

1-1-2018

Interacción entre el extracto de *Azadirachta indica* y el hongo *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Anopheles albimanus* un vector de la malaria

Miguel Ángel Beltran Ruiz
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia>

Citación recomendada

Beltran Ruiz, M. Á. (2018). Interacción entre el extracto de *Azadirachta indica* y el hongo *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Anopheles albimanus* un vector de la malaria. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/37>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Departamento de Ciencias Básicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Biología by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**Interacción entre el extracto de *Azadirachta indica* y el hongo *Metarhizium anisopliae*
para el control biológico de *Anopheles albimanus* un vector de la malaria**

Miguel Ángel Beltran Ruiz

**Universidad de la Salle
Departamento de Ciencias Básicas
Bogotá D.C., Colombia. 2018**

**Interacción entre el extracto de *Azadirachta indica* y el hongo *Metarhizium anisopliae*
para el control biológico de *Anopheles albimanus* un vector de la malaria**

Miguel Ángel Beltran Ruiz
Trabajo de Grado para optar por título de Biólogo

Directora
Lucia Cristina Lozano Ardila
Microbióloga M.Sc. Ph.D
Profesora asociada

Universidad de la Salle
Departamento de Ciencias Básicas
Programa de Biología
Bogotá D.C., Colombia
2018

Nota de aceptación:

Jurado

Jurado

Directora: Lucia Cristina Lozano Ardila

Bogotá, 2018

Agradecimientos

Primero que todo, agradezco a toda mi familia en especial a mis padres, Jaqueline Rosa Ruiz Tovar y Edward Harold Beltran Angel, los cuales me apoyaron constantemente en este sueño de ser un profesional en Biología. Igualmente agradezco a mis hermanos Adriana Milena Beltran Ruiz y Sergio Alejandro Beltran Ruiz por ser un apoyo emocional en los momentos más difíciles de mi carrera Universitaria. Agradezco sus consejos, apoyo y comprensión una parte de ustedes hace parte de este trabajo de grado. Así mismo quiero agradecer a mis abuelos, primos y tíos quienes me acogieron, acompañaron y guiaron en todo mi desarrollo como profesional.

Agradezco, además, a mis amigos Omar Santiago Chaparro Sierra, Daniel Eduardo Santos, Andrew Sebastián Muñoz Gamba, Camilo Alejandro Álvarez, Andrés Giraldo, Mario Acosta, Julián Beltran Ruge, David Eduardo Collazos Blanco, Sebastián Rojas Ortiz y todos los demás que me acompañaron en este proceso tanto dentro y fuera de la Universidad, no hay duda que ellos contribuyeron no solo en mi formación profesional sino también en mi desarrollo como persona.

Agradezco de ante mano a mi directora de tesis, Lucia Cristina Lozano Ardila, quien me brindo su confianza, guía, apoyo para el desarrollo de este proyecto. De igual forma, agradezco a todos los docentes que contribuyeron mi formación académica, a la Universidad de la Salle, al departamento de Ciencias básicas y al programa de Biología. Gracias por este proceso arduo de aprendizaje.

Por otra parte, estoy muy agradecido por haber contado con el apoyo de la ingeniera del departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de la Salle, Jesica Paola Osorio Díaz. Gracias por su guía, concejos y apoyo; gracias por brindarme el conocimiento en cuanto al manejo de mosquitos, como también el espacio y algunos de los materiales para el desarrollo de los bioensayos.

Nuevamente gracias a todas aquellas personas que contribuyeron a mi formación profesional como a mi formación personal puesto que sin ellas no hubiera podido desarrollar este proyecto de mi vida.

GRACIAS.

Contenido

	Pags.
Lista de figuras.....	6
Lista de tablas.....	7
Resumen.....	8
Introducción.....	9
Objetivos.....	13
Metodología.....	13
Resultados.....	16
Discusión.....	22
Conclusiones.....	24

Lista de figuras

- Figura 1.** Curva de supervivencia de *Anopheles albimanus* expuesto a diferentes concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae*17
- Figura 2.** Curva de supervivencia de *Anopheles albimanus* expuesto a diferentes diluciones del extracto de *Azadirachta indica*..... 18
- Figura 3.** Porcentaje de inhibición en la germinación de *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^5 conidios ml^{-1} en diferentes diluciones del extracto de *A. indica*.....19
- Figura 4.** Porcentaje de inhibición en la germinación de *M. anisopliae* a diferentes concentraciones del hongo en la dilución de 1 ppm del extracto de *A. indica*.....20
- Figura 5.** Crecimiento micelial de *M. anisopliae* de la concentración 1×10^7 conidios ml^{-1} expuesto al método de difusión en pozo a diferentes diluciones del extracto de *A. indica*. A) Control, B) 1000 ppm, C) 10 ppm.....20
- Figura 6.** Curva de supervivencia de *Anopheles albimanus* expuesto a diferentes concentraciones del hongo *Metarhizium anisopliae* en combinación con la dilución de 1 ppm de *Azadirachta indica*.....21

Lista de tablas

Tabla 1. CL50 de *Anopheles albimanus* frente a diferentes concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae* y diluciones del extracto de *Azadirachta indica*.....18

Tabla 2. Actividad larvicida e interacción del hongo *Metarhizium anisopliae* y del extracto *Azadirachta indica* contra las larvas de *Anopheles albimanus*.....22

Resumen

El biocontrol a comparación de los insecticidas químicos es una alternativa para reducir el tamaño poblacional de un organismo de una forma amigable con el medio ambiente, las diferentes interacciones y mezclas entre compuestos plaguicidas son una opción novedosa para reducir la generación de resistencia de los mosquitos hacia los insecticidas más usados en el mundo. En este estudio se determinó el efecto del aceite de nim (*Azadirachta indica*) en combinaciones con el hongo *Metarhizium anisopliae* frente a larvas de *Anopheles albimanus*; para lo cual se realizaron 3 pruebas frente al vector: 1) la virulencia del hongo *M. anisopliae* de manera independiente, 2) la toxicidad del extracto de *A. indica* de manera independiente, 3) la interacción del hongo y el extracto de nim frente al vector. La Concentración letal 50 frente a las larvas de *Anopheles albimanus* al cabo de 5 días en el caso de *M. anisopliae* fue de $3,26 \times 10^5$ conidios ml^{-1} y del extracto *Azadirachta indica* fue de 16 ppm; las mezclas de *A. indica* y *An. albimanus* causaron un efecto sinérgico con una mortalidad del 100% al cabo de 5 días. Por otro lado, la presencia del extracto de *Azadirachta indica* en la concentración de 1 ppm no afecta la germinación de conidios de hongo *M. anisopliae*, y extracto no afecta su crecimiento. Lo anterior, indica que tanto *M. anisopliae*, como el aceite de nim son una buena alternativa para controlar larvas de *An. albimanus* y se pueden considerar buenos candidatos para futuros programas de control biológico de uno de los vectores de la malaria esto con el fin de reducir la incidencia de esta enfermedad en el futuro.

Palabras clave: Biocontrol, sinergia, *Anopheles-albimanus*, Hongos-biocontroladores, Aceite-de-nim.

Abstract

Biocontrol compared to chemical insecticides is an alternative to reduce the population size of an organism in a environmental friendly way. The different interactions and mixtures between organic compounds are an alternative to reduce mosquitoes' resistance to the most commonly used insecticides.. In this study the effect of neem oil (*Azadirachta indica*) in combinations with the fungus *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles albimanus* was determined. Three tests were done against the vector: 1) the virulence of the fungus *M. anisopliae* independently, 2) the toxicity of the extract of *A. indica* independently and 3) the interaction of the fungus and the extract of neem against the vector. The lethal concentration 50 against the larvae of *Anopheles albimanus* in the case of *M. anisopliae* was 3.26×10^5 conidia ml^{-1} and the extract *Azadirachta indica* was 16 ppm; mixtures of *A. indica* and *An. albimanus* caused a synergistic effect with 100% mortality after 5 days. Otherwise, the presence of the extract of *Azadirachta indica* in the concentration of 1ppm does not affect the germination of *M. anisopliae* conidia and extract does not affect fungus growth. The results indicate that both, *M. anisopliae* and neem oil are good alternatives to control larvae of *An. albimanus* and can be considered for future programs of biological control of malaria vectors in order to reduce the its incidence in the future.

Keywords: Biocontrol, Synergy, *Anopheles-albimanus*, Fungi-biocontrollers, Nim-oil.

