

21
2 ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"



Efectos del Diflubenzurón en Culex
quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae),
en diferentes etapas del desarrollo larvario

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

HECTOR RUEDA HERNANDEZ



MEXICO, D. F.

1987.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Efectos del Diflubenzurón en
Culex quinquefasciatus Say (Diptera:
Culicidae), en diferentes etapas del
desarrollo larvario

Para obtener el grado de
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

HECTOR RUEDA HERNANDEZ

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Departamento de Preparatoria Agrícola, en particular -
Al Area de Biología por el apoyo otorgado para la -
realización de este proyecto.

Al Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Post
graduados, por las facilidades brindadas que permi-
tieron el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que de una
u otra manera apoyan el desarrollo
de la Ciencia en general.

C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCION.	1
2. ANTECEDENTES.	6
2.1 Biología de los mosquitos.	6
2.2 Estructura del exoesqueleto.	12
2.3 Estructura de la quitina	14
2.4 Las benzofenilureas.	15
2.5 Metabolismo y modo de acción del Diflubenzurón.	19
2.6 Efectos del DFB en diversos organismos	28
2.7 Efectos del Diflubenzurón en Dípteros.	30
3. METODOLOGIA	43
3.1 Cría de <u>Culex quinquefasciatus</u> Say	43
3.2 Ciclo de vida.	44
3.3 Preparación del Diflubenzurón.	44
3.4 Análisis estadístico	46
4. RESULTADOS Y DISCUSION.	49
4.1 Ciclo de vida.	49
4.2 Efectos morfogénicos y de comportamiento	52
4.3 Efecto larvícida	56
5. CONCLUSIONES.	66
6. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES	68
7. BIBLIOGRAFIA.	69

INDICE DE CUADROS

<u>Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Enfermedades transmitidas por mosquitos de la Familia <u>Culicidae</u> en México.	5
2	Efectos "secundarios" del Diflubenzurón en <u>Musca domestica</u> y <u>P. brassicae</u> .	24
3	Metabolismo del DFB en insectos.	25
4	Bioacumulación de DFB en el Modelo de Ecosistema de Metcalf (56).	27
5	Duración promedio de los diferentes estadios biológicos de <u>Culex quinquefasciatus</u> Say, bajo condiciones controladas.	50
6	Porcentaje de mortalidad en larvas de 1er. ínstar de <u>Culex quinquefasciatus</u> Say tratadas con Diflubenzurón.	54
7	Porcentaje de mortalidad en larvas de 2do. ínstar de <u>Culex quinquefasciatus</u> Say tratadas con Diflubenzurón.	55
8	Porcentaje de mortalidad en larvas de 3er. ínstar de <u>Culex quinquefasciatus</u> Say tratadas con Diflubenzurón.	55
9	Porcentaje de mortalidad en larvas de 4o. ínstar de <u>Culex quinquefasciatus</u> Say tratadas con Diflubenzurón.	56

CuadroPágina

10	CL ₅₀ del Período Larvario de <u>Culex</u> - - - - <u>quinquefasciatus</u> Say, tratado con Diflubenzurón.	59
11	CL ₉₀ del Período Larvario de <u>Culex</u> - - - - <u>quinquefasciatus</u> Say, tratado con Diflubenzurón.	59

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
1	Ciclo biológico del mosquito.	11
2	Sección de la cutícula de un insecto.	13
3	Fórmula estructural de la quitina.	14
4	Fungicidas que interfieren con la forma- ción de la quitina.	16
5	Benzofenilureas y compuestos análogos.	18
6	Biosíntesis de la quitina.	20
7	Metabolitos del DFB.	26
8	Duración del desarrollo larvario de <u>Culex</u> <u>quinquefasciatus</u> Say en condiciones de la- boratorio.	51
9	Líneas de respuesta dosis - mortalidad pa- ra los diferentes ínstares larvarios de - <u>Culex quinquefasciatus</u> Say tratados con - DFB.	60

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo consistieron en evaluar los efectos de un inhibidor de la síntesis de la quitina: El Diflubenzurón (DFB) o Dimilin N-(((4-clorofenil)amino)carbonil)-2-6 difluorobenzamida, en el desarrollo larvario de Culex quinquefasciatus Say.

Se trabajó con una colonia mantenida en una cámara de cría bajo condiciones ambientales controladas (28°C, 75% de H. R. y 12 horas-luz). Se aplicaron 7 concentraciones de DFB ingrediente activo (i.a) a larvas de primero a cuarto - ínstar; las observaciones se hicieron durante los siete días siguientes a la eclosión o cambio de ínstar, tiempo suficiente para que se presente el proceso de muda correspondiente.

Los efectos fueron variables de acuerdo a la dosis y consistieron en la incapacidad para realizar el movimiento ondulatorio característico para salir a la superficie y falta de movimiento mandibular, hasta la inmovilidad total y fragmentación del cuerpo en las larvas de tercero y cuarto - ínstar, así como una coloración oscura irregularmente distribuida, aunque predominante en el tórax.

La concentración letal media (CL₅₀) para larvas de 1o, 2o, 3o y 4o ínstar es de 0.0000012, 0.0000002, 0.0000022

y 0.0000251 ppm, respectivamente, mientras que la CL_{90} tiene valores de 0.0001075, 0.0001071, 0.0013647 y 16.9645066 ppm, para los mismos instantes mencionados.

1. INTRODUCCION

Los insectos pertenecen al phylum Arthropoda, que comprende el 85% de todas las especies animales conocidas. - Dentro de ellos los dípteros presentan una particular importancia, debido a su contribución activa en la transmisión de microorganismos causantes de un gran número de enfermedades que son de importancia para el hombre y animales domésticos; en particular los mosquitos transmiten, entre otras, las siguientes enfermedades: Encefalitis, dengue, fiebre amarilla, filariasis y malaria (17) (Cuadro 1).

Esta situación, aunada a otros factores, ha limitado la colonización de amplias zonas tropicales, además de ocasionar pérdidas considerables en cuanto a incapacidad de la fuerza de trabajo en diversas partes del mundo, por lo que estos insectos han motivado una intensa búsqueda de estrategias para su combate.

El combate de los mosquitos involucra los siguientes métodos (47):

- a) Biológico. Peces que se alimentan de huevecillos, larvas o pupas de mosquitos; depredadores invertebrados como son los mosquitos del género Toxorhynchites; algunos nemátodos, protozoa -

rios, hongos, bacterias y virus parasitoides.

- b) Genético. Utilización de individuos con material genético modificado.

- c) Plantas larvicidas. Las algas de la familia - Characeae exudan una toxina en el agua que impide el desarrollo de los mosquitos; algunas semillas exudan sustancias mucilaginosas que causan la muerte de las larvas que se adhieren a - - - ellas.

- d) Labores culturales. Eliminación de criaderos.

- e) Reguladores del crecimiento. Incluyen los análogos de la hormona juvenil y los inhibidores - de la síntesis de quitina, que alteran el desarrollo normal de los insectos.

- f) Químico. Es el más utilizado por ser directo y práctico; sin embargo, ocasiona trastornos ambientales por su acción residual y por su poca especificidad, además de que el uso inadecuado de estos productos ha favorecido el desarrollo de resistencia.

Con base en lo antes citado, se deduce la causa - por la cual los insecticidas han constituido en los últimos años el medio más común para intentar reducir los problemas que constituyen las poblaciones de mosquitos y otras plagas, de manera que la producción global de insecticidas ha ido en aumento desde su aparición en el mercado.

Sin embargo, la utilidad de cualquier insecticida depende en gran parte de su aplicación adecuada, lo cual no sucede en muchas ocasiones, causando con ello excesos en la frecuencia de su uso y en las cantidades aplicadas. Toda es ta situación ha traído como consecuencia la complicación en el control de plagas por la selección de líneas resistentes y la eliminación del control biológico; asimismo se han alte rado los niveles de susceptibilidad de algunos vectores de - enfermedades humanas, lo que ha ocasionado la aparición cada vez más frecuente de insensibilidad a estos insecticidas y - la contaminación creciente del medio con todas sus consecuen cias.

La situación anterior ha motivado la búsqueda de - agentes químicos, cuyo objetivo sea el de interrumpir procesos fisiológicos y/o metabólicos más específicos; uno de estos procesos es la síntesis de quitina, uno de los principales componentes de la cutícula de los insectos.

Se ha comprobado que el Diflubenzurón (DFB), un - producto químico sintetizado a principios de la década anterior, inhibe la síntesis metabólica de la quitina, al interrumpir el desarrollo normal del exoesqueleto de los insectos. Los organismos tratados con este producto presentan di dificultades durante el proceso de muda, ya que la cutícula ca rece de las propiedades mecánicas necesarias para el soporte de los músculos y para resistir la presión interna que ejerce la hemolinfa durante dicho proceso biológico (35).

Al tomar en cuenta la acción selectiva del Diflubenzurón se planeó la siguiente investigación cuyos objetivos fueron los siguientes:

- 1) Evaluar el efecto larvicida de este inhibidor - de la síntesis de quitina en Culex quinquefasciatus Say, y
- 2) Observar los efectos morfogénicos y de comportamiento de las larvas afectadas por dicha sustancia.

Cuadro 1

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS DE LA FAMILIA CULICIDAE EN MEXICO (31).

NOMBRE CIENTIFICO	ORGANISMO TRANSMITIDO	ENFERMEDAD CAUSADA	H O S P E D E R O
<u>Aedes (Stegomyia)</u> <u>Taeniorhynchus</u>	Virus filtrable	Dengue, fiebre amarilla	Hombre
<u>Aedes (Anopheles)</u> <u>Pseudopunctipennis</u>	Virus filtrable	Dengue, fiebre amarilla	Hombre
<u>Aedes (Anopheles)</u> <u>quadrimaculatus</u>	<u>Plasmodium</u> spp.	Paludismo	Hombre
<u>Anopheles (Nyssorhynchus)</u> <u>albimanus</u>	<u>Plasmodium</u> spp.	Paludismo	Hombre
<u>Culex (Culex) opisthus</u>	Filarias, virus filtrables	Filariasis	Equinos, zarigüeyas, murciélagos, cerdos, ganado vacuno, pollos, conejos, carnívoros silvestres, roedores.
<u>Culex (Melanoconion)</u> <u>tolambidis</u>	Filarias virus filtrables	Filariasis	Equinos, zarigüeyas, murciélagos, cerdos, ganado vacuno, pollos, conejos, carnívoros silvestres, roedores.
<u>Culex (Stegoconops)</u> <u>mesodentatus</u>	Filarias virus filtrables	Filariasis encefalitis	Equinos, zarigüeyas, murciélagos, cerdos, ganado vacuno, pollos, conejos, carnívoros silvestres, roedores.
<u>Deinocerites pсевdes</u> <u>melanura</u>	Virus filtrables	Encefalitis	Equinos, zarigüeyas, murciélagos, cerdos, ganado vacuno, pollos, conejos, carnívoros silvestres, roedores.
<u>Sabethes (Mansonia)</u> <u>titillans</u> s. p.	Virus filtrable	Encefalitis	"
<u>Wyeomyia (Wyeomyia)</u> <u>mitchellii</u>	Virus filtrable	Encefalitis	"

2. ANTECEDENTES

2.1 Biología de los mosquitos (15,36).

Entre los dípteros se encuentran muchas especies - en las que los machos y las hembras se alimentan de sangre; en el caso particular de los mosquitos solamente las hembras tienen este hábito alimenticio. Sin embargo, no todas las - especies de mosquitos se alimentan de sangre humana, sino muchas de ellas prefieren la sangre de aves o de otros animales, incluyendo mamíferos, reptiles y otros organismos más.

