

2022

Interacción entre *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata* para el biocontrol de larvas *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue en Colombia

Jessica Briyith Escamilla Ariza
Universidad de La Salle, Bogotá, jescamilla27@unisalle.edu.co

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



Part of the [Integrative Biology Commons](#)

Citación recomendada

Escamilla Ariza, J. B. (2022). Interacción entre *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata* para el biocontrol de larvas *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue en Colombia. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/144>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas 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 *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata* para el biocontrol de larvas *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue en Colombia

Jessica Briyith Escamilla Ariza

**Universidad de la Salle
Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas
Programa de Biología
Bogotá D.C., Colombia. 2022**

Interacción entre *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata* para el biocontrol de larvas *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue en Colombia

Jessica Briyith Escamilla Ariza

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Bióloga

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

**Universidad de la Salle
Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas
Programa de Biología
Bogotá D.C., Colombia. 2022**

Nota de aceptación:

**Sara Emilia Quintero Giraldo
Jurado**

**Jesus Eduardo Castro Escobar
Jurado**

Directora: Lucia Cristina Lozano Ardila

Bogotá, 2022

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a Dios por darme las capacidades y las herramientas para realizar mi carrera universitaria. Agradezco a toda mi familia en especial a mi mamá: Jaqueline Ariza Sánchez, quien ha sido mi principal apoyo económico, emocional, que con su ejemplo y palabras me impulsa a luchar por mis sueños y por lo que me propongo cada día, quiero agradecer a mi papá: Jorge Anibal Escamilla Ruiz, por estar presente en cada uno de mis pasos, por aconsejarme e inspirarme cada día a lograr lo que quiero, guiarme a entender lo que es mejor para mi vida. Agradezco a mis hermanos, Jaer Escamilla Ariza, por inculcarme su amor por la naturaleza y la fotografía, Johana Escamilla Ariza por su apoyo incondicional y motivarme siempre a luchar por mis logros, a Juliette Escamilla Ariza por estar siempre a mi lado y querer lo mejor para mí. También agradezco a mi familia, primos, tíos y abuela, quienes me han acompañado en todo mi proceso como profesional de biología.

Agradezco a mis amigos y compañeros de clases, Yurani Arteaga Ortiz, Jessika Fernández, Paula Cascavita, Alejandro Pedraza y Arbey Mejía por su apoyo incondicional en cada momento de mi carrera como bióloga y por aportarme cada uno algo distinto que fue de gran ayuda en mi vida universitaria y personal.

Agradezco a mi directora de tesis, Lucia Cristina Lozano Ardila, por depositar su confianza en mí, creer en mis capacidades, por ser una gran profesora, ser guía, inspiración para mi carrera profesional y por estar muy presente y pendiente de mi proceso con el trabajo de grado. De igual forma agradezco a todos los profesores del programa de Biología y de la Universidad de la Salle que fueron partícipes de mi proceso académico, brindándome las herramientas y bases científicas que serán aplicadas por el resto de mi carrera como bióloga.

Gracias también a mí por disfrutar cada uno de los procesos y por elegir una carrera que me hace feliz.

Gracias a todas las demás personas que fueron partícipes de toda mi carrera universitaria y que gracias a su ayuda se mejoró mi proceso para lograr ser profesional en Biología.

¡GRACIAS!

Contenido

Lista de figuras.....	6
Lista de tablas.....	7
1. Resumen.....	8
2. Abstract.....	8
3. Introducción.....	9
4. Objetivos.....	11
5. Metodología.....	11
6. Resultados.....	13
7. Discusión.....	17
8. Conclusiones.....	18
9. Bibliografía.....	19

Lista de figuras

Figura 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti* durante 4 días obtenidas en los bioensayos con el extracto de *A. muricata* en concentraciones de 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml y 0,05 mg/ml.

Figura 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti* durante 5 días obtenidas en los bioensayos con el extracto de *M. anisopliae* en concentraciones de $2,3 \times 10^6$ conidios/ml, $1,7 \times 10^6$ conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml, $0,6 \times 10^6$ conidios/ml.

Figura 3. Curva de mortalidad de larvas de *A. aegypti* expuesto a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *A. muricata* en combinación con el hongo *M. anisopliae*.

Lista de tablas

Tabla 1. Concentración letal 50 de diluciones del extracto de *A. muricata* y conidios de *M. anisopliae* para mortalidad de larvas de *A. aegypti*.

Tabla 2. Actividad larvicida (día 2) de *M. anisopliae* y *A. muricata* de manera individual y en combinación contra larvas de *A. aegypti*.

Tabla 3. Actividad larvicida (día 4) de *M. anisopliae* y *A. muricata* de manera individual y en combinación contra larvas de *A. aegypti*.

Interacción entre *Metarhizium anisopliae* y extracto de *Annona muricata* para el biocontrol de larvas *Aedes aegypti*, vector del virus del dengue en Colombia

RESUMEN

Aedes aegypti es vector del agente etiológico de enfermedades como fiebre amarilla, dengue y chikungunya; habita en ambientes antrópicos, su distribución se ha ampliado con respecto a la altitud. Debido a que, las opciones para su control son limitadas y ha generado resistencia a insecticidas químicos, se han buscado métodos como biopesticidas, los cuales son más específicos y no representan riesgo para las personas y el ambiente. Entre las especies de plantas con acción insecticida se encuentra *Annona muricata* y como micoinsecticida *Metarhizium anisopliae*. Se han realizado estudios que comprueban la eficacia de *M. anisopliae* y *A. muricata* como controladores de larvas de *A. aegypti*, sin embargo, no hay estudios relacionados con su interacción; por lo anterior, en este trabajo se quiso comprobar la eficacia de la interacción entre *M. anisopliae* y el extracto etanólico de semillas de *A. muricata* para control biológico de larvas de *A. aegypti*. Para lograr esto se determinó el efecto larvicida del extracto y del hongo frente a larvas de *A. aegypti*. Para cada uno de los bioinsecticidas se realizaron bioensayos de los cuales se obtuvo la concentración letal 50, para el extracto de semillas de *A. muricata* se obtuvo una CL_{50} de 0,06 mg/ml. Y para el hongo CL_{50} de $2,1 \times 10^6$ conidios/ml. Posteriormente se evaluó la interacción entre ambos biocontroladores utilizando concentraciones que ocasionaron mortalidad superior al 30% de forma independiente. La mezcla binaria que mostró toxicidad más alta fue 1×10^6 conidios/ml + 0,5 mg/ml, con la cual se observó interacción sinérgica y se obtuvo mortalidad del 100% a las 24 horas después de realizados los bioensayos.

Palabras Clave: Control Biológico, *Aedes aegypti*, *Annona muricata*, *Metarhizium anisopliae*, sinergia.

