

Actividad larvicida de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bacillaceae) combinado con extractos vegetales para el control biológico de *Aedes aegypti* (Culicidae)

Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bacillaceae) and plant extracts for the biological control of *Aedes aegypti* (Culicidae)

Sebastián Sanabria-Jimenez¹, Lucía C. Lozano^{1*}

Resumen

El díptero *Aedes aegypti* es trasmisor de virus causantes de enfermedades como dengue, fiebre amarilla, Zika y chikungunya; para el control de este vector se utilizan pesticidas químicos frente a los cuales los mosquitos han generado resistencia. El control biológico con microorganismos y extractos vegetales es una alternativa de manejo de las poblaciones de insectos vectores efectiva y menos contaminante para el ambiente. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad larvicida de mezclas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) y extractos de *Annona muricata*, *Ricinus communis* y *Sapindus saponaria* para el control biológico de larvas de *A. aegypti*. Para ello se obtuvieron extractos etanólicos de semillas o frutos de las tres especies vegetales y se determinaron las concentraciones letales 50 de los extractos y la bacteria. Posteriormente se realizaron combinaciones de los extractos con *Bti* y se evaluó el efecto de dichas interacciones. Tanto la bacteria como los extractos vegetales presentaron actividad larvicida. Se encontró que las mezclas de *Bti* con el extracto etanólico de *R. communis* y *S. saponaria* generaron un efecto antagónico, mientras que la combinación con *A. muricata* presentó una acción independiente. La adición del extracto etanólico de semillas de *A. muricata* a cultivos esporulados de *Bti* se podría considerar una alternativa más efectiva para el control biológico de *A. aegypti* que con cada uno de estos compuestos por separado.

Palabras claves: bioensayos, dengue, mezclas binarias, mosquitos, vectores

Abstract

Aedes aegypti transmits viruses that cause diseases such as dengue, yellow fever, Zika and chikungunya. Chemical pesticides have been used to control this vector, but mosquitoes have developed resistance to insecticides. Biological control with microorganisms and plant extracts are effective alternatives for the management of insect vector populations and introduce less pollutants into the environment. The objective of this research was to evaluate the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) and extracts of *Annona muricata*, *Ricinus communis* and *Sapindus saponaria* for the biological control of *A. aegypti* larvae. For this, ethanolic extracts of seeds or fruits of the three plant species were obtained and lethal concentrations for 50% mortality of the extracts and bacteria were determined. Subsequently, combinations of the extracts with *Bti* were made and the interactions were evaluated. Both bacteria and plant extracts showed larvicidal activity. Mixtures of *Bti* with the ethanolic extracts of *R. communis* and *S. saponaria* generated an antagonistic effect, while in combination with ethanolic extracts of *A. muricata* presented an independent action effect. Therefore, the addition of the ethanolic extract of *A. muricata* seeds to sporulated cultures of

¹. Programa de Biología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá-Colombia.

* Autor para correspondencia: <lclozano@unisalle.edu.co>

Bti could be considered more effective for the biological control of *A. aegypti* than with each compound separately.

Keywords: bioassays, binary mixtures, dengue, mosquitoes, vectors

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, el 17% de las enfermedades infecciosas, a nivel mundial, corresponden a las causadas por microorganismos transmitidos por vectores (OMS, 2017). Entre las más importantes y que necesitan vigilancia, prevención y control se encuentran el dengue, la fiebre amarilla, la fiebre por Zika y chikungunya (OMS, 2017). Todas estas son enfermedades producidas por arbovirus transmitidos por el mismo vector, *Aedes aegypti*, un díptero hematófago perteneciente a la familia Culicidae asociado principalmente a zonas urbanas y suburbanas (Nelson, 1986).

La falta de vacunas para la mayoría de los virus transmitidos por *A. aegypti* genera que los esfuerzos se concentren en el control de las poblaciones del vector y, aun con la implementación de vacunas, se debe continuar un enfoque integrado con la investigación en el control de vectores, para alcanzar tasas elevadas de cobertura en las comunidades con mayor riesgo (Espinal et al., 2019). Desde hace más de 50 años se intensificó el uso de insecticidas químicos a base de compuestos organofosforados, para controlar larvas y adultos de *A. aegypti* (Jayaraj et al., 2016; Soborio et al., 2019) y, como consecuencia de esto, las poblaciones de mosquitos fueron sometidas a una intensa presión de selección; en 1999 se reportaron poblaciones de *Aedes* resistentes a dichos compuestos alrededor de todo el continente americano (Rodríguez et al., 2010). Igualmente ocurrió con el uso de compuestos piretroides (Da-Cunha et al., 2005), encontrando resistencia a estos insecticidas en al menos 21 especies de *Aedes* (Fonseca y Quiñones, 2005). Así también, se reporta la resistencia cruzada de estos mosquitos a otros insecticidas (Rodríguez et al., 2003).