El ciclo biológico de un mosquito presenta varias etapas y su comportamiento alimenticio varía en cada período, lo mismo que su aspecto. Durante su ciclo de vida, los mosquitos desarrollan una metamorfosis completa, esto es, pasan de una etapa de huevo a larva, después se transforman en pupa y finalmente emerge el adulto. Las larvas y pupas son acuáticas y parece que cada especie selecciona un tipo especial de hábitat.

Las hembras fecundadas hibernan, por lo que durante esta época su actividad es mínima y cuando se acerca la - primavera su actividad se normaliza y empiezan a buscar lugares propicios para la oviposición. Dependiendo del lugar, - ovipositan en cuerpos de agua principalmente durante los me-

ses de mayo y junio. Cada hembra deposita de 100 a 400 huevecillos o incluso más, los cuales unidos forman una especie de balsa en la superficie del agua o en una zona protegida del viento.

Generalmente se les suele encontrar en tanques de agua, cisternas, jardines con plantas acuáticas y en general en cualquier recipiente o depósito de agua estancada.

El mosquito empieza a desarrollarse desde que está flotando en el agua en estado de huevo fecundado; el embrión se desarrolla con rapidez y empieza a absorber el material - vitelino, que pasa a su estómago recién formado a las 24 horas de edad.

Cuando la larva del mosquito está lista para salir del huevo, su faringe empieza a dar rápidas sacudidas, las cuales provocan que la sangre de la larva dilate su cabeza, de manera que forma una especie de espina aguda que empuja el corion y lo rompe.

En cuanto logra salir del huevo nada por los alrededores y se alimenta filtrando agua a través de dos grandes haces de cerdas quitinosas en forma de abanico, que forman parte del aparato bucal; dichos abanicos forman corrientes de agua que llevan el alimento hasta las piezas bucales.

El desarrollo larval es muy rápido, completando - los cuatro instares en siete a diez días, aunque en agua - - fría pueden tardar un poco más; las larvas son bastante activas, nadan fácil y rápidamente, con movimientos súbitos y - bruscos; constantemente se trasladan del fondo a la superficie, rompiendo la película superficial con sus sifones respiratorios, mientras que el resto del cuerpo queda "suspendido" formando un ángulo. La larva, omnívora, se alimenta de bacterias, polen, plantas microscópicas y una gran diversidad de otras sustancias y aunque come continuamente, utiliza un 95% de su tiempo para filtrar agua y así obtener las partículas alimenticias; en general las larvas prefieren las - aguas turbias.

El período pupal es muy corto, generalmente de sólo dos a tres días; la pupa normalmente "descansa" en la superficie, con los tubos respiratorios en contacto con ella; cuando se presenta algún disturbio, nada rápidamente hacia - el fondo por medio de contracciones abdominales violentas, - disminuyendo su capacidad de descender conforme se acerca la emergencia.

El tiempo que lleva la transformación de pupa en - adulto es bastante corto; para ello, en el instante anterior a la emergencia, el adulto empieza a tomar aire, procedente de una burbuja situada adelante del tórax; el aire se deglu-

te y pasa al estómago del nuevo adulto, lo que provoca que el insecto se hinche y pueda abandonar su indumentaria pupal; en este momento la pupa ha adquirido un color blanco-plateado y su gravedad específica se reduce a tal grado que la totalidad del cefalotórax y parte del abdomen tocan la superficie; la exuvia pupal presenta una pequeña hendidura en la línea media del cefalotórax, por donde se observa el dorso del adulto. Las hendiduras se hacen más anchas por presión constante y aparecen otras transversas a cada lado; el adulto se esfuerza por poder salir de la exuvia lentamente, a la vez que flota y se balancea en la superficie con gran cuidado; en dos o tres minutos el insecto, ahora hinchado por el aire, queda completamente fuera de la exuvia y muy pronto estará listo para iniciar el vuelo.

En un principio los adultos carecen de pigmentación, pero en pocas horas adquieren los colores característicos de la especie. A las 20 ó 24 horas después de la emergencia, el adulto se desplaza en busca de alimento; los machos ingieren sustancias azucaradas como néctar de flores, en tanto que las hembras además del néctar succionan sangre de su hospedero.

Los hábitos de vuelo no son muy conocidos en esta especie, pero en forma general su actividad principia al atardecer, cuando se forman enjambres de machos que empren-

den el vuelo hacia arriba y abajo, descansando ocasionalmente en postes, árboles o cualquier otro lugar; las hembras - atraviezan la nube y emergen de ella unidas a un macho; esta actividad continua hasta que la obscuridad dispersa el enjambre.

La longevidad de los adultos es difícil de definir, pues no existen datos exactos, excepto bajo condiciones artificiales; de manera general las hembras viven más que - los machos. Estos sobreviven desde unos cuantos días hasta algunas semanas, mientras que las hembras incluso presentan hibernación de una estación a otra.

Normalmente los mosquitos son más abundantes en - los meses de junio, julio y principios de agosto. Todas las especies de Culex pasan el invierno como hembras fertilizadas, mientras que los machos mueren al aproximarse el invierno. Las hembras permanecen en solares, establos, construcciones antiguas y en general en todo lugar que pueda representar un refugio con cierto grado de humedad y obscuridad. Durante el período de hibernación las hembras normalmente - son inactivas, aunque en algunos casos invaden los hogares - para buscar resguardo y alimento (15,36). En la Figura 1 se muestran los estados de desarrollo del mosquito.

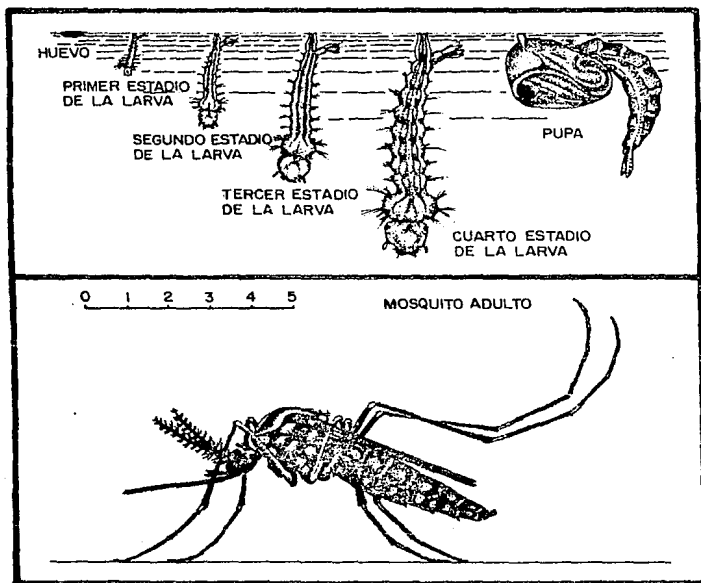
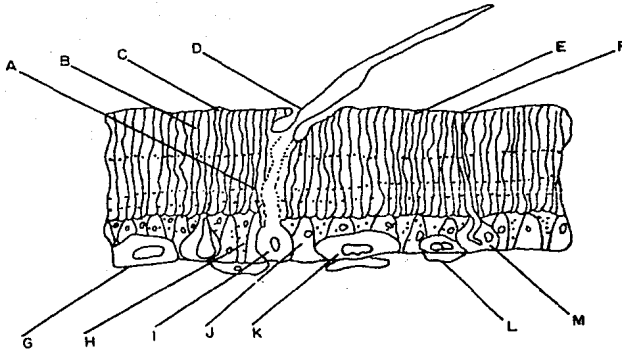


Fig. 1. Ciclo biológico del mosquito. Consta de varias etapas, en cada una de las cuales varía el comportamiento alimenticio. (1) Empieza su vida como huevo fecundado que flota en el agua, el cual eclosiona a las 24 horas de su puesta. (2-5) En cuanto sale, la larva comienza a alimentarse casi ininterrumpidamente y crece muy de prisa; varios días más tarde queda terminada la etapa larval durante la cual ha mudado tres veces. (6) Antes de convertirse en adulto pasa por un estado de pupa con la boca y el ano sellados, por lo que no puede tomar ningún alimento ni expulsar residuos líquidos, ó sólidos. (7) Al cabo de dos días se rompe el pupario y sale el mosquito adulto (15).

2.2 Estructura del exoesqueleto.

El exoesqueleto es un rasgo distintivo de los artrópodos y que ha constituido un factor importante en la sobrevivencia del grupo; es secretado por las capas subyacentes de células epiteliales integumentarias conocidas como hipodermis (9).

La cutícula (Figura 2) consiste en dos partes principales: una interna o procutícula y otra externa muy delgada llamada epicutícula; la primera esta compuesta esencialmente de microfibrillas de quitina en una matriz de proteínas, mientras que en la segunda intervienen lipoproteínas, fenoles, fosfolípidos, ceras y otros compuestos que se originan en las células de la hipodermis y en menor grado de las células dermales; cuando la parte distal de la procutícula se curte origina la exocutícula y la parte interna que permanece blanda forma la endocutícula. Durante la muda se pierde la epicutícula y la parte externa de la procutícula - (13).



- A _ Endocutícula laminada
- B _ Exocutícula
- C _ Epicutícula
- D _ Cerda o pelo
- E _ Canales-poro
- F _ Conducto de la glándula dérmica
- G _ Membrana basal
- H _ Célula epidérmica
- I _ Célula tricógena
- J _ Célula tormógena
- K _ Encito
- L _ Hemocito adherido a la membrana basal
- M _ Glándula dérmica

Figura 2. Sección de la cutícula de un insecto (57).

2.3 Estructura de la quitina.

La quitina (Figura 3), constituyente importante de la endocutícula, es un polisacárido compuesto de residuos de N-acetil-glucosamina y a cada 6 ó 7 residuos se presenta uno de glucosamina; los residuos de los azúcares se encuentran - unidos por enlaces beta 1-4, de tal forma que todos los residuos estan orientados en la misma direcc*io*n. Las cadenas adyacentes se encuentran unidas por puentes de hidrógeno, uniones de oxígeno y probablemente también a través de los residuos de glucosamina (13):

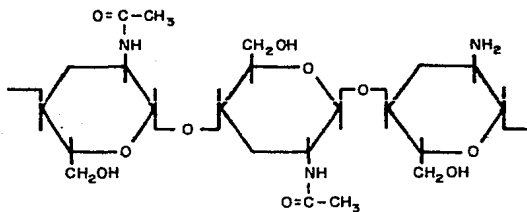


Figura 3. Fórmula estructural de la quitina (13).

2.4 Las benzofenilureas.

El desarrollo selectivo de compuestos con propiedades pesticidas basadas en la interferencia de la deposición de la quitina en hongos e insectos, ha sido trabajado activamente durante las últimas décadas. El principio de este desarrollo se dió cuando se descubrieron las propiedades del fungicida antibiótico Polioxin D en el período 1968-1970, - cuando se demostró que éste y otros compuestos análogos interferían con la síntesis de quitina en algunos hongos, por inhibición de la sintetasa de la quitina, la última enzima - en el proceso de polimerización. En trabajos posteriores se encontró que el componente sintético Kitazin también detenía la incorporación de la UDP-N-acetilglucosamina en la quitina, aunque este efecto probablemente no consiste en detener la síntesis de quitina en sí mismo, sino que inhibe la permeabilidad del sustrato a través de la membrana citoplasmática, de tal manera que la enzima carece del sustrato específico (Figura 4) (56).

