyecto y por la amistad brindada hacia mi persona, muchas gracias por todo. A mis compañeros de Laboratorio, **Ileana, Viviana, David, Rosita, Servando, Ricardo, Gerardo, Aymee, Jessy, Oziel, Angello, Laiju, Esteban, Oscar, Felizardo**, los aprecio y los quiero muchísimo.

A mis compañeras y amigas de Maestría en Micro, **Dannie Cerda Apresa** y **Karlita Solís Arévalo**. A mis amigas de Inmuno **María González** y **Carito Hernández**, las quiero mucho a todas. A mi novio **Alonso Moreno**, muchísimas gracias por todo tu apoyo, amor y compañía durante este tiempo, te amo.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para el desarrollo de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional.

A la **Dra. Cristina Rodríguez Padilla**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

A mis padres, mis hermanos **Lucero, Fernando** y **Angel**, a mi sobrino **Cristian** y a toda mi familia por todo el apoyo y animo durante esta etapa.

A mis amigas del alma **Nereyda Chávez, Carolina Castellón, Luz Flores** y **Yocelyn Cota** que aun en la distancia siempre estuvieron ahí, las quiero muchísimo.

## **DEDICATORIA**

A mis padres María de Jesús Gámez Esquer y Fernando Domínguez Rodríguez por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, todos mis logros se los debo a ustedes, son mi motor para seguir adelante. Me formaron con reglas y valores, que al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis metas y anhelos, sin ustedes no sería nada, los amo con todo mi corazón.

Muchas Gracias por todo.

## ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO .....	ii
COMITÉ DE TESIS.....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIA .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Insectos vectores de enfermedades en humanos .....	3
2.1.1 Géneros de la familia Culicidae presentes en México .....	3
2.1.2 <i>Aedes aegypti</i> (L).....	4
2.1.3 Ciclo de vida .....	5
2.1.4 Ecología del mosquito vector <i>Ae. aegypti</i> .....	6
2.1.4 Importancia sanitaria en México.....	7
2.1.4.1 Arbovirus.....	7
2.2 Control de <i>Ae. aegypti</i> .....	8
2.2.1 Control químico .....	8
2.2.2 Control cultural.....	9
2.2.3 Uso de trampas .....	10
2.2.3.1 Ovitrapa letal (LO): .....	10
2.2.3.2 Ovitrapa pegajosa .....	11
2.2.3.2 Ovitrapa autocida grávida (CDC-AGO) y trampa grávida <i>Aedes</i> (CDC-GAT) .....	11
2.2.4 Control biológico.....	12
2.2.4.1 Uso de hongos entomopatógenos .....	13
2.2.4.2 <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Villemin .....	13
2.2.4.2.1 Ciclo de infección de <i>B. bassiana</i> .....	14
2.2.5. Formulaciones de bioinsecticidas .....	15

3.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	16
4.	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
	4.1 Objetivo general.....	17
	4.2 Objetivos específicos.....	17
5.	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
	5.1. Cría de <i>Ae. aegypti</i> .....	18
	5.2 Producción semi-masiva de <i>B. bassiana</i> .....	18
	5.3 Vida de anaquel de <i>B. bassiana</i> en un formulado microgranular humectable y otro sólido en combinación con atrayentes.....	20
	5.3.1 Compatibilidad de conidios de <i>B. bassiana</i> con atrayentes y conservadores. ....	20
	5.3.2 Preparación de formulados.....	21
	5.3.3 Evaluación de la acción atrayente de <i>Spirulina sp.</i> en un formulado granular .....	21
	5.3.3.1 Evaluación de viabilidad de un formulado microgranular con <i>Spirulina sp.</i> .....	23
	5.3.4 Vida anaquel de un formulado microgranular en polvo y uno sólido. ....	24
	5.4 Efectividad insecticida de los formulados contra adultos de <i>Ae. aegypti</i> , en pruebas de laboratorio. ....	25
	5.5 Diseño y evaluación de trampas a nivel laboratorio.....	26
	5.6 Evaluación de trampas a nivel de campo. ....	27
	5.7 Análisis Estadístico.....	28
6.	<b>RESULTADOS</b> .....	30
	6.1 Vida de anaquel de <i>B. bassiana</i> en un formulado microgranular .....	30
	6.1.1 Compatibilidad de conidios de <i>B. bassiana</i> con atrayentes y conservadores. ....	30
	6.1.2 Pruebas, preliminares de distintos atrayentes .....	34
	6.1.2.1 Evaluación de la acción atrayente de dos aditivos: sacarosa o de <i>Spirulina sp.</i> a un formulado microgranular. ....	34
	6.1.3 Evaluación de viabilidad de un formulado microgranular con adición de sacarosa y <i>Spirulina sp.</i> .....	35

6.1.4	Vida anaquel de un formulado microgranular en polvo y uno sólido. ....	36
6.1.5	Efectividad insecticida de los formulados contra adultos de <i>Ae. aegypti</i> , en pruebas de laboratorio. ....	40
6.1.6	Evaluación de trampas a nivel laboratorio. ....	42
7.	DISCUSIÓN .....	44
8.	CONCLUSIONES .....	47
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	48
	RESUMEN BIBLIOGRAFICO .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Ingredientes para el desarrollo de formulaciones a base de <i>B. bassiana</i> .....	22
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos preliminares de evaluación de atrayentes sobre adultos de <i>Ae. aegypti</i> .....	23
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos de formulaciones microgranulares y sólidos a dos temperaturas de almacenamiento (4°C y 28°C).....	25
<b>Figura 1.</b> Producción de conidios de <i>B. bassiana</i> , mediante fermentación sólida a base de arroz.....	19
<b>Figura 2.</b> Preparación de formulaciones microgranulares (FMG) <b>A)</b> FMG con IA. <b>B)</b> FMG con IA más atrayentes.....	22
<b>Figura 3.</b> Prototipo de sistema de infección para hembras grávidas, adicionado con un formulado químico-atrayente de hembras y machos, a base de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 .....	27
<b>Figura 4.</b> Viabilidad de conidios al tiempo cero en unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 ( $4.3 \times 10^8$ conidios/mL) en solución INEX-A al 0.5% mezclados con ácido bórico (AB), sacarosa (Sc), miel (M), acetona (AC) (1%, 5% y 10%) y ácido láctico (AL) (2, 4 y 8 µg/mL)..	31
<b>Figura 5.</b> Viabilidad de conidios después de 5 días de almacenamiento (25 °C ± 2 °C.) en unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 ( $4.3 \times 10^8$ conidios/mL) en solución INEX-A al 0.5% mezclados con ácido bórico (AB), sacarosa (Sc), miel (M), acetona (AC) (1%, 5% y 10%) y ácido láctico (AL) (2, 4 y 8 µg/mL)..	32
<b>Figura 6.</b> Viabilidad de conidios después de 30 días de almacenamiento (25° ± 2°C.) en unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 ( $4.3 \times 10^8$ conidios/mL) en solución INEX-A al 0.5% mezclados con ácido bórico (AB), sacarosa (Sc), miel (M), acetona (AC) (1%, 5% y 10%) y ácido láctico (AL) (2, 4 y 8 µg/mL).....	33
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de atracción de adultos <i>Ae. aegypti</i> utilizando diferentes tratamientos a) sacarosa nivel laboratorio (Sc L 2%) y sacarosa refinada comercial (Sc R 2%), b) FMG + sacarosa 2% y FMG + sacarosa al 2% + <i>Spirulina</i> , c) FMG + sacarosa al 2% + <i>Spirulina</i> seco y húmedo..	34
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de germinación de <i>B. bassiana</i> después de 0, 15, 30 y 45 días de adicionar los tratamientos FMG + sacarosa + <i>Spirulina</i> a temperatura ambiente (30 °C ± 2 °C) y en refrigeración (4 °C ± 2°C).....	35
<b>Figura 9.</b> Viabilidad de conidios al tiempo cero en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de formulado de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 en 4 distintos formulados almacenados a 4°C y a 28°C. ....	37

<b>Figura 10.</b> Viabilidad de conidios después de 15 días en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de formulado de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 en 4 distintos formulados almacenados a 4 °C y 28 °C .....	38
<b>Figura 11.</b> Viabilidad de conidios al tiempo 30 días en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de cuatro distintos formulados con conidios de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4, almacenados a 4 °C y 28 °C. ....	39
<b>Figura 12.</b> Viabilidad de conidios después de 120 días, en unidades formadoras de colonias por gramo de formulado (UFC/g) de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 en cuatro distintos formulados almacenados a 4 °C y 28 °C .....	40
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de sobrevivencia de adultos <i>Aedes aegypti</i> expuestos a cuatro distintos formulados de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 al tiempo cero de almacenamiento.....	41
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de sobrevivencia de adultos <i>Aedes aegypti</i> expuestos a cuatro distintos formulados de la cepa <i>B. bassiana</i> BBPTG4 almacenados por 30 días. ....	42
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de atracción de adultos de <i>Aedes aegypti</i> expuestos a trampas de laboratorio con formulados funcionales .....	43

## RESUMEN

*Aedes aegypti* L. es una importante plaga que actúa como vector de dengue y otros Arbovirus. Los hongos entomopatógenos se consideran una opción para su control; sin embargo, muestra deficiencias en la atracción del mosquito, por esta razón se reduce su exposición y por ende su infección y mortalidad. El objetivo de este estudio fue relacionar la efectividad de atrayentes con un formulado microgranular (FMG) en combinación con *Beauveria bassiana*, con la mortalidad de mosquitos expuestos. Primeramente, se realizaron mezclas de conidios a ( $4.3 \times 10^8$  conidios/mL) con diversos aditivos como: acetona, miel, ácido bórico, sacarosa (1, 5 y 10%) o ácido láctico (2, 4 y 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y se realizaron evaluaciones de viabilidad (UFC) después de 0, 5 y 30 días. Se probó la atracción y mortalidad en adultos de *Ae. aegypti* expuestos al FMG con y sin *B. bassiana* + el aditivo con menor toxicidad sobre el hongo (sacarosa). En el control y otros atrayentes se perdió viabilidad de conidios a los 30 días, a excepción de acetona (al 1 y 5%), sacarosa y miel (al 1%) ( $4.89 \times 10^4$  -  $1.04 \times 10^5$  conidios/mL). La atracción y mortalidad de *Ae. aegypti* al FMG + 2% sacarosa, fue mayor al 50 y 40%, respectivamente. Se realizaron pruebas adicionales con otro aditivo, la *Spirulina*, combinada al 3.8% + FMG + 2% sacarosa + *B. bassiana* ( $2.6 \times 10^4$  conidios/g) (FMGsSp) o sin *Spirulina* (FMGsSp). El FMGsSp-IA tuvo 20% más atracción versus el FMGs-IA. La mortalidad se incrementó hasta el 26.7% cuando se le adicionó *B. bassiana*. Los conidios en FMGsSp-IA no perdieron viabilidad en refrigeración o temperatura ambiente después de 45 días. Se realizaron cuatro distintos tratamientos a base de *B. bassiana*, a los cuales se les evaluó su viabilidad a diferentes temperaturas y la efectividad de estos. Los formulados más efectivos en cuanto a viabilidad fueron FMGsSp4 y FMGs4, ya que mantuvieron los conidios de *B. bassiana* viables durante 120 días, y FMGsSp disminuyó significativamente el porcentaje de sobrevivencia de *Ae. aegypti*.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* L. is an important pest that acts as a vector for dengue and other Arboviruses. Entomopathogenic fungi are considered an option for their control; however, it shows deficiencies in the mosquito attraction, for this reason its exposure is reduced and therefore its infection and mortality. This study objective was to relate attractants effectiveness with a microgranular formulation (MGF) in combination with *Beauveria bassiana*, with exposed mosquitoes mortality. First, conidia mixtures were made at ( $4.3 \times 10^8$  conidia/mL) with various additives such as: acetone, honey, boric acid, sucrose (1, 5 and 10%) or lactic acid (2, 4 and 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) and viability evaluations (CFU) were performed after 0, 5 and 30 days. The attraction and mortality were tested in *Ae. aegypti* adults exposed to MGF with and without *B. bassiana* + the additive with the lowest toxicity to the fungus (sucrose). In the control and other attractants, conidia viability was lost at 30 days, except for acetone (1 and 5%), sucrose and honey (1%) ( $4.89 \times 10^4$  -  $1.04 \times 10^5$  conidia/mL). The attraction and mortality of *Ae. aegypti* at MGF + 2% sugar, was greater than 50 and 40%, respectively. Additional tests were carried out with another additive, *Spirulina*, combined at 3.8% + MGF + 2% sucrose + *B. bassiana* ( $2.6 \times 10^4$  conidia/g) (MGFSpS) or without *Spirulina* (MGFs). MGFsSp-AI had 20% more attraction versus MGFs-AI. Mortality increased to 26.7% when *B. bassiana* was added. In MGFsSp-AI, conidia did not lose viability in refrigeration or room temperature after 45 days. Four different treatments were carried out based on *B. bassiana*, which were evaluated for their effectiveness and viability at different temperatures. The most effective formulations in terms of viability were MGFsSp4 and MGFs4, since they maintained *B. bassiana* conidia viable for 120 days, and MGFsSp significantly decreased the *Ae. aegypti* survival percentage.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* (L.) es vector principal de virus como el de la fiebre amarilla, Zika, chikungunya y dengue, siendo este último el que tiene mayor impacto en la salud humana (Flores *et al.*, 2019). El dengue es uno de los virus transmitidos por vectores de más rápida propagación, ya que por lo menos 390 millones de infecciones ocurren anualmente. Desafortunadamente no existen tratamientos específicos para atacar esta enfermedad, por lo que el control del vector es la mejor herramienta para prevenirla (OMS, 2017).

Actualmente, el método de control más utilizado para la eliminación de este vector se basa en el uso de insecticidas químicos. Por lo que, su mal manejo ha generado contaminación ambiental, deterioro de la salud del personal que los maneja, eliminación de insectos benéficos, así como resistencia de mosquitos hacia algunos insecticidas (Sutthanont *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2011). Por ello, se ha implementado el control biológico de mosquitos, mediante el uso de agentes entomopatógenos (AEP), en los cuales se encuentran bacterias, nematodos, hongos, protozoarios y virus, donde los hongos destacan por el amplio espectro de insectos a los que estos pueden infectar (Marina *et al.*, 2012).

*Beauveria bassiana* (Balsmo) Villemin es un hongo EP (HEP) que se ha destacado en el biocontrol de diferentes insectos de importancia agrícola y urbana. Adultos de *Culex sp.*, *Anopheles albimanus* Wiedemann y *Ae. aegypti* han mostrado susceptibilidad a la infección por *B. bassiana*. Así mismo, se ha demostrado que el uso de *B. bassiana* en mosquitos, favorece a la auto-diseminación del hongo por vía cópula, incluso puede servir para el control en la mayoría de las etapas del insecto, larva, pupa y adulto (Scholte *et al.*, 2005; García-Munguía *et al.*, 2011; de Paula *et al.*, 2018. Otra de los resultados favorables ha sido la relación del uso de HEP con la reducción vectorial de infecciones por el arbovirus, Zika (Deng *et al.*, 2019).

Por otro lado, en países de América del norte y centro, el uso de trampas con atrayentes ha sido una herramienta eficiente para la captura de adultos o como ovitrampas (Pushpanathan, 2017; Parker *et al.*, 2017). Además, al acoplar dos técnicas para su control, se han usado HEP impregnándolos en telas negras para el control de adultos de *Ae. aegypti*,

resultados que han corroborado la infección de mosquitos y la acción atrayente de la tela utilizada (Silva *et al.*, 2018).

Se ha documentado que *Ae. aegypti* puede verse atraído por CO<sub>2</sub>, acetona y ácido L-láctico, componentes principales del resultado de la respiración o transpiración por parte del humano (Bernier *et al.*, 2003). Por lo tanto, se han desarrollado métodos de control para este y otras especies de mosquitos; sin embargo, se han utilizado cada uno por separado, mostrando deficiencias. Por ejemplo, los HEP han mostrado algunos problemas, como la baja estabilidad durante su almacén (vida de anaquel) y en campo (Feng *et al.*, 1994; Bukhari *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2017). Una vez dispersados, se pueden reducir su viabilidad debido a factores medio ambientales (Shahid *et al.*, 2012).

Otro problema es la reducida probabilidad de que el mosquito logre infectarse, ya que de esto depende del contacto directo con el HEP. Por lo anteriormente mencionado, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el control de adultos y larvas de *Ae. aegypti*, así como la generación de un sistema eficiente de atracción e infección, que además logre proteger al HEP empleado durante su vida de anaquel y su acción en campo.

Ante tal necesidad, el presente estudio se evaluó el efecto combinado de *B. bassiana* en un bioformulado fúngico, adicionado con atrayentes en una trampa, para el biocontrol de *Ae. aegypti*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Insectos vectores de enfermedades en humanos

Un vector puede definirse, como un ser vivo capaz de transmitir una enfermedad a huéspedes vertebrados, incluidos los humanos. Las enfermedades transmitidas por vectores aparecen cuando el agente etiológico que las produce, virus o parásito, es transmitido por especies de insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos alojados en la sangre de un portador infectado y los transmiten a un huésped sensible mediante mecanismos de transmisión activa o pasiva (Verwoerd, 2015)

Los vectores de enfermedades más conocidos son: los flebótomos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, transmisores de la leishmaniasis; las chinches de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma*, transmisores de la enfermedad de Chagas; los mosquitos del género *Anopheles*, transmisores de la malaria o paludismo, y el mosquito *Ae. aegypti*, transmisor del dengue, el chikungunya y el Zika (Padilla *et al.*, 2017).

#### 2.1.1 Géneros de la familia Culicidae presentes en México

La familia Culicidae, es de importancia entomológica y médica, ya que la mayoría de sus miembros actúan como vectores de enfermedades infecciosas, principalmente la familia de los arbovirus. Hoy en día se conocen alrededor de 3,601 especies y subespecies de esta familia. Sin embargo, este número cambia rápidamente al descubrir nuevos virus a medida que se continúa investigando (Wilkerson *et al.*, 2015; del Carpio-Orantes, 2018).

En México, existe una diversa presencia de especies y géneros registrados por el catálogo sistemático de la familia Culicidae con un total de 203 especies, y de estas, solo 29 especies se recolectan en el país. Entre los principales géneros registrados se encuentran: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Psorophora* y *Sabethes*. Estos géneros se localizan principalmente en el sureste del país; sin embargo, se han documentado casos en la frontera y la región norte de México. Además, se han identificado especies nativas del país de alguno de los géneros mencionados (del Carpio-Orantes *et al.*, 2018).

### 2.1.2 *Aedes aegypti* (L).

Los mosquitos *Aedes* spp. están estrechamente relacionados con el hábitat humano y depositan sus huevos en el agua que se encuentra alrededor de las casas. La acumulación de plásticos y neumáticos proporciona más lugares de reproducción y contribuye a la mayor densidad de su población en las zonas urbanizadas (Vontas *et al.*, 2012).