Debido al aumento en el número de brotes de las arbovirosis transmitidas por *A. aegypti* (OPS, 2017)

y a la pérdida de la eficacia de los insecticidas químicos, cuyos compuestos son altamente tóxicos para el ambiente, los organismos no blanco y la salud humana (Cárdenas et al., 2005), es necesario buscar nuevas estrategias para el control de *A. aegypti*.

El control biológico se propone como una alternativa al uso de los insecticidas químicos y uno de los organismos más utilizados es la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* (*Bti*). El mecanismo de acción de este microorganismo es la producción de toxinas Cry y Cyt, específicas para las larvas de especies de estos dípteros, causando la lisis de las células epiteliales del intestino y finalmente la muerte del insecto (Mendoza-Almanza et al., 2020; Ritchie et al., 2010). El principio activo de los formulados comerciales de *Bti* son las toxinas Cry4Aa, Cry4Bb, Cry11Aa y la Cyt1Aa; las cuatro actúan en conjunto disminuyendo la ocurrencia de poblaciones de insectos resistentes en condiciones de campo, pero, en laboratorio, ya se han registrado cepas de *A. aegypti* resistentes a una sola de las toxinas Cry (Silva-Filha et al., 2021).

También se han evaluado los extractos vegetales obtenidos a partir de frutos de *Ricinus communis*, *Sapindus saponaria*, *Melia azedarach*, *Carica papaya*, *Annona muricata* y la especie *Gliricidia sepium*, para los cuales se ha demostrado actividad larvicida en *A. aegypti* (Bobadilla et al., 2005; Corradine et al., 2014; Gomez, 2015; Prophiro et al., 2008; Rojas et al., 2015; Sharma et al., 1998).

Se propone que la aplicación de mezclas de compuestos con actividad insecticida con diferente modo de acción es una alternativa para minimizar la generación de resistencia y mejorar el control de los estadios inmaduros de dípteros (Chang et al., 2014). Así mismo, en las mezclas, los compuestos activos pueden interactuar presentando efectos aditivos, sinérgicos potenciando la actividad insecticida o

antagónicos causando una disminución en la eficacia de los compuestos en comparación con el uso de cada uno por separado (Lemes et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior, cobra mayor relevancia el estudio de mezclas de insecticidas biológicos en bajas dosis que minimicen la posibilidad de generación de resistencia en las poblaciones de los organismos blanco. En este estudio se evaluó el efecto individual de *Bti* y de los extractos etanólicos de *A. muricata*, *R. communis* y *S. saponaria* y el de combinaciones binarias sobre larvas de *A. aegypti* con el fin de determinar entre éstos el tratamiento antivectorial más eficaz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los extractos etanólicos

Se utilizaron 500 g de material vegetal de cada especie, los cuales fueron seleccionados por su disponibilidad en plazas de mercado, donde fueron adquiridos comercialmente. Dicho material correspondió a semillas de *A. muricata* y frutos completos de *R. communis* y *S. saponaria*. Cada material fue secado, triturado y sometido a extracción exhaustiva mediante percolación con etanol al 95%. Posteriormente, 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 obtenido fue almacenado en botellas de vidrio color ámbar para su posterior uso (Carrion y García, 2010). Se evaluó la solubilidad de los extractos vegetales en agua destilada y Tween 80 al 0,05% y 0,1%.

Cultivo de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Se sembró una colonia de la cepa AM65-52 de *Bti* en caldo nutritivo y se incubó a 30 ± 2 °C y 150 rpm por 16 h; posteriormente, se realizó un subcultivo en 30 ml de NSYM (caldo nutritivo 8 g, extracto de levadura 0,05%, MnCl_2 5×10^{-5} M, MgCl_2 1×10^{-3} M, CaCl_2 7×10^{-4} M) y se incubó a 30 °C sin agitación por siete días. Se tomó 1 ml de cultivo, el cual se centrifugó a 12.000 rpm por 5 minutos, se adicionó 1 ml de solución salina (NaCl 0,85%) y se

volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se secaron las células a 50 °C por 48 h para determinar el peso seco.