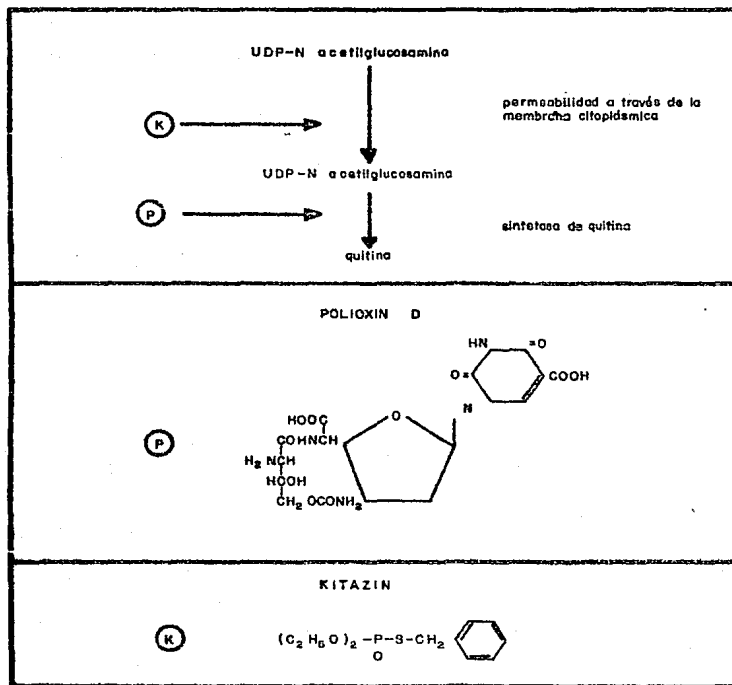


Figura 4. Fungicidas que interfieren con la formación de la quitina (56).

Durante un programa de prueba de un compuesto de este grupo, el DU-19111, se observó que después de su aplicación no se encontraron efectos herbicidas o fitotóxicos; sin embargo, se notó que las larvas de algunos insectos, incluyendo Pieris brassicae, mostraron síntomas de anormalidad después de 5 ó 6 días de la ingestión del compuesto; las larvas detuvieron su alimentación y caían de las hojas, sugiriendo que principiaba su proceso de muda, pero en lugar de liberar la exuvia, adquirirían una coloración anormal y al realizar un examen más preciso se observó que la larva en estado de apólisís se movía dentro de la exuvia intacta, pero era incapaz de salir de ella. Posteriormente se efectuaron análisis histológicos de los insectos afectados, notándose severas lesiones en la capa endocuticular; la nueva cutícula en formación era frágil y delicada, incapaz de resistir la tracción muscular y la turgencia desarrollada durante el proceso de muda, lo cual era la causa de que las larvas afectadas no fueran capaces de abandonar la exuvia.

A partir de la observación de estos efectos, se han analizado cientos de compuestos análogos, determinando el efecto que producen en diversas especies de lepidópteros, coleópteros y dípteros, evaluando así su potencial insecticida; de todos ellos el DFB mostró las mejores características para fomentar su desarrollo y aplicación (Figura 5).

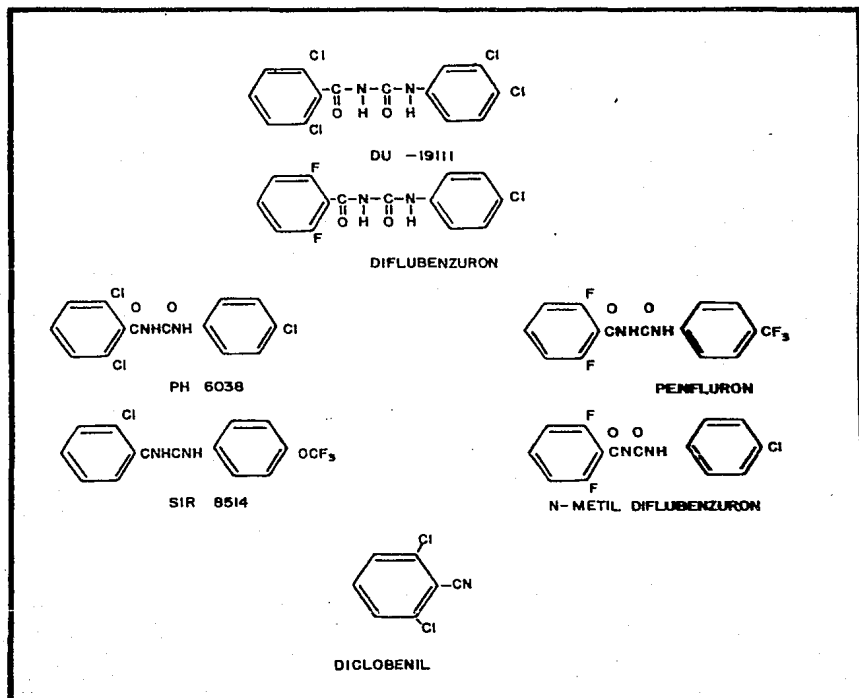


Figura 5. Benzofenilureas y compuestos análogos (24).

A partir de la introducción del DFB se han realizado numerosas pruebas sobre su espectro insecticida, tanto en laboratorio como en campo; es relevante mencionar que además del efecto larvicida se ha observado también una acción ovicida en diversas especies, que puede ser obtenido por aplicación topical en los huevos, o al ser ingerido el producto - por la hembra grávida. En todos los casos el fenómeno es similar; el desarrollo de las primeras etapas transcurre normalmente dentro de los huevos, pero las larvas son incapaces de abandonarlos por no poder romper el corion, ya que se afecta la formación de cutícula en el embrión en desarrollo. Asimismo al efectuar una revisión del estado de desarrollo del DFB, se determinó que puede ser aplicado en dosis bajas en cultivos agrícolas, en bosques y para el control de mosquitos, así como probablemente también contra plagas de granos almacenados (56).

2.5 Metabolismo y modo de acción del Diflubenzurón.

El modo de acción de las benzofenilureas ha sido estudiado bastante durante la última década y se han realizado trabajos diversos para determinar el punto exacto en el cual inciden en la biosíntesis de la quitina; la mayoría de las evidencias sugiere que actúa sobre la sintetasa de quitina (Figura 6) (24).

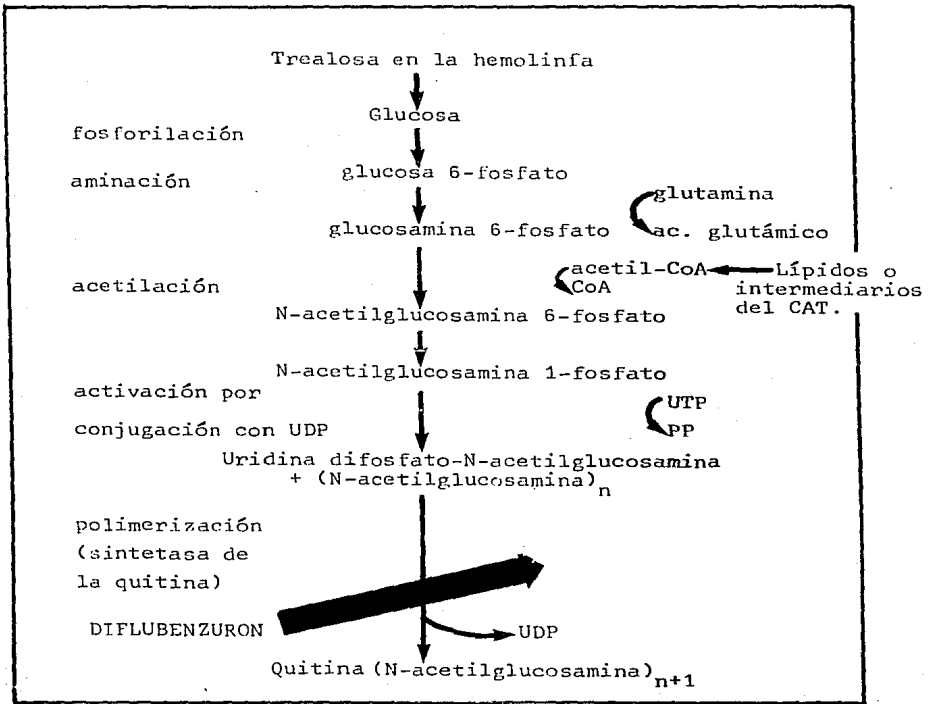


Figura 6. Biosíntesis de la quitina (46).

Por otra parte, al estudiar la rapidez de la inhibición por DFB, se encontró que la mayoría de las incorporaciones toma lugar aproximadamente 15 minutos después de la aplicación del DFB inyectado en larvas de Pieris; asimismo se - concluyó que el DFB es capaz de inhibir este proceso de incorporación en más del 95%; de la misma forma otros estudios similares realizados en langostas, muestran que el DFB actúa a las seis horas de su aplicación y en algunos casos en menos de 80 minutos (56).

De lo anterior se concluye que el DFB actúa rápidamente interfiriendo la deposición de quitina; los posibles - efectos en la deposición de proteínas, el segundo componente en importancia de la matriz endocuticular, fueron estudiados en 1974, al trabajar con langostas, concluyendo que no se - afecta la deposición de proteínas, la cantidad de ellas, ni los puentes que las mantienen unidas (26).

En general el DFB no afecta la síntesis de proteínas; trabajos realizados en Lepinotarsa, P. brassicae y - - Anthonomus grandis, muestran que no hay alteración; el 1974 se encontró un incremento de proteínas dependiente de la dosis aplicada de DFB en cutícula de M. domestica, lo cual sugiere que se afecta la elasticidad y firmeza de la endocutícula (28). Contrariamente a esto, en 1977 se mostró que el tratamiento de la membrana peritrófica de Locusta con DFB -

produjo una proporción constante pero reducida de quitina -
-proteína.

En Calliphora, el tratamiento con DFB disminuye -
los niveles de quitina, así como la masa y longitud de la -
membrana peritrófica (14). Posteriormente en 1978, se encon-
tró que el DFB modifica la permeabilidad mecánica de los élitros
del adulto de L. decemlineata, concluyendo que los efec-
tos se deben a la interferencia del DFB con los puentes qui-
tina-proteína en el élitro (19). En 1974 se encontró que el
DFB bloqueaba completamente la síntesis de quitina en P. - -
brassicae y se acumulaba la uridín 5.difosfo-N-acetilglucosa
mina (UDPAG), lo cual sugiere que se presenta una inhibición
de la síntesis de quitina (24). La UDPAG también se acumula
por efecto del DFB en Oncopeltus fasciatus y M. domestica -
(23). También en 1974 se encontró que en varias especies de
langosta el DFB no afectaba la esclerotización de la cutícu-
la (26). En 1976 se manifestó que el DFB no afectaba teji-
dos internos ni la espermatogénesis en lepidópteros (50), y
en 1977 se encontraron efectos en la síntesis de lipoproteí-
nas e inhibición del crecimiento testicular en machos de A.
grandis. La disminución de las funciones sexuales fue atri-
buida en parte a la inhibición de la síntesis de DNA por - -
DFB.

Asimismo se piensa que las malformaciones morfoló-

gicas presentes en insectos tratados con DFB pueden deberse al incremento en los niveles de quitinasa y fenoloxidasas; el incremento del nivel enzimático mencionado se atribuyó a una posible estimulación hormonal, lo cual podría explicar el decrecimiento observado en la deposición de quitina (28).