Introducción

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) son conocidos por ser organismos vectores que transmiten diferentes patógenos provocando enfermedades en diferentes animales (1), como es el caso del género *Aedes* el cual es vector de diferentes arbovirus como los virus del zika, el dengue y la fiebre amarilla; por otro lado el género *Anopheles* es el responsable de transmitir la malaria en humanos (2). Actualmente en la familia Culicidae se reconocen 2 subtribus y 38 géneros (3), en donde el género *Anopheles* de la subtribu Anophelinae es el único que puede transmitir los protozoarios del género *Plasmodium* responsables del paludismo (4); cada año a nivel mundial se reportan 500 millones de casos de esta enfermedad, de los cuales aproximadamente 1 millón desencadena en muertes (5).

Colombia se ubica en una zona tropical con una gran variedad de climas que proporciona un ambiente propicio para el desarrollo abundante de los mosquitos del género *Anopheles* (6), lo cual permite que sea endémico para esta patología. En el país la morbilidad por parte de la malaria que se ha mantenido constante desde 1900 al 2009 en aproximadamente unos 150.000 casos anuales (7, 8); sin embargo, la mortalidad ha disminuido de 180 a 45 casos por año en el mismo periodo de tiempo (8). A pesar de las medidas que se toman para prevenir la propagación de esta enfermedad, el costo económico que se estimó para el control de los mosquitos del género *Anopheles* en el 2012 fue de US 936.253 (9). En los últimos años en el área de la ecoepidemiología nace la urgente y controvertida preocupación de que, debido al cambio climático y los cambios en el uso de la tierra a nivel mundial, se ve afectada la distribución, la intensidad y la estacionalidad de las enfermedades transmitidas por vectores. La transmisión de la malaria depende de las condiciones de crecimiento óptimas tanto para el vector, como para el parásito y por ello el aumento drástico en la incidencia de la malaria a nivel mundial puede atribuirse a factores climáticos, sociales políticos y demográficos (10–12). Caminade y colaboradores (2014) estimaron que para el año 2050 y 2080, aumente la incidencia de la malaria a nivel mundial específicamente en regiones que se encuentren por encima de 1000 m.s.n.m. (13).

De las 460 especies de *Anopheles* actualmente reportadas se han reconocido 100 de ellas como vectores de la malaria y sólo de 30 a 40 especies como vectores de los protozoarios más comunes del género *Plasmodium* que causan esta enfermedad, como lo son *P. malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. knowlesi* (14). En América latina la mayoría de los investigadores consideran en general a *An. darlingi* el vector más ampliamente distribuido de la malaria y a *An. albimanus* como uno de los más importantes, debido a que se considera que se adapta muy bien a los diferentes ecosistemas costeros y se distribuye ampliamente por centro América y una pequeña parte de sur América (15, 16). Los principales vectores de la malaria en Colombia son *An. darlingi*, *An. albimanus* y *An. nuneztovari* (17), ya que el país proporciona diferentes condiciones ambientales que favorecen la adaptación de los mosquitos (18).

En Colombia *An. albimanus* se distribuye a lo largo de las costas de los océanos Atlántico y Pacífico, principalmente en las zonas periurbanas y rurales en donde se ha reportado una relación entre la abundancia de los adultos de este insecto con la transmisión de la malaria (19). Se ha reportado que *An. albimanus* transmite los protozoarios *P. falciparum* y *P. vivax* (17), pero en Colombia solamente se ha reportado la infección de *An. albimanus* con *P. vivax* a lo largo del pacifico (20).

Un factor que influye en la distribución de los mosquitos es el fenómeno del niño (Niño-Oscilación del Sur, ENOS o ENSO) que afecta las condiciones climáticas globales cada 2 a 7 años y se ha relacionado con el aumento de casos de malaria en áreas donde *An. albimanus* es el principal vector de la malaria además de otros factores que no han sido ampliamente estudiados como los cambios en la demografía, en el uso de las tierras y la resistencia a insecticidas entre otros (10, 21, 22).

A principios de la década de 1940 se crearon los insecticidas órganoclorados, cuyo objetivo era controlar la población de mosquitos. En ese entonces, estos productos químicos disminuyeron los problemas relacionados con estos vectores, pero a principios del año 1950 estos insectos comenzaron a generar resistencia y desde ese entonces los científicos han intentado generar nuevos compuestos o técnicas para controlarlos (23). En el siglo XX se generó y se utilizó el dicloro difenil tricloroetano (DDT), el primer insecticida orgánico sintético para controlar los mosquitos vectores, el cual tuvo un gran impacto pero presentaba efectos nocivos tanto en la salud de los seres humanos, como de otros seres vivos y asimismo los mosquitos comenzaron a generar resistencia; fue entonces cuando se consideró la idea de utilizar otros compuestos o técnicas que tengan actividad insecticida frente a los mosquitos (24, 25). Por esta razón la asamblea mundial de la salud (AMS) solicitó que se adoptaran nuevas estrategias para el control de plagas lo que se conoce como el manejo integrado de plagas (MIP), el cual reúne una gran variedad de métodos , como por ejemplo, por medio de la introducción de bacterias modificadas genéticamente, plaguicidas sintéticos, el control biológico entre otros (12, 13, 26); también analiza las repercusiones a nivel ambiental, ecológico, social y cultural (21, 27).

El biocontrol tiene como objetivo reducir el tamaño poblacional de un organismo no deseado a partir de otro organismo o un componente del mismo, frecuentemente se utilizan los enemigos naturales como los depredadores, competidores, parásitos y patógenos (26). Este método ha sido estudiado ampliamente durante los últimos 30 años, ya que es una alternativa al uso indiscriminado de agroquímicos, debido a que los organismos biocontroladores presentan leves efectos para la salud de los seres humanos y hacia otros seres vivos en el medio ambiente como también mayor especificidad, por esta razón se utilizan para controlar los vectores transmisores de enfermedades; en *Anopheles* se han usado diferentes organismos

como controladores tales como las bacterias, parásitos microsporidicos, virus, nemátodos, peces depredadores de Culicidae, hongos entomopatógenos y extractos de plantas (28–30).

Las plantas y sus diferentes extractos han sido utilizadas para manejar las poblaciones de mosquitos debido a sus propiedades repelentes o insecticidas, y se ha evaluado la combinación de diferentes componentes u organismos biocidas con el fin de garantizar eficacia y seguridad en el control de la plaga (31, 32).. Existen muchos productos botánicos que sirven para el control de mosquitos, pero los extractos de la planta *Azadirachta indica* presentan una gran actividad larvicida frente a diferentes mosquitos vectores que transmiten múltiples parásitos como lo es la malaria, filariasis, dengue y chikungunya (33); cabe resaltar que las investigaciones de la planta *A. indica* son respaldadas debido a que la unión Europea en el año 2012 calificó a los extractos de esta planta como un biocida seguro (34). Durante los últimos años la importancia de *A. indica* ha aumentado, debido a la gran cantidad de estudios científicos que comprueban sus propiedades medicinales e insecticidas (35). Esta especie vegetal, es eficaz como larvicida ya que debilita el sistema inmune en los insectos permitiendo la penetración de microorganismos patógenos (33). Se ha usado el aceite de nim (un extracto de *A. indica*) en *An. gambiae* y *An. stephensi*, en las cuales ha mostrado resultados positivos como larvicida (33, 36), Se ha comprobado su actividad larvicida en condiciones de campo frente al vector *An. albimanus* sin embargo en este estudio no se conoce la cantidad del compuesto activo responsable del efecto larvicida y ovocida (37)

Por otro lado, también se han utilizado más de 750 especies de hongos entomopatógenos para el control biológico (38). Los hongos biocontroladores usados en *Anopheles* tales como *Coelomomyces*, *Culicinomyces*, *Beauveria* y *Metarhizium*; eliminan los mosquitos a una velocidad lenta, lo que es un inconveniente si se compara con los pesticidas químicos, pero tienen la ventaja de que si se exponen a la cutícula del insecto, debilitan el sistema inmune permitiendo su uso con otros compuestos pesticidas como lo son los extractos de las plantas (14, 39). Los hongos más reconocidos a nivel mundial como biocontroladores son *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* debido a que controlan una gran variedad de plagas en insectos (40).