Mantenimiento de la colonia de *Aedes aegypti*

Las larvas de *A. aegypti*, se obtuvieron del insectario del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de La Salle. La colonia se mantuvo a 25–30 °C de temperatura, 38–50% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h día:12 h noche. Las larvas se colocaron en recipientes plásticos con agua reposada y se alimentaron con purina pulverizada.

Bioensayos de toxicidad

Para la determinación de la actividad larvicida individual del *Bti* y los extractos vegetales se evaluaron cinco concentraciones de cada una como se describe a continuación: 1) *Bti* cepa AM65-52: 33×10^{-3} mg/ml, 33×10^{-4} mg/ml, 33×10^{-5} mg/ml, 33×10^{-6} mg/ml y 33×10^{-7} mg/ml, 2) *A. muricata*: 0,001 mg/ml, 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml y 0,5 mg/ml y 3) *R. communis* y *S. saponaria*: 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1,5 mg/ml y 3 mg/ml. Para la elaboración de las mezclas binarias se utilizaron combinaciones de aquellas concentraciones que presentaron valores de mortalidad de larvas de entre 30% y 60% para cada compuesto aplicado en forma individual.

Para descartar la actividad larvicida del emulsificante, se adicionó Tween 80 al 0,05% y 0,1% en recipientes con 100 ml de agua destilada y 20 larvas de tercer estadio de *A. aegypti*; como control negativo se utilizó solo agua destilada.

Se realizaron tres bioensayos (repeticiones) y en cada uno se utilizaron tres unidades experimentales por tratamiento y concentración. Las unidades experimentales consistieron en vasos de precipitado previamente esterilizados en autoclave, cada uno con 20 larvas de *A. aegypti* de tercer estadio y un volumen final de 100 ml entre agua destilada y cada extracto, *Bti* o una mezcla binaria. Para la realización de las mezclas, se seleccionaron concentraciones tanto de *Bti*, como de los tres extractos vegetales que fueran inferiores a la concentración letal 50 (CL_{50}) y así po-

der evaluar si la interacción entre estos componentes era sinérgica, aditiva o antagónica.

Por su parte, en cada bioensayo se realizaron tres réplicas para los controles, los cuales fueron agua destilada o el solvente utilizado para cada extracto vegetal. Las unidades experimentales se distribuyeron al azar en un cuarto con temperatura controlada a 25 °C y fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. A las 24 y 48 h se registró la mortalidad de larvas, considerando que una larva estaba muerta si al tocarla con un palillo de madera no presentaba movimiento.

Análisis estadístico

La determinación de la CL₅₀ se realizó a partir del número de larvas vivas y muertas en cada uno de los ensayos, mediante el uso del programa TRAP versión 3.1a. Para el análisis de las interacciones en las mezclas se realizó utilizando la Hipótesis de Acción Independiente, en la cual se asume que, en la mezcla cada uno de los biocontroladores actúa de forma independiente y por lo tanto, cada uno tiene su propia probabilidad de causar la muerte de las larvas (Drescher y Boedeker, 1995; Lemes et al., 2014) y se calculó de acuerdo con la fórmula utilizada por Lemes y colaboradores (2014):

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

Donde P1 y P2 representan las proporciones de larvas muertas para los compuestos 1 y 2 de las mezclas (*Bti* y el extracto vegetal). La diferencia entre la mortalidad esperada y la observada se estimó por medio del programa R (R Core Team, 2020) versión 3.6, a partir de la prueba de distribución de Pearson (χ^2) con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

El extracto etanólico de frutos de *S. saponaria* fue soluble en agua destilada, mientras que el solvente adecuado para el extracto semillas de *A. muricata* fue Tween 80 al 0,05% y para el extracto de frutos de *R. communis* fue Tween 80 al 0,1%. El Tween 80 en ambas concentraciones evaluadas no causó mortalidad en larvas.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad larvicida de todos los compuestos en forma individual, demuestran su efectividad para el control de larvas de *A. aegypti* (tabla 1). Los valores de toxicidad más altos los presentó *Bti*, seguido de los extractos etanólicos de *A. muricata*, *S. saponaria* y *R. communis* (tabla 1).