Una alternativa posible para explicar el modo de - acción es la inhibición de una de las enzimas en la ruta de la biosíntesis de la quitina. Considerando la rapidez del - proceso lo más probable es una inhibición directa, sin la intervención hormonal; al compararse las tasas de incorpora- - ción de ^{14}C en glucosa en el último precursor de la quitina, la uridin difosfato N-acetilglucosamina (UDPAG), en larvas - de Pieris, tanto normales como tratadas con DU-19111, se en- - contró que las proporciones no diferían significativamente, por lo que se puede concluir que los compuestos análogos no inhiben ningún paso intermedio entre la glucosa y la - - UDPAG; esto apoya la hipótesis de que en realidad el - - - - DU-19111 y sus análogos bloquean la sintetasa de quitina - - (49).

Además de lo mencionado anteriormente, se han ob- - servado otros efectos causados por el DFB en diversos proce- - sos bioquímicos, los cuales se muestran en el Cuadro 2. Si comparamos estos efectos con la rápida inhibición de la sín- - tesis de quitina manifestada anteriormente, estos efectos po- - drían denominarse secundarios.

Cuadro 2. Efectos "secundarios" del diflubenzurón en Musca domestica y P. brassicae.

COMPUESTO	ORGANISMO	DIAS DES PUES DEL TRATAMIENTO	E F E C T O S
DFB	<u>Musca domestica</u>	3	Incremento en la actividad de la quitinasa y fenoloxidasá.
DFB	<u>M. domestica</u>	2	Incremento en la actividad de las enzimas metabolizantes de la β ecdisona e incremento en la actividad de la oxidasá microsomal.
DFB	<u>P. brassicae</u>	2	Ligero incremento - en la biosíntesis - de material no quitinoso.

De la misma forma se encontró una alta estabilidad del DFB después de su aplicación en insectos, como se puede observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Metabolismo del DFB en insectos (56).

Organismo	Aplicación	Eliminación+	Absorción++
<u>Pieris brassicae</u>	suspensión en hojas	0.5	30-35
<u>Anthonomus grandis</u>	topical e inyección	1-2	100
<u>Estigmate acrea</u>	suspensión	- -	25-40

+ = tiempo promedio en días.

++ = porcentaje de dosis aplicada.

En todos los casos el DFB se mantuvo estable; su contenido dentro del insecto depende del método de aplicación; después de la ingestión oral, cerca de 2/3 del material ingerido permanece en el tracto digestivo y se excreta posteriormente.

Al estudiar el metabolismo del DFB en Anthonomus grandis de manera más amplia, los reportes iniciales mostraron que no presentaba degradación, pero estudios posteriores mostraron un 23% de degradación, cuatro días después de su aplicación. Se ha estudiado la transferencia del DFB en picudos tratados con él, hacia otros no tratados, así como la secreción del compuesto no metabolizado de los huevecillos, lo cual impide la eclosión. En la Figura 7 se muestran los metabolitos del DFB encontrados en diversos insectos (24).

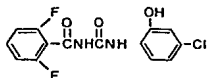
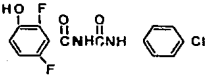
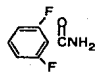
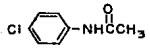
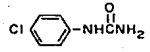
Metabolitos	Insecto	Dosis aplicada %
 <p>(((4-cloro-2-hidroxifenil) amino) carbonyl)-2,6-difluorobenzamida.</p>	<p><u>Anthonomus grandis</u></p> <p><u>Musca domestica</u></p>	<p>(1)</p> <p>12</p>
 <p>N-(((4-clorofenil) amino) carbonyl)-2,6-difluoro-3 hidroxibenzamida.</p>	<p><u>A. grandis</u></p>	<p>(1)</p>
	<p><u>A. grandis</u></p> <p><u>M. domestica</u></p> <p><u>Stomoxys calcitrans</u></p>	<p>2</p> <p>0.8</p> <p>0.3</p>
	<p><u>S. calcitrans</u></p>	<p>0.2</p>
	<p><u>S. calcitrans</u></p> <p><u>M. domestica</u></p>	<p>0.5</p> <p>0.3</p>

Figura 7. Metabolitos del DFB (24).

(1) = Los DFB's hidroxilados sólo fueron detectados como conjugados; colectivamente representan - alrededor del 19% de la dosis aplicada.

Por otra parte, en experimentos tendientes a medir -- el incremento del DFB en el medio ambiente, llamado también -- "bioacumulación ecológica", los resultados (Cuadro 4) muestran que en larvas de mosquito es donde se presenta un mayor incremento, mientras que en peces y caracoles este resultado es menor; con respecto al DDT, se ha reportado que estos incrementos son del orden del 10 000 para peces y 5 000 para caracoles, en ecosistemas similares (24).

Cuadro 4. Bioacumulación de DFB en el Modelo de Ecosistema de Metcalf (56)

Organismo	Bioacumulación Incremento Ecológico (I.E.)		
	A	B	C
Caracol (<u>Physa sp.</u>)	86	95	221
Peces (<u>Gambusia affinis</u>)	19	14	80
Largas de mosquito (<u>Culex sp.</u>)	779	596	1099

I.E. = Concentración en el organismo
 Concentración en el agua (después de 33 días)

2.6 Efectos del DFB en diversos organismos.

El DFB aplicado en tres depósitos de agua en dosis de 10, 5 y 2.5 ppb, inhibió la emergencia de Chaoborus - - - astictopus en un 95-100% en los siete días posteriores al - tratamiento, aunque en algunos lugares se incrementó nuevamente la población al cabo de 6 semanas; en todos los tratamientos hubo eliminación de crustáceos, mientras que los rotíferos y las poblaciones de algas no fueron afectadas; por su parte, el pez Lepomis macrochirus el cual se alimentaba - principalmente de crustáceos, continuó su desarrollo de manera normal.

Los residuos encontrados en los depósitos de agua tratados, declinaron hasta 0.2, 0.3 y 0.5 ppb dos semanas - más tarde; de la misma forma, analizando los sedimentos no se localizaron residuos en él, contrariamente a lo sucedido en el pez Promoxis annularis el cual contenía de 62.2 a - - 355.1 ppb, sin embargo, a los 14 días posteriores al tratamiento estos niveles empezaron a declinar rápidamente (5).

Se probaron productos de la degradación del DFB, tratando de observar su toxicidad en tres especies de invertebrados acuáticos; Daphnia magna, Gammarus pseudolimnaeus y Chironomus plumosus, así como en cuatro especies de peces: - Salmo gairdneri, Pimephales promelas, Ichtaurus punctatus y

Lepomis macrochirus, encontrando que a las 48 horas la CE_{50} (concentración estimada que inmoviliza el 50% de los organismos prueba), fue de 0.015 mg/1 para D. magna, a las 96 horas y de 660 mg/1 para macrochirus; la CE_{50} a las 96 horas excedía los 100 mg/1 para las cuatro especies de peces.

El producto más tóxico fue la 4-cloroanilina, la cual a las 96 horas tuvo una CE_{50} de 2.4 mg/1 de L. macrochirus y a las 48 horas de 43 mg/1 en las larvas de cuatro instar temprano (30).

Al agregar DFB al alimento de gallinas en una proporción de 10 ppm, fue posible detectar residuos en los huevos, el hígado y en las grasas viscerales, aunque no se afectó la viabilidad de los huevos producidos (40). Tomando en cuenta la posibilidad que existe de una contaminación accidental del alimento utilizado en gallineros, se probó el DFB y su efecto en la reproducción de las gallinas, las cuales fueron sometidas a dietas en las cuales se les incorporaba DFB en niveles de 0.25 y 250 ppm, en hembras y machos de gallina para postura, desde un día de edad, hasta todo el ciclo de postura; se midió la producción de huevos, su peso y el del cascarón, la fertilidad, la eclosión y los efectos en la progenie, encontrando que aún los organismos que habían ingerido 250 ppm, no mostraron ningún efecto (32).

De la misma forma se indica que el DFB presenta - una baja toxicidad en mamíferos, ya que por ejemplo, la DL_{50} para ratas es de 4600 mg/kg; el ganado Holstein puede consumir hasta 1 mg/kg por día de DFB sin presentar efectos en el crecimiento o histopatología en algún órgano. Estudios in vitro realizados en células de rata, muestran que el DFB no es tóxico y que no inhibe la síntesis de carbohidratos complejos.

El temor toxicológico fue disminuido cuando el Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute, - - - 1979), "absolvió" parcialmente la 4-cloroanilina de posibles efectos cancerígenos (24).

2.7 Efectos del Diflubenzurón en Dípteros.

En un intento de controlar las larvas de Musca autumnalis se incluyó DFB en la dieta de ganado Holstein, el cual fue ingerido a través del estiércol, encontrándose - - gran actividad contra la mosca y otros grupos de insectos. - En 1977 al probar nuevamente el DFB, pero ahora en ganado - Tennessee, el estiércol fue analizado dos veces por semana, de abril a septiembre, registrándose en él 24 especies de insectos, de los cuales solamente se vieron afectados M. autumnalis, Ravinia sp. y Sharipidium scarabaeoides; además

se pudo observar que el estiércol tratado se descompuso más lentamente que el de ganado no tratado (16). También en - - 1977 se probó DFB para el control de la misma M. autumnalis, trabajando con adultos de 1-2 días de edad, de ambos sexos; el DFB se les proporcionó en la dieta o bien por contacto; - los huevecillos fueron severamente inhibidos en su eclosión, observándose también que hembras no tratadas produjeron huevecillos con muy poca viabilidad cuando fueron cruzadas con machos tratados. La inhibición óptima de los huevecillos se presentó cuando cada sexo fue expuesto por unos 15 minutos a una superficie cubierta con polvo de DFB (48).

De la misma forma, al probar DFB para combatir el último instar de Simulium vittatum, se encontró que la mortalidad causada fue del 70% en una concentración de 0.02 ppm IA/ha; asimismo produjo el 100% de mortalidad de huevecillos de 72 a 96 horas de edad, con una dosis de 0.2 ppm durante - 24 horas (34).

También se encontró que la emergencia de los adultos de S. verecundum, fue reducida en un 95% cuando se sometieron larvas de diferentes instares a la presencia de DFB, en dosis de 0.001 ppm; por su parte, las larvas del último instar presentaron una metamorfosis anormal, en este caso la mortalidad fue de 86-100% con 15 minutos de exposición a - -

0.1-0.2 ppm de DFB, y 100% con 1 ppm y 15 minutos de exposición al producto, ya sea a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ o menos (27).

Por otra parte, aplicando DFB en dos lagos de recreo se obtuvo un excelente control de mosquitos acuáticos; el tratamiento se realizó en el lago Calabazas, donde el DFB se aplicó en una dosis de 0.1 y 0.25 lb/acre de superficie; sin embargo, después de la eliminación de la fauna, apareció en el lago una nueva especie: Labrundinia maculata la cual originalmente no se encontraba ahí (43).

En 1976 se probaron las diferentes formulaciones de DFB: polvo humectable (PH), concentrado emulsificable (CE) y granular (G) para evaluar su efectividad en condiciones campo contra varias especies de mosquitos, para lo cual se irrigió alfalfa con 0.0025 y 0.005 ab de IA/acre, obteniéndose un control completo sobre Psorophora confinnis; los gránulos fueron ligeramente menos efectivos que la formulación PH y no hubo diferencias marcadas entre las otras formulaciones. Las dosis efectivas se encontraron en el rango de 0.0025 - 0.005 lb de IA/acre (44).

En 1983 se encontró que la emergencia de los adultos de Clistoronia magnifica fue inhibida a 0.1 ug/l; en Daphnia magna hubo mortalidad a 2.0 ug/l y en Hyallela azte-

ca fue significativa a 2.0 ug/l, mientras que la muda y sobrevivencia del mosquito Cricotopus spp. fue afectada a 4.9 ug/l y la emergencia de los adultos se afectó con 1.6 ug/l, todo eso al aplicar DFB en pruebas de laboratorio (45).