El hongo *M. anisopliae* ha sido usado ampliamente en el mundo como insecticida de manera independiente o combinándolo con otros componentes, se han reportado cepas con actividad en uno de 7 órdenes de insectos y presenta baja toxicidad frente a los seres humanos y a otros seres vivos (41, 42). En cuanto a los mosquitos del género *Anopheles* se ha reportado la actividad larvicida y mosquitocida de *M. anisopliae* en *An. gambiae* y *An. stephensi* (43–46).

En los últimos años las investigaciones relacionadas con el MIP combinan nuevos componentes insecticidas para maximizar el efecto insecticida contra las enfermedades transmitidas por vectores y reducir la resistencia de los insectos, por lo que se ha propuesto la mezcla de diferentes y novedosos extractos, compuestos u organismos (21, 47). Modernamente, en el campo del control de plagas se utiliza la interacción farmacológica

como una alternativa a los problemas actuales del uso masivo de insecticidas químicos, se utilizan entre dos o más componentes pesticidas con el fin de maximizar el efecto contra el organismo objetivo. Se reconocen 3 tipos de interacciones las cuales son: efecto aditivo (a), efecto antagonista (b) y efecto sinérgico (c); en donde: a) aditivo, es que la combinación de los compuestos genera un efecto combinado de cada compuesto independiente, b) antagonista, es la combinación de los compuestos produce un menor efecto que cada compuesto independiente y c) sinergia, es la combinación de los compuestos genera un efecto aun mayor que los compuestos combinados (48, 49).

El efecto aditivo y el efecto sinérgico han sido considerados por muchos científicos como una alternativa prometedora para combatir las plagas ya que tienen un leve impacto sobre el medio ambiente y aumenta considerablemente el efecto hacia el insecto (50). Se ha demostrado un efecto sinérgico al combinar *Bacillus thuringiensis* junto a *A. indica* frente a las larvas de *Aedes aegypti* en laboratorio (28).

Al ser los efectos sinérgicos más eficientes que los compuestos independientes, estos son investigados ampliamente explorando así nuevos organismos o extractos más eficaces como plaguicidas (51, 52). Se ha comprobado el efecto sinérgico de varios extractos de plantas con otros componente pesticidas, por ejemplo en condiciones de laboratorio se comprobó la eficacia del extracto de *A. indica* en combinaciones con el hongo *M. anisopliae* en larvas de *Aedes aegypti* en definitiva dio como resultado un efecto sinérgico, también se han evaluado productos derivados del nim o *A. indica* en combinación con *B. thuringiensis* lo cual dio como resultado un efecto sinérgico frente a larvas de *A. aegypti* (28). Por lo tanto, en esta investigación se evaluó el efecto larvicida de forma individual y conjunta de *M. anisopliae* y el extracto *A. indica* para el control de *Anopheles albimanus*.

Objetivos

General

Determinar el efecto larvicida del extracto de *Azadirachta indica* y el hongo *Metarhizium anisopliae* de forma independiente y en combinaciones frente a larvas de *Anopheles albimanus*.

Específicos

- Comparar el efecto larvicida en *An. albimanus* de manera independiente del extracto de *A. indica* y del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*
- Determinar el efecto del extracto de *A. indica* sobre la germinación y el crecimiento en *M. anisopliae*.
- Evaluar la interacción del extracto de *A. indica* junto con el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* sobre la mortalidad en larvas de *An. albimanus*.

Metodología

Mantenimiento de la colonia de *Anopheles albimanus*

Las larvas de *An. albimanus* se obtuvieron y se criaron gracias al insectario del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de la Salle, las larvas se mantuvieron en recipientes plásticos de 40 cm de largo, 60 cm de ancho y 40 cm de alto, cada recipiente contenía 1000 ml de agua reposada; se alimentaron por medio de purina pulverizada (marca Dogshow), los adultos se mantuvieron en jaulas y se alimentaron con sangre de curí *Cavia porcellus*; la temperatura se mantuvo entre 25-30 °C y la humedad relativa entre 38-50% y el laboratorio presentó un fotoperiodo de 12L: 12D.

Preparación de las diluciones de *Metarhizium anisopliae*

El hongo *M. anisopliae* se adquirió en la empresa Biológicos y Ecológicos, es una cepa comercial y además la ficha técnica indicaba que era específico para larvas de mosquitos (53), El hongo se sembró y se incubó en agar de papa y dextrosa (PDA) por 7 días. Se realizó un recuento de conidios por medio de la cámara de Neubauer para confirmar la concentración del hongo comercial en 1 gramo. Se realizaron 8 réplicas del recuento de conidios siguiendo la metodología de García y colaboradores (54). En base al recuento de conidios se realizó un ajuste en la concentración que se adicionaban a las larvas para cada concentración del hongo.

Preparación de las diluciones del extracto de *A. indica*

El extracto de *A. indica* se compró en la empresa Ibicol por medio del producto comercial NeemAzal en donde la ficha técnica indicó que posee 1.20% de azadirachtina el cual es el compuesto activo insecticida (55), Se realizaron 5 diluciones seriadas con agua destilada y Tween 80 al 0,05%, las diluciones que se utilizaron fueron desde 1000 ppm hasta 0,1 ppm teniendo en cuenta la metodología de Gomes y colaboradores las diluciones se hicieron en base al compuesto activo, la azadirachtina (56).

Pruebas de virulencia del hongo *Metarhizium anisopliae* frente a las larvas de *Anopheles albimanus*

Se colocaron 10 larvas de 1^{ro} y 2^{do} estadio de *An. albimanus* en recipientes de vidrio en donde se agregaron 100 ml de agua reposada, se realizaron 3 repeticiones por cada concentración y se llevaron a cabo 3 réplicas del experimento.

Se analizaron 5 concentraciones del hongo de 1×10^3 conidios ml^{-1} hasta 1×10^7 conidios ml^{-1} previamente diluido en Tween 80 al 0,05% en cada tratamiento y el control negativo fue Tween 80 al 0,05%, luego se realizó el conteo de la mortalidad de las larvas por 5 días en donde se retiraron las larvas muertas diariamente.

Toxicidad del extracto de *A. indica* contra las larvas de *Anopheles albimanus*

Se colocaron 10 larvas de 1^{ro} y 2^{do} estadio de *An. albimanus* en recipientes de vidrio en donde se agregaron 100 ml de agua reposada, se realizaron 3 repeticiones por cada dilución y se llevaron a cabo 3 réplicas del experimento.

Se analizaron 5 diluciones del extracto de *A. indica* previamente diluido en Tween 80 al 0,05% en cada tratamiento, las diluciones que se utilizaron fueron: (1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm y 0,1 ppm); el control negativo fue Tween 80 al 0,05%. Posteriormente se determinó la mortalidad de las larvas por 5 días en donde se retiraron las larvas muertas diariamente.

Efecto del extracto de *A. indica* sobre la germinación de conidios de *M. anisopliae*

Para estos 2 ensayos se utilizaron tres concentraciones del hongo las cuales fueron: 1×10^3 conidios ml^{-1} , 1×10^4 conidios ml^{-1} y 1×10^5 conidios ml^{-1} . Por otro lado, del extracto de *A. indica* se utilizaron tres diluciones las cuales son las siguientes: 1 ppm, 10 ppm y 100 ppm. En los dos ensayos el control negativo fue Tween 80 al 0,05%.