En los bioensayos realizados con la mezcla de *Bti* y el extracto etanólico de semillas de *A. muricata*, se observó mayor mortalidad en larvas de *A. aegypti* que cuando se adicionó solo la bacteria o solo el extracto vegetal (tabla 2), pero al comparar la mortalidad observada con la esperada con esta combinación, no se observó significancia estadística ($p > 0,05$), lo cual indica que en la mezcla binaria los compuestos actúan de forma independiente.

Los resultados obtenidos a partir de las mezclas de *B. thuringiensis* con *R. communis* y la bacteria con *S. saponaria*, mostraron una diferencia significativa entre los porcentajes de mortalidad observados y esperados (con un $p < 0,05$). Sin embargo, se evidenció que el valor de la mortalidad observado fue menor al esperado, indicando la presencia de una interacción antagónica entre los compuestos (tabla 2).

Tabla 1. Concentración letal media (CL₅₀) de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* y extractos etanólicos sobre larvas de *A. aegypti* a las 48 horas de exposición.

Tratamiento	CL ₅₀ (mg/ml)	Intervalo de confianza (mg/ml)
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	0,002	0,0005–0,0778
<i>A. muricata</i>	0,01	0,01–0,02
<i>R. communis</i>	0,5	0,45–1,58
<i>S. saponaria</i>	0,12	0,11–0,13

Tabla 2. Interacción de mezclas de extractos vegetales y *B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* para el control de larvas de *A. aegypti*.

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Mortalidad esperada (%)	Mortalidad observada (%)	χ^2	<i>p</i>
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israeliensis</i>	33×10^{-4}	-	43	-	-
<i>A. muricata</i>	0,001	-	35	-	-
<i>R. communis</i>	0,1	-	43	-	-
<i>S. saponaria</i>	0,1	-	60	-	-
<i>Bti</i> + <i>A. muricata</i>	33×10^{-4} + 0,001	52,3	55	0,28	0,59
<i>Bti</i> + <i>R. communis</i>	33×10^{-4} + 0,1	43,8	8,3	51,14	$8,6 \times 10^{-13}$
<i>Bti</i> + <i>S. saponaria</i>	33×10^{-4} + 0,1	56	18,3	57,75	3×10^{-14}

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la actividad larvicida de *B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* y los extractos etanólicos de *A. muricata*, *R. communis* y *S. saponaria* sobre cepas de laboratorio de *A. aegypti*. En los ensayos de actividad larvicida individual, las CL₅₀ obtenidas en este estudio, indican que los extractos fueron más efectivos para el control de las larvas que las reportadas previamente. Parra et al. (2007) obtuvieron una CL₅₀ de 0,9 mg/ml con extracto de semillas de *A. muricata* y una CL₅₀ de 0,86 mg/ml con el extracto de frutos de *R. communis*. Bobadilla et al. (2005) reportaron una CL₅₀ de 0,02 mg/ml con el extracto de semillas de *A. muricata*, siendo este muy cercano al encontrado en la presente investigación. Por otra parte, autores como Amariles et al. (2013) obtuvieron una CL₅₀ de 0,5 mg/ml, con extractos de frutos de *S. saponaria*.

Por otro lado, la CL₅₀ observada en este estudio con *Bti* AM65-52, es similar a la CL₅₀ de 0,004 mg/ml obtenida con la cepa BtMA-750 de *Bti* aislada de un suelo de Brasil (Vieira-Neta et al., 2021) e inferior a las CL₅₀ de 0,0068 mg/ml y 0,018 mg/ml reportadas con la preparación de esporas y cristal de *Bti* LBIT-1250L y de *Bti* IPS-82 (García et al., 2021).

Teniendo en cuenta los valores de CL₅₀ obtenidos en este estudio, los tres extractos vegetales y la cepa AM65-52 de *Bti* son considerados promisorios para el control biológico de larvas de *A. aegypti*. Pero los que presentaron individualmente mayor actividad larvicida fueron la bacteria, seguido por el extracto

etanólico de semillas de *A. muricata* y por lo tanto serían los recomendados para realizar estudios posteriores con larvas recolectadas en campo o en condiciones semicontroladas.