Al respecto de Ceratitis capitata, las larvas de último instar fueron tratadas con DFB por inmersión, observándose mortalidad larval y deformación pupal, además de que se redujo la emergencia de los adultos, la fecundidad y la eclosión de huevecillos. El DFB ingerido por los adultos produce una reducción irreversible en la fecundidad si la hembra lo ingiere durante el primer día después de la emergencia (52).

En los valles de Sacramento y San Joaquín se aplicó DFB para controlar poblaciones de Aedes nicromaculis y A. melanimon que habían mostrado resistencia a compuestos organofosforados; la aplicación aérea de una dosis de 0.025 lb de IA/acre mostró resultados completamente satisfactorios. De la misma manera el DFB es adecuado para controlar Culex tarsalis, resistente a compuestos organofosforados y vector de encefalitis equina en California (53). En Ontario se realizaron pruebas de campo para controlar las especies de primavera de Aedes, aplicando tratamientos en diferentes estadios larvarios; el DFB a 0.022 kg de IA/ha y a 0.045 kg

de IA/ha fue efectivo al aplicar el tratamiento a larvas de tercer ínstar (50).

Con larvas de 1er. ínstar y pupas de Culex quinquefasciatus, así como con larvas de 4o. ínstar de Anopheles albimanus, el DFB ofreció resultados efectivos ya que inhibió completamente la emergencia de los adultos en los 5-10 días posteriores a su aplicación (42). De la misma forma, aplicando DFB a larvas de C. pipiens quinquefasciatus Say en laboratorio y a C. tarsalis, C. peus y Culiseta inornata en el campo, se vió inhibida la emergencia hasta por un período de 15 a 18 días (44).

Posteriormente se expusieron masas de huevecillos de C. pipiens quinquefasciatus Say en agua tratada con DFB, observando que se presentaba una eclosión anormal, así como efectos ovicidas, que estuvieron influenciados tanto por la edad de los embriones como por el tiempo de tratamiento; este efecto ovicida, lo mismo que la inhibición de la eclosión de huevecillos también se produjeron en organismos que habían sido sometidos a tratamiento con DFB mezclado con sacarina, siendo más sensibles las hembras que los machos; de la misma manera, cuando se aplicó DFB para combatir C. tarsalis y Aedes taeniohynchus se observó una eclosión anormal y como efectos ovicidas (18).

En 1978 se informó que al trabajar con DFB en C. quinquefasciatus a dosis de 1 ppm, en una sección muy poblada de Jakarta, Indonesia, se encontró una alta efectividad en la inhibición de la emergencia de los adultos por dos semanas (54).

Posteriormente, en 1979, se observó que al aplicar DFB a larvas de C. pipiens se inhibía el crecimiento y el desarrollo; una dosis de 4 ppb, con 42 horas de exposición en el período siguiente a dos mudas, causa una reducción en el peso del cuerpo y en el contenido de la quitina, dependiente de la dosis; así mismo, hay un incremento en la duración del instar y en la mortalidad, ambos dependientes también de la dosis aplicada (22).

En C. quinquefasciatus Say el DFB aplicado en cuerpos de agua anaeróbicos y con desechos, proporcionó un control satisfactorio durante un período de una a dos semanas al utilizar 0.1 lb/acre (7).

Al probar formulaciones granulares de DFB para el control de larvas de mosquito de los géneros Chironomus, - - Tanytarsus y Procladius, en canales y cuencas del río Santa Ana en el sur de California, se obtuvieron los siguientes resultados: una dosis de 0.11 kg de IA/ha fue altamente efecti

va contra los tres géneros en agua superficial; en profundidades menores de un metro controló la población de mosquitos durante las 3 semanas posteriores al tratamiento; en aguas - con 1-2 m de profundidad también se logró una mortalidad significativa (3).

En 1977 se probó DFB contra diversos mosquitos en lagos de recreo artificiales en el sur de California y se observó que una dosis de 0.22 kg de IA/ha del producto los controlaba durante 4-5 semanas, afectando a Ch. decorus sólo durante la semana siguiente al tratamiento (4).

Posteriormente se probó en laboratorio el mismo producto contra larvas de cuarto ínstar de Ch. decorus y Gluptotendipes paripes colectadas en el campo, obteniéndose un 90% de mortalidad en ambas especies con 4-22 ppb (6).

Por otra parte, utilizando DFB en el control de Glossina spp. se encontró que en condiciones experimentales, el tratamiento más efectivo en la hembra de G. morsitans morsitans fue la aplicación topical, seguida por el contacto tarsal con superficies que contenían DFB; el tratamiento por contacto durante la cópula con machos tratados tuvo menor efecto. En insectos ovíparos, el DFB aplicado a las hembras adul

tas inhibe la eclosión de los huevecillos, pero en la mosca - tsé tsé, por ser larvípara, la eclosión del huevecillo se desarrolla normalmente sin presentar interferencia hasta el período de pupación, quizá porque no es necesaria la síntesis de quitina en su desarrollo en el útero durante los primeros estadios y a que la quitina sólo es utilizada para proveer protección en los primeros estadios libres. Una simple aplicación de DFB de 0.5 microgramos por mosca, da como resultado una descendencia no viable a través de una hembra cuyo ciclo reproductor es de más de 100 días (29).

En Haematobia irritans se afecta la eclosión de huevecillos si las hembras se tratan topicalmente con 1-2 microgramos de DFB/microlitro de acetona, a pesar de que la larva se desarrolla dentro del huevecillo.

En pruebas de campo se observó que el DFB inhibió el desarrollo de larvas de H. irritans en heces de bovinos que han consumido alimento con 0.1 y 0.05% de DFB (aproximadamente 36.5 y 26.8 mg de IA por animal por día, respectivamente). Los análisis de residuos de estiércol indicaron que 75 y 85% de las larvas fueron susceptibles a concentraciones de 0.13-0.52 ppm de DFB, respectivamente (8). Posteriormente en 1977, probando aspersiones con 0.5 y 1.0% de DFB en ganado de línea, se encontró que se inhibía el desarrollo de H. irritans; el tratamiento con una solución al 1.0% dió como resultado la inhibición en la eclosión de los huevecillos y la transforma-

ción de larvas en pupas; de esta manera, la emergencia de los adultos fue virtualmente eliminada después de un tratamiento de cuatro semanas (33).

En Stomoxys calcitrans se observó inhibición de la emergencia como resultado de la aplicación topical con DFB en una proporción de 1 mg/pie² de superficie expuesta (60). Al exponer hembras de la misma especie a papel impregnado con DFB se observó que los huevecillos no eclosionaban; la CL₅₀ para lograr este efecto fue aproximadamente del 17%.

De manera semejante, el 88% de los huevecillos no eclosionaron cuando las hembras fueron expuestas por siete días a residuos de DFB al 1%; el 60% no eclosionó después de una exposición similar durante 14 días. También se observó inhibición en la eclosión de huevecillos, concluyendo que el compuesto es activo principalmente en las hembras, aún cuando se ha observado que machos tratados transmiten el efecto a hembras no tratadas (61). En 1980 se encontró un segundo modo de acción para la inhibición de la síntesis de la quitina por el DFB, ya que éste bloquea la síntesis de la cutícula imaginal por una prevención en la formación de la epidermis del adulto en el estado pupal. En pupas de la misma especie se encontró que el DFB tiene dos maneras de inhibir la síntesis de quitina, por un lado previene la proliferación de las células primordiales indiferenciadas que forman la epidermis

imaginal, bloqueando el subsecuente ciclo de deposición cuticular, además de que inhibe la síntesis de quitina por establecimiento de células epidermales. Otro efecto interesante del DFB fue que retarda la muerte de células de la epidermis larval, aunque la fagocitosis de otros tejidos larvales tiene lugar en el mismo tiempo que los testigos (38).

Por otra parte, en Musca domestica se observó que se inhibía la emergencia, como resultado de la aplicación topical en una proporción de 1 mg/pie² de superficie expuesta a DFB; el DFB aplicado en plantas de tratamiento de aguas residuales en una proporción de 50 mg/pie², controló el 90% de moscas domésticas, debido a la inhibición de la síntesis de quitina, así como la metamorfosis (58). En 1975, se observó que cuando el DFB fue agregado a dieta alimenticia de gallinas para postura en dosis decrecientes desde 50 a 1.6 ppm, el nivel que causó una completa inhibición de desarrollo de larvas de la mosca cayó entre los 6.2 y 12.5 ppm, aunque se encontraron residuos de DFB en todos los huevos de gallinas tratadas (39). En pruebas de laboratorio y campo realizadas para determinar el efecto en la misma especie y algunos de sus parasitoides, se observó que en laboratorio, dosis de 10, 50, 1000 y 10 000 ppm no afectan a los huevecillos ni a las pupas de esta mosca; concentraciones de 1.25, 2.5 y 10 ppm de IA producen más del 90% de mortalidad, en tanto que los estadios larvales intermedios y en los últimos, el DFB no parece afectar la emergencia del parasitoide Muscidifurax raptor, así co

mo tampoco los que se encontraban en las pupas. Cuando se -- compararon con los testigos se observó que el tratamiento con DFB favorecía el desarrollo de los parasitoides, puesto que -- se presentó una gran abundancia y diversidad de especies (2). Incluso al agregar DFB en la dieta de ganado, se observó inhi bición del desarrollo de moscas debido al contenido de DFB que se encontraba en las heces del ganado; las dosis aplicadas con -- tenían 0.05 y 0.1% del regulador del crecimiento, que fue su -- ficiente para inhibir la emergencia de los adultos (59).

Utilizando DFB marcado con ^{14}C , se siguió la ruta -- metabólica de éste en la misma M. domestica. A las 72 horas después de la inyección de 2649 dpm por mosca, la distribución de la radioactividad fue del 78.4% en moscas tratadas, del -- cual 74% era DFB inalterado y 4.4% conjugado; 16.5% se encon -- tró en las heces, en las cuales toda la radioactividad se en -- contraba como DFB conjugado. El DFB conjugado constituía un compuesto simple no polar que contenía un 70% de radioactivi -- dad y un compuesto polar no conocido que contenía un 30% de -- radioactividad; el compuesto no polar aislado de la hidróli -- sis ácida de las heces fue identificado como N-(((4-cloro-2- hidroxifenil)-amino)carbonil)2.6-difluorobenzamida (11). Al probar la potencia relativa del DFB en la esterilidad de la -- misma especie, por inyección, se encontró que recobraba su fer tilidad total o parcialmente, diez días después. Al inyectar DFB con ^{14}C en hembras, éste se depositó sin degradarse en los huevecillos; como resultado se redujo la eclosión y la emer --

gencia de la F_1 ; los huevecillos con 10 pg/huevo de DFB no e--
closionaron, pero los residuos se incrementaron con las dosis
y decrecieron en lotes sucesivos de huevecillos; la utilidad
de este tipo de inhibidor reproductivo aparentemente no sólo
depende de su actividad intrínseca, sino también de sus carac
terísticas metabólicas y de excreción (12).

También se han probado en M. domestica, algunas ben
cilureas con variación en sus propiedades lipofílicas; la ac
tividad larvicida fue evaluada con mezclas de compuestos en un
medio artificial, mientras que el efecto ovicida se determinó
a través de la alimentación, o por inyección de hembras adul
tas, causando una no emergencia de los huevos, aunque los em
briones parecían completamente desarrollados; se encontró una
correlación significativa entre la actividad ovicida después
de que los adultos se alimentaron y una acción ovicida des--
pués de la inyección (21).