Para el ensayo de germinación de conidios se determinó la actividad antimicrobiana de *A. indica* frente a la germinación del hongo *M. anisopliae* siguiendo la metodología de García y colaboradores (54) en donde se utilizaron 3 cajas de Petri con 15 ml del medio Agar Papa Dextrosa (PDA) por cada dilución del extracto de *A. indica*. Cuando se prepararon los medios PDA se adicionaron las respectivas diluciones del extracto de *A. indica* y ácido láctico al 10% esto con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias. Después de haber servido los medios en las respectivas cajas de Petri se adicionaron tres alícuotas de 30 μl de una concentración del hongo de 1×10^5 conidios ml^{-1} a lo largo del medio y se dejaron incubando a 28°C por 20 h. Posteriormente se seleccionaron fragmentos de agar inoculados con las alícuotas y con estos se montaron en láminas adicionándoles azul de lactofenol y se procedió a observar la germinación de los conidios en el microscopio óptico a 40x en 10 campos por muestra, se realizaron 3 repeticiones del conteo por cada dilución del extracto de *A. indica*. Se consideró que los conidios germinaron cuando se observó que el tubo germinal era igual o mayor que los conidios independientes, luego se calculó el porcentaje de germinación por medio de la fórmula:

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\# \text{ de conidios germinados}}{\# \text{ de conidios totales}} \times 100$$

Efecto del extracto de *A. indica* sobre el crecimiento del hongo *M. anisopliae* in vitro

Para el ensayo de crecimiento micelial se evaluó la actividad antimicrobiana de *A. indica* frente al crecimiento del hongo *M. anisopliae* por medio del método de difusión de pozos

siguiendo la metodología propuesta por Balouiri y colaboradores (57), en donde se utilizaron 3 cajas de Petri con 20 ml del medio PDA en las siguientes diluciones del extracto de *A. indica* 10 ppm, 100 ppm y 1000 ppm. Nuevamente al preparar los medios PDA se agregó ácido láctico al 10%, luego se perforó un orificio de 6 mm de diámetro y se introdujo una alícuota de 100 µl del extracto de *A. indica* dentro del pozo, después se sembró el hongo en cuatro puntos alrededor del pozo equidistantes de 5 mm, por otro lado el hongo presentaba una concentración de 1×10^7 conidios ml^{-1} y se dejó incubando el hongo a 28°C por 5 días. Al pasar los días se determinó y se midió el halo de inhibición por cada dilución del extracto de *A. indica*. En el ensayo el control negativo fue Tween 80 al 0,05%.

Interacción del hongo *Metarhizium anisopliae* junto con el extracto de *A. indica* para el control de las larvas de *Anopheles albimanus*

Para este ensayo se escogieron tres concentraciones del hongo de 1×10^3 conidios ml^{-1} , 1×10^4 conidios ml^{-1} y 1×10^5 conidios ml^{-1} que ocasionaron una mortalidad del 30% al 50% de forma independiente en las larvas de *An. albimanus* (al cabo de 5 días) así mismo se escogió la dilución del extracto de 1ppm debido a que ocasionó una mortalidad del 40% de forma independiente en las larvas de *An. albimanus* (al cabo de 5 días).

Se colocaron 10 larvas de 1^{ro} y 2^{do} estadio de *An. albimanus* en recipientes de vidrio en donde se agregaron 100 ml de agua reposada, se realizaron 3 repeticiones por cada mezcla entre las concentraciones del hongo y las diluciones del extracto, luego se determinó la mortalidad de las larvas por 5 días en donde se retiraron las larvas muertas diariamente. El control negativo fue Tween 80 al 0,05%.

Análisis experimental

Se siguió la metodología propuesta por Sun & Johnson del 1960 para corregir el porcentaje de mortalidad (58). La fórmula que utilizo es:

$$[(T-C)/(100-C)] \times 100$$

Donde T: Porcentaje de mortalidad en las diferentes diluciones y C: Porcentaje de mortalidad en el control.

En la metodología del efecto del extracto de *A. indica* sobre la germinación de los conidios del hongo *M. anisopliae* se realizó un ANOVA y se utilizaron los porcentajes de germinación por cada tratamiento.

En la metodología del efecto del extracto de *A. indica* sobre el crecimiento micelial del hongo *Metarhizium anisopliae* se realizó una regresión simple utilizando el radio del halo de inhibición versus la concentración del extracto evaluada por cada tratamiento.

Se determinó la concentración letal 50 (LC₅₀) del hongo *M. anisopliae* y del extracto de *A. indica* de forma independiente gracias al programa TRAP (59).

Para determinar el efecto de la interacción farmacológica como la LC₅₀ del hongo *M. anisopliae* en conjunto con el extracto de *A. indica*, se siguió la metodología propuesta por Lemes y colaboradores (60). Con ayuda de la fórmula:

$$P=1-(1-P_1)(1-P_2)$$

Con base en los resultados de la actividad independiente tanto del hongo *M. anisopliae* y del extracto *A. indica*, se definieron las proporciones P en donde P₁ y P₂ representan la cantidad de larvas muertas para los tratamientos con *M. anisopliae* y *A. indica* respectivamente, y en base a estas proporciones se halla el P esperado calculándolo en base a la actividad independiente de los compuestos, después se realizó una prueba de Chi-cuadrado para determinar el efecto de las mezclas, por medio de la posible significancia entre la observada y la esperada.

Resultados

Al realizar el recuento de conidios del hongo *M. anisopliae* en la cámara de Neubauer se obtuvo una concentración de $4,48 \times 10^9$ conidios ml⁻¹. El hongo *M. anisopliae* demostró ser un buen controlador de las larvas de *An. albimanus* ya que a mayor concentración mayor porcentaje de mortalidad (Figura 1). Las concentraciones que lograron una mortalidad del 30 al 70% en las larvas de *An. albimanus* pasados unos 5 días fueron 1×10^3 conidios ml⁻¹, 1×10^4 conidios ml⁻¹, 1×10^5 conidios ml⁻¹ y 1×10^6 conidios ml⁻¹. Debido a esto, estas concentraciones se pueden llegar a usar conjuntamente con otras diluciones del extracto de *A. indica* para maximizar el efecto larvicida frente a las larvas de *An. albimanus*; por otro lado, la concentración 1×10^7 conidios ml⁻¹ fue lo suficientemente alta como para eliminar al 100% las larvas de *An. albimanus* al cabo de 5 días (Figura 1).

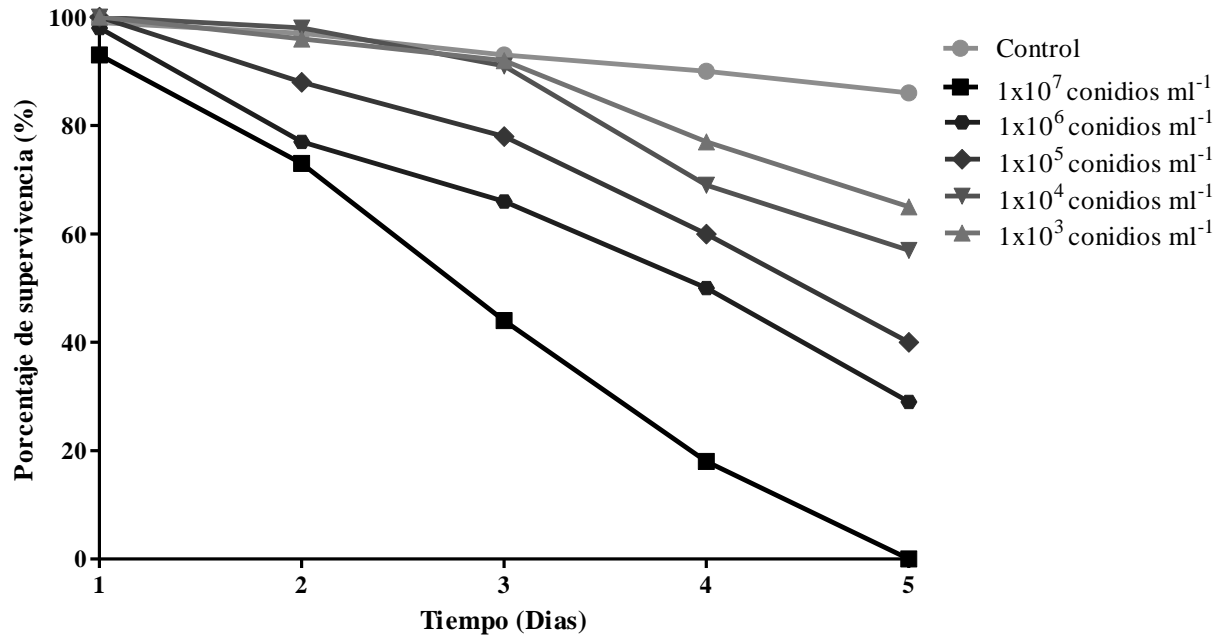


Figura 1: Curva de supervivencia de larvas de *Anopheles albimanus* expuestas a diferentes concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae*.

Luego, al usar el extracto de *A. indica* de manera independiente se encontró que las diluciones que ocasionaron una mortalidad entre el 20% y el 40% de mortalidad en las larvas de *An. albimanus* al cabo de 5 días fueron las de 0,1 ppm, 1 ppm y 10 ppm; a mayores concentraciones se ocasionaba una mortalidad próxima del 100% en menos días (Figura 2).