La clasificación taxonómica de *Ae. aegypti* (L) según Bates (1970) es la siguiente:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Culicidae

Subfamilia: Culicinae

Género: *Aedes*

Subgénero: *Stegomyia*

Especie: *aegypti*

*Ae. aegypti* es originario de África, donde existen subespecies tanto selváticas; *Ae. aegypti formosus*, como domésticas; *Ae. aegypti*, *Ae. aegypti queenslandensis*. Se le ha caracterizado por ser un transmisor de enfermedades virales como el dengue, la fiebre amarilla, chikungunya y Zika. En México es el vector principal de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1-4) y son los agentes causantes de la fiebre del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue (Lozano-Fuentes *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Ae. aegypti* es holometábolo, ya que comprende las fases de huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras durante el proceso de ovogénesis, necesitan una fuente de nutrientes necesarios y la sangre que obtienen de sus hospederos es suficiente para poder desarrollar sus huevos y así dejar descendencia. Ambos sexos se alimentan de carbohidratos para la obtención de energía necesaria para volar. Sin embargo, la hembra puede usar la sangre como otra fuente de energía.

*Ae. aegypti* tiene preferencias de picadura por los humanos y se alimenta y ocasionalmente de animales domésticos. Las hembras normalmente ovipositan en la superficie de agua. Los recipientes pequeños de agua localizados en los hogares son excelentes criaderos para estos mosquitos. Desde que la hembra obtiene la sangre hasta que oviposita puede transcurrir tres o más días. Luego de la oviposición se requieren de aproximadamente 48 horas para el desarrollo embrionario de los huevos, posteriormente estos pueden mantenerse en estado de latencia durante varios meses. Al entrar en contacto con el agua, los embriones eclosionan como larvas.

En condiciones de laboratorio, las hembras pueden depositan entre 100 y 300 huevos de aproximadamente 0,8 mm sobre los recipientes en contacto con el agua. Pasados dos o tres días, los huevos eclosionan como larvas de estadio I, luego mudan como larvas de estadio II, III, IV. Las larvas son exclusivamente acuáticas, muy activas y consumen para su desarrollo la materia orgánica presente en el recipiente, o llegan a practicar el canibalismo, ya que pueden alimentarse de otras larvas de su especie o de otras especies. Entre los 7 y los 14 días en condiciones óptimas de temperatura (25 a 29°C) y alimentación, las larvas se transforman en pupas. En este estado permanecen entre tres o más días, y experimentan cambios anatómicos y fisiológicos, no se alimentan y apenas se mueven hasta el momento en que emergen, en este estadio pueden llegar a durar hasta 24 a 48 h y finalmente emergen como adulto (Galván, 2016; Carbajo, 2003).

La emergencia del mosquito adulto de la cubierta pupal es producida rápidamente y al salir, reposa sobre la película de agua y antes de una hora hace su primer vuelo, se para después posarse en un lugar seco. La proporción entre hembras y machos es cercana a 1:1. El macho es diferenciado de la hembra por sus antenas plumosas y se alimenta de

carbohidratos que los obtiene del néctar de las flores o frutos (Clement, 1992). El macho es atraído por el sonido que hace la hembra por el movimiento de sus alas y en el aire la engancha con sus genitales y la fecunda (Christophers, 1960).

Los adultos suelen ser alados y dimorfos; 24 horas después de emerger están en capacidad de aparearse y viven entre 10 y 18 días (Carbajo, 2003; Velandia-Romero *et al.*, 2017).

#### **2.1.4 Ecología del mosquito vector *Ae. aegypti***

Se antecede que *Ae. aegypti* era un mosquito zoofílico llamado *Ae. aegypti formosus*. La forma doméstica de *Ae. aegypti* es genéticamente distinto con nichos geográficos discretos. Se planteó la hipótesis de que, debido a las duras condiciones junto con el inicio de la trata de esclavos, *Ae. aegypti* fueron introducidos en el Nuevo Mundo desde África, desde donde posteriormente fue extendido a nivel mundial a diferentes partes tropicales del mundo (Brown *et al.*, 2011, -2014). Sin embargo, la deforestación e invasión de hábitats propios de los mosquitos, por el hombre, los ha obligado a utilizar sitios, además de botellas, recipientes pequeños, llantas, piletas, barriles, tambos, etc. para ovipositar (Fernández, 2009).

Estudios realizados anteriormente evidencian que las hembras adultas de *Ae. aegypti* se alimentan preferentemente por la sangre humana, mientras que los adultos machos se alimentan por néctar o jugo de frutas. Estos semblantes ecológicos del vector han sufrido modificaciones por la repercusión del humano en los ecosistemas, debido al almacenamiento del agua en contenedores a lo largo del tiempo, incluyendo en temporadas de sequía, lo que tuvo como resultado un importante nicho de reproducción y desarrollo de larvas de *Ae. aegypti*. En consecuencia, las hembras fueron mostrando preferencia por sangre humana para su alimentación, ya que esta era la fuente de mayor disponibilidad en su nuevo entorno, originándose así la domesticación del mosquito vector a lo largo de los seis continentes (Powell y Tabachnick, 2013; McBride *et al.*, 2014).

#### **2.1.4 Importancia sanitaria en México**

La propagación de este vector comenzó a partir del siglo XVI, con la esclavización de africanos nativos, de donde probablemente se trajo a *Ae. aegypti* y se diseminó el virus de la fiebre amarilla (Eltis y Richardson, 2010). Para el año 1648, ya habían ocurrido epidemias de fiebre amarilla en el nuevo mundo. Desde entonces han acontecido estas epidemias virales causadas por la transmisión por mosquitos como lo son el dengue, Zika y chikungunya, tanto en regiones tropicales como subtropicales del mundo (Powell, 2018). Las hembras de esta especie permiten que los virus se mantengan viables, por lo que se le considera el vector más eficiente para los arbovirus, debido probablemente a su historia co-evolutiva con el humano (Ritchie, 2014).

##### **2.1.4.1 Arbovirus**

Los arbovirus son un grupo de virus que se encuentran principalmente en la naturaleza, debido a la propagación biológica entre huéspedes vertebrados, como mamíferos o aves, y vectores que se alimentan de sangre (Arredondo-García *et al.*, 2016). Existen cientos de virus transmitidos por artrópodos, generalmente por mosquitos y garrapatas (Fauci y Morens, 2016).

Las infecciones arbovirales transmitidas por artrópodos son un importante problema de salud pública y causan una considerable morbilidad y mortalidad en humanos y ganado en todo el mundo. Hay más de 100 arbovirus que causan enfermedades en los seres humanos, incluidos los miembros de las familias *Faviviridae*, *Bunyaviridae* y *Togaviridae* (Diaz-Baldillo *et al.*, 2011).

En el mundo existen más de 3500 especies de mosquitos, de los cuales los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* son los más abundantes vectores de enfermedades. Los agentes son virus ARN encapsulados de cadena simple: Chikungunya (*Alphavirus*), dengue y Zika (*Flavivirus*); Comparten vectores en común como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Marcondes y Ximenes, 2016).

El dengue, es uno de los arbovirus con mayor incidencia en México y es una enfermedad viral la cual es transmitida por mosquitos, principalmente por la especie *Ae.*

*aegypti*, ya que esta especie vive en ambientes densos hechos por el hombre y la reciente urbanización en todo el mundo ha acelerado la propagación de este virus (Brady, 2019).

Esta enfermedad es endémica en más de 100 países en regiones tropicales y subtropicales del mundo, y se ha estimado que se producen entre 50 y 100 millones de infecciones por dengue cada año, y en 2010, se originaron más de 2,2 millones de casos y un aproximado de 20,000 muertes en todo el mundo (Sarti *et al.*, 2015).

## **2.2 Control de *Ae. aegypti***

Debido al incremento en el desarrollo de los casos de las enfermedades causadas por este vector, se han implementado distintas maneras para el control de *Ae. aegypti* en las cuales se han utilizado los métodos tanto de control químico, cultural y biológico (García-Gutiérrez *et al.*, 2012).

### **2.2.1 Control químico**

Los insecticidas son comúnmente utilizados para el control de este vector, ya sea como larvicidas agregándolos a los criaderos o por aplicaciones de aulticidas espaciales residuales o con el tratamiento e impregnación de materiales (Vontas *et al.*, 2012). Los cuatro principales grupos de insecticidas más utilizados para el control han sido los organoclorados, introducidos en la década de 1940; organofosforados, en la década de 1950; metilcarbarmatos, en 1960 y piretroides, en los 70s (Ranson *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado que este método no es suficiente para la eliminación o control de este vector.

En el año 2014 se realizó una evaluación a la resistencia a diversos insecticidas en *Ae. aegypti* tales como temefos, fenitrothion, deltametrina, cipermetrina, lambdacialotrina y clorpirifos, se encontró que aún siguen siendo susceptibles tanto en larvas como en adultos para todos los productos. Sin embargo, las larvas de *Ae. aegypti* ya han demostrado alta resistencia a los temefos, mientras que los adultos a la lambdacialotrina y Aqua K-Otrina 2 EW (Bisset-Lazcano *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016), los cuales son insecticidas de primera elección para controlar al mosquito vector.

A pesar de que los productos químicos son utilizados principalmente para tratar los hábitats larvarios de *Ae. aegypti*, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) este debe de considerarse como un método adicional y solo utilizarse en caso de emergencia como en recipientes que no puedan eliminarse o tratarse de otra forma. Los larvicidas que sean aplicados en los recipientes de agua no deben de modificar el sabor, olor o color de esta y no deben de ser tóxicos para otras especies (OMS, 2019).

### **2.2.2 Control cultural**

Este tipo de control tiene como objeto destruir, alterar, retirar o reciclar los recipientes no esenciales en los cuales se puedan encontrar y desarrollar huevos, larvas o pupas. Se alienta a los miembros de la familia y la comunidad a que participen en la eliminación y control de criaderos de mosquitos, transformando los hábitos para que los individuos sean capaces de reconstruir y transformar su espacio y prevenir enfermedades. Asimismo, se realizan campañas de difusión en radio, en escuelas, en eventos políticos, además de talleres de capacitación a técnicos de salud y a los miembros de las comunidades (Galván, 2016).

Según la OMS es importante llevar a cabo la modificación y manipulación ambiental. En el caso de la modificación esta sería llevada a cabo con la instalación de canalizaciones para el abastecimiento seguro de agua que incluyan las conexiones domiciliarias. Posteriormente en el caso de la manipulación ambiental implicaría vaciar y limpiar con frecuencia los recipientes donde se almacena agua, los jarrones y los sistemas para refrigerar estancias vacías; limpiar los canalones; guardar los neumáticos al abrigo de la lluvia; reciclar o eliminar debidamente los recipientes y los neumáticos que no vayan a usarse más y ocuparse de las plantas que se encuentren cerca de las viviendas y en cuyas se acumule agua. No obstante, también es importante las acciones destinadas a reducir el contacto entre las personas, y los vectores, como la instalación de tela metálica en puertas, ventanas u otros puntos de acceso o el uso de mosquiteros y trampas para mosquitos (OMS, 2019).

### **2.2.3 Uso de trampas**

La expansión intensiva de las arbovirosis resalta la necesidad de un control efectivo del mosquito vector. Aunque los intentos de captura masiva no han recibido mucha atención por ser ineficientes en comparación con la aplicación de insecticidas, los niveles de resistencia a estos últimos se han incrementado en los últimos años, a la par que se ha impulsado el desarrollo de trampas accesibles y sencillas que matan a hembras de *Ae. aegypti* grávidas, lo que representa una buena área de oportunidad en el ámbito del control de *Ae. aegypti* (Johnson *et al.*, 2017).

*Ae. aegypti* tiene hábitos domésticos y se reproduce en una gran variedad de recipientes que almacenan agua limpia cercanos a la vivienda de los humanos. El conocimiento sobre las preferencias de los sitios de oviposición ha resultado en el desarrollo de ovitrampas para el monitoreo de las poblaciones y para la evaluación de las medidas de control.

A partir de las primeras ovitrampas se han realizado modificaciones en ellas con la finalidad de aumentar su efectividad. La incorporación tanto de atrayentes como de reductores de poblaciones modifica la función de las ovitrampas, convirtiéndolas de un sistema de monitoreo pasivo, a una medida de control bajo el concepto de atraer y matar (Torres-Estrada y Rodiles-Cruz, 2013).

#### **2.2.3.1 Ovitrapa letal (LO):**

Las ovitrampas o trampas de oviposición son unos recipientes donde las hembras de los mosquitos depositan sus huevos, que crecen hasta convertirse en larvas, pupas y mosquitos adultos. Se encuentran compuestas principalmente por un vaso negro de plástico en el cual se le agrega una combinación de insecticidas, sustratos de ovipostura como toalla, dacrón o franela e infusiones atrayentes como heno y agua de clorada para matar a las hembras atraídas para ovipositar. Las ovitrampas letales podrían contribuir de forma práctica en estrategias costo-efectivas para el control vectorial (Quimbayo *et al.*, 2014; OMS, 2019).

### **2.2.3.2 Ovitrapa pegajosa**

La ovitrampa pegajosa se desarrolló para la solución del frecuente problema de la resistencia a los insecticidas, utilizando la misma estrategia de atraer y eliminar a las hembras, pero con la diferencia de que no emplea insecticidas, sino que contiene una tira adhesiva que sirve para capturar y matar a las hembras que ovipositan en ella. Estas ovitrampas resultaron ser muy eficientes para la atracción y muerte de mosquitos hembra (Chadee y Ritchie, 2010).

### **2.2.3.2 Ovitrapa autocida grávida (CDC-AGO) y trampa grávida *Aedes* (CDC-GAT)**

La CDC-AGO consiste en dos cilindros de polietileno unidos, uno superior que sirve como ingreso a la trampa y cámara de captura cubierto por una superficie pegajosa de polietileno. Es una paila negra que contiene una infusión creada con agua y heno. El color oscuro de la paila y el olor de la infusión atrae a los mosquitos *Ae. aegypti* hembra que están buscando un lugar con agua acumulada para poner sus huevos.

Los mosquitos entran en la cámara de captura, pero una malla evita que los mosquitos lleguen al agua. Cuando los mosquitos *Ae. aegypti* hembra están listas para poner sus huevos aterrizan en una superficie pegajosa en la cámara de captura y se quedan atrapados en la misma (Rodríguez-González, 2018; WHO, 2003).

La CDC-GAT está compuesta por un recipiente que contiene una infusión creada con agua y heno. El olor de esta infusión atrae a la hembra del mosquito *Ae. aegypti* que está lista para poner sus huevos. El mosquito entra a la cámara de captura transparente, la cual está cubierta con aceite de canola. Una malla sirve de barrera entre el mosquito y el agua, de tal manera que el mosquito no puede alcanzar el agua para poner sus huevos. Cuando el mosquito aterriza en la superficie transparente se cubre de aceite, dándole peso al mosquito impidiendo que pueda volar (UCVPR, 2019).

#### 2.2.4 Control biológico

El control biológico es definido como la reducción de la densidad de inóculo o de la actividad de un patógeno o parásito, ya sea en su estado activo o durmiente, que se logre de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, de antagonistas o del hospedero del patógeno o plaga que se desea controlar (Moreno-Velandia *et al.*, 2018).

Los métodos de control biológico del mosquito consisten básicamente en el uso de insecticidas biorracionales, AEP y agentes entomófagos. El uso de biorracionales suele ser eficaz para prevenir o reducir el desarrollo de etapas acuáticas inmaduras de importantes especies de vectores de mosquitos. Un ejemplo sería el uso de insecticida biorracional Spinosad, producido durante la fermentación de un actinomiceto. Es una mezcla de dos neurotoxinas de espinosinas que son altamente tóxicas para ciertos tipos de insectos, incluido Díptera como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, *Anopheles gambiae*, *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *Culex. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, entre otros (Marina *et al.*, 2012). Sin embargo, tiene muy poca toxicidad para los vertebrados y ha sido aprobado para su uso como larvicida de mosquito en el agua potable (WHO, 2010).

Por otro lado, los AEP que infectan al insecto y se reproducen en él hasta causarles la muerte y clasificarse en cinco grandes grupos: bacterias, hongos, nematodos, protozoarios y virus (Marina, 2018). Entre los virus que afectan a *Ae. aegypti* se encuentran los densovirus, virus de la poliedrosis citoplasmática (VPC) y los virus iridiscentes de invertebrados. Sin embargo, en la actualidad no existen formulaciones comerciales para la utilización en campo de ninguno de estos virus (López *et al.*, 2008).

Respecto a las bacterias que más se emplean para el control de mosquitos son *Bacillus thuringiensis* serovariedad *israelensis* (Bti) y *Bacillus sphaericus*, utilizados como bioinsecticidas por su eficacia reduciendo o eliminando las poblaciones de mosquito (WHO, 1982; Fernández, 2009). Su capacidad insecticida se debe a un cristal proteínico que se forma junto a la espora. Su modo de acción se relaciona con la ingestión de esporas y cristales tóxicos que producen parálisis intestinal y envenenamiento de la fase larvaria del mosquito. (Martínez *et al.*, 2008).

También se ha empleado el control biológico de mosquitos mediante la utilización de entomófagos entre los cuales se encuentran algunos enemigos naturales o depredadores de

*Ae. aegypti*, entre ellos destacan algunas especies de invertebrados como *Toxorhynchites* sp., algunos peces larvívoros entre los más usados bajo condiciones de laboratorio se encuentra, *Gambusia* sp. y *Poecilia reticulata*, ranas y patos que se alimentan de los estadios inmaduros del mosquito, sin embargo, aún no se usan programas de control por su complejo manejo en casa habitación (WHO, 1982; Costero *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Duque *et al.*, 2004; Kay y Nam, 2005).

#### **2.2.4.1 Uso de hongos entomopatógenos**

Los hongos se consideran bioinsecticidas de contacto, ya que penetran en los mosquitos a través de su cutícula externa y aberturas naturales como boca, espiráculo y ano. Los insectos infectados por la aplicación inicial del HEP mueren y la enfermedad se disemina a medida que los insectos muertos liberan de nuevo el inóculo. Los dos géneros más importantes que invaden a las larvas de mosquitos son *Coelomomyces* y *Lagenidium* (Martínez *et al.*, 2008).

Los HEP conforman el mayor grupo de importancia en el control biológico de insectos plaga, se presentan de forma natural en el medio ambiente como en el suelo, en restos de cultivos y sobre los cadáveres de insectos, nutriéndose de estos o de materia orgánica. A pesar de que se conocen más de 750 especies de hongos que infectan a insectos, sólo algunas se han desarrollado de manera comercial en Estados Unidos, Europa, América Latina y China. Comúnmente, estos hongos son de acción lenta (Martínez *et al.*, 2008). Entre los géneros más importantes y utilizados en el control de insectos plaga causantes de daños en cultivos de importancia económica, se encuentran *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, *Isaria fumosorosea* e *Hirsutella thompsonii* (Ramírez *et al.*, 2014).

#### **2.2.4.2 *Beauveria bassiana* (Bals.) Villemin**

Se conoce a *B. bassiana* como un hongo filamentoso de la clase Hyphomycete, división Deuteromicetes (Fungi imperfecti o Fungi asexual). Al igual que los demás HEP, es un organismo eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas y parasita otros insectos, gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección (Echeverría-Beirute, 2006).