El desarrollo de la resistencia larvicida fue estu
diado en una variedad susceptible (S) y en una multirresisten
te (NIC), al incorporar DFB al medio de cultivo, además de los
cambios en la actividad larvicida y ovicida, la selección dió
como resultado un retardo en el crecimiento y una disminución
en el peso pupal, disminuyendo la fertilidad y fecundidad de
los adultos, e incrementando la mortalidad pupal; este efecto
llegó a un colapso en la F_{32} de la variedad NIC; las observa--

ciones para este estudio con variedades S fueron detenidas en la F₄₀. La fijación final del desarrollo de resistencia larval en la variedad NIC fue encontrada en la F₂₆, donde muestra un incremento de 13.6 veces sobre los valores de CL₅₀(20).

Finalmente, existen informes de que el DFB afecta a las larvas de mosca en dosis de 0.0125 ppm; la aspersión directa sobre suelo forestal causó un 100% de mortalidad en larvas inmediatamente después de su aplicación, no obstante que dos meses después no se encontraron residuos del DFB aplicado (10).

3. METODOLOGIA

3.1 Cría de Culex quinquefasciatus Say.

La cría de mosquito se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, en una cámara de cría a 28°C, 75% de humedad relativa y 12 horas luz. Los adultos se mantuvieron en una jaula de madera de 60 x 50 x 50 cm forrada con una malla fina de plástico y con una de sus caras provista de mangas para poder maniobrar dentro de ella. En la jaula se introdujo un recipiente con azúcar y pasas para la alimentación suplementaria de los adultos y otro recipiente con agua para la oviposición; por la noche se colocaba un pollo no mayor de quince días de edad dentro de la misma jaula, para la alimentación de las hembras.

Diariamente se colectaron las masas de huevecillos encontrados en los recipientes citados, mismas que se colocaban en pequeñas tinas de plástico (10 x 10 x 10 cm) con agua, para la eclosión.

Las pequeñas larvas se transfirieron a charolas de 30 x 50 x 8 cm, con agua, dispuestas en anaqueles apropiados; éstas se alimentaron con una mezcla de levadura de cerveza y alimento canino molido (croquetas), en proporción 1:3, elimi-

nando previamente el sobrenadante, una delgada capa blanquecina que se forma en la superficie y que es producto de la fermentación del alimento proporcionado el día anterior; se efectuaron observaciones diarias para determinar el ciclo de vida de los cambios presentados, así como el tiempo requerido para ello.

Una vez desarrolladas las pupas, se colocaron dentro de la jaula para la emergencia de los adultos, evitando su dispersión y permitiendo la cópula, dando de esta manera oportunidad de comenzar el ciclo nuevamente.

3.2 Ciclo de vida.

Las observaciones sobre el ciclo de vida del mosquito, comenzaron a partir de los huevecillos, los cuales son depositados en grupos que dan la apariencia de balsas, diez de las cuales se observaron para determinar la fecundidad.

3.3 Preparación del Diflubenzurón.

Las soluciones de DFB aplicadas se prepararon a partir del producto al 25% (PH), tomando inicialmente 4g del producto y disolviéndolos en 100 ml de agua; una vez obtenida esta solución madre al 1.0%, se prepararon a partir de ella - - - - - concentraciones al 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, - - - - - 0.000001 y 0.0000001%.

Para el bioensayo se prepararon una serie de diluciones adicionando una alícuota de 1 ml de la concentración respectiva a un vaso desechable que contenía 100 ml de agua corriente, de manera que se obtuvieron diluciones de 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 y 0.00001 ppm de ingrediente activo, respectivamente; en todos los casos las soluciones se preparaban al momento de utilizarse.

Cada tratamiento, incluyendo el testigo, se probó con larvas de 1º, 2º, 3º, 4º ínstar; la elección de los organismos se realizó al azar dentro de cada cohorte, con tres repeticiones por tratamiento y 20 individuos por repetición.

La toma de datos se realizó un día después del cambio de ínstar, marcando los vasos con los datos correspondientes (ínstar, concentración y fecha), con etiquetas adhesivas.

Diariamente se realizaron las observaciones de los efectos producidos, con ayuda de un microscopio estereoscópico, durante un período de siete días, tiempo suficiente para su cambio de ínstar, o muerte, según el caso.

3.4 Análisis Estadístico.

Los datos se procesaron mediante el análisis de Probit, en el Centro de Estadística y Cálculo del Colegio de Postgraduados, Chapingo, Méx. Dicho análisis es el resultado de la búsqueda de técnicas estadísticas para el tratamiento de datos obtenidos cuando se trabaja con experimentos cuyo objetivo consiste en estimar la dosis necesaria de un estímulo aplicado, para que una cierta proporción de la población presente la respuesta esperada. Tomando en cuenta las dosis aplicadas y los organismos que muestran respuesta a cada una de ellas, la distribución probabilística de la tolerancia a las dosis es generalmente asimétrica, por lo que se ha vuelto práctica común trabajar con el logaritmo de la dosis, obteniendo así distribuciones simétricas que son más sencillas de interpretar (27).

Usualmente en experimentos de Toxicología se le denomina CL_{50} a la concentración necesaria para que muera el 50% de los individuos sujetos al estímulo; de la misma forma, la CL_{90} será la concentración letal para el 90% de la población tratada.

Los valores Probit son unidades de probabilidad arreglados en una escala de uno a diez, de modo que el número cinco presenta el 50% de respuesta al estímulo analizado (55).

Con el análisis se obtuvieron los valores A y B de la ecuación de regresión:

$$Y = A + BX$$

Donde: Y = Valor Probit

A = Ordenada al origen

B = Coeficiente de regresión o pendiente de la línea de regresión

X = Logaritmo de la dosis.

El valor de la concentración letal media (CL_{50}) de la población tratada es obtenido al sustituir Y por 5 y despejar X; a dicho valor se le saca el antilogaritmo y de esa manera obtenemos la concentración letal media (25).

Los datos sobre acción letal es bioensayos se analizan por medio de la línea de regresión dosis-respuesta. En experimentos toxicológicos donde se registra una mortalidad apreciable debido a causas ajenas a la acción del tóxico aplicado, éste corresponde a la mortalidad del testigo y se debe corregir por medio de la fórmula de Abbott (1):

$$MC = \frac{X - Y}{100 - X} \times 100$$

Donde: MC = Mortalidad corregida

X = Porcentaje de mortalidad observada en el tratamiento

Y = Porcentaje de mortalidad en el testigo.

El programa Probit proporciona el valor estimado - del logaritmo de la DL_{50} , de la ordenada al origen y de la -- pendiente de la recta ajustada, de la desviación estándar de la distribución de las tolerancias, de las varianzas y cova-- rianzas y el valor de la X^2 ; además incluye el valor estimado de la CL_{50} y de otras concentraciones letales desde CL_{01} has-- ta CL_{10} con incrementos del 1%, desde CL_{10} hasta CL_{90} con in-- crementos del 5% y desde CL_{90} hasta CL_{98} con incrementos nue-- vamente del 1%, así como los logaritmos de éstas mismas dosis estimadas; también se obtienen los intervalos de confianza pa-- ra la dosis y sus logaritmos al 95% de probabilidad así como-- gráficas de los valores observados y ajustados.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Ciclo de vida.

El desarrollo larvario de Culex quinquefasciatus - Say, bajo condiciones ambientales controladas, tuvo una duración de 16 días; en el Cuadro 5 se muestran los tiempos requeridos para cada etapa de desarrollo.

La fecundidad promedio de las hembras fue de 250 - huevecillos por oviposición; a las 24 horas tuvo lugar la - eclosión de los huevecillos, de los cuales surgieron pequeñas larvas de movimientos característicos, que empezaron a - alimentarse desde ese momento; durante los cuatro días si- - guientes no presentaron cambios en cuanto a forma y tamaño, pero al acercarse el final de este período dejaron de alimentarse, moviendo las mandíbulas mucho más lentamente y se mantuvieron "flotando" cerca de la superficie. Al día siguiente se observaron las exuvias sobre la superficie y las larvas de mayor tamaño, inquietas y de movimientos vigorosos; - este período duró otros cuatro días, al término de los cuales se repitió nuevamente el proceso, dando lugar así al tercer ínstar; el paso al cuarto ínstar se dió en los siguientes cuatro días, en el transcurso de los cuales se observaron cambios más marcados en las larvas ya que sus movimien-

tos se tornaron más lentos, el tórax comenzó a expandirse, - el cuerpo adquirió tonalidades más oscuras y permaneció inmóvil, tocando la superficie del agua; sin embargo, cuando - fueron estimulados con un movimiento brusco, la larva buscó el fondo rápidamente, para volver a la superficie de manera más lenta; esta fase se presentó al término de tres días; - los adultos emergieron 48 horas después de la transformación en pupa (Figura 8).

Cuadro 5. Duración promedio de los diferentes estadios biológicos de Culex quinquefasciatus Say, bajo condiciones controladas.

Fase Biológica	Individuos Observados	Duración (Días)
Huevecillo	250	1
Larva 1	100	4
Larva 2	100	4
Larva 3	100	4
Larva 4	100	3
Pupa	100	2
Total		18

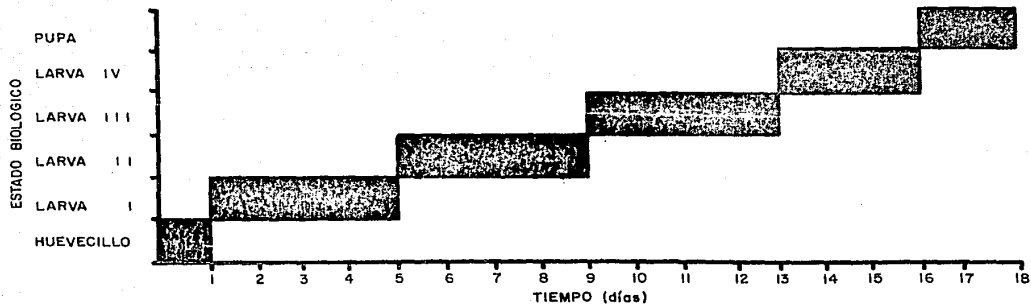


Fig. 8. Duración del desarrollo larvario de Culex quinquefasciatus Say en condiciones de laboratorio. Chapingo, Méx. 1985.

4.2 Efectos morfogénicos y de comportamiento.

En forma general, ante concentraciones menores la mortalidad fue baja y conforme estas concentraciones se incrementaron se observaron diversos efectos; las primeras respuestas fueron la pérdida de movimiento característico, ya que permanecieron más tiempo inmóviles, tendiendo a mantenerse en el fondo del recipiente que las contenía; el movimiento de las mandíbulas que era constante, también declinó por lo cual se redujo su capacidad de ingestión de alimento; conforme aumenta la concentración y se acerca el período de muda, la inmovilidad es casi total, permaneciendo así hasta su muerte. Cuando esto sucede, el tórax típicamente globoso ha aumentado de tamaño, efecto debido a que la hemolinfa ha aumentado la presión hidrostática necesaria para permitir la muda; sin embargo, las larvas no pueden llevar a cabo el proceso y mueren presentando diversas tonalidades en el color de su cuerpo; estos resultados concuerdan con las observaciones reportadas al aplicar un regulador del crecimiento sobre P. brassicae, donde además se efectuaron análisis histológicos de las larvas afectadas, encontrando severas lesiones en el tejido endocuticular; incluso la nueva cutícula era frágil e incapaz de resistir la tracción muscular y turgencia incrementada durante el proceso de muda (56).