ABSTRACT

Aedes aegypti is the vector of the etiological agent of diseases such as yellow fever, dengue and chikungunya; Inhabits anthropic environments, its distribution has expanded with respect to altitude. Because the options for its control are limited and have generated resistance to chemical insecticides; control methods such as biopesticides have been sought, which are more specific and do not pose a risk to people and the environment. Among the plant species with insecticidal action is *Annona muricata* and as mycoinsecticide, *Metarhizium anisopliae*. Studies have been carried out that verify the efficacy of *M. anisopliae* and *A. muricata* as controllers of *A. aegypti* larvae, however, there are no studies related to their interaction; Therefore, this aim work is to verify the effectiveness of the interaction between *M. anisopliae* and *A. muricata*'s seeds ethanolic extract for biological control of *A. aegypti* larvae. To achieve this, the larvicidal effect of each of the biocide against *A. aegypti* larvae was determined. For each of the bioinsecticides, bioassays were carried out, from which the lethal concentration 50 was obtained, for the extract of *A. muricata* seeds, an LC_{50} of 0.06 mg/ml was obtained. And for the fungus LC_{50} of 2.1×10^6 conidia/ml. Subsequently, the interaction between both biocontrol agents was evaluated using concentrations that caused independently mortality greater than 30%. The binary mixture that showed the highest

toxicity was 1×10^6 conidia/ml + 0,5 mg/ml, with a synergistic interaction and 100% mortality was obtained at 24 hours after performing the bioassays.

Key Words: Biological Control, *Aedes aegypti*, *Anonna muricata*, *Metarhizium anisopliae*, Interaction.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos conforman un grupo importante de insectos, ya que muchas especies son transmisores de agentes causales de enfermedades humanas con gran importancia en salud pública (Parra et al. 2017). Uno de estos, es el mosquito *Aedes aegypti*, siendo el principal vector de arbovirus que causan enfermedades como el dengue, fiebre amarilla y chikungunya (Cuartas et al. 2017); este insecto habita ambientes antrópicos, áreas domiciliarias y alrededores, por lo anterior, el control de sus poblaciones es un tema de importancia en salud pública (Rueda, 2015).

A. aegypti se caracteriza por ser una especie antropofílica que se desarrolla principalmente en recipientes y cuerpos de agua limpia o estancada (Cabezas et al. 2017). Las hembras de esta especie son las que están implicadas en la propagación de la infección, las cuales se alimentan de hospederos durante el día. En los trópicos las poblaciones de *A. aegypti* persisten durante todo el año incluso en la temporada seca y aumentan significativamente en temporada de lluvias (Báez, et al. 2010; Rodrigues et al. 2019) debido a variaciones en las condiciones climáticas como las precipitaciones, temperatura y humedad, que repercuten los factores de riesgo locales (OMS, 2021). Lo que representa también un aumento en los brotes epidémicos de las enfermedades mencionadas, por ejemplo, según la OMS se estima que hay 390 millones de infecciones por el virus del dengue cada año en 125 países (OMS, 2021; Bhatt et al. 2013).

Según los reportes más recientes, la distribución de *A. aegypti* ha ido cambiando, hay nuevos registros altitudinales y una gran distribución en todos los continentes, en Colombia, *A. aegypti* se encuentra en todos los departamentos que presentan alturas hasta los 2.302 msnm (Ruiz et al. 2016; Kraemer et al. 2015). Esto sucede a causa del calentamiento global y diferentes factores socioculturales, regionales y económicos, como los asentamientos humanos en las laderas de la montaña (Ruiz et al. 2016) el ambiente urbano, los comportamientos individuales y grupales de los habitantes, además, las formas particulares de organización para controlar el insecto y las enfermedades asociadas a él (Cuartas et al. 2017).

La especie *Aedes aegypti* (L.) está clasificada dentro de la familia Culicidae, Género *Aedes*, Subgénero *Stegomyia* (Rueda, 2015). Los individuos de *A. aegypti* son holometábolos, presentan cuatro estadios definidos: huevo, larvas (I, II, III, IV), pupa y adulto (Mosqueira et al. 2014). Los juveniles son de hábito acuático y son anatómicamente diferentes a los adultos (Clements, 1992).

Las opciones para el control de este vector y prevención de las enfermedades que transmite son limitadas y la gran mayoría se centra en reducir la abundancia de la población de adultos. Los programas para evitar la proliferación de mosquitos se basan en el uso de insecticidas químicos sintéticos (Marcombe et al. 2012) tales como los clorados, organofosforados y piretroides, que en sus inicios fueron exitosos. Sin embargo, a causa de su uso inadecuado, aparecieron problemas de

resistencia de los insectos hacia esos productos (González et al. 2012). El insecto puede presentar tolerancia al insecticida, la cual comienza con gran disminución de los efectos de las dosis que en un principio se consideraron eficaces. Además de la tolerancia, los insectos pueden producir enzimas específicas para degradar el compuesto químico que le fue aplicado, evitando la erradicación del insecto, a esto se le llama resistencia (Blade Font, 2010); debido a esta resistencia, es necesario replantearse nuevas formas para abordar la problemática de los insectos vectores de enfermedades (García et al., 2018).

El uso de insecticidas químicos promueve la aparición de poblaciones de plagas secundarias, esto lleva a una disminución de fauna y flora benéfica, lo que ocasiona desequilibrio en los diferentes ecosistemas, representando un riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Amariles et al. 2013; Parra et al. 2017). Con el fin de evitar estas consecuencias perjudiciales se ha buscado disminuir el uso de los plaguicidas convencionales (González et al. 2012) y desarrollar nuevas alternativas de manejo, entre estos métodos se encuentra el control biológico, el cual se define como la acción de los enemigos naturales en una población de plaga (Campos, 2016). Entre los organismos más utilizados como biocontroladores se encuentran los derivados de materiales de origen animal, vegetal y de microorganismos, los cuales han demostrado ser efectivos debido a que son específicos de los insectos objetivo, evitan el desarrollo de resistencia por parte de los insectos y representan poco o ningún riesgo para las personas y el ambiente (Amariles et al. 2013; Nava et al. 2012).

Muchas especies vegetales han mostrado potencial como insecticidas biológicos (Bobadilla et al. 2005) los cuales, debido a su bajo costo y eficacia en los programas integrados de control de mosquitos vectores, han sido usados tradicionalmente en comunidades humanas en muchas partes en el mundo, tales como *Gliricidia sepium* (Jacquin. Kunth ex Walpers, 1842), *Sapindus saponaria* (Linnaeus, 1753) y *Annona muricata* (Linnaeus, 1753; Amariles et al. 2013) Esta última pertenece a la familia Anonaceae (Llanos et al. 2008). Las semillas de esta planta poseen un grupo de metabolitos secundarios conocidos como acetogeninas, las cuales presentan propiedades repelentes o insecticidas y pueden extraerse químicamente (Rupprecht, 1990).