Morfológicamente, *B. bassiana* se caracteriza por presentar un crecimiento lento de colonias, circular, llegando a alcanzar 20 mm de diámetro en 10 días, en un rango de 0.6 a 2.3 cm de diámetro. El aspecto de su colonia es lanoso en forma de polvo debido a los abundantes conidios, es de color blanco en un principio, y posteriormente se torna amarillenta en la parte del centro, de textura blanda y superficie plana. Posee hifas cenocíticas, lisas, con células conidiógenas formando densos racimos irregularmente agrupados, las fiálides se encuentran hinchadas en la base que asemeja la estructura de un frasco sub-globoso y se adelgazan hacia la parte que sostiene las esporas llamado raquis en forma de zigzag. El tamaño de las células conidiógenas es de  $3.8-7 \times 1.3-1.8 \mu\text{m}$ , el raquis de  $2.2-4.2 \times 1 \mu\text{m}$ . Los conidios de *B. bassiana* son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de  $2.2-3 \mu\text{m}$  de diámetro (Domsch *et al.*, 1993; Alean, 2003; García *et al.*, 2014).

En la actualidad, se conoce que los mosquitos adultos de *Ae. aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Culex* son susceptibles a las infecciones por este patógeno. Se ha evaluado la mortalidad de los mosquitos adultos mediante métodos de infección con *B. bassiana* que involucran conidios secos y formulados con aceite. Sin embargo, también podría ser diseminado por los machos vírgenes hacia las hembras en el caso del vector del dengue *Ae. aegypti* debido a la tendencia de los machos a aparearse varias veces con diferentes hembras (García-Mungía *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Foster y Lea (1975) observaron que un macho virgen de *Ae. aegypti* es capaz de aparearse e inseminar hasta siete hembras después de los primeros treinta minutos de encierro en una jaula.

#### **2.2.4.2.1 Ciclo de infección de *B. bassiana***

El ciclo de infección comienza mediante la unión de los conidios a la cutícula del huésped a través de fuerzas físicas seguidas de la germinación y penetración de las capas cuticulares con la ayuda de enzimas hidrolíticas, presión mecánica y otros factores. Cuando las hifas en crecimiento alcanzan la hemolinfa rica en nutrientes, *B. bassiana* es capaz de brotar en blastosporas unicelulares, las cuales son estructuras especializadas para proliferar y explotar nutrientes ágilmente, colonizar tejidos internos y evadir al sistema inmunitario del huésped (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013; Mascarín y Jaronski, 2016).

Posteriormente, durante la colonización se produce una variedad de metabolitos tóxicos como péptidos antimicrobianos, los cuales están involucrados en la supresión inmune del huésped, acompañados por la destrucción de los tejidos internos y el agotamiento de nutrientes, que como consecuencia conducen a la muerte del huésped (Ortiz-Urquiza *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2014).

### **2.2.5. Formulaciones de bioinsecticidas**

El uso de ETP al paso del tiempo ha necesitado aditivos que ayuden a mantener su efectividad, conservando, coadyuvando, incrementando la eficiencia, etc. Se puede mezclar algún material inerte y carecer de actividad biológica, lo cual ayuda a no afectar la actividad del ETP y cuya mezcla no debe ser dañina para el ambiente. Además, el desarrollo de un formulado ayuda a facilitar el empleo del ETP (Khosravi y Ghiassi, 2014).

La formulación debe contener componentes que no dañen al microorganismo, considerando también las condiciones de almacenamiento del producto final, resultando en el éxito del formulado, ya que de esto dependerá la viabilidad del ETP (Figuroa *et al.*, 2007). Por ejemplo, uno de los métodos más utilizados en la encapsulación de conidios de hongos ETP,

Existen diversos métodos para formular hongos entomopatógenos, uno de ellos es la encapsulación, en el cual intervienen, además de los conidios del hongo, micronutrientes, enzimas. El propósito de una encapsulación es proteger y preservan a los conidios del ambiente, así como incrementar el tiempo de viabilidad al protegerlos de factores adversos como la temperatura, la actividad del agua o  $A_w$  (por sus siglas en inglés) baja y la radiación ultravioleta (Hinestroza-Cordoba y López-Malo, 2008). Esta técnica ya se ha utilizado para microencapsular virus, bacterias (Tamez-Guerra *et al.*, 2000a, -2000b), y hongos entomopatógenos en estudios recientes en el laboratorio, obteniendo resultados óptimos (Castillo, 2018).

### **3. HIPÓTESIS**

Las formulaciones a base de atrayentes y *B. bassiana* en trampas son efectivas para el control de *Ae. aegypti* (L.) en laboratorio y campo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Analizar diferentes formulaciones a base *B. bassiana* más atrayentes en trampas, para el control de *Ae. aegypti* (L.) en laboratorio y campo.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Desarrollar y comprobar la atracción y efectividad de biocontrol de adultos de *Ae. aegypti* de formulados microgranulares y sólidos, con propágulos de *B. bassiana*, en combinación con atrayentes, en pruebas a nivel laboratorio.

4.2.3 Determinar la vida de anaquel de *B. bassiana* en los formulados combinados con atrayentes.

4.2.4 Diseñar un dispositivo y evaluar la atracción de biocontrol de adultos de *Ae. aegypti* en una trampa (dispositivo + agente activo formulado + atrayente), en condiciones de laboratorio.

4.2.5 Comprobar la efectividad de biocontrol de *Ae. aegypti* a nivel de campo, evaluando una trampa seleccionada a nivel de campo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

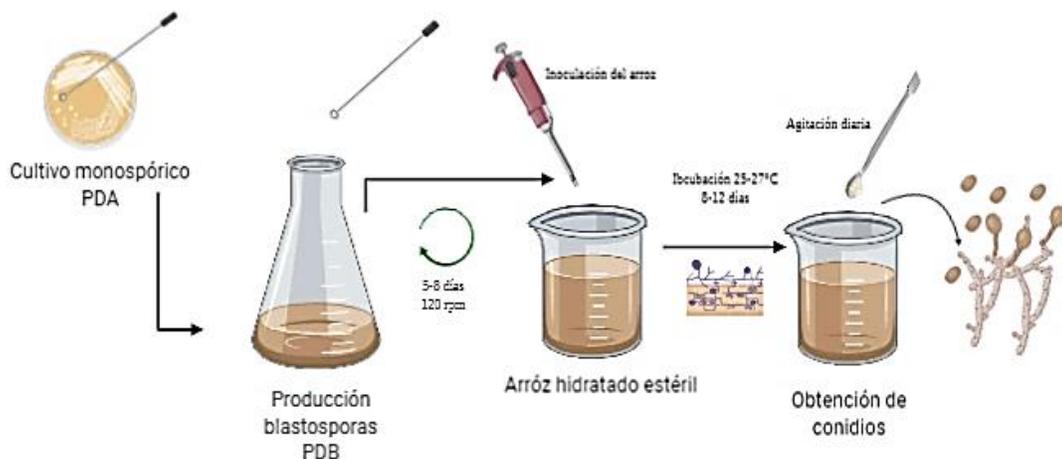
### 5.1. Cría de *Ae. aegypti*

Se utilizaron jaulas entomológicas (Carolina® Biological Supply Company, China) para mantener a la cría en fase adulta, para el apareo y ovoposición. El pie de cría partió de 100 huevecillos de *Ae. aegypti* proporcionados por el Laboratorio Entomológico de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Tanto hembras como adultos se alimentaron con una solución de sacarosa refinada al 5% provista en algodón. Las hembras de *Ae. aegypti* se alimentaron con sangre dos veces a la semana con el fin de facilitar la producción de huevos (Secretaría de Salud 2016). Las larvas recién eclosionadas y hasta el cuarto estadio se alimentaron con hojuelas de pescado básicos (WARDLEY®, Grupo Acuático Lomas S. A. de C. V., Cuajimalpa, México). Y se mantuvieron en recipientes de 2 L en bandejas de plástico. Las pupas se transfirieron a jaulas para la emergencia de adultos. La cría se mantuvo bajo condiciones de 28°C ( $\pm$  2°C), 70-80% de humedad relativa (HR) en un fotoperiodo de luz: oscuridad de 12:12 h. La mayoría de los insectos adultos que emergieron (de 5 a 8 días de edad) se alimentaron con sacarosa al 5% y se separaron en una jaula adicional con el uso de un aspirador entomológico mediante la técnica de succión para su posterior uso en bioensayos.

### 5.2 Producción semi-masiva de *B. bassiana*

La cepa BBPTG4 de *B. bassiana* que se evaluó en este proyecto fueron previamente aisladas de cucarachas infectadas, provenientes de Nuevo León, proporcionadas por el laboratorio de Inmunología y Virología en la Unidad de Formulación de biológicos de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La cepa se encuentra identificada morfológica, biológica y genéticamente (Tamez-Guerra *et al.*, 2013; Cuevas, 2020). Las cepas se reactivaron a partir de los bancos monospóricos conservados en aceite mineral, se tomó una muestra con un asa bacteriológica del cultivo conservado y se inoculó por estría en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA, BD Difco, Ciudad de México), después de 6 días de incubación de las placas, se tomó una muestra de conidios de una de las placas, con ayuda de un asa

bacteriológica y se inoculó en caldo nutritivo papa dextrosa (PDB, BD Difco, Ciudad de México) en un matraz Erlenmeyer, para la obtención de blastosporas y se mantuvo a 120 rpm durante 8 días. La producción de blastosporas se utilizó para la producción semi-masiva de conidios. La producción semi-masiva de conidios se obtuvo mediante la fermentación sólida, la cual se realizó con el siguiente procedimiento: se utilizaron blastosporas de la cepa BBPTG4, la cual nombraremos desde ahora como ingrediente activo (AI) y se realizó siguiendo el procedimiento de Jaronski y Jackson (2012). Se utilizaron 100 g de granos de arroz precocido, como sustrato sólido, se colocaron en vaso de precipitado de vidrio de 500 mL, donde se adicionó 30 mL de solución de hidratación [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.97 g/L);  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (410  $\mu\text{L/L}$ ); extracto de levadura (0.31 g/L)]. El vaso que contenía el arroz estéril he hidratado, se esterilizó en autoclave durante 20 min. Después de la esterilización se inoculó el arroz con  $1 \times 10^8$  blastosporas/mL de suspensión y se incubó el medio a 25-27°C durante 8-12 días en la oscuridad. Durante la incubación, el cultivo sólido de arroz en botellas se mezcló diariamente con una espátula para airear y homogenizar la mezcla en condiciones estériles (Fig. 1).



**Figura 1.** Producción de conidios de *B. bassiana*, mediante fermentación sólida a base de arroz (elaboración original).

Los conidios producidos en arroz se cosecharon usando un tamiz de No. 40 (tamaño de apertura de 426  $\mu\text{m}$ ) y se cuantificaron tomando una muestra de 15 mg, se suspendieron en 0.5% de INEX-A® (agente emulsionante). Para calcular la concentración de conidios por

gramos, se utilizó la cámara de Neubauer y se almacenaron a 4 °C para preparar formulaciones microgranulares.

### 5.3 Vida de anaquel de *B. bassiana* en un formulado microgranular humectable y otro sólido en combinación con atrayentes

#### 5.3.1 Compatibilidad de conidios de *B. bassiana* con atrayentes y conservadores.

Para validar la compatibilidad de los atrayentes o conservadores que se utilizaron en formulaciones con *B. bassiana*, se realizaron ensayos previos de viabilidad. La viabilidad de los conidios se evaluó inmediatamente después de mezclar con atrayentes (tiempo cero) y después del almacenamiento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  a los 5 y 30 días. Se prepararon suspensiones con conidios y se utilizó un control negativo (sin atrayente o conservador). Todos los tratamientos se prepararon con una solución de INEX-A® al 0.5% y se ajustaron a  $4.3 \times 10^8$  conidios/mL. Se probó tres atrayentes químicos y dos conservadores a tres concentraciones, como sigue:

Atrayentes o conservadores	Concentraciones	Abreviación
Ácido láctico	2, 4 y 8 µg/mL	<b>AL</b>
Sacarosa	1%, 5% y 10%, peso/vol	<b>Sc</b>
Acetona	1 %, 5% y 10% vol/vol	<b>AC</b>
Ácido bórico	1%, 5% y 10%, peso/vol	<b>AB</b>
Miel	1%, 5% y 10%, peso/vol	<b>M</b>
<i>Spirulina</i>	3.8% peso/vol	<b>Esp</b>

Se evaluaron tres réplicas de cada tratamiento (19 tratamientos con conidios del IA y 2 controles). Se determinó el porcentaje de germinación, utilizando como referencia la germinación del tubo germinativo, la viabilidad de conidios se determinó en medio de PDA en placas de Petri por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), seleccionando las diluciones de conidios a evaluar, en función de los resultados de porcentaje de viabilidad. Las medias de UFC de los datos entre los tratamientos mantenidos a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , se realizó un

análisis de normatividad de los datos, y posteriormente los métodos estadísticos correspondientes.

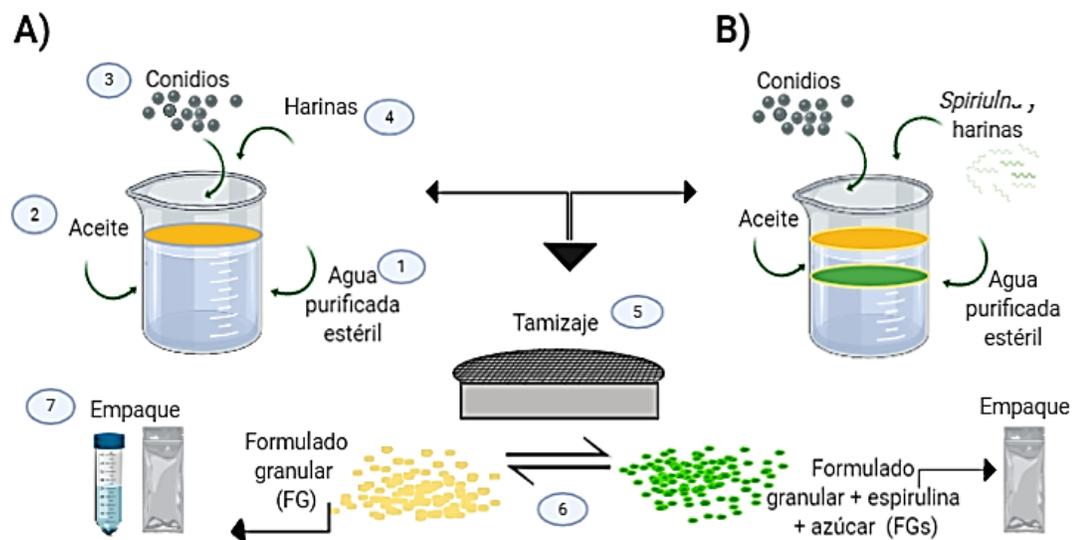
### **5.3.2 Preparación de formulados**

Para el desarrollo de formulado microgranular (FMG) se utilizó una matriz a base de harinas y grasa vegetal descrita en la Tabla 1. Para el FMG solo y con *Spirulina* (FMGsSp), respectivamente, se agregaron los componentes líquidos en un vaso de precipitado y posteriormente los conidios de *B. bassiana* con una concentración  $\sim 1 \times 10^{10}$  conidios/g, se adicionaron los gramos correspondientes para ajustar a la concentración deseada de  $1 \times 10^8$  con/g, se mezclaron los líquidos perfectamente con ayuda de una espátula y se adicionaron lentamente los sólidos hasta obtener una mezcla homogénea (Fig. 2, Tabla 1). Los microgránulos se obtuvieron con el uso de un tamiz fino No. 40 (apertura de 426  $\mu\text{m}$ ), los gránulos que se obtuvieron fueron de un tamaño de partícula que permita pasar por ese tamiz (Fig. 2). Para preparar el tratamiento a base de fibra de coco, denominado formulado sólido con *Spirulina* sp. o FSSp, se mezclaron los ingredientes sólidos (sacarosa pre-pulverizada, grasa vegetal y *Spirulina*) a la mezcla se incluyó en la fibra de coco, la cual se molió finamente y esterilizó antes de mezclarse con el resto de los ingredientes (Tabla 1).

### **5.3.3 Evaluación de la acción atrayente de *Spirulina* sp. en un formulado granular**

Para el desarrollo de la FMG y FS (Fig. 2); se realizaron diferentes pruebas preliminares. Se probó la acción atrayente solos: i) sacarosa refinada y sacarosa al 2% grado laboratorio (Tabla 2). Para esto, se utilizaron adultos hembras y machos de *Ae. aegypti* y se transfirieron a una jaula de mariposas (Carolina® *Biological Supply Company*, China) y dentro de la jaula se colocó una trampa para mosquitos doméstica convencional en forma de embudo, el cual a su vez contenía el tratamiento en un algodón. La trampa casera convencional consistió en una botella de refresco de plástico vacía de 2 L, cortando un tercio del área superior para lograr un recipiente con forma de embudo y se colocó boca abajo en

el lado superior de la botella cortada. Se contó el número de mosquitos que se encontraban dentro de la trampa doméstica después de 48 h (Morato *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Preparación de formulaciones granulares **A)** Granulado con IA. **B)** Granulados con IA más atrayentes (elaboración original).

**Tabla 1.** Ingredientes para el desarrollo de formulaciones a base de *B. bassiana*

Ingredientes	FMG	FMGs	FS
Conidios <i>B. bassiana</i>	(IA, $1 \times 10^8$ conidios/gramo)		
Conidios	0.9 g	0.9 g	0.9 g
Harina de maíz	21.5 g	8.14 g	-
Fécula de maíz	21.5 g	8.14 g	-
Agua purificada	30 mL	30 mL	-
Aceite	16 mL	16 mL	-
Sacarosa (1%)	-	0.9	0.9 g
Grasa vegetal (25%)	-	22.5 g	22.5 g
<i>Spirulina</i> (3.8%)	-	3.4 g	3.4 g
Fibra de coco	-	-	62.3 g
Total		90 g	

**FMG** = Formulado microgranular, **FMGs** = Formulado con atrayentes y conservadores, **FS** = Formulado sólido.

En un segundo experimento, **ii**) se desarrollaron dos FMG utilizando harina y fécula de maíz, aceite y agua purificada estéril y todos estos componentes se mezclaron perfectamente en combinación con atrayentes y/o acción conservadora de viabilidad de conidios (FMGs) (Tabla 2). Cada FMGs se obtuvo bajo la metodología anteriormente mencionada y con los ingredientes (Fig. 2, Tabla 1). Cada tratamiento se colocó dentro de trampas domésticas, como se mencionó anteriormente en la prueba de atrayentes solos.

Se seleccionó el FMGs que presentó los mejores resultados para el siguiente experimento, **iii**) preparando los tratamientos descritos en la Tabla 2, FMG + atrayente + *Spirulina* (3.8%) secado por 17 h y el segundo tratamiento fue: FMG + atrayente + *Spirulina* (3.8%) secado por 17 h y se humedeció con 6 mL de agua purificada estéril, simulando a un producto comercial granulado humectable. El conteo de mosquitos dentro de las trampas domésticas se determinó después de 48 h y se obtuvo el porcentaje de atracción.