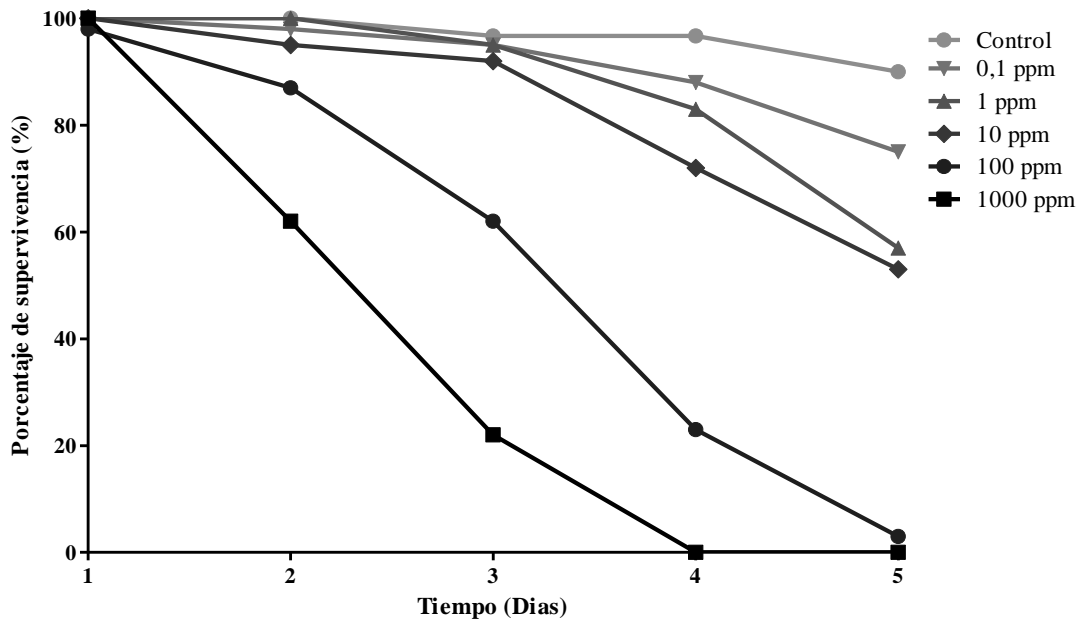


Figura 2: Curva de supervivencia de larvas de *Anopheles albimanus* expuestas a diferentes diluciones del extracto de *Azadirachta indica*.

La concentración letal 50 del hongo *M. anisopliae* 50 fue de 326.587 conidios ml⁻¹ y la del extracto de *A. indica* fue 16 ppm en larvas de *An. albimanus* (Tabla 1).

Tabla 1: Concentración letal 50 (CL50) de conidios de *Metarhizium anisopliae* y diluciones del extracto de *Azadirachta indica* frente a larvas de *Anopheles albimanus*

Organismo	CL ₅₀ (conidios ml ⁻¹) o (ppm)	Intervalo de confianza
<i>M. anisopliae</i>	326.587	72.610-1'472.312
<i>A. indica</i>	16	3,9-70

Previo al ensayo de actividad larvicida de las mezclas del hongo y el nim, se evaluó sí el extracto de *A. indica* podría afectar la germinación de conidios de *M. anisopliae*, para lo cual se utilizaron las diluciones del extracto que ocasionaron entre el 20 y el 95 % de la mortalidad en *An. albimanus* en un tiempo de 5 días (100 ppm, 10 ppm y 1 ppm) y se utilizó la concentración del hongo de 1x10⁵ conidios ml⁻¹ debido a que ocasionó una mortalidad del 45% en las larvas de *An. albimanus*, Obteniendo los resultados que se presentan en la (Figura 3)

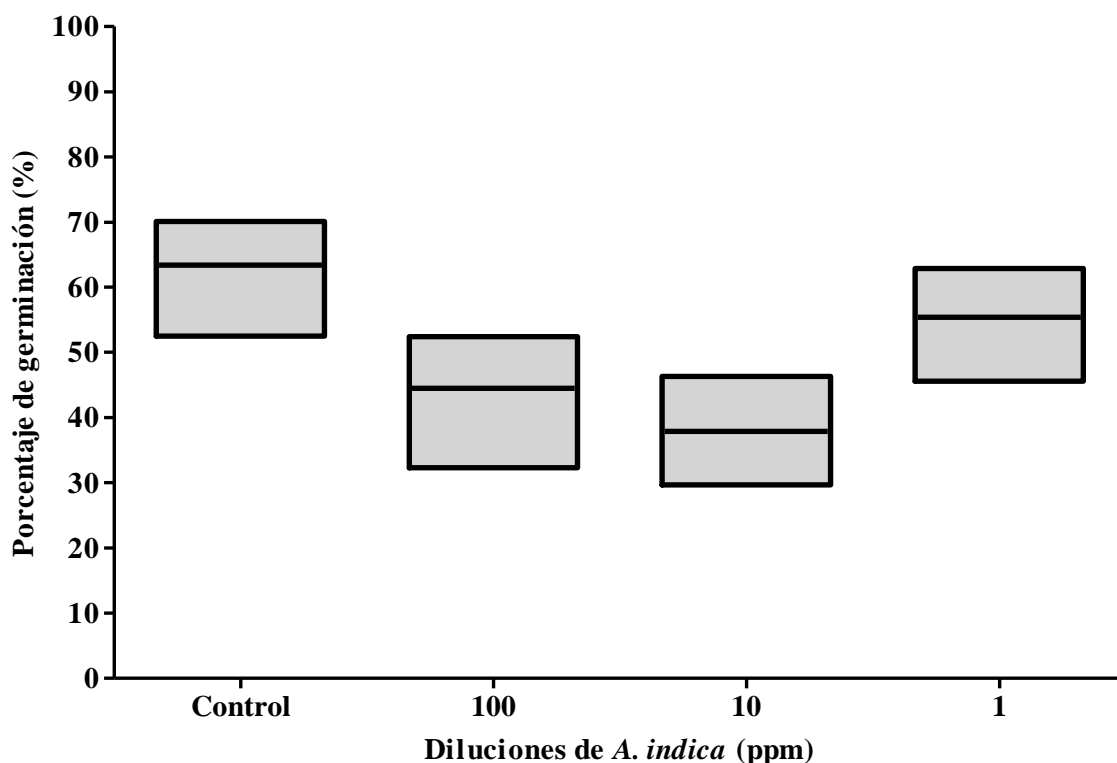


Figura 3: Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* a una concentración de 1×10^5 conidios ml^{-1} , en presencia de diferentes concentraciones del extracto de *A. indica*.

El extracto de *A. indica* a concentraciones de 10 ppm y 100 ppm si afectan la germinación de conidios, debido a que al realizar el análisis de varianza el valor de p obtenido fue menor a 0,05, lo que indica una diferencia significativa en el porcentaje de conidios germinados con respecto al control; por consiguiente la única dilución que se podría llegar a utilizar para realizar las mezclas sería la de 1 ppm (Figura 3).

Al utilizar la dilución del extracto de *A. indica* de 1 ppm en las concentraciones de 1×10^3 conidios ml^{-1} , 1×10^4 conidios ml^{-1} y 1×10^5 conidios ml^{-1} del hongo *M. anisopliae* se encontró que los conidios que germinaron tanto en el control como en las tres concentraciones presentaron en promedio un valor entre el 60-70% (Figura 4). Al realizar el análisis de varianza se encontró que la dilución del extracto no afecta la germinación del hongo en las tres concentraciones previamente mencionadas, debido a el valor de p que se obtuvo fue de 0,151.;