En las industrias dedicadas a la producción de pulpas de fruta, las semillas son desechadas, tal como *A. muricata* donde existe la posibilidad de añadir valor, utilizando sus semillas como materia prima para obtener extractos con actividad insecticida (Hincapie, 2008). Según estudios realizados por Parra y colaboradores (2007) se halló actividad insecticida del extracto etanólico de *A. muricata* sobre larvas de cuarto estadio de *A. aegypti*, con un porcentaje de mortalidad del 100% al cabo de 24 horas. En otro estudio realizado por Bobadilla y colaboradores (2005), ellos compararon entre las diferentes partes de la planta de *A. muricata* (Semillas, flores, hoja, corteza) y se encontró que al utilizar extracto etanólico de las semillas se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad en el menor tiempo, encontrando una mortalidad de larvas del 96% al cabo de 12 horas, y del 100% a las 24 horas, lo que indica que el extracto tiene un alto potencial larvicida para mosquitos de esta especie.

Otro grupo de biopesticidas son los hongos entomopatógenos, los cuales son los principales agentes de enfermedades naturales en los insectos (Carolino, 2019), al comportarse de forma epizoótica, ocasionan la disminución de poblaciones naturales (Blade Font, 2010). Los micoinsecticidas son fáciles de formular, menos tóxicos para los mamíferos y con pocas posibilidades de desarrollar resistencia a los insectos (Ravindran et al. 2016). Entre los hongos reportados como entomopatógenos se encuentran en los Deuteromycota, Orden Moniliales y

Familia Moniliaceae como: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y otro ejemplo de estos agentes de control biológico especies de *Lagenidium*, *Coelomomyces*, *Tolypocladium*, *Culicinomyces* (Mosqueira et al. 2014; Santos et al. 2009), estos han mostrado buenos resultados en el control de plagas tropicales, como los mosquitos vectores del dengue (Roberts & Leger, 2004). En condiciones de laboratorio se ha comprobado que *M. anisopliae* actúa como agente controlador en larvas de *A. aegypti* y de los géneros *Culex* y *Anopheles* (García et al. 2014). Así mismo, se ha demostrado la virulencia del microorganismo en huevos de *A. aegypti* (Mnyone, 2009; Mosqueira, 2014).

Las mezclas de compuestos con propiedad plaguicida encontrados en plantas y hongos muestran 3 tipos de interacciones; estas pueden ser aditivas: total efecto de una combinación, siendo igual a la suma de los efectos de los componentes tomados independientemente; antagónicas, el cual el efecto de la combinación de los componentes es menor que de manera individual; o sinérgicas, las cuales pueden tener un efecto más alto y duradero (Blade Font, 2010, Lozano y Dussan 2017), debido a que la actividad toxica de la mezcla es mayor que la suma de sus actividades individuales (Fernández, 2016). Por esto es importante la identificación de compuestos dentro de las mezclas que produzcan una mayor eficacia en el control de vectores y minimicen el desarrollo de la resistencia a los insecticidas (González et al. 2012).

Aunque se han realizado diversos estudios que comprueban de forma independiente la eficacia de *Metarhizium anisopliae* y los extractos de *Annona muricata* como agentes de control contra larvas de *Aedes aegypti*, no se encontraron referencias de estudios que evalúen los efectos de la mezcla de estos. Por lo anterior, en este trabajo se determinó el efecto larvicida del extracto etanólico de la semilla de *A. muricata* y el hongo *M. anisopliae* de forma independiente y en combinaciones para el control biológico de larvas de *A. aegypti*.

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto larvicida del extracto etanólico de la semilla de *A. muricata* y el hongo *M. anisopliae* de forma independiente y en combinaciones frente a larvas de *A. aegypti*.

Específicos

- Comparar el efecto larvicida en *A. aegypti* de manera independiente del extracto de la semilla de *A. muricata* y del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*.
- Evaluar la interacción del extracto de la semilla de *A. muricata* junto con el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* sobre la mortalidad en larvas de *A. aegypti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La fase experimental se realizó en los laboratorios de la Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad de la Salle, en Bogotá, Colombia.

Las colonias de *A. aegypti* se obtuvieron a partir de un pie de cría colectada en el municipio de Villeta Cundinamarca. El insectario de la Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad de La Salle, el encargado de proporcionar las larvas las mantuvo en recipientes de plástico, con agua reposada; las larvas fueron alimentadas con alimento balanceado ‘‘purina’’ pulverizada, los adultos fueron mantenidos en jaulas y se alimentaron con sangre de curí (*Cavia porcellus*). Se mantuvo a una temperatura entre 25-30°C, una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (Mosqueira et al. 2014).

Preparación de diluciones del extracto de la semilla de *A. muricata*

El extracto etanólico de semilla de *A. muricata* fue proporcionado por La Escuela de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad de La Salle. El cual había sido preparado por Sanabria & Lozano (2022), quienes utilizaron 500 g de semillas de *A. muricata*, adquiridas comercialmente en plazas de mercado. Las semillas fueron secadas, trituradas y sometidas a extracción exhaustiva mediante percolación con etanol al 95%. Luego el extracto se filtró y concentró mediante destilación a presión reducida en un rota-evaporador a una temperatura controlada de 40°C. Finalmente el material fue almacenado en botellas de vidrio color ámbar para su posterior uso. (Carrion y Garcia, 2010). Posteriormente evaluaron la solubilidad de los extractos vegetales en agua destilada y Tween 80 al 0,05% y 0,1%. (Sanabria & Lozano 2022).

Preparación de diluciones de *M. anisopliae*

El hongo *M. anisopliae* se adquirió comercialmente de la empresa Biológicos y Ecológicos, su ficha técnica indica que es específico para larvas de mosquitos. El medio de cultivo fue PDA (agar de papa y dextrosa), se mantuvo a 25°C durante 5 días, luego se diluyó en Tween 80 al 0,05%. Los conidios fueron cuantificados mediante un conteo directo utilizando un microscopio óptico con una cámara Neubauer (Mosqueira et al. 2014, Amóra et al. 2010).