**Tabla 2. Tratamientos preliminares de evaluación de atrayentes sobre adultos de *Ae. aegypti***

Nº de prueba preliminar	Tratamiento	mL/g utilizados	Rep	Nº adultos <i>Ae. aegypti</i> /rep
i) Sacarosa	Sacarosa 2% comercial	4 mL	3	15
	Sacarosa 2% grado laboratorio			
ii) FMG más atrayentes	FMG + sacarosa (2%) (FMGs)	6 g		
	FMG + sacarosa (2%) + <i>Spirulina</i> (3.8%) (FMGsSp)			
iii) FMGsSp seco y húmedo	FMG + atrayente + <i>Spirulina</i> (3.8%) seco			
	FMG + atrayente + <i>Spirulina</i> (3.8%) húmedo			

### 5.3.3.1 Evaluación de viabilidad de un formulado microgranular con *Spirulina* sp.

Al formulado con mejores características de atracción se le incluyó una suspensión de *B. bassiana* a una concentración final de  $2.6 \times 10^4$  conidios/g con una viabilidad inicial

de 70% y se prepararon de cuatro a seis réplicas para cada temperatura de almacenamiento a 28 °C (Ta) y a 4 °C (Tr). Para la evaluación de vida de anaquel del formulado, se tomaron 50 mg de cada una de las réplicas del FMGsSp-IA y se resuspendieron en 1000 µL de INEX-A® 0.02%, manejándolo como solución stock; a partir de ésta se prepararon diluciones 1/10 de cada stock, las cuales se emplearon para realizar las pruebas de porcentaje de germinación, utilizando el método de micro cultivo. Para lograrlo, en un trozo de 1 cm<sup>2</sup> del medio papa dextrosa agar (PDA) solidificado, colocando en un portaobjetos y encima del trozo de PDA, se adicionaron 10 µL de la dilución preparada. Pasadas 17 h de incubación a temperatura ambiente, se realizó el conteo de conidios viables y no viables; se consideraron conidios viables aquellos que tenían un tuvo germinativo dos veces más grande que su diámetro. Las evaluaciones se realizaron en los tiempos: 0, 15, 30 y 45 días en ambas temperaturas de almacenamiento. El formulado con mejores resultados se seleccionó para su evaluación de vida de anaquel por mayor tiempo y se tomaron en cuenta los atrayentes con mejores resultados para la preparación del FMG y FS a base de fibra de coco.

#### **5.3.4 Vida anaquel de un formulado microgranular en polvo y uno sólido.**

Los tratamientos consistieron en la matriz de harinas, agua y aceite anteriormente mencionada, así como el mismo de preparación y las variantes consisten en adición de grasa vegetal o bien en la adición de fibra de coco molida y estéril para la formulación sólida y su preparación se realizó conforme a la metodología descrita en la Fig. 2 (Tabla 1). Los formulados FMG y FS se envasaron al vacío, con ayuda de una máquina de vacío de uso doméstico (Tabla 3).

Todos los formulados se prepararon bajo condiciones de esterilidad y de cada formulado se preparó la cantidad en gramos suficiente para obtener tres réplicas de 90 g c/una; se separaron en alícuotas de cada réplica en porciones de 10 g c/u, de manera que cada alícuota sirvieran para cada evaluación que se hizo tanto de vida de anaquel, como de efectividad que fueron evaluados en diferentes tiempos (0 y 30 días). Los tratamientos que se analizaron se describen a continuación (Tabla 3).

Los formulados evaluados fueron: FMGsSp, FMGs, FSSp, FS, y se almacenaron en dos condiciones de temperatura: 28°C y 4°C (Tabla 3).

**Tabla 3. Tratamientos de formulaciones microgranulares y sólidos a dos temperaturas de almacenamiento (4°C y 28°C).**

Tratamientos	Nombre abreviado	
FMG + IA + sacarosa + grasa veg. + <i>Spirulina</i> (FMGsSp)	FMGsSp28	FMGsSp4
FMG + IA + sacarosa + grasa veg. (FMGs)	FMGs28	FMGs4
FS + IA + sacarosa + grasa veg. + <i>Spirulina</i> + fib. coco (FSSp)	FSSp28	FSSp4
FS + IA + sacarosa + grasa veg. + fib. coco (FS)	FS28	FS4
Control positivo (INEX-A 0.5% + IA)	C(+)-28IA	C(+)-4IA
Control negativo (INEX-A 0.5%)	C(-)-28	C(-)-4

**FMG**= Formulado microgranular, **FMGsSp**= Formulado microgranular con *Spirulina*, **FS**= Formulado sólido, **FSSp**= Formulado sólido con *Spirulina*, **IA**= Ingrediente activo.

Las evaluaciones de viabilidad de conidios de los diferentes tratamientos se realizaron a los 0 días (17 h post-preparación), a los 15, y 120 días. Para cada evaluación, se tomó una muestra de 50 mg de cada tratamiento y réplica en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. Al tubo se le adicionó 1000 µL de solución de INEX-A® al 0.5% y se mezcló agitando cada tubo por un lapso de 30 segundos, después se realizaron tres diluciones sucesivas 1:10 y de la última dilución se tomaron 100 µL y se inocularon en placas de PDA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 a 6 días y se procedió a obtener el conteo de UFCs de cada tratamiento.

#### **5.4 Efectividad insecticida de los formulados contra adultos de *Ae. aegypti*, en pruebas de laboratorio.**

Los formulados a evaluados fueron los mismos desarrollados para la evaluación en anaquel; FMGsSp, FMGs, FSSp y FS en ambas temperaturas (Tabla 3). La efectividad de los formulados se evaluó realizando tres réplicas y 10 mosquitos adultos para cada réplica de cada tratamiento y se expusieron durante 48 h a cada tratamiento y posteriormente se sustituyó el formulado por un algodón con sacarosa al 5%, la sobrevivencia se obtuvo

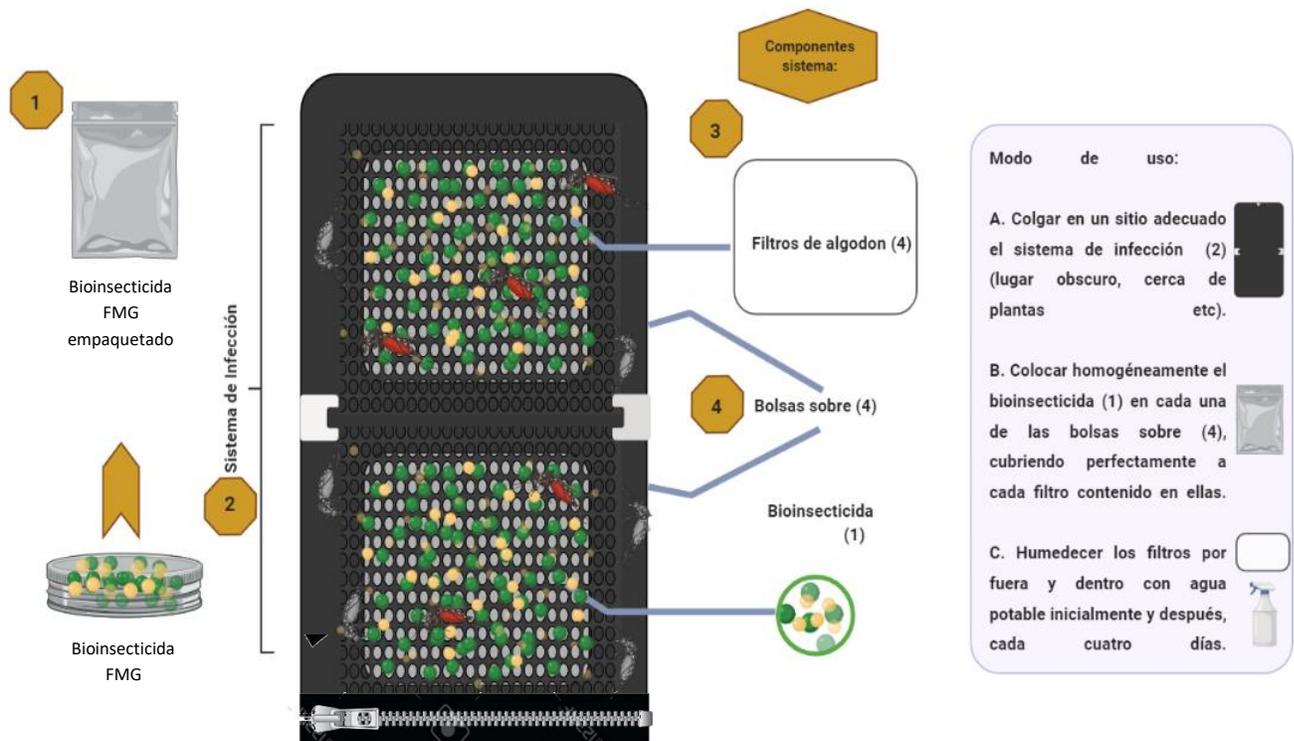
diariamente durante 16 días. Para la manipulación de mosquitos se inmovilizaron durante 5 min a 4 °C. Los sistemas de infección consistieron en un bote de 1 L y la tapa del contenedor se le quitó la mayoría de la superficie para recubrir con una malla fina, donde se colocó de 5 g de cada formulado o el algodón con sacarosa, cuando pasó el tiempo de exposición a cada tratamiento. Las evaluaciones se realizaron al tiempo cero (24 h después de la preparación de los tratamientos) y a los 30 días. A los mosquitos que murieron se les realizó un lavado con hipoclorito de sodio al 2% y después con agua estéril, para eliminar cualquier microorganismo oportunista, posterior a esto se colocaron en cámara húmeda para detectar crecimiento micelial del hongo y corroborar la mortalidad por *B. bassiana* (Tamayo-Mejía *et al.*, 2016).

### **5.5 Diseño y evaluación de trampas a nivel laboratorio.**

En el diseño de la trampa, se realizó usando como referencia las trampas convencionales forradas con tela he impregnadas con conidios de HEP (Mackay *et al.*, 2013; Unlu *et al.*, 2014; de Paula, 2018). Para el desarrollo del prototipo se consideraron factores como la capacidad atrayente para hembras grávidas, así como la adición de un formulado quimio-atrayente de hembras y machos, a base de *B. bassiana* (Fig. 3). El formulado tiene la bi-funcionalidad de atraer e infectar por contacto a las hembras o machos al entrar a la trampa y, lograr la transmisión del hongo en caso de que la tengan la oportunidad de un segundo apareamiento (Reyes-Villanueva *et al.*, 2011). Y Para el desarrollo del sistema de infección, se utilizó una trampa la cual constaba de la unión de dos mallas plásticas de 33 x 27 cm cada una como soporte formando un cilindro y forradas por una tela impermeable. Dentro del cilindro se encontraban 8 bolsas de tela en las cuales se colocaron 20 g de formulado por bolsa, se colocó un techo de hule plástico para protección de factores adversos del ambiente, tales como la lluvia, y por dentro, al centro del hule se colocó una tira de pegamento para la captura de mosquitos.

Con base en los mejores resultados previos de atracción de mosquitos y mortalidad a una formulación granular o sólida a base de *B. bassiana*, se evaluó en el sistema bifuncional trampa-formulado. Se usó una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/g de formulado.

Para la evaluación de atracción del sistema bifuncional trampa-formulado la cual contenía una tira de pegamento en medio, para atrapar a los mosquitos atraídos, se expusieron 50 mosquitos en una jaula con dimensiones 80 × 80 × 150 cm y los mosquitos se colectaron a los 5 días de exposición.



**Figura 3.** Prototipo de sistema de infección para hembras grávidas, adicionado con un formulado quimio-atrayente de hembras y machos, a base de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 (elaboración original)

### 5.6 Evaluación de trampas a nivel de campo.

El formulado con mejores resultados de atracción y efectividad, así como el prototipo de trampa desarrollado se evaluaron en campo. Se seleccionaron 20 casas de dos colonias con incidencia de mosquitos de un municipio en Nuevo León. Cada colonia estará por lo menos a 200 m de distancia. Las zonas que rodeaban a cada sitio donde se realizó cada control biológico, se efectuó una previa descacharrización, eliminado cualquier foco de crianza de

larvas. Además, en coordinación con la Secretaría de Salud del Estado, se aplicó en zonas que rodeaban a las seleccionadas para el manejo biológico, insecticida químico, generando barreras para posterior evaluación de los formulados. Se colocó 1 trampa por cada casa, y estas se asperjaron durante un mes con una solución de sacarosa al 5% los lunes de cada semana, y con agua los días miércoles y viernes para mantener la humedad. Asimismo, de ambas trampas se realizó un muestreo de mosquitos semanal, el cual consistió en retirar las tiras de pegamento en las cuales se encontraban mosquitos atrapados.

Los mosquitos que se obtuvieron en cada semana se les realizó un lavado con hipoclorito de sodio al 2% y después con agua estéril, para eliminar cualquier microorganismo oportunista superficial, posterior a esto se colocaron en cámara húmeda para detectar si había crecimiento micelial del hongo (Tamayo-Mejía *et al.*, 2016). A los mosquitos positivos se les tomó una muestra con un asa bacteriológica y se diluyó en INEX-A® al 0.5%, para posteriormente sembrarlo en PDA y se comprobó la presencia de *B. bassiana* mediante de la morfología típica de la cepa utilizada.

## 5.7 Análisis Estadístico

Para los datos de número de UFC de los ensayos que se realizaron de compatibilidad de conidios con diferentes aditivos de los 18 tratamientos se analizaron en cada tiempo (0, 5 y 30 días de almacenamiento) mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido de una prueba *prueba HSD de Tukey*, ( $P = 0.05$ ). En cuanto a los experimentos de la evaluación de la acción atrayente de *Spirulina* sp., los datos de porcentajes de moscos atraídos por sacarosa refinada o sacarosa pureza de laboratorio, la evaluación de porcentaje de atracción a formulados con adición de sacarosa o de *Spirulina* sp., la evaluación del número de UFC de los ensayos y la vida anaquel del formulado granular con mejores resultados de atracción y con la adición de *B. bassiana* almacenados a  $T_a$  y  $T_r$ , y para evaluar el porcentaje de mortalidad ocasionado por el formulado sin y con adición de *B. bassiana* se realizó la prueba *t* de Student.

Para los ensayos de vida de anaquel de los formulados desarrollados; FMGsSp, FMGs, FSSp y FS, que se almacenaron en dos condiciones diferentes de temperatura y se

evaluaron a los 0 días (17 h post-preparación), a los 15, 30 y 120 en cada tiempo para una misma temperatura se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía, y para la separación de medias de los seis tratamientos se usó un análisis no paramétrico HSD de Tukey ( $P < 0.05$ ). Para validar el efecto de temperatura sobre los formulados se realizó en cada tiempo para cada tratamiento un análisis estadístico, con los datos del número de UFC obtenido en cada temperatura mediante la prueba  $t$  de Student.

De los mismos tratamientos señalados en el párrafo anterior, se obtuvo la efectividad insecticida, mediante el porcentaje de mortalidad de los cuatro tratamientos en dos tiempos diferentes; al tiempo cero (24 h después de la preparación de los tratamientos) y a los 30 días, los cuales no se sometieron al análisis estadístico correspondiente, debido a que solamente se contaba con dos réplicas de cada tratamiento. Para analizar el efecto de temperatura de almacenaje de cada tratamiento se realizó una prueba  $t$  de Student.

Para el experimento del diseño de trampas se evaluaron una trampa de diseño propio, un control con el formulado sin *B. bassiana* y otra con el formulado más efectivo, y los datos obtenidos de atracción de mosquitos a cada trampa se analizó mediante una prueba  $t$  de Student). Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS Versión 21.0 (2008).

## 6. RESULTADOS

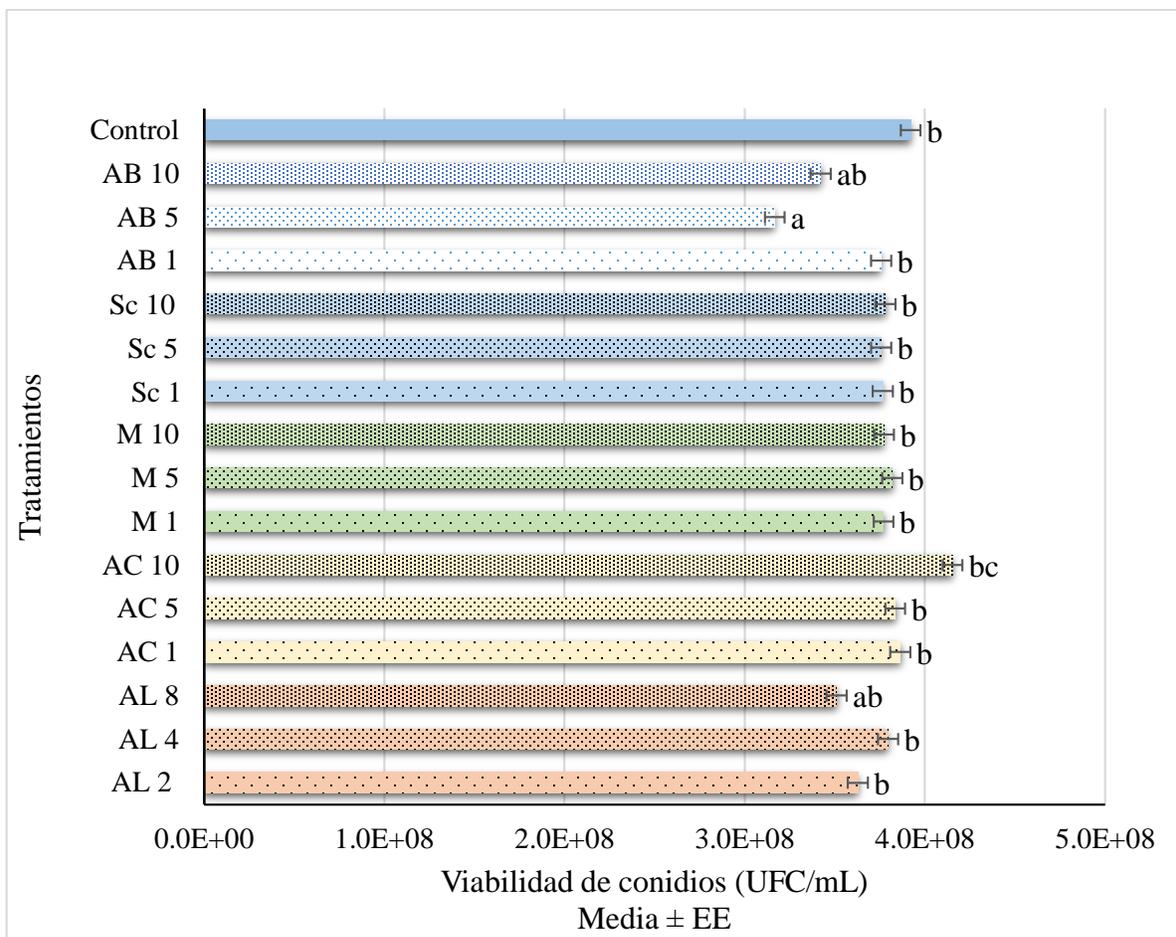
### 6.1 Vida de anaquel de *B. bassiana* en un formulado microgranular