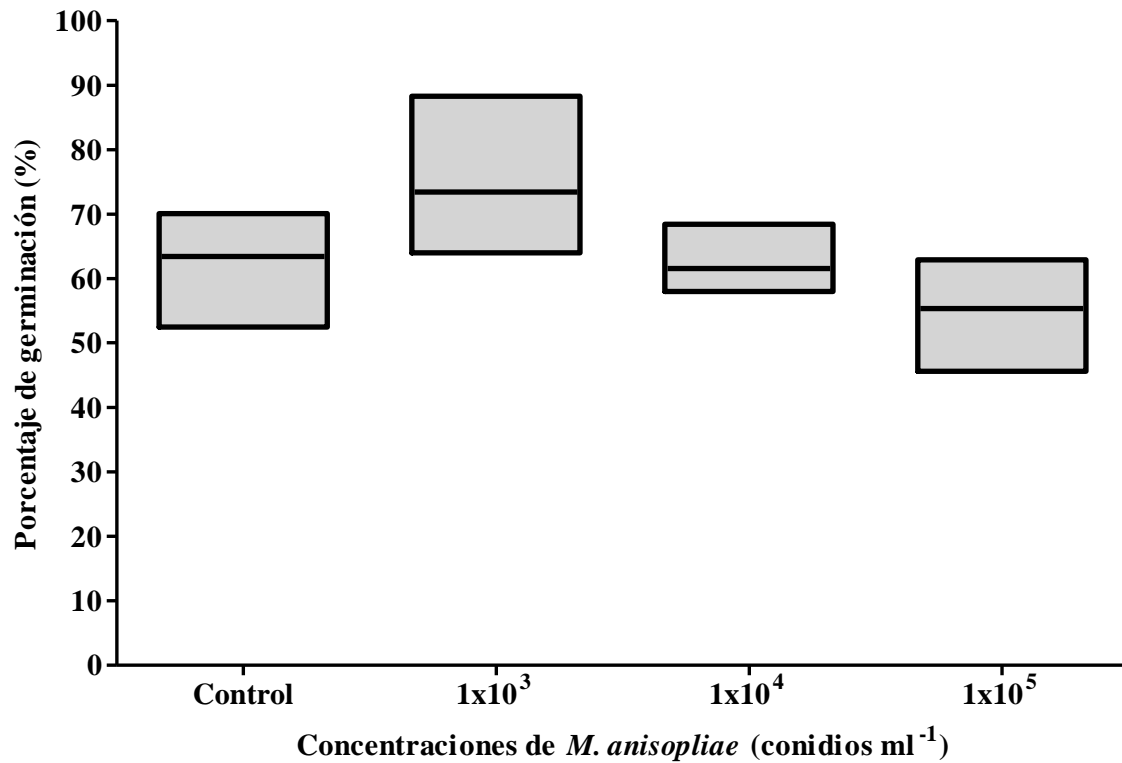


Figura 4: Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* en presencia de 1 ppm del extracto de *A. indica*.

Las concentraciones del extracto de *A. indica* desde 10 ppm hasta 1000 ppm no inhibieron el crecimiento micelial del hongo, ya que no se observaron halos de inhibición pese a que se utilizaron concentraciones que disminuyeron la germinación de conidios, a modo de ejemplo se presentan los resultados de las concentraciones 10 ppm y 1000 ppm en la figura 5.

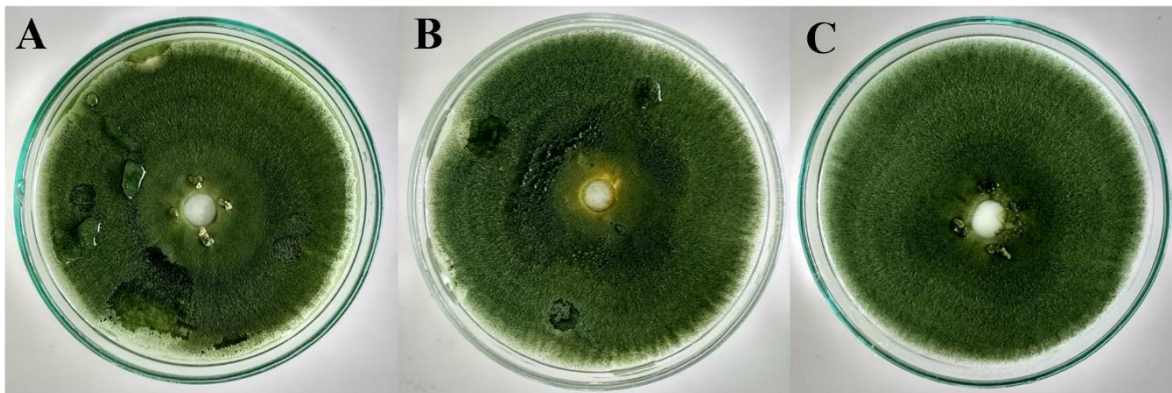


Figura 5: Crecimiento micelial de *M. anisopliae* de la concentración 1×10^7 conidios ml^{-1} expuesto al método de difusión en pozo a diferentes diluciones del extracto de *A. indica*. A) Control, B) 1000 ppm, C) 10 ppm.

Debido a que la dilución del extracto de *A. indica* de 1 ppm no inhibió la germinación de conidios, ni el crecimiento del hongo, se utilizó esta concentración e mezclas con 1×10^3 conidios ml^{-1} , 1×10^4 conidios ml^{-1} y 1×10^5 conidios ml^{-1} del hongo, para conocer la actividad larvicida conjunta frente a las larvas de *An. albimanus* (Figura 6).

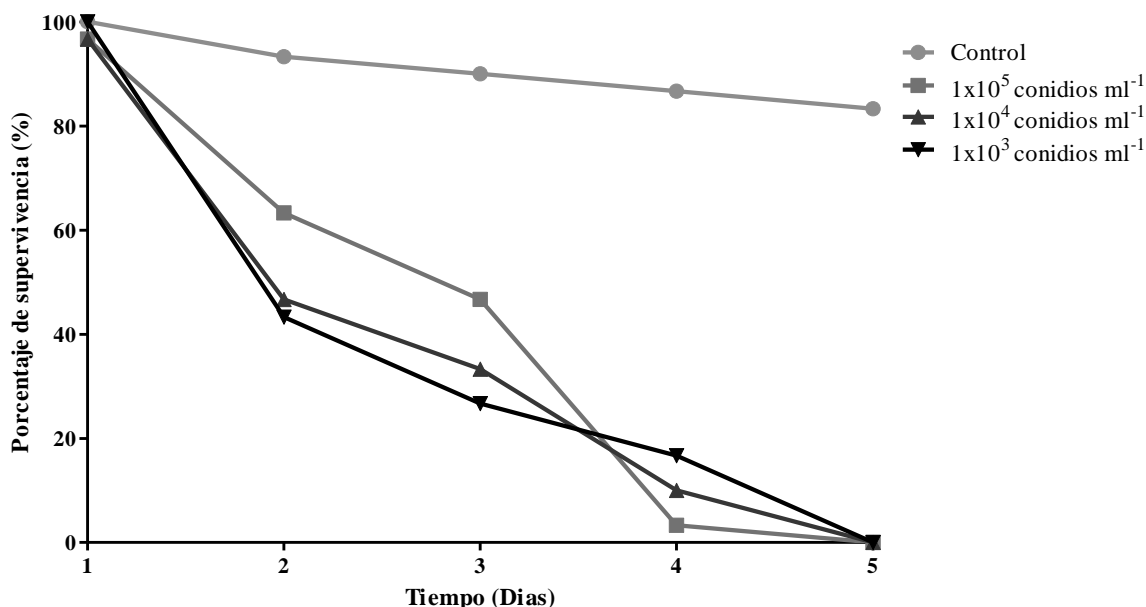


Figura 6: Curva de supervivencia de larvas de *Anopheles albimanus* expuesto a diferentes concentraciones del hongo *Metarhizium anisopliae* en combinación con la dilución de 1 ppm de *Azadirachta indica*.

Al comparar la actividad larvicida de las mezclas del hongo *M. anisopliae* y del extracto *A. indica* en comparación del efecto independiente de estos dos compuestos insecticidas, se observó que al cabo de 5 días en todas las combinaciones se halló una mortalidad en las larvas de *An. albimanus* del 100% a comparación del efecto de los compuestos de forma independiente que ocasionaron una mortalidad inferior al 60% como se puede observar en la tabla 2. Además, el valor de p del chi cuadrado confirmó el efecto sinérgico del hongo y del extracto ya que la significancia en las tres mezclas fue igual o menor a 0,01.

Tabla 2: Actividad larvicida del hongo *Metarhizium anisopliae* y del extracto *Azadirachta indica* en larvas de *Anopheles albimanus*; los dos asteriscos indican diferencias significativas en $P < 0,01$, y los tres asteriscos en $p < 0,001$.