Pruebas de toxicidad del extracto etanólico de semilla de *A. muricata* y el hongo *M. anisopliae* de manera individual y en combinaciones contra larvas de *A. aegypti*

Para las pruebas de actividad larvicida individual y en combinaciones del extracto de semillas de *A. muricata* y del hongo *M. anisopliae*, se utilizaron tres unidades experimentales por tratamiento y concentración, consistieron en vasos de vidrio previamente esterilizados en autoclave, cada uno

con 20 larvas de tercer estadio de *A. aegypti* y con un volumen de 90 ml de agua destilada. Para el extracto de semillas de *A. muricata* se utilizaron 10 ml; para el hongo se agregaron las concentraciones de esporas del hongo en volumen de 10 ml para ambos se diluyeron en agua destilada y Tween 80 al 0,05%. Se realizaron tres repeticiones por las cuatro concentraciones de cada uno, fueron: 1) *A. muricata*: 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml y 0,05 mg/ml, las cuales se utilizaron en otros estudios y se encontró actividad larvicida. (Bobadilla et al. 2005). 2) *M. anisopliae*: $2,3 \times 10^6$ conidios/ml, $1,7 \times 10^6$ conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml, $0,6 \times 10^6$ conidios/ml, en las que se tuvieron en cuenta intervalos de concentraciones usadas con éxito en otros estudios (Mosqueira et al. 2014, Amóra et al. 2010). Para mejorar la emulsión de los compuestos se adicionó Tween 80 al 0,05% en recipientes con 90ml de agua destilada y 20 larvas de tercer estadio de *A. aegypti*; como control negativo se utilizó 90 ml de agua destilada y Tween 80 al 0,05%. Para el control negativo también se realizaron 3 réplicas por tratamiento. Se registró mortalidad de larvas durante cada 24 horas, durante 4 y 5 días, considerando que una larva estaba muerta si al tocarla con un palillo de madera no presentaba movimiento.

Para la elaboración de las mezclas binarias se utilizaron combinaciones de aquellas que presentaron valores de mortalidad de larvas superior al 30% para cada biocontrolador aplicado en forma individual. Se evaluaron 3 concentraciones del hongo *M. anisopliae*, mezcladas con 3 concentraciones del extracto de *A. muricata* 1×10^6 conidios/ml + 0,5 mg/ml, $1,7 \times 10^6$ conidios/ml + 0,1 mg/ml, $2,3 \times 10^6$ conidios/ml + 0,5 mg/ml y $2,3 \times 10^6$ conidios/ml + 0,01 mg/ml. Se realizó un control negativo con agua destilada y Tween 80 al 0,05% y se realizaron 3 repeticiones por mezcla y control. Luego se determinó la mortalidad de las larvas y se retiraron las muertas diariamente.

Análisis experimental

Se calcularon valores promedio de mortalidad de las larvas y se graficaron curvas de mortalidad para cada extracto por aparte y de la interacción del extracto de semillas de *A. muricata* y de *M. anisopliae*. Para corregir el porcentaje de mortalidad se utilizó la fórmula propuesta por Sun & Johnson de 1960:

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

En donde 'T' es el porcentaje de mortalidad del tratamiento y 'C' es el porcentaje de mortalidad del control negativo.

Se estimó la concentración letal 50 y los límites de confianza de las concentraciones de *A. muricata* y de *M. anisopliae* utilizando el programa TRAP (Version 1.30a) (Pérez, M. 2017).

Para evaluar la interacción entre el extracto de semillas y *M. anisopliae* se utilizó la siguiente fórmula (Lozano y Dussan, 2017):

$$P = 1 - (1 - P1) (1 - P2)$$

Las tasas de mortalidad de las mezclas se sometieron a Chi cuadrado, para lo cual se calculó la mortalidad de larvas esperada, y luego se comparó con la mortalidad de larvas esperada. Lo que resultó clave para determinar el tipo de interacción que se obtuvo en cada una de las mezclas.

RESULTADOS

Mortalidad de larvas de *A. aegypti* causadas por el extracto etanólico de semillas de *A. muricata*

El extracto etanólico de *A. muricata* demostró ser un buen controlador de larvas de *A. aegypti*, ya que cuando aumentó concentración también aumentó el porcentaje de mortalidad de larvas (figura 1). Con la mayor concentración (0,5 mg/ml) del extracto etanólico de las semillas de guanábana se alcanzó una mortalidad del 39% a las 24 horas 91% a las 48 horas y del 100 % a las 72 horas (Figura 1). Con la segunda y tercera concentración se obtuvieron porcentajes de mortalidad superiores al 30% a partir de las 48 horas (Figura 1). Se halló una CL_{50} a los cuatro días de 0,06mg/ml (Tabla 1).

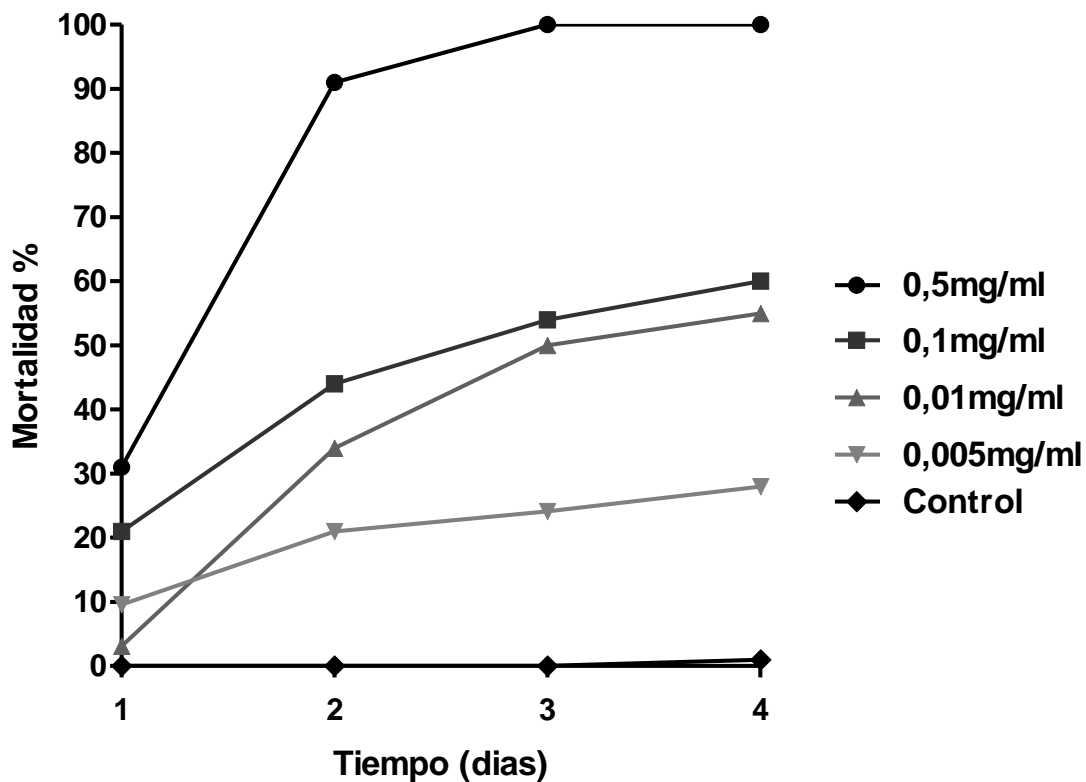


Figura 1. Curva de mortalidad de larvas de *A. aegypti* de los bioensayos con el extracto de *A. muricata* en concentraciones de 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml y 0,005 mg/ml.