#### 6.1.1 Compatibilidad de conidios de *B. bassiana* con atrayentes y conservadores.

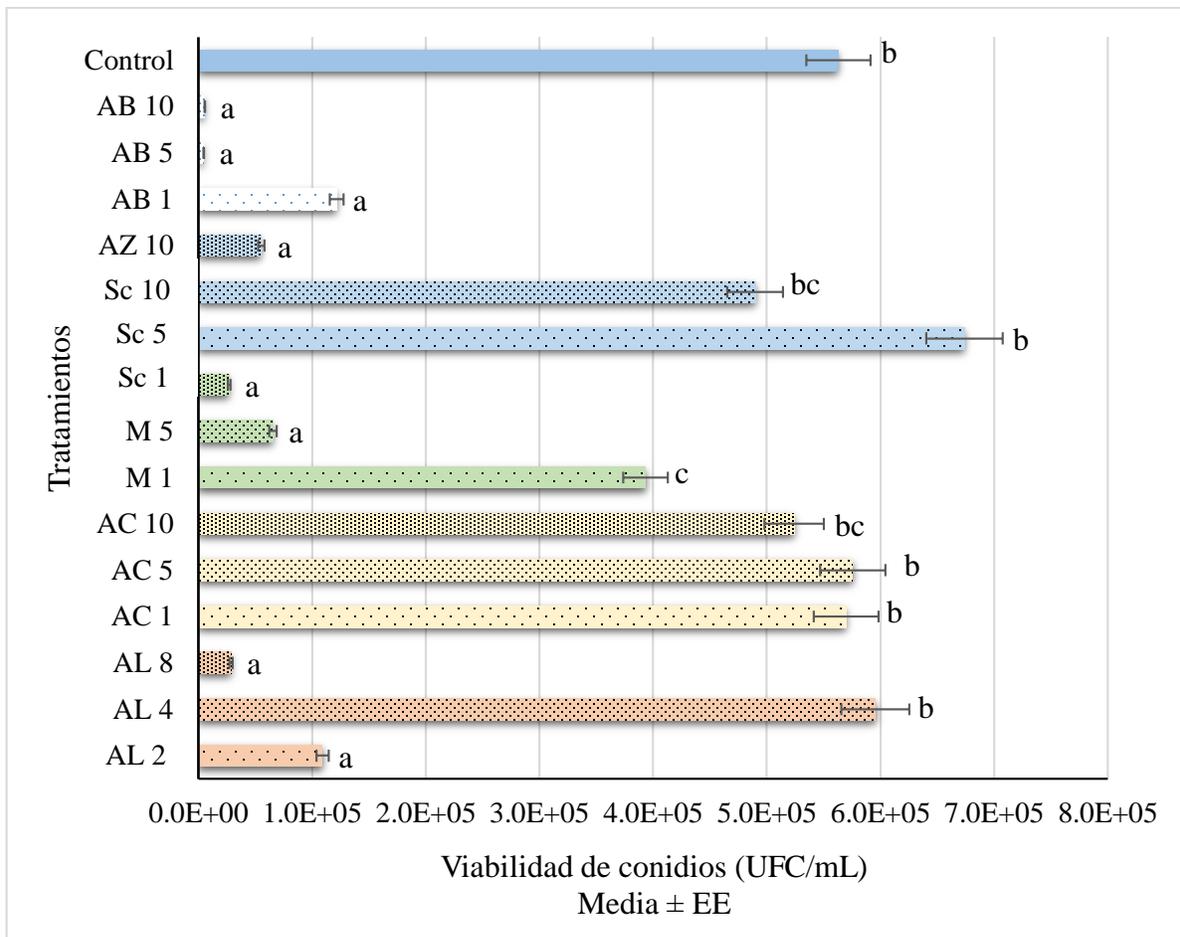
Las mezclas de conidios en concentraciones de  $4.8 \times 10^8$  conidios/mL en mezcla diferentes aditivos, como; acetona, miel, ácido bórico y sacarosa (1, 5 y 10%) y ácido láctico (2, 4 y 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), en general mostraron no tener un efecto negativo sobre la concentración de conidios al inicio del experimento, sin embargo hay un efecto en la reducción de la viabilidad de conidios a los 5 y 30 de exposición a los diferentes tratamientos a los que fueron expuestos, mostrando un rango reducido de  $7.58 \times 10^5$  a  $1.8 \times 10^4$  y  $4.5 \times 10^5$  a 0, de UFC, respectivamente.

No se observó una toxicidad al tiempo cero de los diferentes aditivos utilizados, a excepción del ácido bórico al 5% y al ácido láctico a los 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , los cuales mostraron diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto al resto de los tratamientos con un número de  $3.2 \times 10^8$  y  $3.51 \times 10^8$  UFC, respectivamente (Fig. 4).

La viabilidad de los conidios a los cinco días, los aditivos mostraron una pérdida de la viabilidad hasta 3 veces en los tratamientos con ácido bórico (10, 5 y 1 %), miel (10 y 5%) y ácido láctico (8 y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mientras que los tratamientos que mostraron una mayor viabilidad fueron los conidios en mezcla con sacarosa (5 y 1%), acetona (10, 5 y 1%) y ácido láctico (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) manteniéndose de  $6 \times 10^5$  a  $7 \times 10^5$  UFC (Fig. 5).

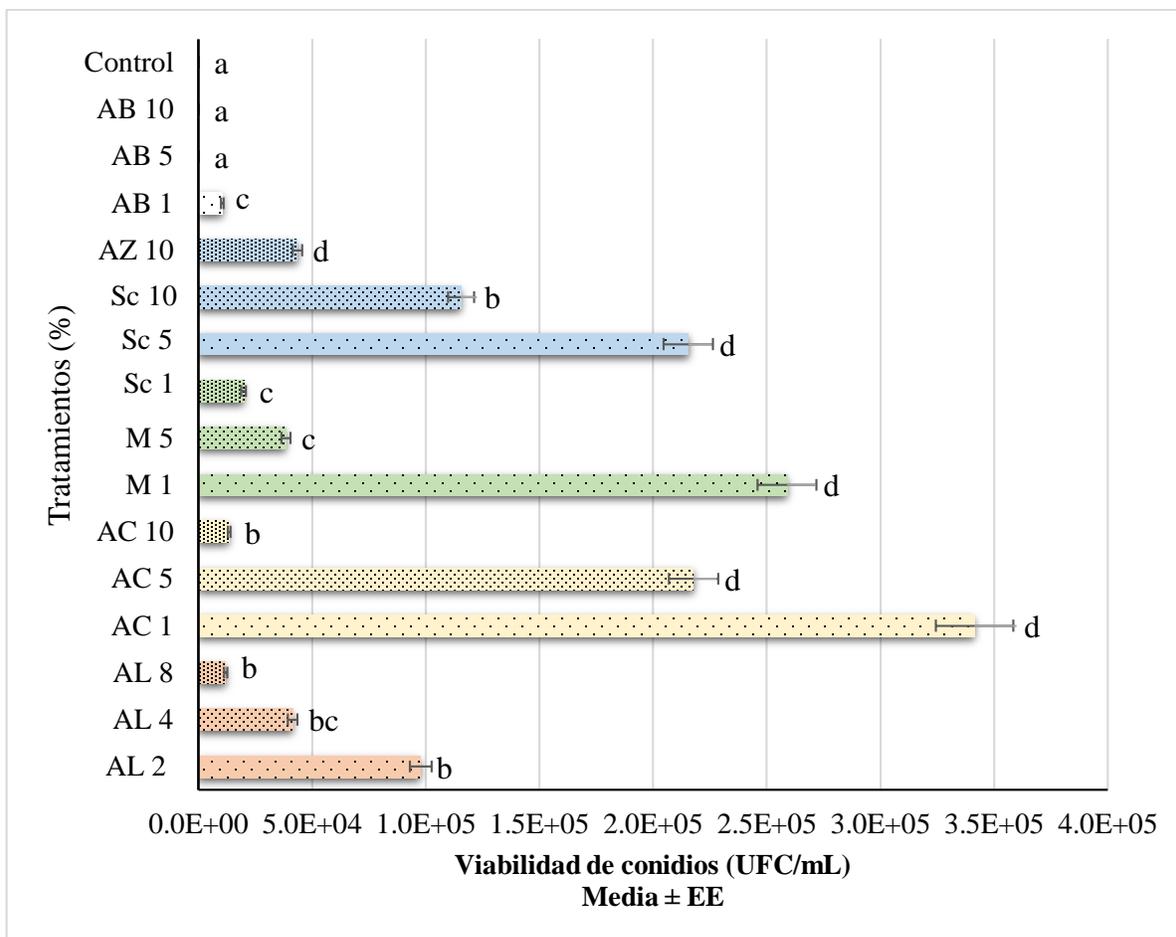


**Figura 4.** Viabilidad de conidios al tiempo cero en unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 ( $4.3 \times 10^8$  conidios/mL) en solución INEX-A al 0.5% mezclados con ácido bórico (AB), sacarosa (Sc), miel (M), acetona (AC) (1%, 5% y 10%) y ácido láctico (AL) (2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Las medias en cada columna seguidas de una letra minúscula diferente son diferentes estadísticamente (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).



**Figura 5.** Viabilidad de conidios después de 5 días de almacenamiento ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .) en unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 ( $4.3 \times 10^8$  conidios/mL) en solución INEX-A al 0.5% mezclados con ácido bórico (AB), sacarosa (Sc), miel (M), acetona (AC) (1%, 5% y 10%) y ácido láctico (AL) (2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Las medias en cada columna (letras minúsculas) seguidas de una letra diferente son diferentes estadísticamente (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).

A los treinta días de almacenamiento, la viabilidad de los conidios se perdió hasta 1 a 4 veces en la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, la acetona (1 y 5%), sacarosa y miel al (1%) mantuvieron la viabilidad de conidios en concentraciones en un rango de  $4.89 \times 10^4 - 1.04 \times 10^5$  conidios/mL, con respecto al control (0 conidios/mL) (Fig.6).



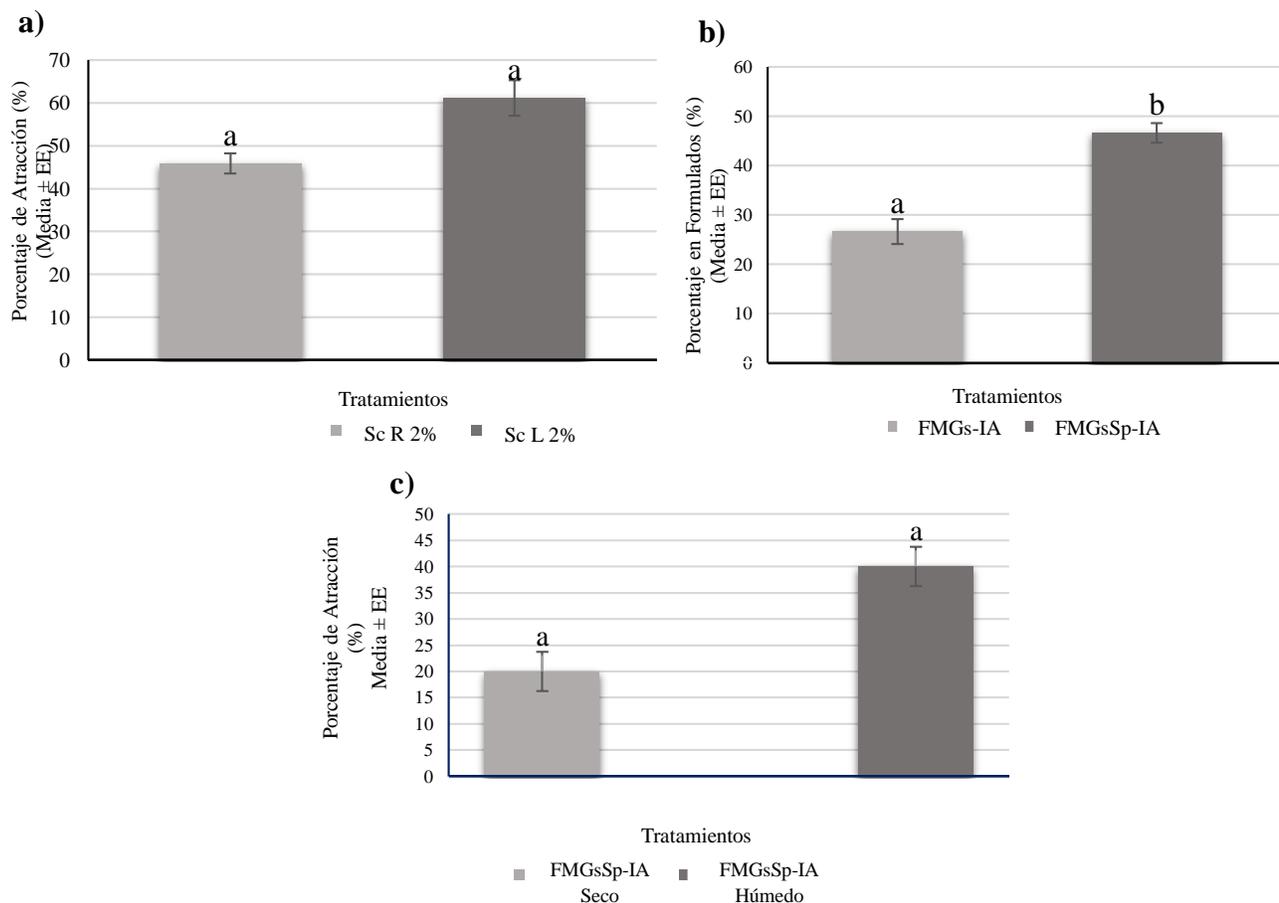
**Figura 6.** Viabilidad de conidios después de 30 días de almacenamiento ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}.$ ) en unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 ( $4.3 \times 10^8$  conidios/mL) en solución INEX-A al 0.5% mezclados con ácido bórico (AB), sacarosa (Sc), miel (M), acetona (AC) (1%, 5% y 10%) y ácido láctico (AL) (2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Las medias en cada columna (letras minúsculas) seguidas de una letra diferente son diferentes estadísticamente (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).

Con base en los resultados de viabilidad obtenidos anteriormente, se seleccionó a la sacarosa, para su adición a los formulados granulares ya que, en ensayos preliminares, se demostró que tiene un mayor efecto atrayente en mosquitos, aunque en nuestro estudio no se detectaron diferencias significativas de viabilidad entre conidios expuestos a sacarosa, miel o acetona al 1% (Castillo, 2018).

## 6.1.2 Pruebas, preliminares de distintos atrayentes

### 6.1.2.1 Evaluación de la acción atrayente de dos aditivos: sacarosa o de *Spirulina sp.* a un formulado microgranular.

Los resultados de la acción atrayente de la sacarosa refinada y de laboratorio, ambas al 2%, muestran un mayor porcentaje de atracción de mosquitos a la de nivel laboratorio con un 61.11%, en comparación con sacarosa refinada con 45.8%, aunque estos no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Fig. 7A).

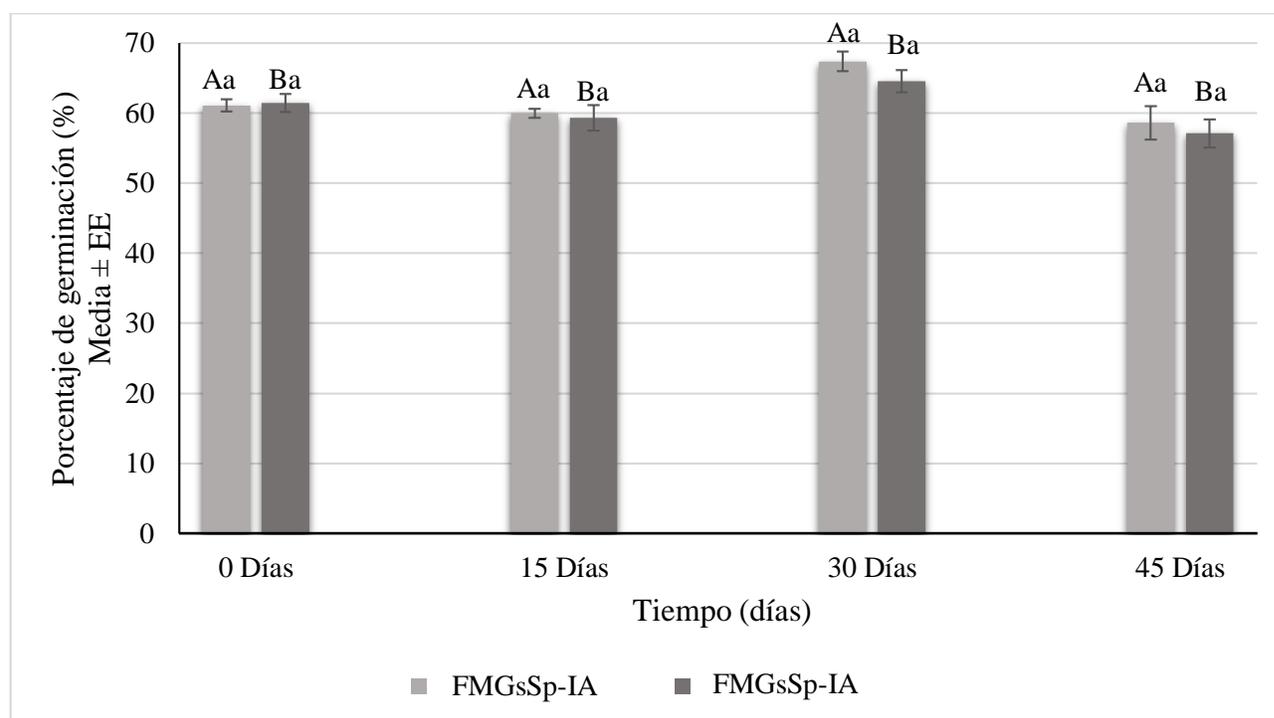


**Figura 7.** Porcentaje de atracción de adultos *Ae. aegypti* utilizando diferentes tratamientos a) sacarosa nivel laboratorio (Sc L 2%) y sacarosa refinada comercial (Sc R 2%), b) FMG + sacarosa 2% (FMGs-IA) y FMG + sacarosa al 2% + *Spirulina* (FMGsSp-IA), c) FMG + sacarosa al 2% + *Spirulina* (FMGsSp-IA) seco y húmedo. Las medias representan el promedio de tres repeticiones (prueba *t-Student*,  $P < 0.05$ ).

En cuanto al experimento ii, el FMG + sacarosa (2%) + *Spirulina* sp. mostró 20% más de atracción comparado con FMG + sacarosa (2%) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7B). Sin embargo, al probar el tratamiento que dio mejores resultados (FMGsSp-IA); no se encontraron diferencias significativas ( $t = -2.121$ ,  $gl = 2$ ) entre el formulado húmedo o seco (Fig. 7C), aunque el FMGsSP-IA húmedo fue un 20% mayor (Fig. 7C).

### 6.1.3 Evaluación de viabilidad de un formulado microgranular con adición de sacarosa y *Spirulina* sp.

Los ensayos realizados en la vida de anaquel del FMG a base de conidios de *B. bassiana* con sacarosa y *Spirulina* sp. (FMGsSp-IA), no mostró reducción en el porcentaje de germinación del hongo tanto a temperatura ambiente como en refrigeración (Fig. 8).