Estas interpretaciones se apoyan en estudios citados anteriormente, en los cuales se observó bloqueo en el paso final de la polimerización en la síntesis de quitina, al mismo tiempo que acumulación de UDPAG (23, 24), la cual se presenta en la etapa previa a la síntesis del polisacárido - (Figura 6), lo que reafirma que el DFB interfiere en el desarrollo de esta última etapa:

Algunas larvas, sobre todo las de los últimos instares (3o. y 4o.), resistieron un poco más, conservando movimiento con el cual intentan en vano separarse de la exuvia; al no conseguirlo y como consecuencia de movimientos bruscos y desesperados, así como por la fragilidad del exoesqueleto, el intergumento puede llegar a romperse.

Por otra parte, ante las concentraciones mayores, al mismo tiempo que se observa declinación en la capacidad motriz se pueden ver rupturas en las líneas de debilitamiento, tanto en la cápsula cefálica, como en el tórax, provocando una ecdisis parcial, la cual es causa de muerte para la larva. Otro efecto se manifiesta en las setas del nuevo organismo, ya que al carecer de la turgencia necesaria, no pueden mantenerse erectas, dando una apariencia peculiar. De manera semejante, es importante hacer notar que en larvas del 4o. ínstar se nota interrupción de la metamorfosis, ya -

que aún a los siete días posteriores a la aplicación del producto, no se había llevado a cabo la transformación en pupa, mientras que en el testigo, sucedió a los tres días siguientes.

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad en larvas de 1er. instar de Culex quinquefasciatus Say tratadas con Difluzenburón. Chapingo, Méx., 1985.

Dosificación (ppm)	Número de Organismos Tratados	Mortalidad %
0.00001	60	45
0.0001	60	25
0.001	60	55
0.01	60	100
0.1	60	100
1.0	60	100
10.0	60	100

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad en larvas de 2o. ínstar de Culex quinquefasciatus Say tratadas con Difluzenburón. Chapingo, Méx., 1985.

Dosificación (ppm)	Número de Organismos Tratados	Mortalidad %
0.00001	60	71
0.0001	60	36
0.001	60	61
0.01	60	96
0.1	60	100
1.0	60	100
10.0	60	100

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad en larvas de 3er. ínstar de Culex quinquefasciatus Say tratadas en Difluzenburón. Chapingo, Méx., 1985.

Dosificación (ppm)	Número de Organismos Tratados	Mortalidad %
0.00001	60	40
0.0001	60	31
0.001	60	45
0.01	60	86
0.1	60	96
1.0	60	90
10.0	60	100

Cuadro 9. Porcentaje de mortalidad en larvas de 4o. ínstar de Culex quinquefasciatus Say tratadas con Difluzenburón. Chapingo, Méx., 1985.

Dosificación (ppm)	Número de Organismos Tratados	Mortalidad %
0.00001	60	40
0.0001	60	35
0.001	60	21
0.01	60	61
0.1	60	71
1.0	60	86
10.0	60	66

4.3. Efecto larvicida.

Por lo que respecta a los efectos causados por el DFB en las larvas de mosquito, se observó que a medida que aumentaba la concentración, se incrementaba el porcentaje de mortalidad de las larvas (Cuadro 6), en tanto que para las de 2o. ínstar esta misma concentración provocó un 96% de mortalidad; (Cuadro 7); las concentraciones mayores a las mencionadas, siempre provocaron mortalidad total. Por otra par

te, las larvas de estadios posteriores mostraron una mayor - resistencia y así, en las de 3er. ínstar el 96% de mortali- dad se alcanzó con 0.1 ppm y el 100% se presentó hasta las 10 ppm (Cuadro 8), mientras que en el caso de las larvas de 4o. ínstar la máxima mortalidad observada se alcanza con una con centración de 1.0 ppm (86%), aunque la mortalidad total - - (100%) no se observó con ninguna de las concentraciones apli cadas (Cuadro 9).

La diferencia de mortalidad observada entre los - primeros y últimos estadios, puede deberse a que las larvas de los primeros, por ser más pequeñas, se afectan con dosis más bajas, ya que la respuesta es proporcional a la masa del organismo en prueba; de este modo los ínstaes 3o. y 4o. por tener una mayor masa, se afectan con dosis mayores.

Por otra parte, los resultados observados en lar- vas del 4o. ínstar se pueden atribuir a que disminuye su ca- pacidad de alimentación en esa etapa, esto es, no se alcanza la mortalidad al 100% porque la larva no se alimenta en la - misma proporción que en las etapas anteriores, de tal forma que al llegar a la etapa pupal y quedar sellado el tracto di gestivo, no se alimenta más, sino algún tiempo después de - emerger como adulto, dando como consecuencia una menor inges tión del producto aplicado.

Analizando los datos obtenidos se encontraron los valores de las CL_{50} y CL_{90} para cada uno de los cuatro ístares, los cuales se pueden observar en los Cuadros 10 y 11. De la misma forma, las gráficas obtenidas se muestran en la Figura 9, en la que se observan las líneas de respuesta do-sis-mortalidad para cada uno de los estadios tratados. Tam-bién se incluyen las ecuaciones que representan la relación entre dichas variables.

En los cuadros y gráficas presentados se puede observar que la toxicidad del DFB es parecida para el primero y segundo ístares, con valores de 0.0000012 y 0.0000002 ppm para la CL_{50} y 0.0001075 y 0.0001071 ppm en la CL_{90} , res-pectivamente, mientras que los ístares posteriores (3o. y -4o.) mostraron una menor susceptibilidad al producto ante -las mismas concentraciones.

Al considerar la pendiente de las líneas se obser-va una cierta heterogeneidad en la respuesta de las poblacio-nes correspondientes al tercero y cuarto ístar, con valores de 0.0000022, 0.000251 ppm para la CL_{50} y 0.0013647, - - - - 16.9645066 ppm para la CL_{90} , lo cual podría explicarse por -la respuesta típica de poblaciones ante insecticidas, en la cual es necesaria una mayor dosificación para obtener los re-sultados esperados en individuos de mayor edad.

Cuadro 10. CL_{50} del Período Larvario de Culex quinquefasciatus Say Tratado con Diflubenzurón. Chapingo, - -
Méx., 1985.

Instar	CL_{50} (ppm)
Primero	0.0000012
Segundo	0.0000002
Tercero	0.0000022
Cuarto	0.000251

Cuadro 11. CL_{90} del Período Larvario de Culex quinquefasciatus Say Tratado con Diflubenzurón. Chapingo, - -
Méx., 1985.

Instar	CL_{90} (ppm)
Primero	0.0001075
Segundo	0.0001071
Tercero	0.0013647
Cuarto	16.9645066

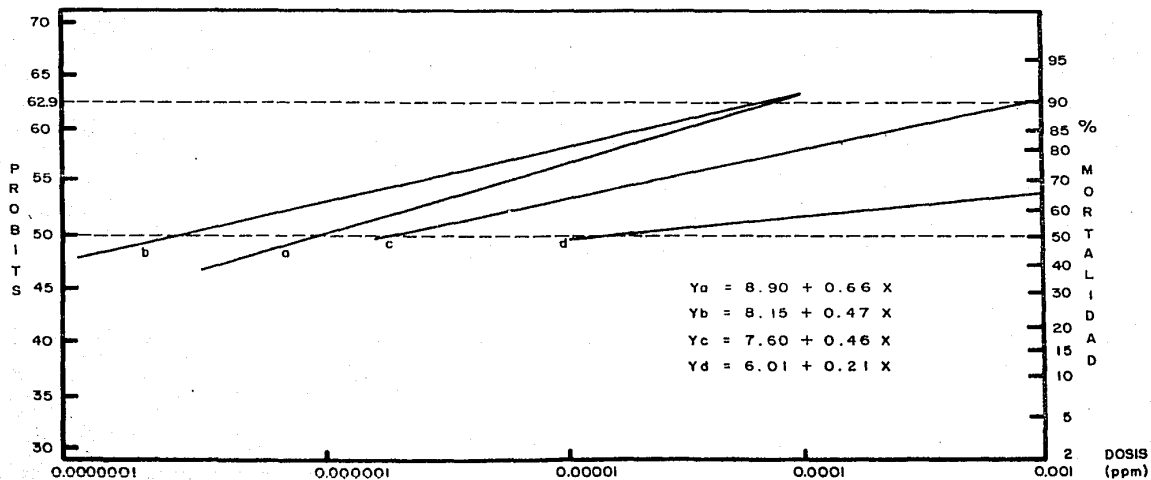


Fig. 9. Líneas de respuesta dosis - mortalidad para los diferentes instares larvarios de Culex quinquefasciatus Say tratados con DFB. Chapingo, Méx. 1985

En este caso, el 4o ínstar, fase previa a la pupa, mostró ser la etapa larvaria menos susceptible al inhibidor de la síntesis de quitina.

Los resultados obtenidos muestran que el 100% de mortalidad se alcanza en forma general ante una concentración mínima de 0.001 ppm, lo cual concuerda con otros trabajos anteriores (54); en todos los casos se observó un retraso en la muda, metamorfosis, o muerte, hasta los siete días después del tratamiento; resultados semejantes ya se habían reportado (7, 43); sin embargo, en forma comparativa, las CL_{90} para los diferentes estadios es baja.

Por otra parte, al comparar estos resultados con los obtenidos en 1978 (34), donde se indica que fue necesario aplicar 0.7, 0.2 y 0.003 ppm para obtener una CL_{95} para S. vittatum, se observa que estos valores son significativamente mayores que los encontrados para Culex; esto puede deberse a que los tiempos de exposición al producto fueron mucho menores (15 minutos, 60 minutos y 24 horas respectivamente); para inhibir la pupación fue necesario aplicar una concentración de 10 ppm durante 24 horas.

Es importante hacer notar el rango de concentraciones aplicadas capaces de causar mortalidad en otros organismos; en un trabajo citado anteriormente (8) se indica que --

H. irritans fue susceptible a concentraciones de 0.13 - 0.52 ppm, mientras que para M. domestica fueron necesarias de - - 6.2 - 12.5 ppm para lograr los mismos efectos (58). Más aún en el mismo trabajo se reporta que dosis de 10, 50, 100 y - 10 000 ppm no afectan a los huevecillos ni a las pupas de este díptero. La marcada diferencia entre concentraciones capaces de causar mortalidad se debe probablemente a la diferencia en el comportamiento alimenticio de estos organismos, ya que las moscas ingieren alimento a partir de material semisólido y se alimentan solamente en ciertos momentos del día, - por lo que es necesario que el producto se encuentre en altas concentraciones, para que el poco alimento ingerido contenga la dosis suficiente para causar el efecto letal.

Por el contrario, las dosis requeridas para Culex - son menores, ya que en las larvas, por ser acuáticas hay un - continuo paso de agua a través del tracto digestivo, proporcionando así el oxígeno y nutrientes necesarios; de esta forma, aún cuando la concentración del producto aplicado sea comparativamente baja, el insecto está en contacto directo con - él de manera constante.