Tratamiento	Concentración	Mortalidad (%)		χ^2	Valor de p
		Observada	Esperada		
<i>M. anisopliae</i>	1x10 ³ conidios/ml	35	-	-	-
	1x10 ⁴ conidios/ml	43	-	-	-
	1x10 ⁵ conidios/ml	60	-	-	-
<i>A. indica</i>	1 ppm	43	-	-	-
<i>M. anisopliae</i> + <i>A. indica</i>	1x10 ³ conidios/ml + 1 ppm	100	62	21,80711	0,001***
	1x10 ⁴ conidios/ml + 1 ppm	100	67	15,63753	0,001***
	1x10 ⁵ conidios/ml + 1 ppm	100	77	6,734	0,01**

Discusión

El control de mosquitos se está fortaleciendo con el descubrimiento de nuevos biocidas de origen vegetal y microbiano sin embargo todavía sigue habiendo muchos desafíos, como la creciente resistencia de los mosquitos y la falta de insecticidas rentables y seguros (61). Por esta razón se deben promover compuestos que se puedan llegar a usar en campo teniendo en cuenta las implicaciones a largo plazo tanto en el medio ambiente como en la salud y seguridad de las personas. Por consiguiente, en este estudio se utilizaron diferentes concentraciones del hongo *M. anisopliae* y diferentes diluciones del extracto de *A. indica* para controlar larvas de *An. albimanus* en condiciones de laboratorio..

El extracto etanólico de *A. indica* ha demostrado ser un buen biocida frente a las larvas de *An. stephensi* en altas concentraciones (62, 63). En una investigación de Dua y colaboradores se puso a prueba el efecto larvicida de *A. indica* en tres especies de mosquito las cuales son *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi*, el extracto contenía 0,15% de azadirachtina el compuesto activo insecticida y se encontró una CL₅₀ cercano a 1,7 ppm del extracto para las 3 especies de mosquitos al cabo de los 2 días (33); en otro estudio utilizaron un extracto de aceite de nim que tenía 0,03% de azadirachtina y a los 8 días se halló una CL₅₀ de 11 ppm del extracto en *Anopheles gambiae* (36). A comparación de la CL₅₀ de 16 ppm contra a *Anopheles albimanus* en este caso el extracto de *A. indica* tenía 1,20% de

azadirachtina y la CL₅₀ frente a las larvas de *An. albimanus* fue de 16 ppm (Tabla 1), la cual es mayor a las concentraciones letales 50 previamente determinadas en larvas de *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, y *Anopheles stephensi*.

El hongo *M. anisopliae* frente a las larvas de *An. stephensi* redujo la viabilidad del insecto cuando se utilizaba en altas concentraciones: 1×10^5 conidios ml⁻¹ - 1×10^7 conidios ml⁻¹ (44, 64, 65). La actividad larvicida del hongo frente a larvas de 3er y 4to estadio del mosquito *Aedes albopictus* mostró una CL₅₀ de 1×10^5 conidios ml⁻¹ (66), en otro estudio en el que se determinó la actividad larvicida frente a *Culex quinquefasciatus* se encontró una CL₅₀ mayor de 1.7×10^7 conidios ml⁻¹ al cabo de 4 días (67), por otra parte en un estudio en larvas de 4to estadio de *Culex pipiens* se encontró una CL₅₀ 5.1×10^5 conidios ml⁻¹ (68). A comparación de la cantidad o CL₅₀ del hongo frente a las larvas de *An. albimanus* que obtuvo un valor de 3.26×10^5 conidios ml⁻¹ (Tabla 1), el cual fue similar al valor de la CL₅₀ de este hongo previamente reportado para *Aedes albopictus* y *Culex pipiens*.

En una investigación se utilizó un producto comercial “Suneem” que contenía *Azadirachta indica* al 1% frente a larvas de 3er estadio de *Culex quinquefasciatus* y se encontró una mortalidad promedio del 60% a los dos días de ser aplicado, en el caso del hongo *Metarhizium anisopliae* al cabo de 3 días se encontró una mortalidad promedio del 50%, por otra parte se miró la interacción del extracto y el hongo en una cantidad de 50ml y 10mg de esporas respectivamente y esta mezcla ocasionó una mortalidad mayor del 90% al pasar los 3 días; por consiguiente teniendo en cuenta los valores de la mortalidad frente a *Culex quinquefasciatus* de forma independiente y combinada se puede decir que el efecto combinado fue sinérgico (69), en una investigación se confirmó un aumento en la mortalidad frente a *Aedes aegypti* al combinar estos dos bioplaguicidas en ese caso se utilizó un extracto de *Azadirachta indica* “Base Neem” cuyo compuesto activo azadirachtina se encontraba al 0.12%, la dilución de este extracto 1 ppm ocasionó una mortalidad del 20% en las larvas al cabo de 3 días mientras tanto el hongo *Metarhizium anisopliae* en una cantidad de 1×10^8 conidios ml⁻¹ causó un 70% de mortalidad a comparación del efecto combinado del extracto y del hongo en estas dos concentraciones que ocasionó una mortalidad aproximadamente del 90% en larvas de *Aedes aegypti* (56). El efecto sinérgico observado al combinar extractos de *Azadirachta indica* y el hongo *Metarhizium anisopliae* frente a diferentes especies de mosquito como en *Anopheles albimanus* (Tabla 2) corrobora que la combinación de estos dos bioplaguicidas es efectivo en larvas de mosquitos por lo que se puede llegar a usar a largo plazo conjuntamente como un potente biocontrolador de larvas de mosquitos, además el efecto sinérgico encontrado al combinar el hongo *M. anisopliae* y el extracto *A. indica* frente a las larvas de *An. albimanus* fue mayor a comparación de los estudios realizados en *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*.

El objetivo de este estudio fue conocer la dilución requerida del extracto de *A. indica* para aumentar la mortalidad en las larvas de *An. albimanus* cuando se combina en diferentes

concentraciones con el hongo *M. anisopliae*, como se observa en la (Figura 4 y 5) en las 3 combinaciones probadas en este estudio se encontró un efecto sinérgico, pero se recomienda usar la combinación de 1×10^3 conidios ml^{-1} junto a la dilución de 1 ppm del extracto debido a que se usa una concentración baja del hongo y se llega al 100% de mortalidad de larvas en *An. albimanus* al cabo de 5 días. Desde un punto de vista económico es beneficioso utilizar pequeñas concentraciones que ocasionan una mayor mortalidad que los compuestos de forma independiente. Se debe tener en cuenta que estos ensayos fueron realizados en laboratorio y se deben realizar las respectivas pruebas en campo para conocer las condiciones y posibles riesgos de estos larvicidas en el medio ambiente.

Conclusiones

Este estudio demuestra que la combinación de un biocida vegetal junto a un hongo entomopatógeno puede tener muchos beneficios tales como aumentar la mortalidad de larvas de *An. albimanus* en un periodo de 5 días a comparación de cada biocida de forma independiente. Estos resultados pueden servir como base para incentivar futuros trabajos que promuevan el uso de otros insecticidas no convencionales. Además se sugiere realizar una investigación a fondo de los mismos insecticidas pero en condiciones de semi-campo.

Bibliografía

1. Parra G, Suarez L (2012) Mosquitos (Díptera: Culicidae) vectores potenciales de arbovirus en la región de Urabá, noroccidente de Colombia. *Inst Colomb Med Trop* 32(2):252–262.
2. Huang Y, Higgs S, Vanlandingham D (2017) Biological Control Strategies for Mosquito Vectors of Arboviruses. *Insects* 8(1):21.
3. Harbach R (2007) The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668(1):538–591.
4. Bown D, Nelson M (1993) Anopheline Vectors of Human Plasmodia. *Parasitic Protozoa (Second Edition)*, ed Kreier J (Academic Press, San Diego), pp 267–328.
5. Abrams S, et al. (2014) Contributors. *Manson's Tropical Infectious Diseases (Twenty-Third Edition)* (W.B. Saunders, London), pp xiii–xxiv.
6. Rodríguez J, Uribe G, Araújo R, Narváez P, Valencia S (2011) Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(1):114–122.
7. ILADIBA. (2013) Malaria Memorias. 6–8.
8. Porras A, Buitrago J, González J, Herrera A, Carrasquilla G (2014) Frequency and tendency of malaria in Colombia, 1990 to 2011: a descriptive study. *Malar J* 13(1):202.