La mezcla de *Bti* y el extracto de semillas de *A. muricata*; no presentó una diferencia estadística entre la mortalidad observada y la esperada, indicando que cada biocontrolador actúa de forma independiente y los dos presentan diferentes lugares o mecanismos de acción (Abendroth et al., 2011; Drescher y Boedeker, 1995); este tipo de efecto también ha sido llamado cero interacción o aditivo (Abendroth et al., 2011). Sería interesante realizar estudios adicionales en donde se analice la aplicación de esta mezcla binaria en una sola formulación, lo cual podría ser ventajoso porque cada uno podría estar a concentraciones subletales y además se podría facilitar su aplicación en campo, al poder utilizar los dos biocontroladores en un solo producto.

Sumado a esto, sería favorable la utilización de la mezcla entre la cepa AM65-52 de *Bti* y el extracto etanólico de *A. muricata*, debido a que la bacteria y el extracto presentan mecanismos de acción diferentes. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* presenta las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa, las tres primeras toxinas se unen a receptores de membrana de las células del intestino de la larva, mientras que Cyt1Aa presenta afinidad por fosfolípidos no saturados de membrana (Ben, 2014). Las moléculas biológicamente más activas de las plantas del género *Annona*, en larvas de mosquitos, son las acetogeninas bistetrahidrofuránicas y mono-



tetrahidrofuránicas, específicamente muricatacina y anonnacina presentes en las semillas de *A. muricata* (Rieser et al., 1991; Rupprecht et al.1990).

El antagonismo observado en las mezclas de *B. thuringiensis* con *R. communis* y con *S. saponaria*, también ha sido reportado para otras mezclas por autores como Murugan et al. (2002), quienes encontraron esta interacción al realizar mezclas de *Bti* y aceites de *Pongamia pinnata*, para el control de larvas de *Culex quinquefasciatus*. Otro ejemplo son los resultados obtenidos por Chang et al. (2014) quienes también observaron antagonismo al realizar mezclas de cinamaldehídos con eugenol contra larvas de *Anopheles sinensis*, al igual que en mezclas de cinamaldehídos con anetol y de eugenol con anetol contra larvas de *A. albopictus* y *An. sinensis*, siendo los componentes de las mezclas los principales constituyentes de aceites esenciales de *Cinnamomum cassia*, *Syzygium aromaticum* e *Illicium verum*.

Hasta el límite de nuestro conocimiento, no se ha reportado el mecanismo que causa el efecto antagónico observado en mezclas binarias de *Bti* con *R. communis* y con *S. saponaria*, ni tampoco en resultados antagónicos obtenidos por Murugan et al. (2002), ni por Lemes et al. (2014). Una posible explicación al antagonismo observado es que una molécula de los extractos interactúe con una toxina de la bacteria, afectando el modo de acción de alguno de estos compuestos o que se unan a un mismo receptor del intestino del vector; pero dichas hipótesis necesitarán ser comprobadas con experimentos futuros.

En este trabajo se observó que *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* presenta diferencias en su interacción con los extractos etanólicos de *A. muricata*, *R. communis* y *S. saponaria*; de forma similar, Lozano y Dussán (2017) reportaron que la mezcla entre la proteína de Capa S de *Lysinibacillus sphaericus* y la toxina binaria, puede ser aditiva o sinérgica frente a larvas de *C. quinquefasciatus*, dependiendo de la cepa de la que se obtuvieran estas proteínas. También se observó que hay un efecto aditivo o antagónico entre *Beauveria bassiana* y *B. thuringiensis* para el control de ninfas de *Bemisia tabaci*, dependiendo de la concentración de cada agente biocontrolador (Somoza-Vargas et al., 2018).

Dado que, en los bioensayos realizados en este estudio se evaluaron extractos etanólicos, una alternativa que podría mejorar la actividad larvicida de las mezclas de estos con *Bti* es la realización del fraccionamiento de estos extractos o directamente la purificación de los metabolitos responsables de la actividad larvicida. Algunos autores como Chang et al. (2014), realizaron mezclas entre *B. thuringiensis* y los principales constituyentes de tres aceites esenciales para el control de *An. sinensis* y *A. albopictus*, obteniendo un efecto sinérgico en las tres mezclas; de igual manera, Murugan et al. (2002), reportaron un efecto sinérgico entre *B. thuringiensis* y el aceite de *Azadirachta indica*, sobre larvas de *C. quinquefasciatus*. Otra alternativa sería la evaluación de la aplicación secuencial de *Bti* con los extractos evaluados en este estudio.