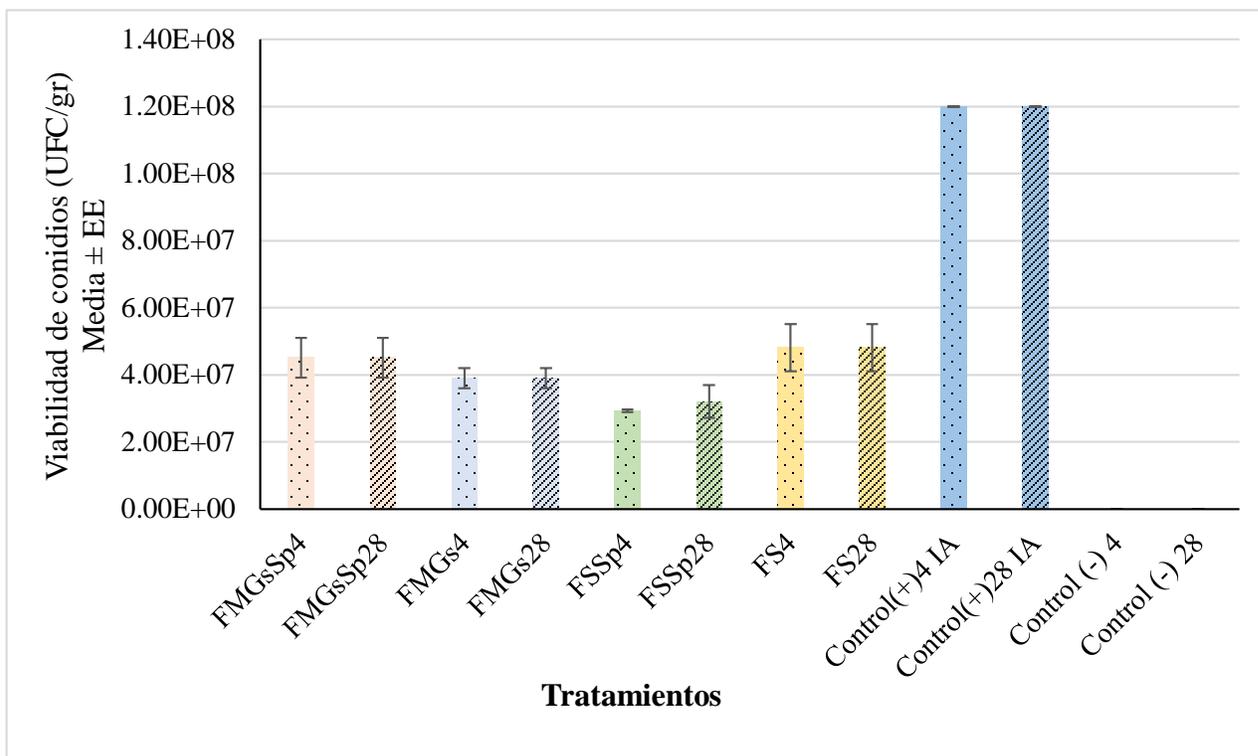
**Figura 8.** Porcentaje de germinación de *B. bassiana* después de 0, 15, 30 y 45 días de adicionar los tratamientos FMG + sacarosa + *Spirulina* (FMGScSp-IA) a temperatura ambiente ( $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ) y en refrigeración ( $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ). Los valores seguidos de letras mayúsculas diferentes en barras gris claro o gris oscuro, fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ). Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes son estadísticamente diferentes para las comparaciones en cada tiempo de evaluación de los dos formulados ( $P < 0.05$ ).

#### 6.1.4 Vida anaquel de un formulado microgranular en polvo y uno sólido.

Se realizaron cuatro distintos tratamientos, los cuales se almacenaron en refrigeración ( $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y a temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Al evaluar la viabilidad de los formulados al tiempo cero de almacenamiento, los diferentes tratamientos almacenados a ambas temperaturas mostraron una menor concentración ( $4.8 \times 10^7$ ,  $3.8 \times 10^7$ ,  $2.9 \times 10^7$  y  $4.5 \times 10^7$  UFC/g) el cual resulto altamente significativo ( $P < 0.01$ ), en comparación con el control ( $1.2 \times 10^8$  UFC/g).

Con los datos obtenidos de los formulados almacenados a  $4^{\circ}\text{C}$  se observó que los tratamientos FMGsSp4 y FMGs4 mostraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) en su viabilidad con una concentración de  $4.51 \times 10^7$  UFC/g y  $3.89 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente. Las viabilidades de los tratamientos FMGs4 y FMGs28 ( $3.8 \times 10^7$  UFC/g) tanto como FS4 y FS28 ( $4.81 \times 10^7$  UFC/g) en el tiempo 0 de almacenamiento no mostraron diferencias contra ninguno de los otros tratamientos. Por otro lado, el tratamiento FSSp4 mostró una disminución en la viabilidad ( $2.92 \times 10^7$  UFC/g) altamente significativa ( $P < 0.01$ ) al compararlo con el tratamiento FSSp28 ( $3.2 \times 10^7$  UFC/g). La viabilidad observada en FMGsSp28 ( $4.5 \times 10^7$  UFC/g) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) al FSSp28 ( $3.8 \times 10^7$  UFC/g) y FSSp ( $3.2 \times 10^7$  UFC/g) mostro un rango reducido altamente significativo ( $P < 0.01$ ) con la viabilidad del tratamiento FS ( $4.18 \times 10^7$  UFC/g) (Fig. 9).

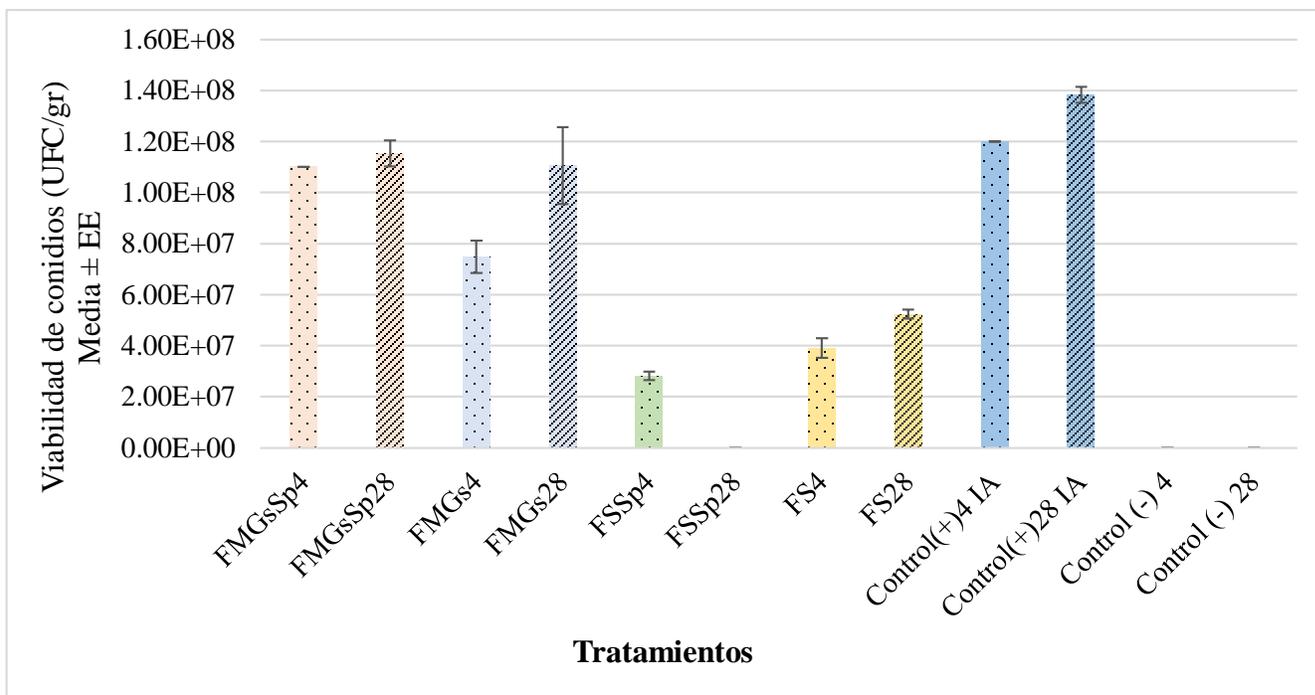
En cuanto a los 15 días de almacenamiento de los formulados, se encontró que todos los tratamientos tanto a  $4^{\circ}\text{C}$  como a  $28^{\circ}\text{C}$ , tuvieron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) en su viabilidad a comparación con el control. El tratamiento FMGsSp4 aumentó su viabilidad a  $1.1 \times 10^8$  UFC/g, lo cual resultó altamente significativo ( $P < 0.01$ ) con la viabilidad de los tratamientos FMGs4, FSSp4 y FS4 de  $7.49 \times 10^7$ ,  $2.83 \times 10^7$  y  $3.9 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente.



**Figura 9.** Viabilidad de conidios al tiempo cero en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de formulado de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 en 4 distintos formulados almacenados a 4 °C y a 28 °C (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).

Respecto los tratamientos almacenados a 28 °C, FMGsSp28 ( $1.1 \times 10^8$  UFC/g) mostró una viabilidad mayor que resultó altamente significativa ( $P < 0.01$ ) comparada contra la de los tratamientos FS28 ( $5.2 \times 10^7$  UFC/g) y FSSp28, el cual perdió totalmente su viabilidad (0 UFC/g). La viabilidad de los conidios en el tratamiento FMGsSp28, no mostró diferencia con ningún otro tratamiento.

Los formulados FMGsSp4 ( $1.1 \times 10^8$  UFC/g) y FMGsSp28 ( $1.1 \times 10^8$  UFC/g), no mostraron diferencias significativas entre ellos, mientras que la concentración en la viabilidad de FMGs4 fue significativamente menor ( $7.4 \times 10^7$  UFC/g) ( $P < 0.05$ ) comparada con la de FMGs28 ( $1.1 \times 10^8$  UFC/g). Las concentraciones de conidios en los tratamientos FSSp4 y 28 ( $2.8 \times 10^7 - 0$  UFC/g), FS4 y 28 ( $3.9 \times 10^7 - 5.2 \times 10^7$  UFC/g) y el control positivo ( $1.2 \times 10^8 - 1.3 \times 10^8$  UFC/g) fueron altamente significativos entre los mismos tratamientos a diferentes temperaturas (Fig. 10).

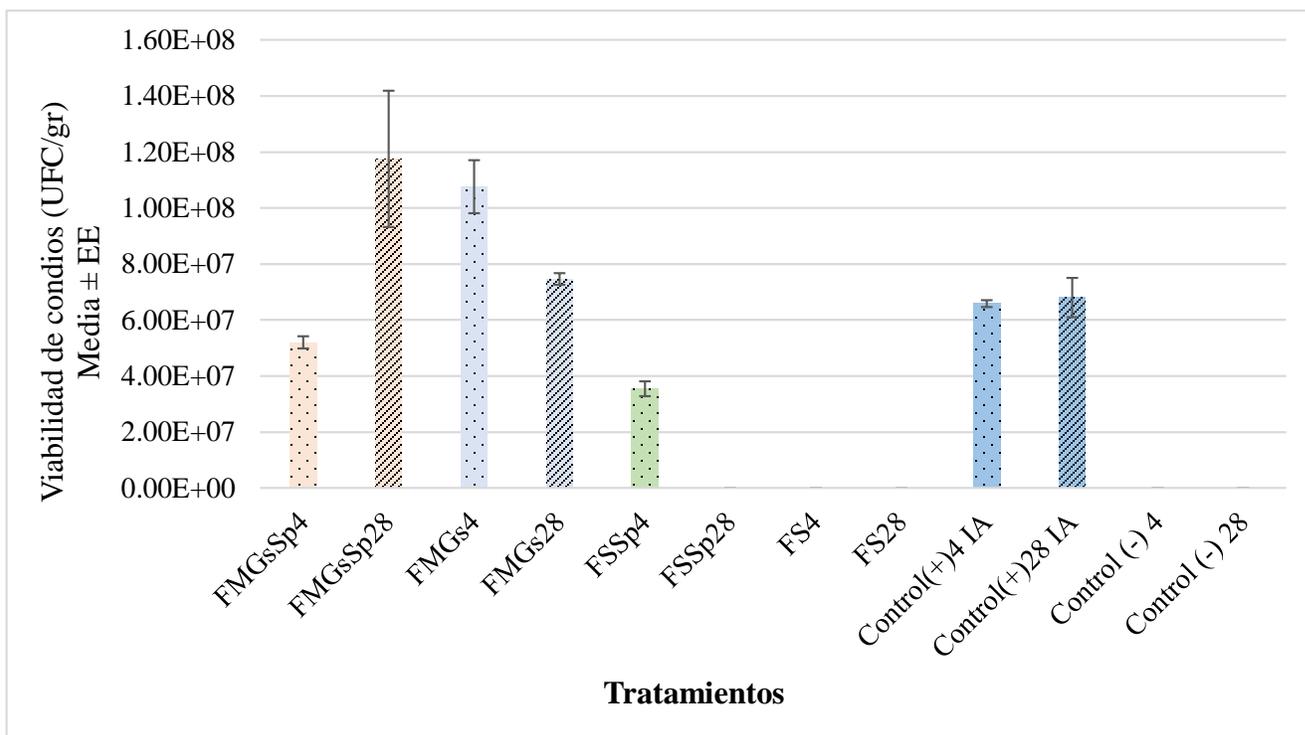


**Figura 10.** Viabilidad de conidios después de 15 días en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de formulado de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 en 4 distintos formulados almacenados a 4 °C y 28 °C (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).

En los resultados obtenidos a los 30 días de almacenamiento se encontró que las viabilidades de todos los tratamientos tanto a 4 °C como a 28 °C de almacenamiento a excepción de FMGsSp28 ( $7.4 \times 10^7$  UFC/gr), tuvieron diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ) con el control positivo ( $6.5 \times 10^7 - 6.8 \times 10^7$  UFC/g). La concentración de FMGsSp4 ( $5.2 \times 10^7$  UFC/g) tuvo una diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) entre FMGs4, FSSp4 y FS4, con una viabilidad de  $1.8 \times 10^8$ ,  $3.5 \times 10^7$  y 0 UFC/g, respectivamente.

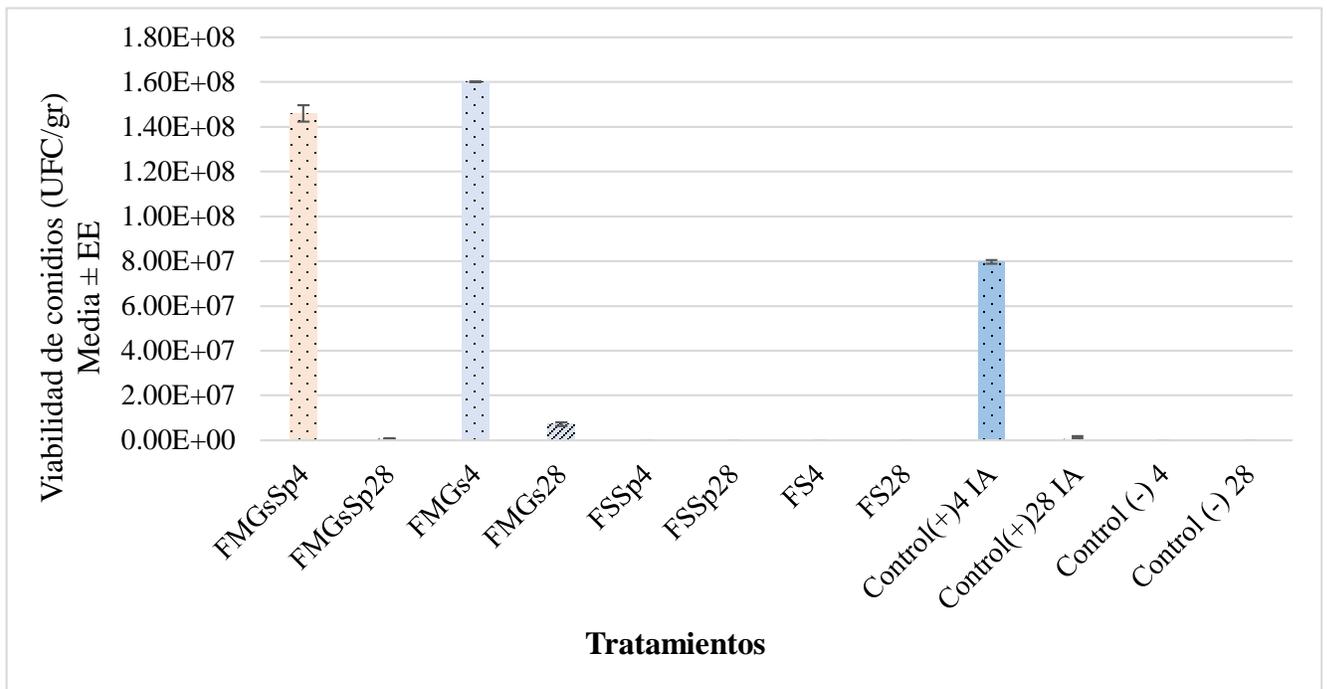
La viabilidad de los conidios en el tratamiento FMGsSp28 resultó mayor ( $1.1 \times 10^8$ ) ( $P < 0.01$ ) comparado con los tratamientos FMGs28 ( $7.4 \times 10^7$  UFC/g), FSSp28 y FS28 (no se detectó viabilidad), los cuales perdieron la viabilidad en su totalidad. La viabilidad de FMGsSp4 tuvo una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en comparación con las concentraciones de los tratamientos FMGsSp28 ( $1.1 \times 10^8$  UFC/g), FMGs4 ( $1 \times 10^8$  UFC/g),

y FMGs28 ( $7.4 \times 10^7$  UFC/g). La concentración de conidios en el formulado FSSp28 disminuyó en su totalidad, caso contrario a lo observado con el tratamiento FSSp4, que mostró una concentración significativamente mayor ( $3.5 \times 10^7$  UFC/g) (Fig. 11).



**Figura 11.** Viabilidad de conidios al tiempo 30 días en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de cuatro distintos formulados con conidios de la cepa *B. bassiana* BBPTG4, almacenados a 4 °C y 28 °C (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).

En cuanto a los 120 días de almacenamiento todos los tratamientos almacenados a 28°C incluyendo el control a excepción de FMGs28 con  $7.2 \times 10^6$  UFC/g, perdieron su viabilidad al 100%, no obstante, la concentración de FMGs28 tuvo una diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) menor que la concentración de FMGs4 ( $1.6 \times 10^8$  UFC/g). Además, entre las concentraciones de los formulados almacenados a 4°C, FPS4 ( $1.4 \times 10^8$  UFC/g) mostró diferencia altamente significativa con la concentración de FP4 ( $1.6 \times 10^8$  UFC/g) (Fig. 12).



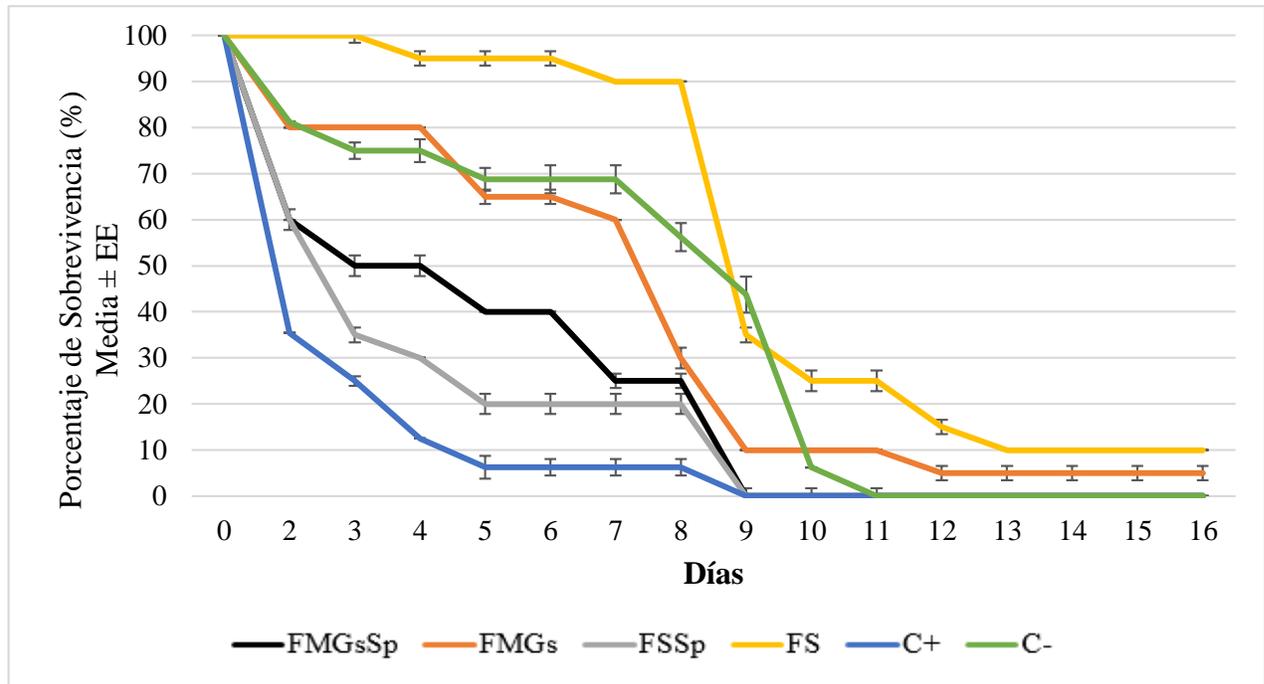
**Figura 12.** Viabilidad de conidios después de 120 días, en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de formulado de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 en cuatro distintos formulados almacenados a 4 °C y 28 °C (prueba HSD de Tukey,  $P < 0.05$ ).