9. Chaparro P, Diaz D, Castañeda C, Hoz F (2015) PIN39 - Burden of Disease and Economic Impact of Malaria In Colombia, 2012. *Value Heal* 18(3):A234.
10. Kelly-Hope LA, McKenzie FE (2009) The multiplicity of malaria transmission: a review of entomological inoculation rate measurements and methods across sub-Saharan Africa. *Malar J* 8(1):19.
11. Pascual M, Ahumada J, Chaves L, Rodó X, Bouma M (2006) Malaria resurgence in the East African highlands: Temperature trends revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15):5829–5834.
12. Tanser F, Sharp B, Suer D (2003) Potential effect of climate change on malaria transmission in Africa. *Lancet* 362(9398):1792–1798.
13. Caminade C, *et al.* (2014) Impact of climate change on global malaria distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(9):3286–3291.
14. Kamareddine L (2012) The Biological Control of the Malaria Vector. *Toxins (Basel)* 4(9):748–767.
15. Faran M (1980) A revision of the albimanus section of the subgenus Nyssorhynchus of *Anopheles*. *Contrib Am Entomol Inst* 15(7):1–215.
16. Loaiza J, *et al.* (2012) Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). *Infect Genet Evol* 12(1):1–12.
17. Montoya J, *et al.* (2011) Malaria vector species in Colombia: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 Suppl:223–238.
18. Lopez P, Mengual X (2015) Updated list of the mosquitoes of Colombia (Diptera: Culicidae). *Biodivers Data J* 3:e4567.
19. Molina V, Helena B, Roberto S, Martha Lucía Q, Jorge A (2001) Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomedica* 21(4):402–408.
20. Conn JE, Quiñones ML, Póvoa MM (2013) *Phylogeography, Vectors and Transmission in Latin America* doi:43482.
21. Beier J (2008) Malaria Control in the Highlands of Burundi: An Important Success Story. *Am J Trop Med Hyg* 79(1):1–2.
22. Poveda G, *et al.* (2001) Coupling between annual and ENSO timescales in the malaria-climate association in Colombia. *Env Heal Perspect* 109(5):489–493.
23. Liu N (2015) Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu Rev Entomol* 60(1):537–559.
24. Hassall K (1982) *The chemistry of pesticides : their metabolism, mode of action and uses in crop protection / Kenneth A. Hassall* ed Millan M (Macmillan, London).

25. Raghavendra K, Barik T, Reddy B, Sharma P, Dash A (2011) Malaria vector control: from past to future. *Parasitol Res* 108(4):757–779.
26. Becker N, *et al.* (2003) *Mosquitoes and Their Control* (Springer US) Available at: <https://books.google.com.co/books?id=OXRk3k0LKxIC>.
27. Mareggiani G (2001) Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integr Plagas* 60:22–30.
28. Shaalan E, Canyon D, Younes M, Abdel H, Mansour A (2005) A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Env Int* 31(8):1149–1166.
29. Fang W, *et al.* (2011) Development of Transgenic Fungi That Kill Human Malaria Parasites in Mosquitoes. *Science* 331(6020):1074–1077.
30. Institute-of-Medicine (2008) *Vector-Borne Diseases* (National Academies Press (US), Washington, DC), pp 4–6.
31. Droby S, Wisniewski M, Teixidó N, Spadaro D, Jijakli H (2016) The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol Technol* 122:22–29.
32. Munakata K (1977) Insect Antifeedants of *Spodoptera Litura* in Plants. *Host Plant Resistance to Pests* (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY), pp 185–196.
33. Dua V, *et al.* (2009) Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malar J* 8:124.
34. Chandramohan B, *et al.* (2016) Neem by-products in the fight against mosquito-borne diseases: Biototoxicity of neem cake fractions towards the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Biomed* 6(6):472–476.
35. Forim M, Fernandes J, Das-Silva M (2012) Secondary Metabolism as a Measurement of Efficacy of Botanical Extracts: The Use of *Azadirachta Indica* (Neem) as a Model (INTECH Open Access Publisher) Available at: <https://books.google.com.co/books?id=HwrEoAEACAAJ>.
36. Okumu F, Knols B, Fillinger U (2007) Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar J* 6:63.
37. Hidalgo AV (1999) Uso de *Azadirachta indica* como control larvario del *Anopheles albimanus*. Pruebas in vitro (San Salvador) Available at: <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/157915>.
38. Flores A, Pucheta M, Rodríguez S, Torre M (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31:856–860.
39. Scholte E, *et al.* (2005) An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* (80-) 308(5728):1641–1642.
40. Nicholas A, McCorkell B (2017) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control

of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae), the principal vector of bluetongue virus in Australia. *J Vector Ecol* 39(1):213–218.

41. Zimmermann G (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol* 17(9):879–920.
42. Tiago P, Oliveira N, Lima E (2014) Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. *Ciência Rural* 44:645–651.
43. Blanford S, Jenkins N, Read A, Thomas M (2012) Evaluating the lethal and pre-lethal effects of a range of fungi against adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Malar J* 11:365.
44. Bukhari T, Middelmann A, Koenraadt C, Takken W, Knols B (2010) Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malar J* 9(1):22.
45. Farenhorst M, *et al.* (2008) African water storage pots for the delivery of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to the malaria vectors *Anopheles gambiae s.s.* and *Anopheles funestus*. *Am J Trop Med Hyg* 78(6):910–916.
46. Scholte E-J, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ (2003) Infection of malaria (*Anopheles gambiae s.s.*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malar J* 2(1):29.
47. Flórez J (2005) *Farmacología humana* (Masson) Available at: <https://books.google.com.co/books?id=OvEPlvUwSqQC>.
48. Díez JEB, Pujol MM (2002) *Farmacología ocular*.
49. Gayo M, Alfonso M (2013) *Fundamentos de farmacología básica y clínica*.
50. Campos E, de-Oliveira J, Pascoli M, de-Lima R, Fraceto L (2016) Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. *Front Plant Sci* 7:1494.
51. Todgham AE, Stillman JH (2013) Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integr Comp Biol* 53:539–544.
52. Xu X, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011) Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology* 101:1024–1031.
53. Biologicos-y-ecologicos (2017) Hongos entomopatogenos. 2017(23/04/2017). Available at: <http://www.biologicosyecologicos.com/>.
54. De-Garcia C, Restrepo S, Franco-Molano A, Toquica M, N. V (2012) *Biología de hongos* (Universidad de los Andes, Colombia, Universidad de los Andes). 1st Ed. Available at: <http://www.jstor.org/stable/10.7440/j.ctt1b18tw3>.
55. Ibicol (2017) *NeemAzal*. 2017(18/04/2017). Available at:

<https://www.ibicol.com.co/neemazal>.

56. Gomes A, *et al.* (2015) Neem oil increases the efficiency of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasit Vectors* 8:669.
57. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 6(2):71–79.
58. Sun Y-P, Johnson E (1960) Analysis of Joint Action of Insecticides Against House Flies. *J Econ Entomol* 53(5):887–892.
59. Environmental protection agency US The Toxicity Relationship Analysis Program. Available at: https://archive.epa.gov/med/med_archive_03/web/html/trap.html [Accessed June 23, 2018].
60. Lemes A, *et al.* (2014) Synergism and Antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One* 9(10):e107196.
61. Michael M, *et al.* (2007) Larvicidal activity of naturally occurring naphthoquinones and derivatives against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitol Res* 56(9):8–21.
62. Murugan K, *et al.* (2016) In vivo and in vitro effectiveness of *Azadirachta indica*-synthesized silver nanocrystals against *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*, and their potential against malaria mosquitoes. *Res Vet Sci* 106:14–22.
63. Sharma, *et al.* (2007) Larvicidal efficiency of certain seed extract against *Anopheles stephensi*, whit reference to *Azadirachta indica*. *J Asian-Pacific Entomology* 10(3):251–255.
64. Kovendan K, *et al.* (2014) Mosquitocidal properties of *Morinda citrifolia* L. (Noni) (Family: Rubiaceae) leaf extract and *Metarhizium anisopliae* against malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston. (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific J Trop Dis* 4(S1):173–180.
65. Prakash S. (2014) Metabolites of *Metarhizium anisopliae* against Malaria Vectors and Non Target Organisms doi:10.4172/2161-0983.1000147.
66. Bilal H, Hassan SA, Khan IA (2012) Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(4):298–300.
67. Sani I, Yusuf U, M S (2017) Larvicidal potentials of *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces sp* on *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) doi:10.24896/jzbr.2017411.
68. Benserradj, Mihoubi (2014) Larvicidal activity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against mosquito larvae in Algeria. *Int J Curr Microbiol Appl*

Sci 3(1):54–62.

69. Seydou T, Ndione R, Toure M, Seye F, Ndiaye M (2017) Larvicidal and Synergic Effects of two Biopesticides (*Azadirachta indica* and *Metarhizium anisopliae*) against Larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae) (Say, 1823) doi:10.18483/ijSci.1258.