En conclusión, la mezcla entre el extracto etanólico de semillas de *A. muricata* y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, presentó un efecto independiente entre los compuestos, permitiendo considerarla viable para el control de larvas de *A. aegypti*, al estar conformada por dos principios activos diferentes. Por su parte, las mezclas realizadas a partir de extractos etanólicos de *R. communis* y *S. saponaria* combinados con *Bti* produjeron un efecto antagónico entre ellas. Por lo anterior, sería recomendable aplicar estos extractos de forma independiente o secuencial. De igual forma, se resalta la importancia de continuar la realización de estudios, enfocados en el análisis de interacciones entre extractos vegetales y microorganismos, para el control de mosquitos vectores de microorganismos patógenos, con el fin de obtener las formulaciones más adecuadas para el manejo de resistencia y a futuro poder desarrollar nuevos productos que generen la mínima toxicidad a organismos no blanco y al medio ambiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Centro de Estudios Interdisciplinarios Básicos y Aplicados CEIBA – Fundación CEIBA, por la financiación y a la Universidad de La Salle por el apoyo en el insectario y el acceso a los laboratorios.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no presentan ningún tipo de conflicto de intereses, por lo que su juicio, independencia e imparcialidad se mantuvieron intactas en la elaboración de esta investigación.

REFERENCIAS

- Abendroth, J., Blankenship, E., Martin, A., & Roeth, F. (2011). Joint action analysis utilizing concentration addition and independent action models. *Weed Technology*, 25(3), 436–446. <https://doi.org/10.1614/WT-D-10-00102.1>
- Amariles, B., García, P., & Parra, H. (2013). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. *CES Medicina*, 27(2), 193–203. <https://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/2680>
- Ben, E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, 6(4), 1222–1243. <https://doi.org/10.3390/toxins6041222>
- 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. <https://doi.org/10.15381/rpb.v12i1.2369>
- Cárdenas, O., Silva, E., Morales, L., & Ortiz, J. (2005). Estudio epidemiológico de la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica*, 25(2), 170–180. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i2.1339>
- Carrion, J., & García, G. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica*; [Tesis de pregrado]. Repositorio institucional de la Universidad de Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2483>
- Corradine, M., Beltrán, S., Corredor, P., & Moreno, A. (2014). Eficiencia del extracto de *Ricinus communis* para el control del mosquito *Culex*. *Revista Científica*, 19(2), 86–92. <http://dx.doi.org/10.14483/23448350.6496>
- Chang, K., Hyun, S., Dae, Y., & Young, A. (2014). Enhanced toxicity of binary mixtures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and three essential oil major constituents to wild *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 51(4), 804–810. <https://doi.org/10.1603/ME13128>
- Da-Cunha, M., Lima, J., Brogdon, W., Moya, G., & Valle, D. (2005). Monitoring of resistance to the pyrethroid Cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(4), 441–444. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000400017>
- Drescher, K., & Boedeker, W. (1995). Assessment of the combined effects of substances: The relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics*, 51(2), 716–730. <https://doi.org/10.2307/2532957>
- Espinal, M., Andrus, J., Jauregui, B., Hull-Waterman, S., Morens, D., Santos, J. Horstick, O., Francis, L., & Olson, D. (2019). Emerging and reemerging *Aedes*-transmitted arbovirus infections in the region of the Americas: Implications for health policy. *American Journal of Public Health*, 109, 387–392. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2018.304849>
- Fonseca, I., & Quiñones, M. (2005). Resistencia a insecticidas en mosquitos (Diptera: Culicidae): mecanismos, detección y vigilancia en salud pública. *Revista Colombiana de Entomología*, 31(2), 107–115. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-04882005000200001&script=sci_abstract&tlng=es
- García, S., Verduzco, R., & Ibarra, E. (2021). Isolation and characterization of two highly insecticidal, endophytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(7), 17. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab080>
- Gomez, G. (2015). *Evaluación larvicida del extracto etanólico de la semilla de Carica papaya sobre larvas del IV estadio de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio*; [Tesis de pregrado]. Repositorio institucional de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. <https://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/3989>
- Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3-4), 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012Interdisciplinary>
- Lemes, A., Davolos, C., Legori, P., Fernandes, O., Ferre, J., Lemos, M., & Desiderio, J. (2014). Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One*, 9(10), 107–196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107196>
- Lozano, L. C., & Dussán, J. (2017). Synergistic activity between S-layer protein and sporecrystal preparations from *Lysinibacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Current Microbiology*, 74(3), 371–376. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1185-7>
- Mendoza, G., Esparza, E., Ayala, J., Mercado, M., Godina, S., Hernández, M., & Olmos, J. (2020). The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. *Toxins*, 12(5), 290–301. <https://doi.org/10.3390/toxins12050301>
- Murugan, K., Thangamathi, P., & Jayabalan, D. (2002). Interactive effect of botanicals and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on *Culex quinquefasciatus* Say. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 61(12), 1068–1076. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/17742>
- Nelson, J. (1986). *Aedes aegypti: biología y ecología*; Organización Panamericana de la Salud. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/28513>
- Organización Mundial para la Salud (OMS). (2017). *Resolución mundial para el control de vectores 2017–2030; Documento de contexto para informar las deliberaciones de la Asamblea Mundial de la Salud en su 70.ª reunión*. <https://www.who.int/malaria/areas/>



- vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf
Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2017). *Diez enfermedades transmitidas por vectores que ponen en riesgo a la población de las Américas. 2017*. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_contentview=articleid=9438%3A2014-10-vector-borne-diseases-that-put-population-americas-at-riskcatid=1443%3Aweb-bulletinsItemid=135lang=es
- Parra, H., García, P., & Cortes, T. (2007). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. *CES Medicina*, 21(1), 47–54. <https://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/34>
- Prophiro, J., Rossi, J., Pedroso, M., Kanis, L., & Silva, O. (2008). Leaf extracts of *Melia azedarach* Linnaeus (Sapindales: Meliaceae) act as larvicide against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(6), 560–564. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000600003>
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>
- Rieser, J., Kozłowski, F., Wood, V., & McLaughlin, L. (1991). Muricatacin: A simple biologically active acetogenin derivative from the seeds of *Annona muricata* (annonaceae). *Tetrahedron Letters*, 32(9), 1137–1140. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)92027-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92027-6)
- Ritchie, S., Rapley, L., & Benjamin, S. (2010). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(6), 1053–1059. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0603>
- Rodríguez, M., Bisset, J., Díaz, C., & Lázaro, A. (2003). Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducido por la selección con el insecticida organofosforado malatión. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55(2), 105–111. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602003000200008&lng=es&tlng=es
- Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., Ricardo, Y., Pérez, O., Montada, D., Figueredo, D., & Fuentes, I. (2010). Resistencia a insecticidas organofosforados en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Santiago de Cuba, 1997-2009. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(3), 217–223. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000300009&lng=es&tlng=es
- Rojas, M., Araujo, P., & Montero, T. (2015). Evaluación del uso de *Sapindus saponaria* como biocida de *Aedes aegypti* en condiciones *in vitro*. *Producción + Limpia*, 10(2), 11–17. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000200002&lng=en&tlng=es
- Rupprecht, J., Hui, Y., & McLaughlin, J. (1990). Annonaceous acetogenins: A review. *Journal of Natural Products*, 53(2), 237–278. <https://doi.org/10.1021/np50068a001>
- Sharma, J., Qadry, B., Subramaniam, T., Verghese, S., Rahman, S., & Jalees, S. (1998). Larvicidal activity of *Gliricidia sepium* against mosquito larvae of *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Pharmaceutical Biology*, 36(1), 3–7. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.1.3.4616>
- Silva-Filha, M., Romão, T., Rezende, T., Carvalho, K., Gouveia de Menezes, H., Alexandre do Nascimento, N., Soberón, M., & Bravo, A. (2021). Bacterial toxins active against mosquitoes: Mode of action and resistance. *Toxins*, 13(1), 523. <https://doi.org/10.3390/toxins13080523>
- Soborio, C., Mora, V., & Duran, M. (2019). Intoxicación por organofosforados. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 110–117. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100110&lng=en&tlng=es
- Somoza, C., Hernández, V., Peña, G., Torres, G., Huerta, A., Ortega, L., & Salazar, J. (2018). Interaction of *Beauveria bassiana* strain HPI-019/14 and *Bacillus thuringiensis* strain GP139 for the biological control of *Bemisia tabaci* in strawberry. *Bulletin of Insectology*, 71(2), 201–209. <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol71-2018-201-209somoza-vargas.pdf>
- Vieira-Neta, M., Soares-da-Silva, J., Viana, J. L., Silva, M. C., Tadei, W. P., & Pinheiro, V. (2021). Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*, 81(4), 872–880. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228790>