Mortalidad de larvas de *A. aegypti* por el hongo *M. anisopliae*

Se realizaron bioensayos con 4 concentraciones diferentes de conidios de las cuales se obtuvo un porcentaje superior al 20% a partir del 3 día con las dos concentraciones $2,3 \times 10^6$ conidios/ml y $1,7 \times 10^6$ conidios/ml. Con la mayor concentración de conidios de *M. anisopliae* se logró una

mortalidad del 50% el día 5 (Figura 2). Al finalizar el bioensayo se halló una CL_{50} de $2,1 \times 10^6$ conidios/ml (Tabla 1).

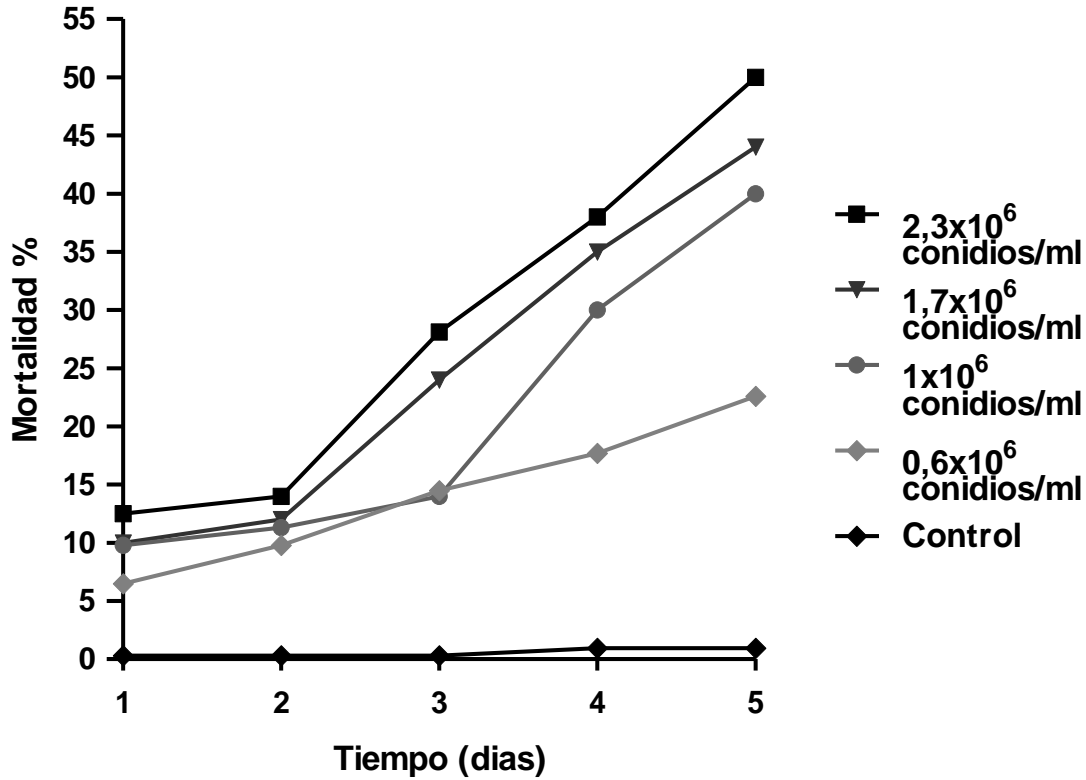


Figura 2. Curva de mortalidad de larvas de *A. aegypti* de los bioensayos con el extracto de *M. anisopliae* en concentraciones de $2,3 \times 10^6$ conidios/ml, $1,7 \times 10^6$ conidios/ml, 1×10^6 conidios/ml y $0,6 \times 10^6$ conidios/ml.

Tabla 1. Concentración letal 50 del extracto de *A. muricata* y conidios de *M. anisopliae* en larvas de *A. aegypti*.

Organismo	CL_{50}	Intervalo de confianza 95%
<i>A. muricata</i>	0,06 mg/ml	0,002 – 2,462
<i>M. anisopliae</i>	$2,1 \times 10^6$ conidios/ml	1362385,46 – 3245786,87

Mortalidad de larvas de *A. aegypti* por la interacción entre *A. muricata* y *M. anisopliae*

Se logró obtener mortalidad superior al 80% a partir del primer día con las combinaciones del extracto de *A. aegypti* y de conidios de *M. anisopliae* evaluadas. Utilizando la mezcla 1×10^6 conidios/ml+0,5mg/ml se obtuvo mortalidad del 100% a partir del primer día (figura 3).

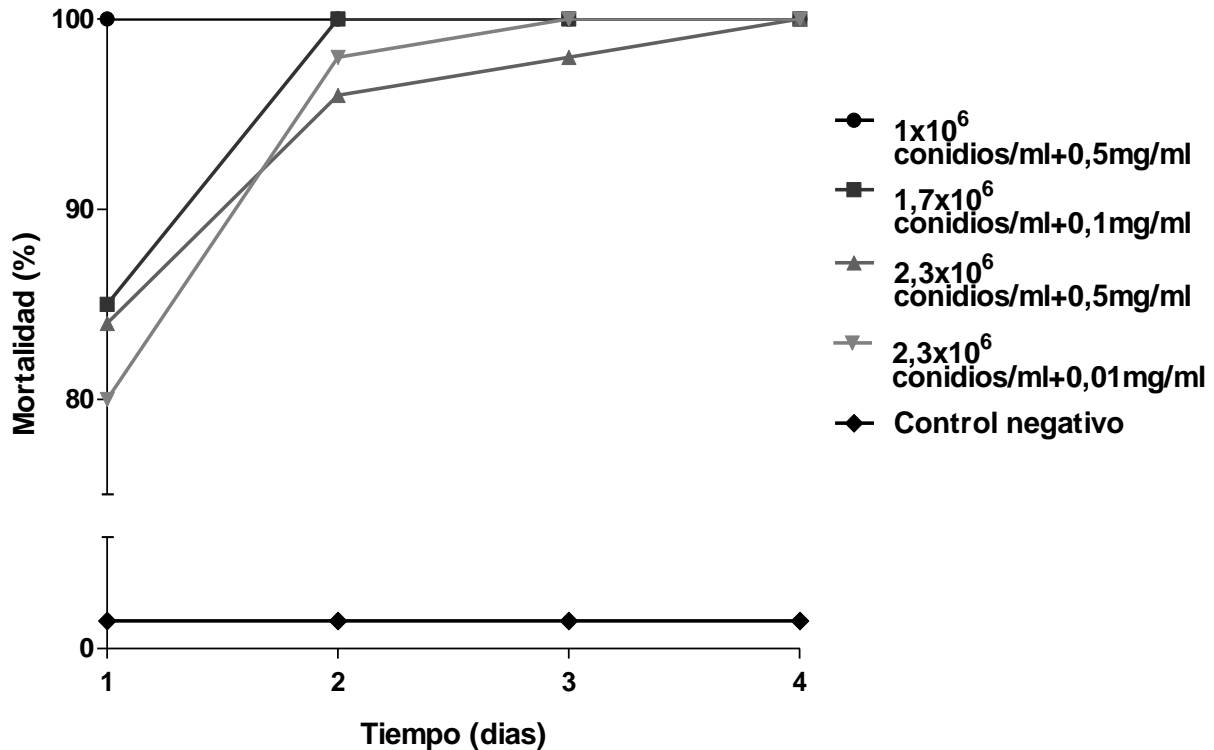


Figura 3. Curva de mortalidad de larvas de *A. aegypti* expuestas a mezclas del extracto etanólico de *A. muricata* en combinación con el hongo *M. anisopliae*.