### 6.1.5 Efectividad insecticida de los formulados contra adultos de *Ae. aegypti*, en pruebas de laboratorio.

Al evaluar la efectividad de los cuatro formulados expuestos por 48 h en adultos de *Ae. aegypti*, se mostró una tendencia de mortalidad en todos los casos. Al día 5 de ser expuestos, el control positivo (C+), el cual era una solución de conidios al  $1 \times 10^8$  conidios/mL de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 mostró un porcentaje de sobrevivencia de 6.25%, mientras que el formulado en polvo con *Spirulina* (FMGsSp) y el formulado solido con *Spirulina* (FSSp) un 40 y 20% respectivamente. El resto de los tratamientos (FSSp, FS) a los cinco días mostraron una sobrevivencia por arriba del 65%.

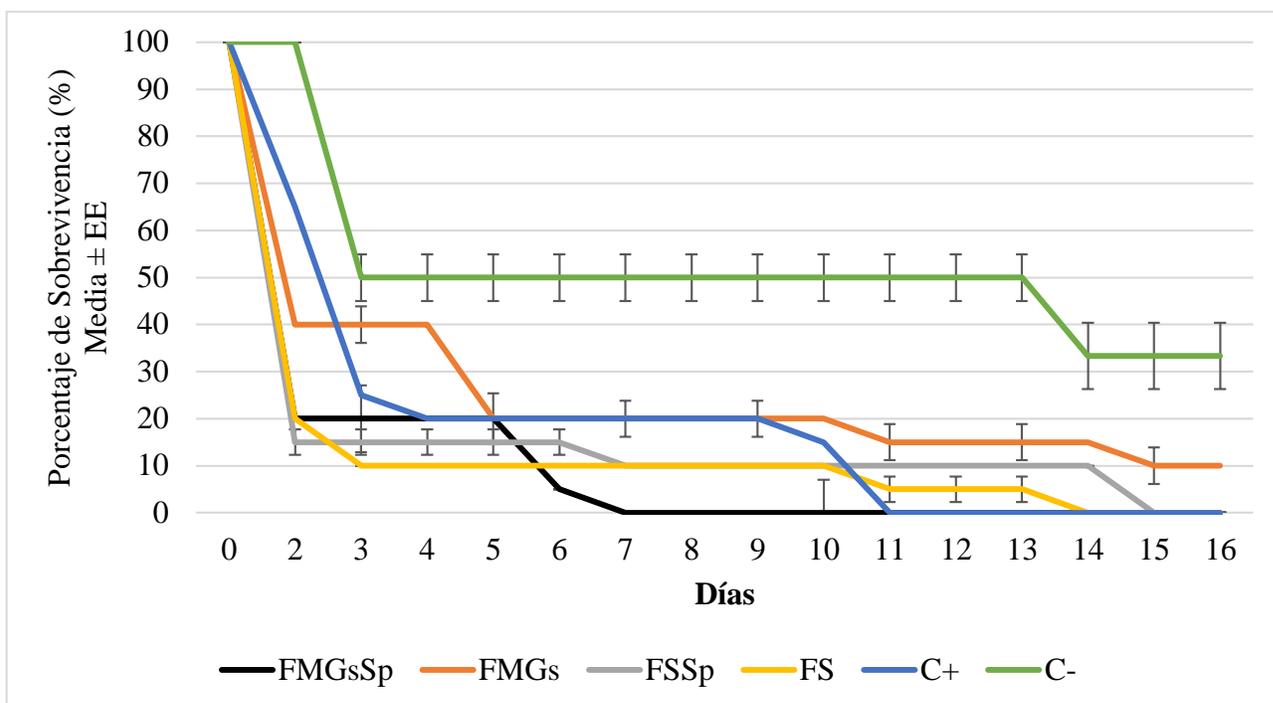
Para el día 9, estos mostraron la disminución de la sobrevivencia en su totalidad. En cuanto a los tratamientos sin presencia de *Spirulina*, para el día 16 el formulado en polvo

(FP) mostró una sobrevivencia del 5%, mientras que el formulado sólido (FS) una sobrevivencia del 10% (Fig. 13).



**Figura 13.** Porcentaje de sobrevivencia de adultos *Aedes aegypti* expuestos a cuatro distintos formulados de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 al tiempo cero de almacenamiento.

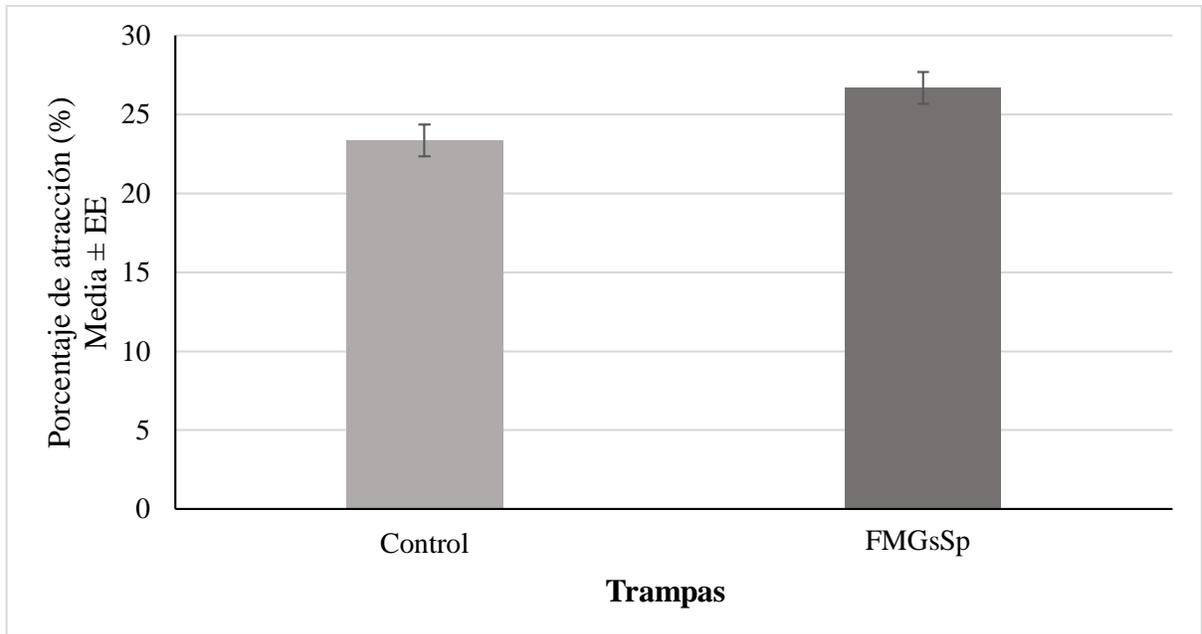
Los resultados de los formulados a los 30 días de almacenamiento, mostraron una efectividad en la mortalidad de los mosquitos. El FMGsSp fue el más efectivo, ya que a los 7 días después de la exposición, ya que no mostró porcentaje de sobrevivencia, a diferencia de los demás, ya que FSSp y FS mostraron una sobrevivencia del 10%, y por otro lado FMGs y el C+ mantuvieron una sobrevivencia del 20%. El C+, FS y FSSp disminuyeron la sobrevivencia en su totalidad hasta los 11, 14 y 15 días, respectivamente, a diferencia del control negativo, el cual al día 16, mantuvo una sobrevivencia del 33.3% (Fig. 14).



**Figura 14.** Porcentaje de supervivencia de adultos *Aedes aegypti* expuestos a cuatro distintos formulados de la cepa *B. bassiana* BBPTG4 almacenados por 30 días.

### 6.1.6 Evaluación de trampas a nivel laboratorio.

Se evaluó el porcentaje de atracción de dos trampas; un control, el cual contenía el formulado en polvo sin el ingrediente activo (IA) y otra con el formulado FMGsSp, el cual mostró un mejor resultado, en la viabilidad. En los resultados obtenidos, la trampa con FMGsSp mostró un 26.5% de atracción, mientras que la trampa control un 23.4%, aunque no se mostraron diferencias significativas entre ellos ( $P > 0.05$ ) (Fig.15).



**Figura 15.** Porcentaje de atracción de adultos de *Aedes aegypti* expuestos a trampas de laboratorio con formulados funcionales, *t*-student.

## 6.2 DISCUSIÓN

Se ha documentado la atracción de mosquitos hacia la acetona, ácido láctico y sacarosa, pero no se ha evaluado la citotoxicidad de estos en combinación con conidios de *B. bassiana*. En el presente estudio los conidios que permanecieron en suspensión con los diferentes aditivos probados y el surfactante INEX-A al 0.5% no mostraron efecto citotóxico en el tiempo 0, a excepción del ácido bórico al 10%, el cual mostro diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto al resto de los compuestos (Fig. 4). Después de 5 días de almacenamiento a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , los conidios perdieron significativamente su viabilidad ( $P < 0.05$ ) independientemente del tratamiento (Fig. 5). Según Khachatourians y Qazi (2008), este descenso puede deberse a los cambios en la permeabilidad membranal de los conidios, ya que estos fueron almacenados en suspensión y a temperatura ambiente, lo que permite la producción de enzimas, tales como proteasa, quitinasas, lipasas, peptidasas y fosfolipasas, mismas que tuvieron efecto sobre la degradación de éstas unidades infecciosas.

Posteriormente, los conidios en el tratamiento control, que se encontraban en suspensión en INEX-A 0.5%, tuvieron una disminución del 100% de viabilidad a los 30 días de almacenamiento (Fig. 6). En un estudio realizado por Mascarin y Jaronski (2016), mencionan que esto se puede deber a que el surfactante favorece la germinación de los conidios, y, por ende, su muerte debido a la escasez de nutrientes y oxígeno.

En un estudio por Luo *et al.* (2012) mencionan que el estrés osmótico puede jugar un papel importante en la viabilidad de los conidios a lo largo del tiempo, probablemente a la sobresaturación y la pérdida de turgencia de la pared celular, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la viabilidad de los conidios en este estudio, ya que estos la perdieron significativamente ( $P < 0.05$ ), independientemente de la sustancia química probada, pero principalmente en los tratamientos con ácido láctico y sacarosa a altas concentraciones; no obstante, se observó que después de los 30 días de almacenamiento, los conidios mostraban una mejor viabilidad en los tratamientos con acetona 1% o 5%, sacarosa y miel al 1% (Fig. 6), resultados que demuestran un posible efecto conservador o de compatibilidad sobre los conidios. En otros estudios como en el de Faraji *et al.* (2016) mencionan que puede existir la compatibilidad de *B. bassiana* con otras sustancias, incluso con pesticidas químicos y semioquímicos, tales como abamectina, deltametrina, imidacloprida y espinosad.

Por otro lado, Steiner *et al.* (2018) observaron que, al adicionar sacarosa como cebo en trampas, estas mostraron un aumento significativo en la atracción de diferentes arbovirus. En el presente estudio, al probar la acción atrayente de la sacarosa refinada y la del laboratorio al 2%, se mostró un mayor porcentaje de atracción de mosquitos a la sacarosa con un 61.11% en comparación con sacarosa con un 45.8%, pero estos no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) (Fig. 7A), lo que nos indica de acuerdo a los costos, utilizar sacarosa refinada para formulaciones posteriores.

Darbro *et al.* (2012) reportaron una mortalidad aproximadamente del 60% después de 10 días de exposición con *B. bassiana*. En el presente estudio, al evaluar la adición de *Spirulina* al FMG + sacarosa 2% con el IA (FMGsSp-IA), este mostró una atracción mayor al 20% ( $P < 0.05$ ) de *Ae. aegypti*, también aumentando significativamente su mortalidad en un 26.7% (Fig. 7B). Al evaluar la formulación húmeda, se encontró que ésta mejora el porcentaje de atracción en un 20%, lo cual puede deberse a la reactivación de los microorganismos presentes (*Spirulina* y otros); sin embargo, la diferencia no fue significativa comparada con el FMGsSp-IA seco (Fig. 7C).

En un estudio realizado por Corrêa *et al.* (2015) utilizaron la fibra de coco en la formulación para mejorar la vida de anaquel de *Pseudomonas chlororaphis*, la cual se pudo conservar hasta por 32 semanas. No obstante, eso fue lo contrario a lo que se mostró en este estudio, ya que los formulados que tenían como matriz la fibra de coco, mostraron una disminución altamente significativa ( $P < 0.01$ ) de la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* desde el día 15 y para los 30 días ya habían perdido la viabilidad de los conidios en su totalidad (Fig. 10 y 11), lo que sugiere que probablemente este tipo de sustrato y a pesar de su previa molienda, no genera una mezcla homogénea y por lo tanto los conidios quedan más expuestos ante factores abióticos que perjudican la viabilidad de este (luz, aumento de temperaturas, baja humedad, etc.).

Las formulaciones más efectivas fueron la de los tratamientos FMGsSp4 y FMGs4, a base de harina, almidón de maíz y grasa vegetal, los cuales mantuvieron la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* en  $1.4$  y  $1.6 \times 10^8$  UFC/g a los 120 días de almacenamiento (Fig. 12); esto puede deberse a que el uso de los distintos aditivos ayudo a la protección de distintos factores abióticos anteriormente mencionados. Por lo tanto, la adición de *Spirulina* aumenta la atracción de *Ae. aegypti*; sin embargo, no otorga ningún beneficio conservador al

formulado microgranular, como se pudo ver en éste experimento con el tratamiento FMGs4 y a temperatura de 28°C en el mismo tratamiento. En un estudio por McGuire *et al.* (1995) realizaron una formulación pulverizable de *Bacillus thuringiensis* (Bt), la cual estaba compuesta por una combinación de sacarosa y almidón de maíz comercial, y observaron en sus bioensayos que las hojas donde trataron con las formulaciones mostraron una mayor actividad residual de Bt después de lluvia en el campo.

Al evaluar la efectividad de los formulados, se observó que al tiempo 0, el control (+) tuvo una mejor efectividad en cuanto al porcentaje de sobrevivencia de *Ae. aegypti*, esto se debió a que los conidios se encontraban más expuestos a los mosquitos, que en formulación. En cuanto a los mejores tratamientos, se encontró que los formulados con adición de *Spirulina* (FMGsSp, FSSp) causaban la mejor disminución de la sobrevivencia en el tiempo 0. No obstante, el mejor tratamiento al tiempo 30, fue el FMGsSp, ya que a los 7 días después de la exposición causó una mortalidad del 100% a diferencia de los demás tratamientos, lo cual concuerda con la viabilidad encontrada en dichos tratamientos en un rango de  $2 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  UFC/g (Fig.13 y 14). En un estudio realizado por Darbro *et al.* (2012) mostraron que el uso de conidios de *B. bassiana* en una formulación líquida con aceite redujo la sobrevivencia de *Ae. aegypti* en un 61 – 69 % después de 10 días de exposición a ellos en un sistema semi-campo con jaulas pequeñas. De Paula *et al.* (2018) utilizaron telas negras impregnadas de conidios de *B. bassiana* en trampas de plástico PET, ellos observaron un aumento de la atracción de *Ae. aegypti* de 31 a 66% y una disminución de la sobrevivencia del 52% en un tiempo de 120 h. En el presente estudio se evaluó una trampa diseñada de tela con la adición de FMGsSp y, se encontró una atracción del 26.5% a diferencia del estudio anterior, esto debido a que el sistema de infección implementado genera una volatilización más acelerada de compuestos atrayentes (sacarosa y *Spirulina*) en condiciones de semi-campo utilizando jaulas (Fig.15).