Al evaluar la actividad larvicida de las mezclas del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* y del extracto de *A. muricata* al cabo de dos días se halló mortalidad superior al 96%, comparado con el efecto individual de estos dos compuestos que ocasionaron desde el 11,3% hasta el 14% de mortalidad con *M. anisopliae* y desde el 34% hasta el 91% de mortalidad con *A. muricata* tal y como se observa en la tabla 2. Adicional, el valor de p del chi cuadrado confirmó el efecto sinérgico del hongo y el extracto, ya que en 3 de las 4 combinaciones la significancia fue menor a 0,01 y confirmó el efecto aditivo en una de las mezclas con un valor de $p > 0,05$ (tabla 2).

Tabla 2. Actividad larvicida (día 2) de *M. anisopliae* y *A. muricata* de manera individual y en combinación contra larvas de *A. aegypti*

Tratamiento	Concentración	Mortalidad		χ^2	Valor de p
		Observada %	Esperada %		
<i>M. anisopliae</i>	1x10 ⁶ conidios/ml	11,3			
	1,7x10 ⁶ conidios/ml	12			
	2,3x10 ⁶ conidios/ml	14			
<i>A. muricata</i>	0,01 mg/ml	34			
	0,1 mg/ml	44			
	0,5 mg/ml	91			
<i>M. anisopliae</i>	1x10 ⁶ conidios/ml+0,5 mg/ml	100	92,02	8,68	*0,003
+ <i>A. muricata</i>	1,7x10 ⁶ conidios/ml+0,1 mg/ml	100	50,72	97,16	**6,3917e ⁻²³
	2,3x10 ⁶ conidios/ml+0,5 mg/ml	96	92,26	1,98	0,161
	2,3x10 ⁶ conidios/ml+0,01 mg/ml	98	43,24	122,18	**2,108e ⁻²³

Al comparar la actividad larvicida de las mezclas del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* y del extracto de *A. muricata* al cabo de cuatro días, se halló mortalidad del 100%; comparado con el efecto individual de estos dos compuestos que ocasionaron mortalidad desde el 30% hasta el 99%, como se observa en la Tabla 3. Además, el valor de p del chi cuadrado confirmó efectos sinérgicos del hongo y del extracto ya que en 2 combinaciones la significancia fue menor a 0,01, también se halló efecto aditivo en 2 de las combinaciones con valor de p > 0,05.

Tabla 3. Actividad larvicida (día 4) de *M. anisopliae* y *A. muricata* de manera individual y en combinación contra larvas de *A. aegypti*

Tratamiento	Concentración	Mortalidad		χ^2	Valor de p
		Observada %	Esperada %		
<i>M. anisopliae</i>	1x10 ⁶ conidios/ml	30			
	1,7x10 ⁶ conidios/ml	35			
	2,3x10 ⁶ conidios/ml	38			
<i>A. muricata</i>	0,01 mg/ml	55			
	0,1 mg/ml	60			
	0,5 mg/ml	99			
<i>M. anisopliae</i>	1x10 ⁶ conidios/ml+0,5 mg/ml	100	99,93	0,07	0,791
+ <i>A. muricata</i>	1,7x10 ⁶ conidios/ml+0,1 mg/ml	100	74	35,13	**3,076e ⁻⁰⁹
	2,3x10 ⁶ conidios/ml+0,5 mg/ml	100	99,94	0,06	0,803
	2,3x10 ⁶ conidios/ml+0,01 mg/ml	100	72,1	38,69625	**4,952e ⁻¹⁰

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con lo constatado en referencias bibliográficas se evidencia que el uso de insecticidas de origen vegetal y de microorganismos han demostrado ser efectivos en control de mosquitos (Amariles et al, 2013; Roberts et al, 2004). Así mismo, se ha reportado que los bioinsecticidas pueden ser usados en fase de campo ya que son amigables con el medio ambiente, adicionalmente son más rentables que los insecticidas químicos, sin contar con el beneficio que trae su particular característica de no afectar otros ecosistemas sino a la especie que específicamente se pretende controlar (Nava et al. 2012). Ahora bien, referente al fomento de su uso, constituye una gran labor darlos a conocer, y de esta manera evitar el uso de insecticidas químicos, los cuales representan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Parra et al. 2017).

En el presente estudio se realizaron bioensayos con el extracto de semillas de *A. muricata* el cual se eligió porque se ha comprobado que es un buen insecticida frente a las larvas de *A. aegypti* en bajas y altas concentraciones, por cuanto, esta parte de la planta es mejor comparada con otras partes como flores, hojas, ramas, corteza, o raíz; Los resultados obtenidos están relacionados con el estudio realizado por Bobadilla y colaboradores (2005) en el cual se evidenció que con el extracto de semillas de *A. muricata* se obtuvo el porcentaje más alto de mortalidad de larvas de cuarto estadio con concentraciones de 0,5mg/ml y 1mg/ml, obtuvieron resultados de mortalidad del 100% a las 24 horas de mosquitos del género *Aedes*. Lo anterior indica, que el extracto de las semillas tiene un alto potencial tóxico para mosquitos de este género. Comparado con el presente estudio en el que se utilizaron larvas de *A. aegypti* de tercer estadio y se obtuvo una mortalidad de estas del 99% a partir del cuarto día, utilizando la concentración 0,5 mg/ml del extracto de semillas de *A. muricata* (figura 1).

Con el fin de establecer una comparación y determinar las cantidades más adecuadas de concentración para utilizar, en la investigación realizada por Parra y colaboradores (2007) se halló actividad insecticida del extracto etanólico de *A. muricata* sobre larvas de *A. aegypti*, con un porcentaje de mortalidad del 100% al cabo de 24 horas utilizando una concentración de 0,9 mg/ml;in embargo, esta concentración de 0,9 mg/ml es más alta comparada con la realizada en este estudio, siendo la mayor concentración utilizada de 0,5mg/ml. Por lo tanto, se puede pensar que, al utilizar una mayor concentración, se obtiene mayor mortalidad de mosquitos en menor tiempo. El extracto de semillas de *A. muricata* también produjo mortalidad entre el 30 y 50% a las 72 h utilizando las concentraciones 0,1mg/ml y 0,01 mg/ml (Figura 1) lo cual demostró que a concentraciones bajas también funciona como controlador de larvas de *A. aegypti*.

En cuanto al hongo, es pertinente mencionar que *M. anisopliae* ha mostrado buenos resultados en el control de plagas tropicales como los mosquitos vectores del dengue (Roberts & Leger, 2004), actuando como agente controlador de larvas de *A. aegypti* y de los géneros *Culex* y *Anopheles* (García et al. 2014). En la investigación realizada por Mosqueira y colaboradores (2014) utilizando las concentraciones $2,5 \times 10^6$ conidios/ml y $2,5 \times 10^7$ conidios/ml las cuales demostraron la virulencia del microorganismo, en el estudio se obtuvieron resultados de mortalidad del 70 y 100% respectivamente al día 3, estas son concentraciones superiores a las utilizadas en el presente estudio, las siguientes son las más significativas ($2,3 \times 10^6$ conidios/ml, $1,7 \times 10^6$ conidios/ml) en las que se obtuvo mortalidad del 20% a partir del 3er día, aumentando hasta el quinto día con una

mortalidad del 50% y 43% respectivamente (Figura 2). Además, se obtuvo una concentración letal 50 de $2,1 \times 10^6$ conidios/ml (Tabla 1).

En cuanto a la utilización de mezclas de diferentes extractos de plantas con microorganismos se puede potencializar el efecto de cada uno de estos, ya que tienen efectos tóxicos en las larvas de especies de mosquitos del género *Aedes* y *Anopheles*, sin embargo, cabe resaltar que cuando son utilizados de manera individual se necesitan concentraciones elevadas para obtener una mortalidad alta en la especie *A. aegypti*, contrario a lo que sucede en combinación con otros productos, de lo cual se puede obtener efectos aditivos o sinérgicos, tal como se pudo demostrar en el artículo realizado por Schmutterer en 1990 en el que se utilizó la planta de neem (*Azadirachta indica*) y Bti (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*) ocasionando una mortalidad mayor al ser combinados.

De acuerdo con una investigación realizada por Murugan y colaboradores (2002) en donde se combinó el aceite esencial de *A. indica* y *Pongamia pinnata* con Bti observándose un efecto sinérgico donde la mortalidad de larvas, pupas y adultos de *C. quinquefasciatus* incrementó al aumentar la concentración de los aceites esenciales y Bti cuando fueron combinados; comprobándose que en menores concentraciones el uso de combinaciones reduce el tiempo de mortalidad.

Se ha comprobado que utilizar el hongo *M. anisopliae* en combinación con extractos de plantas puede aumentar la actividad larvicida. En un estudio realizado por Beltrán, et al (2018) se realizaron bioensayos de *M. anisopliae* con el extracto de *A. indica* que evidenció interacción sinérgica en las concentraciones de hongo *M. anisopliae* 1×10^3 conidios/ml y *Azadirachta indica* 1 ppm y su actividad larvicida fue mayor a la de cada biocontrolador de forma independiente, obteniendo una mortalidad del 100% al cabo de 5 días a comparación con el efecto de manera individual que causó mortalidad menor al 60%, además su efecto sinérgico se comprobó con un p valor menor de 0,01, demostrando que el uso combinado de insecticidas biológicos aumenta la actividad biocida.

En este estudio se obtuvo interacciones aditivas y sinérgicas teniendo en cuenta que la mortalidad observada en la mezcla fue mayor a la mortalidad esperada en los días 2 y 4 (Tabla 2 y 3) con las diferentes mezclas del extracto de semillas de *A. muricata* y conidios de *M. anisopliae*.

La mezcla que tuvo una toxicidad más alta fue la 1×10^6 conidios/ml + 0,5mg/ml. Estas concentraciones por separado tuvieron un porcentaje de mortalidad del 28% y 99% respectivamente el día cuatro. Sin embargo, en la mezcla de estos extractos se obtuvo una mortalidad del 100% desde el primer día; No obstante, al determinar el nivel de significancia con ayuda del test de chi cuadrado se obtuvo un p valor menor a 0,01 el día 2 (Tabla 2.) demostrando sinergia hasta ahora, mientras que al cabo de 4 días hubo diferencias en los resultados del test, mostrando un p valor superior a 0,01 y por debajo de 1, a pesar de ser el más idóneo, no configuró un patrón de sinergia, por tanto se determinó como una interacción aditiva; esto puede ser debido a que se utilizó una concentración alta (0,5mg/ml) en este caso al mezclarse con el hongo, potencializando su efecto, e influyendo en aumentar su toxicidad, teniendo mayor mortalidad en menor tiempo, que cuando son usados de manera individual.

La mezcla que señaló interacción aditiva desde el día 2 fue la $2,3 \times 10^6$ conidios/ml+0,5 mg/ml mostrando un p valor mayor que 0,01 e inferior a 1 (tabla 2 y 3), además, una mortalidad del 96% y 100% el día 2 y 4 respectivamente. Este tipo de interacción se da debido a que las concentraciones

utilizadas presentaban resultados de mortalidad altos incluso al ser usados de manera individual. En este caso el resultado es positivo, porque se redujo el tiempo de mortalidad de larvas, sin embargo, para obtener una interacción sinérgica es mejor utilizar concentraciones bajas.

Las mezclas $1,7 \times 10^6$ conidios/ml+0,1 mg/ml y $2,3 \times 10^6$ conidios/ml+0,01 mg/ml tuvieron una alta toxicidad, mostrando mortalidad del 85% y 80% respectivamente al día 1, lo cual fue aumentando significativamente hasta llegar al 100% de mortalidad al día 4 (figura 3). Por otro lado, la mortalidad observada fue superior a la esperada y se obtuvo un p valor inferior a 0,01. Las mezclas mencionadas anteriormente tuvieron valores bajos de mortalidad siendo usados de manera individual. Lo que señala una interacción sinérgica por parte de las mezclas, por esta razón, las mezclas son idóneas para ser usadas como control de larvas de *A. aegypti*, debido a que se necesitan pocas concentraciones del extracto de *A. muricata* y del hongo *M. anisopliae*; lo cual es positivo para disminuir costos y obtener actividad biocida en menor tiempo, teniendo mayor efectividad y de esta forma evitar crecimiento de larvas y propagación de adultos.

CONCLUSIONES

- Se comprobó el efecto larvicida del extracto etanólico de semillas de *A. muricata* y el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* de manera individual y en combinaciones binarias. Siendo 0,5 mg/ml, $2,3 \times 10^6$ conidios/ml y 1×10^6 conidios/ml+0,5 mg/ml, las concentraciones que presentaron porcentajes de mortalidad más altos.
- Se comparó el efecto larvicida entre el insecticida vegetal y el hongo entomopatógeno y se halló mayor mortalidad de *A. aegypti* con la presencia del insecticida vegetal *A. muricata*. Además, se demostró que al utilizar la combinación de un insecticida de origen vegetal unido a un hongo entomopatógeno puede ser una alternativa al control del mosquito *Aedes aegypti*. debido a que se obtuvo interacción aditiva y sinérgica entre la mezcla las diferentes diluciones mencionadas del extracto de semillas de *A. muricata* y el hongo entomopatógeno *M. anisopliae*

RECOMENDACIONES

Es necesario tener en cuenta que los bioensayos fueron realizados en condiciones laboratorio y se sugiere realizar en condiciones de semi campo para determinar su efecto bajo esas condiciones.