## 7. CONCLUSIONES

- El uso del ácido bórico al 5% y al ácido láctico a los 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  al tiempo cero, mostraron una disminución significativa de la viabilidad de los conidios de la cepa BBPTG4 de *B. bassiana*.
- La acetona (1 y 5%), sacarosa y miel al (1%) mantuvieron la viabilidad de conidios a los 30 días de almacenamiento.
- Se lograron identificar aditivos compatibles con conidios de *B. bassiana* y acción atrayente de *Ae. aegypti*.
- El formulado microgranular con *Spirulina* sp. (FMGsSp) mostró una mayor atracción comparado con el mismo formulado con sacarosa al 2% (FMGs).
- La viabilidad de los conidios de *B. bassiana* en el FMGsSp no se afectó después de almacenarse por 45 días tanto a temperatura ambiente como en refrigeración.
- Los formulados FMGsSp4 y FMGs4 mantuvieron significativamente la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* PTG4 durante 120 días.
- El formulado FMGsSp fue el más efectivo en el tiempo 0 y 30 días de almacenamiento en la disminución del porcentaje de sobrevivencia de *Ae. aegypti*. Por lo tanto, fue posible el desarrollo de un formulado con una vida de anaquel favorable para mantener la viabilidad de conidios de *B. bassiana*, así como ser efectivo para atraer y reducir la sobrevivencia de *Ae. aegypti*.
- La trampa con FMGsSp en el laboratorio, mostro un mayor porcentaje de atracción en *Ae. aegypti*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alean, C. I. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Tesis doctoral, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas, Microbiología Agrícola y Veterinaria, Bogotá, DC, CO. 107 p.
- Arredondo-García, J. L., Méndez-Herrera, A., y Medina-Cortina, H. 2016. Arbovirus in Latin America. *Acta pediátrica de México*, 37(2), 111–131.
- Bates, A. 1970. The Natural History of Mosquitoes and Plasmodium Parasites. *New York: Gloucester. Mass. Peter Smith*. New York, States United.
- Bernier, U. R., Kline, D. L., Posey, K. H., Booth, M. M., Yost, R. A., y Barnard, D. R. 2003. Synergistic attraction of *Aedes aegypti* (L.) to binary blends of L-lactic acid and acetone, dichloromethane, or dimethyl disulfide. *Journal of medical entomology*, 40, 653–656.
- Bisset-Lazcano, J. A., Mondelo, R. E., Rodríguez-Coto, M. M., Leyva, R. Y., Hurtado-Núñez, D., y Fuentes, I. 2014. Evaluación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Argentina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 6(3), 360–369.
- Brady, O. 2019. Disease Risk: Mapping the emerging burden of dengue. *eLife*, 8, e47458.
- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., ... y Powell, J. R. 2014. Los impactos humanos han dado forma a la evolución histórica y reciente en *Aedes aegypti*, el dengue y el mosquito de la fiebre amarilla. *Evolución*, 68(2), 514-525.
- Brown, J. E., McBride, C. S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., ... y Black IV, W. C. 2011. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple ‘domestications’ of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: biological sciences*, 278(1717), 2446–2454.
- Bukhari, T., Takken, W., y Koenraadt, C. J. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites & vectors*, 4(1), 23.
- Carbajo, A. E. 2003. Distribución espacio-temporal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): su relación con el ambiente urbano y el riesgo de transmisión del virus dengue en la

- Ciudad de Buenos Aires. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Castillo, S. 2018. Vida de anaquel de conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* Sorokin en microcápsulas con polímeros a base de maíz y atrayentes de mosquitos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N. L. México.
- Castrejón, J. E., Núñez, G., Iracheta, M. M., Tamayo, F., Ocampo, J. A., Gomez, R. y Tamez, P. 2017. *Beauveria bassiana* blastospores produced in a selective culture medium reduce the survival time of *Epilachna varivestis* Mulsant larvae. *Southwestern entomologist*, 42(1), 203-220.
- Chadee, D., y Ritchie, S. 2010. Efficacy of sticky and standard ovitraps for *Aedes aegypti* in Trinidad, West Indies. *Journal of vector ecology*, 35, 395–400.
- Christophers, S. R. 1960. *Aedes aegypti* (L.) el mosquito de la fiebre amarilla: su historia vital, bionomía y estructura, Cambridge University Press, Nueva York, USA. 739 p.
- Clement, A. N. 1992. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. Chapman & Hall, London. Control and surveillance of *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 6(1), 225.
- Corrêa, E. B., Sutton, J. C., y Bettioli, W. 2015. Formulation of *Pseudomonas chlororaphis* strains for improved shelf life. *Biological Control*, 80, 50-55.
- Costero, A., Edman, J. D., Clark, G. G., y Scott, T. W. 1998. Life table study of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Puerto Rico fed only human blood versus blood plus sugar. *Journal of medical entomology*, 35(5), 809-813.
- Cuevas, G. A. D. 2020. Identificación molecular de *Beauveria bassiana* para su uso en trampas bifuncionales en el control de *Aedes aegypti* (L). San Nicolás de los Garza, N.L. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. En proceso.
- Darbro, J. M., Johnson, P. H., Thomas, M. B., Ritchie, S. A., Kay, B. H., y Ryan, P. A. 2012. Effects of *Beauveria bassiana* on survival, blood-feeding success, and fecundity of *Aedes aegypti* in laboratory and semi-field conditions. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(4), 656-664.
- de Paula, A., Brito, E., Pereira, C., Carrera, M., y Samuels, R. 2018. Susceptibility of adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria*

- bassiana*: prospects for dengue vector control. *Biocontrol science & technology*, 18, 1017–1025.
- del Carpio-Orantes, L., González-Clemente, M. del C., y Lamothe-Aguilar, T. 2018. Zika and its vector mosquitoes in Mexico. *Journal of Asia-pacific biodiversity*, 11(2), 317–319.
- Deng, S., Huang, Q., Wei, H., Zhou, L., Yao, L., Li, D., ... y Peng, H. 2019. *Beauveria bassiana* infection reduces the vectorial capacity of *Aedes albopictus* for the Zika virus. *Journal of pest science*, 92(2), 781–789.
- Díaz-Badillo, A., Bolling, B. G., Pérez-Ramírez, G., Moore, C. G., Martínez-Munoz, J. P., Padilla-Viveros, A. A., ... y de Lourdes Muñoz, M. 2011. The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasites & vectors*, 4(1), 70p.
- Domsch, K. H., Gams, W., y Anderson, T. H. 1993. Compendium of soil fungi. Institute of Soil Biology. Federal Agricultural Research Centre, 845 p.
- Duque, L., Jonny, E., Muñoz, L., y Navarro-Silva, M. A. 2004. Modelo de simulación para el control del mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue y la fiebre amarilla, por el crustáceo *Mesocyclops* spp. *Revista de salud pública*, 6, 87–99.
- Echeverría-Beirute, F. 2006. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (bálsamo) Vullemin.
- Eltis, D., y Richardson, D. 2010. Atlas of the Transatlantic Slave Trade. The Lewis Walpole series in eighteenth-century culture and history. Ebook. New Haven, Connecticut, USA. Yale University Press. Accesado el 02-Abril-2019.
- Faraji, S., y Shadmehri, A. D., Mehrvar A. 2016. Compatibility of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with some pesticides. *Journal of Entomological Society of Iran*, 36(2):137–146.
- Fauci, A. S., y Morens, D. M. 2016. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. *New England journal of medicine*, 374(7), 601-604.
- Feng, M. G., Poprawski, T. J., y Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol science and technology*, 4(1), 3–34.

- Fernández, S. I. 2009. Biología y control de *Aedes aegypti*. Manual de Operaciones. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. 130 p.
- Figuroa, L. M., Valera, A. y Corredor, D. 2007. Evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Revista de Investigación*, 7(1), 127–131.
- Flores, A. E., Ponce, G., Silva, B. G., Gutierrez, S. M., Bobadilla, C., Lopez, B., ... y Black IV, W. C. 2019. Wide spread cross resistance to pyrethroids in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Veracruz state Mexico. *Journal of economic entomology*, 106(2), 959-969.
- Foster, W. A., y Lea, A. O. 1975. Renewable fecundity of male *Aedes aegypti* following replenishment of seminal vesicles and accessory glands. *Journal of insect physiology*, 21(5), 1085–1090.
- Galván, R. 2016. Nivel de susceptibilidad a insecticidas y mecanismos de resistencia de *Aedes aegypti* (L.) en Puerto Rico. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León). San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., y Martínez, R. F. M. 2014. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte sanitario*, 10(2), 21–28.
- García-Gutiérrez, C., Gómez-Peraza, R., Aguilar, C. E. L., y León-Váldez, A. 2012. Insecticidas biorracionales para el control de mosquitos y moscas negras en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3).
- García-Munguía A. M., Garza-Hernández, J. A., Rebollar-Tellez, E. A., Rodríguez-Pérez, M. A., y Reyes-Villanueva, F. 2011. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & vectors*, 4(1), 24.
- Gibson, D. M., Donzelli, B. G., Krasnoff, S. B., y Keyhani, N. O. 2014. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Natural product reports*, 31(10), 1287-1305.
- Hinestroza-Cordoba, L. I. y López-Malo, A. 2008. Técnicas de encapsulación de microorganismos probióticos con polímeros. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 2. pp 28-35.

- Howard, A., Guessan, R., Koenraadt, C., Asidi, A., Farenhorst, M., Akobéto, M., Knols, B. y Takken, W. 2011. First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria journal*, 10-24.
- Jaronski, S. T. y Jackson, M. A. 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. L.A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (second ed.), Academic Press, San Diego pp, 255-284.
- Johnson, B., Ritchie, S., y Fonseca, D. 2017. Review: The state of the art of lethal oviposition trap-based. *Insects*. (8)5, 1-16.
- Kay, B., y Nam, V. S. 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *The Lancet*, 365(9459), 613-617.
- Khachatourians, G. G., y Qazi, S. S. 2008. Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology. In: Brakhage A. A. Zipfel, P. F. (Eds) *Human and animal relationship, Mycota VI*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 66-66.
- Khosravi, M. y Ghiassi, B. 2014. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Ranian journal of pharmaceutical research*, 13(3), 843-852.
- López, C., Lazo, L., Gil, L., Hermida, L., Guillén, G., Guzmán, G., ... y Valdés, I. 2008. New evidence on the virus capsid as a vaccine candidate against the Dengue 2 virus without the induction of the neutralizing antibodies. *Biotechnología aplicada*, 25, 55.
- Lozano-Fuentes, S., Welsh-Rodriguez, C., Hayden, M. H., Tapia-Santos, B., Ochoa-Martinez, C., Kobylinski, K. C., ... y Steinhoff, D. F. 2014. *Aedes* (Ochlerotatus) *epactius* along an elevation and climate gradient in Veracruz and Puebla States, Mexico. *Journal of medical entomology*, 49(6), 1244-1253.
- Luo, X., Keyhani, N. O., Yu, X., He, Z., Luo, Z., Pei, Y., y Zhang, Y. 2012. The MAP kinase Bbslt2 controls growth, conidiation, cell wall integrity, and virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Fungal genetics and biology*, 49(7), 544-555.
- Mackay, A., Amador, M., y Barrera, R. 2013. An improved autocidal gravid ovitrap for the control and surveillance of *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 6, 225.

- Marcondes, C. B., y Ximenes, M. D. F. F. D. 2016. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, 49(1), 4-10.
- Marina, C. F., Bond, J. G., Muñoz, J., Valle, J., Chirino, N., y Williams, T. 2012. Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico. *Parasites & vectors*, 5(1), 95.
- Martínez, M. G. V., Compean, G. B., Estrada, J. L. T., Sandoval, J. A. J., Fernández, C. F. M., y Ordóñez, T. L. 2008. Estrategias de control biológico. En: Manual para la Vigilancia y el Control del Paludismo en Mesoamérica. Rodríguez M. H., Ulloa-Garcias, A. y Ramsey-Willoquet, J. M. (Eds.). Ed. Instituto Nacional de Salud Pública, México. pp 149-163.
- Mascarin, G. M., y Jaronski, S. T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World journal of microbiology and biotechnology*, 32, 177.
- McBride, C., Baier, F., Omondi, A., Spitzer, S., Lutomiah, J., Sang, R., Ignell, R. y Vosshall, L. 2014. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. *Nature*, 13515(7526), 222-227.
- McGuire, M. R., y Shasha, B. S. (1995). Starch encapsulation of microbial pesticides.
- Morato, V. C., Teixeira, M. D. G., Gomes, A. C., Bergamaschi, D. P., Y Barreto, M. L. 2005. Infestation of *Aedes aegypti* estimated by oviposition traps in Brazil. *Revista de saude publica*, 39, 553-558.
- Moreno-Velandia, C. A., Cotes, A. M., Beltrán-Acosta, C., Bettioli, W. Elad, Y. 2018. Control biológico de fitopatógenos de suelo. En: Agentes de Control Biológico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Mosquera, Colombia: Agrosavia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/34059>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Dengue. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>. Fecha de consulta: 27 de Mayo 2020
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2019. Lucha contra el dengue: Investigación en materia de lucha contra el dengue. Disponible en: <https://www.who.int/denguecontrol/research/es/> Accesado el 31 de Octubre del 2019.

- Ortiz-Urquiza, A., Riveiro-Miranda, L., Santiago-Álvarez, C., y Quesada-Moraga, E. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate pathology*, 105(3), 270–278.
- Ortiz-Urquiza, A., y Keyhani, N. 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, 4(3), 357–374.
- Padilla, J. C., Lizarazo, F. E., Murillo, O. L., Mendigaña, F. A., Pachón, E., y Vera, M. J. 2017. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica*, 37(2), 27–40.
- Parker, C. N., Pereira, R. M., Baldwin, R. W., Chaskopoulou, A., y Koehler, P. G. 2017. Laboratory evaluation of a novel lethal ovitrap for control of *Aedes aegypti*. *Journal of medical entomology*, 54(6), 1666–1673.
- Powell, J. 2018. Mosquito-Borne Human Viral Diseases: Why *Aedes aegypti*? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 98(6), 1563–1565.
- Powell, J., y Tabachnick, W. 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* -a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(1), 11–17.
- Pushpanathan, M. 2017. Lethal ovitrap: A cost-effective weapon to fight Zika virus infection. *Virology research & review*. 1, 1-2.
- Quimbayo, M., Rúa-Urbe, G., Parra-Henao, G., y Torres, C. 2014. Evaluación de ovitrampas letales como estrategia para el control de *Aedes aegypti*. *Biomédica*, 34(3), 473-482.
- Ramírez, H. G., Granja, A. Z., Del Aguila, E. T., y Cantoral, M. T. 2014. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Perú: Servicio Nacional de Sanidad Agraria*. La Molina, Perú.
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N. y Black IV, W.C. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. Review. TropIKA.net. 1-12. <http://journal.tropika.net> Accesado el 31 de Octubre del 2019.
- Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernández, J. A., Garcia-Munguia, A. M., Tamez-Guerra, P., Howard, A., y Rodríguez-Pérez, M. A. 2011. Dissemination of *Metarhizium anisopliae* of low and high virulence by mating behavior in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*. 4, 171.

- Ritchie, S. 2014. Dengue vector bionomics: why *Aedes aegypti* is such a good vector. En *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, D. Gubler (Ed.), Oxfordshire, United Kingdom: CAB International. pp 455–480.
- Rodríguez-González, C. 2018. Monitoreo y control de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba (Tesis de Licenciatura) Córdoba, Argentina.
- Rodríguez, M. M., Bisset-Lazcano, J. A., Hurtado, D., Montada, D., Leyva, M., Castex, M., Hernández, H., O´Farril, L. A., y Fuentes, I. 2016. Estado de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del municipio Pinar del Río. *Revista cubana de medicina tropical*, 68(2), 125–135.
- Rodríguez, W., Marchizeli, I., Batista Filho, A., Giordano, I. B., Denadae, B. E., Fernandes, J. B., y Forim, M. R. 2017. Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. *Acta scientiarum. agronomy*, 39(4), 457–464.
- Sarti, E., Cox, H., Besada-Lombana, S., y Tapia-Maruri, L. 2015. Dengue awareness in Latin American populations: A questionnaire study. *Infectious diseases and therapy*, 4(2), 199–211.
- Scholte, E. J., Ng'Habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., ... & Knols, B. G. 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 308(5728), 1641–1642.
- Secretaría de Salud. 2016. Guía para la instalación y mantenimiento del insectario de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Accesado el 31 de Octubre del 2019. <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/GuiaInstalacionMantenimientoInsectario.pdf>
- Shahid, A. A., Rao, A. Q., Bakhsh, A., y Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of biological sciences*, 64(1), 21–42.
- Silva, L. E. I., de Paula, A. R., Ribeiro, A., Butt, T. M., Silva, C. P., y Samuels, R. I. 2018. A new method of deploying entomopathogenic fungi to control adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of applied entomology*, 142(1–2), 59–66.
- SPSS. 2008. Version 17.0. SPSS Inc., an IBM Company. Chicago, Illinois, USA.

- Steiner, C. D., Riemersma, K. K., Stuart, J. B., Singapuri, A., Lothrop, H. D., y Coffey, L. L. 2018. Scented sugar baits enhance detection of St. Louis encephalitis and West Nile viruses in mosquitoes in suburban California. *Journal of medical entomology*, 55(5), 1307–1318.
- Sutthanont, N., Choochote, W., Tuetun, B., Junkum, A., Jitpakdi, A., Chaithong, U., ... y Pitasawat, B. 2010. Chemical composition and larvicidal activity of edible plant-derived essential oils against the pyrethroid-susceptible and-resistant strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of vector ecology*, 35(1), 106–115.
- Tamayo-Mejía, F., Tamez-Guerra, P., Guzmán-Franco, A. W., y Gomez-Flores, R. 2016. Developmental stage affects survival of the ectoparasitoid *Tamarixia triozae* exposed to the fungus *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 93, 30-36.
- Tamez-Guerra, P., Damas-Buenrostro, G., López-Torres, M., Valadez-Lira, J. A., y Gómez-Flores, R. A. 2013. *Beauveria bassiana* biological control of *P. americana*. Definition: *Beauveria bassiana* isolate BBPTG1, BBPTG2, BBPTG4, BBPTG6, and BBPTG7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Genbank Accession: KC759728; VERSION: KC759728.1, GI:480360075.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Hamm, J. J., Sumner, R. H., y Shasha, B. S. 2000a Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology*. 93, 210–218.
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha B. S., y Galan-Wong, L. J. 2000b. Assessment of microencapsulated formulations, for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of economic entomology*, 93, 219–225.
- Torres-Estrada, J. L., y Rodiles-Cruz, N. del C. 2013. Diseño y evaluación de una ovitrampa para el monitoreo y control de *Aedes aegypti*, principal vector del dengue. *Salud pública de México*, 55(5), 505–511.
- Unidad de Control de Vectores de Puerto Rico. Monitoreo y Vigilancia (UCVPR). 2019. Accesado el 04-Agosto-2019. Disponible: <http://prvectorcontrol.org/monitoreo-vigilancia/>

- Unlu, I., Faraji, A., Indelicato, N., y Fonseca, D. 2014. The hidden world of Asian tiger mosquitoes: Immature *Aedes albopictus* (Skuse) dominate in rainwater corrugated extension spouts. *Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene*, 108(11), 699–705.
- Velandia-Romero, M. L., Olano, V. A., Coronel-Ruiz, C., Cabezas, L., Calderón-Peláez, M. A., Castellanos, J. E., y Matiz, M. I. 2017. Detección del virus del dengue en larvas y pupas de *Aedes aegypti* recolectadas en áreas rurales del municipio de Anapoima, Cundinamarca, Colombia. *Biomédica*, 37, 193-200.
- Verwoerd, D. W. 2015. Definition of a vector and a vector-borne disease. *Revision science teaching*, 34(1), 29–39.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., y Ranson, H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(2), 126–131.
- Wang, C. H., Chang, N. T., Wu, H. H., y Ho, C. M. 2000. Integrated control of the dengue vector *Aedes aegypti* in Liu-Chiu village, Ping-Tung County, Taiwan. *Journal American mosquito control association*, 16(2), 93–99.
- Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C., y Strickman, D. A. 2015. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PloS one*, 10(7), e0133602.
- World Health Organization (WHO). 2010. *Aedes aegypti*: medidas para el control del vector Disponible: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4503:2010-aedes-aegypti-medidas-control-vector](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4503:2010-aedes-aegypti-medidas-control-vector). Accesado el 22 de Octubre del 2019.
- World Health Organization (WHO). 2003. Guidelines for dengue surveillance and mosquito control. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/206987> Accesado el 31 de Octubre del 2019.
- World Health Organization (WHO). 1982. Manual on environmental management for mosquito control, with special emphasis on malaria vectors, Geneva, Switzerland.

## RESUMEN BIBLIOGRAFICO

**Maribel Domínguez Gámez**

**Candidato para el Grado en**

**Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología**

**EFFECTIVIDAD DE UN BIO-INSECTICIDA FÚNGICO CON ADICIÓN DE ATRAYENTES, APLICADO EN TRAMPAS PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* (L.).”**

**Campo de estudio:** Ciencias Biológicas

**Datos Personales:** Nacida en Navojoa, Sonora el 19 de Julio de 1995, hija de Fernando Domínguez Rodríguez y María de Jesús Gámez Esquer.

**Educación:** Egresada de la Universidad de Sonora, grado obtenido Químico Biólogo Clínico desde 2018.

**Presentación en Congreso:** Domínguez-Gámez, M., Zamora-Avilés, N., Ibarra-Elizondo, A. y Tamez-Guerra, P. 2019 “IMPLEMENTACIÓN DE *Beauveria bassiana* EN TRAMPAS AGO® PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti* EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN”. XLII Congreso Nacional de Control Biológico. 7 al 8 de noviembre del 2019 en Boca del Río, Veracruz.