Se recomienda utilizar las menores concentraciones de los bioensayos para las mezclas de extracto y hongo, de esta forma se reduce tiempo de mortalidad y costos al momento de ser implementado en condiciones de semicampo y campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amóra, S., Bevilaqua, C., Feijó, F., Pereira, R., Alves, N., Freire, F., & Rocha, M. (2010). Los efectos del hongo *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* en diferentes etapas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Acta tropica*, 113 (3), 214-220.
2. Báez, I. (2010). Evaluación de Plantas Medicinales con Potencial en el Control Biológico del Vector Transmisor de Dengue de *Aedes aegypti*. *Tlaxcala: Instituto Politécnico Nacional Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada*.
3. Beltrán Ruiz, M. (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. <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/37>
4. Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J., Brownstein, J., Hoen, A., Sankoh, O et al. The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* 2013, 496, 504–507.
5. Blade Font, A. (2010). Apuntes sobre mecanismos de acción de fármacos: farmacología. Instituto Politécnico Nacional.
6. Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J., & Taramona, L. (2005). Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Revista peruana de Biología*, 12(1), 145-152.
7. Cabezas, L., Cabanzo, W., Santa, F., Olano, V. A., Sarmiento, D., Vargas, S., & Matiz, M. I. (2017). Distribución espacial de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el área rural de dos municipios de Cundinamarca, Colombia. *Biomédica*, 37(2), 41-49.
8. Campos, E., de Oliveira, J., Pascoli, M., de Lima, R., & Fraceto, L. (2016). Neem oil and crop protection: from now to the future. *Frontiers in plant science*, 7, 1494.
9. Carolino, A., Gomes, S., Teodoro, T., Mattoso, T., & Samuels, R. (2019). *Aedes aegypti* pupae are highly susceptible to infection by *Metarhizium anisopliae* blastospores. *J Pure Appl Microbiol*, 13(3), 1629-1634.
10. Clements, N. (1992). The biology of mosquitoes. Volume 1: development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall.
11. Cuartas, E., Martínez, G., Caicedo, M., Garcés, J., Ariza-Araújo, Y., Peña, M., & Méndez, F. (2017). Distribución espacial de criaderos positivos y potenciales de *Aedes aegypti*. *Biomédica*, 37(2), 59-66.
12. Fernández Navarro, M. (2016). Caracterización de las cepas LBIT-980 y LBIT-1217 de *Bacillus thuringiensis* con toxicidad hacia larvas del mosquito *Aedes aegypti* (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica).
13. García, G., García, C., Gordillo, L., & Martínez, M. (2014). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2), 21-28.
14. García, G., David, M., Martins, A., Maciel-de-Freitas, R., Linss, J., Araújo, S & Valle, D. (2018). The impact of insecticide applications on the dynamics of resistance: The case of four *Aedes aegypti* populations from different Brazilian regions. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(2).
15. González, M., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2012). Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8), 42-55.

16. Hincapie, A.; Ceballos, M.; Lopera, D. (2008). Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista colombiana de entomología* 34(1):76-82.
17. Kraemer, U., Sinka, E., Duda, A., Mylne, Q., Shearer, M., Barker, M., & Hendrickx, G. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. *elife*, 4, e08347.
18. Llanos, H., Lopera, A. & M. Giraldo (2008). Insecticidal activity of *Annona muricata* (Anonaceae) seed extracts on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 76-82.
19. Lozano, L. C., & Dussán, J. (2017). Synergistic activity between S-layer protein and spore-crystal preparations from *Lysinibacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Current microbiology*, 74(3), 371-376.
20. Marcombe, S., Mathieu, B., Pocquet, N., Riaz, A., Poupardin, R., Sélior, S., & David, P. (2012). Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PloS one*, 7(2), e30989.
21. Mnyone, L., Russell, T., Lyimo, I., Lwetoijera, D., Kirby, M & Luz, C. (2009). First report of *Metarhizium anisopliae* IP46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabienses* (Diptera: Culicidae). *Bio Med Central Parasit & Vectors*; 2(1):59.
22. Mosqueira, A., Rodríguez, R., Cueva, S., & Silva, C. (2014). Efecto Biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* ccb-1e302 y *Beauveria Bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes aegypti*. *Ucv-Scientia*, 6(1), 33-41.
23. Nava, E., García, C., Camacho, R., & Montoya, L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.
24. Parra, G., Pajón C., Cotes, J. (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Med*, 21(1):47-54.
25. Parra, G., Cortes, K., & Corradine, D. (2017). Efecto del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* (Guanábana) para el control de larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. *Intropica*, 23-30.
26. Pérez, M. (2017). Evaluación del temefos y pyriproxifeno para el control de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. *Horizonte Médico*, 17(4), 24-29.
27. Ravindran, K., Akutse, S., Sivaramakrishnan, S., & Wang, L. (2016). Determination and characterization of destruxin production in *Metarhizium anisopliae* Tk6 and formulations for *Aedes aegypti* mosquitoes control at the field level. *Toxicon*, 120, 89-96.
28. Roberts, D. & Leger, R. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54(1), 1-70.
29. Rodrigues, J., Borges, P., Fernandes, É. & Luz, C. (2019). Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* sl IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis. *Acta tropica*, 193, 192-198.
30. Rueda, E. (2015). Aporte al conocimiento de la biología básica y aplicada de *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila, Saprolegniales) como agente de control biológico de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).
31. Ruiz, F., González, A., Vélez, A., Gómez, G. F., Zuleta, L., Uribe, S., & Vélez, D. (2016). Presence of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) and its natural infection with dengue virus at unrecorded heights in Colombia. *Biomédica*, 36(2), 303-308.

32. Rupprecht, K. & H. Mclaughlin, L. (1990). Annonaceous acetogenins a review. *Journal. Natural Products* 53 (2): 237-278.
33. Sanabria, S., & Lozano, L. (2022). Actividad larvica de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bacillaceae) y extractos vegetales para el control biológico de *Aedes aegypti* (Culicidae). *Actualidades Biológicas*, 44(117).
34. Santos, A., Tai, H., Rocha, L., Silva, H., & Luz, C. (2009). Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. *Biological Control*, 50(1), 37-42.
35. Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual review of entomology* 35(1): 271-297.
36. Sun, Y. P., & Johnson, E. (1960). Analysis of joint action of insecticides against house flies. *Journal of economic entomology*, 53(5), 887-892.