Otro aspecto que es importante hacer notar es la rapidez de la inhibición causada por DFB; los resultados encontrados en el presente trabajo fueron resultado de observaciones tomadas siete días después del tratamiento, aún cuando la

mortalidad se presentó en algunos casos antes de ese período, lo cual no fue considerado; en trabajos anteriores se manifestó que en Pieris sp. el efecto se puede observar a los 15 minutos posteriores al tratamiento; de la misma forma, en langostas adultas se observaron los efectos en menos de 8 minutos (56). El registro de datos observados aún hasta los siete días posteriores al tratamiento se debió a que las respuestas variaban entre los diferentes estadios, ya que en los primeros el efecto fue más rápido que en los últimos y se presentó sobrevivencia hasta siete días después del tratamiento; - por otra parte, aunque el proceso de cambio de instar se lleva a cabo en un promedio de cuatro días, trabajos anteriores indican que se presenta también un retraso en la muda, por lo que se decidió observar durante tres días más; sin embargo, - en ningún caso se presentó muda tardía.

Por otra parte, la observación de los cambios de coloración y el movimiento de las larvas, confirma el planteamiento de que el DFB afecta la inserción muscular, por lo - - - - - cual se reduce la capacidad motriz; la apariencia globosa del tórax en las larvas afectadas confirma a su vez que la presión de la hemolinfa es tal, que al no haber la posibilidad de desalojar la exuvia, el organismo se fragmenta, causando así la muerte. Observaciones semejantes fueron reportadas - con P. brassicae, cuyas larvas mostraron síntomas de anomalidad, deteniendo su alimentación y adquiriendo una coloración

anormal en lugar de liberar la exuvia como lo hacen normalmente (56).

No debemos dejar de lado las observaciones reportadas sobre efectos del DFB en otros organismos que no presentan el proceso metabólico de la síntesis de quitina, como lo serían los vertebrados; en caso de una ingestión accidental - del mismo al incluir DFB en dietas de gallinas, ganado, ratas y otros organismos, se observó que los residuos que se mantuvieron como tales, no causaron ningún efecto en la descendencia ni fueron motivo de algún otro efecto secundario (24, 40, 56). De la misma forma, tomando en cuenta los posibles efectos causados por el DFB al aplicarse en cuerpos de agua de manera constante, se analizó el incremento del producto en el medio ambiente, en la llamada "bioacumulación ecológica", encontrando que en larvas de mosquito es donde se encuentra una mayor acumulación, no así en peces y caracoles, en contraste con los efectos del DDT, en los cuales sucede lo contrario - (24).

Lo anterior puede ser debido a que el DFB, por afectar específicamente el proceso de muda, se encontrará presente en el organismo durante mayor período de tiempo, en tanto que en otros organismos como los peces y caracoles, al no presentar dicho proceso, metabolizan el producto, utilizando sus componentes de una manera más conveniente.

Es así por todo lo anterior, que se considera que -
el DFB puede representar una opción efectiva en el control po
blacional de los mosquitos.

5. CONCLUSIONES

1. El desarrollo larvario de Culex quinquefasciatus Say en condiciones de laboratorio, tuvo una duración de 18 - - días, con un promedio de 250 huevecillos por oviposición.
2. La aplicación de DFB disuelto en el agua, causa diversos efectos en el desarrollo larvario, desde incapacidad de movimiento mandibular, con lo cual disminuye la capacidad de alimentación y pérdida de movimientos característicos, hasta la inmovilidad total, incremento en el tamaño del tórax, aparición de una coloración obscura distribuida irregularmente en todo el cuerpo, incapacidad de muda, fragmentación del integumento y muerte.
3. La CL_{50} para los instares 1o., 2o., 3o. y 4o. fue - - - 0.0000012, 0.0000002, 0.0000022 y 0.0000251 ppm, respectivamente.
4. La CL_{90} para los instares 1o., 2o., 3o. y 4o. fue - - - 0.0000012, 0.0001071, 0.0013647 y 16.9645066 ppm, respectivamente.

5. Las dosificaciones indicaron que el DFB es activo a concentraciones relativamente bajas, si se comparan con - las obtenidas para otros dípteros sometidos a tratamientos semejantes.
6. La respuesta de la población de C. quinquefasciatus Say se ajustó al patrón característico que se presenta con la aplicación de insecticidas convencionales, en donde se observa una relación directa entre la dosis y el porcentaje de mortalidad.
7. Los efectos morfogénicos en las larvas debido a la in-gestión del tóxico, fueron evidentes justamente al mo-mento de la ecdisis.
8. La aplicación del producto, causó inhibición en la metamorfosis durante los 7 días que duró el tratamiento.
9. El cuarto ínstar fue la etapa larvaria menos susceptible al producto aplicado.
10. Las concentraciones mayores causaron ruptura en las lí-neas de debilitamiento, tanto en la cápsula cefálica como en el tórax, provocando una ecdisis parcial, lo cual fue causa de muerte para la larva.

6. SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.

Es conveniente continuar investigando las potencialidades de este producto, sobre todo por las bondades que a primera vista parece presentar, más aún considerando las concentraciones tan bajas que logran efectos satisfactorios.

Los presente resultados deben tomarse como preliminares de una investigación más profunda que convendría continuar con el mismo producto y la misma especie; se recomienda utilizar concentraciones intermedias en el rango que produjo 0 y 100% de mortalidad para cada ínstar y de esa manera cerrar el rango de efectividad, así como realizar análisis histológicos del integumento.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abbot, E.S. 1975. A Method of computing the effective nnes of an insecticide. J. Econ. Ent. 18:265-267.
2. Ables, J.R., R.P. West and M. Shepard. 1975. Rspnse of the house fly and its parasitoides to DIMILIN (TH 6040). J. Econ. Ent. 68:622-24.
3. Ali, A. and M.S. Mulla. 1976. Chemical control of nuisance midges in the Santa Ana river basin, Southern California. J. Econ. Ent. 70: 191-95.
4. Ali, A. and M.S. Mulla. 1977. The IGR diflubenzurón - and organophosphorus insecticides against nuisance - midges in man-made residential recreational lakes. J. Econ. Ent. 70: 571-77.
5. Apperson, C.S., C.H. Schaefer, A.E. Colwell, G.H. Werner N.L. Anderson, E.F. Dupras, Jr. and D.R. Longanecker. 1978. Effects of Diflubenzuron on Chaoborus astictopus and non target organisms and persistence of Diflu benzuron in lentic habitats. J. Econ. Ent. 71: 521-27.
6. Arshad A. and J. Lord. 1980. Experimental insect growth regulators against some nuisance chironomid midges of central Florida. J. Econ. Ent. 73: 243-49.
7. Axtell, R.C., D.A. Rutz and T.D. Edwards. 1980. Field tests of insecticides and growth regulators for the control of Culex quinquefasciatus in anaerobic animal waste lagoons. Mosquito News 40 (1): 36-42.
8. Barker, R.W. and R.L. Jones. 1976. Inhibition of larval horn fly development in the manure of bovines fed -- Dimilin mineral blocks. J. Econ. Ent. 69: 441-43.
9. Barnes, R.D. 1978. Zoología de los invertebrados. Edit. Interamericana, México. 826 p.

10. Barth, A. 1981. Residues of dimilin, an insecticide inhibiting the molting of insect larvae in forest - soils studied by a new biotest method. Anz - - - aschaedlingskd pflanzenschutz Umweltschutz. 54(11): 164-69.
11. Chang, S.C. 1979. Laboratory evaluation of diflubenzuron, penfluron and Bay Sir 8614 as female sterilants against the house fly. J. Econ. Ent. 72: 479-81.
12. Chang, S. C. and A.B. Borkovec. 1980. Effects of diflubenzuron and penfluron on viability of house fly - - eggs. J. Econ. Ent. 73: 285-87.
13. Chapman, R.F. 1975. The insects. Structure and function. The English Universities Press Ltd. London. 819 p.
14. Clarke, L., G.H.R. Temple and J.F.V. Vicent. 1977. - The effects of a chitin inhibitor, DIMILIN, on the production of peritrophic membrane in the locust, - - Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 23: 241-46.
15. Colvard, J. J. 1978. El comportamiento alimentario de los mosquitos. En: Investigación y Ciencia No. 23. Barcelona España, p. 86-93.
16. Cook, C. W. and R.R. Gerhardt. 1977. Selective mortality of insects in manure from cattle fed racion and dimilin. Environ. Ent. 6: 589-90.
17. Echeverría, A.E. 1983. Toxicidad de varios insecticidas contra el mosquito Culex sp. (Diptera: Culicidae) de la presa Endho de Tula, Edo. de Hidalgo. Tesis Profesional, UACH. Chapingo, México.
18. Georghiou, G.P., V. Ariaratnam, M.E. Pasternak and C.S. Lin. 1975. Organophosphorus multiresistance in Culex pipiens quinquefasciatus in California. J. Econ. Ent. 68: 461-67.
19. Grosscurt, A.D. 1978. Effects of Diflubenzuron on - - - mechanical penetrability chitin formation and - - - structure of the elytra of Leptinotarsa decemlineata. J. Insect Physiol. 24: 827-31.

20. Grosscurt, A. D. 1980. Larvicidal and ovicidal - - - resistance to dfb in house fly (Musca domestica). - Biol. Med. Sci. 83 (2): 127-42.
21. Grosscurt, A.C. and J. Tipker. 1980. Ovicidal and larvicidal structure activity relationship of benzofenilureas on the house fly (Musca domestica). Pest. - - Bio. and Phy. 13: 249-54.
22. Hajjar, N. P. 1979. Diflubenzuron inhibits chitin - - synthesis in Culex pipiens L. larvae. Mosquito News 39: 381-84.
23. Hajjar, N.P. and J.E. Casida. 1979. Structure-activity relationships of benzoylphenyl ureas as toxicants and chitin synthesis in Oncopeltus fasciatus. Pestic. - Biochem. Physic. 11: 33-45.
24. Hammock, E.D. and G.B. Quistad. 1981. Metabolism and - mode of action of juvenile hormone, juvenoids and - - other insect growth regulations. In: Progress in - - pesticide biochemistry. Hutson and Roberts. Great - Britain. p. 1-83.
25. Hoskins, W.M. 1960. Use to the dosage mortality curve - in cantitative estimation of insecticide resistance. - Mis Publ. Ent. Soc. Amer. 2: 83-91.
26. Hunter, E. and Vicent, J.F.V. 1974. The effects of a - novel insecticide on insect cuticle. Experientia 30: 1432-33.
27. Infante, G.S. y Calderón, A.L. del C. 1980. Manual de Análisis Probit. Centro de Estadística y Cálculo. - CP. Chapingo, México, p. 107.
28. Ishaaya, I. and Casida J.E. 1974. Dietary TH 6040 - - alters composition and enzyme activity of house fly larval cuticle. Pestic. Biochem. Physiol. 4: 484-90.
29. Jordan, A.M. and M.A. Trewern. 1978. Larvicidal - - - - activity of diflubenzuron in the tse tse fly. Nature 272: 719-20.

30. Julin, A.M. and H.O. Sanders. 1978. Toxicity of the - IGR diflubenzuron to freshwater invertebrates and - fishes. Mosquito News 38: 256-59.
31. Kennet, G.V.S. 1973. Insects and other artropods of - medical importance. Ed. Kenet, London. 561 p.
32. Kubena, L.F. 1982. The influence of DFB in several re - productive characteristics in male and female layer- - bread chickens. Poult Sci. 61(2): 268-71.
33. Kunz, S.E., R.L. Harris, B.F., Hoganand, J.E., Wright. 1977. Inhibition of development in a field popula- - tion of horn flies treated with diflubenzuron. J. - Econ. Ent. 70: 298-300.
34. Lacey, L.A. and Mulla. 1978. Biological activity of - diflubenzuron and three new IGRs against Simulium vi- - ttatum. Mosquito News 38(3): 377-81.
35. Llanderal, C.C. y J. Cibrián T. 1983. Prácticas de fi- - siología de insectos. Centro de Entomología y Acaro- - logía, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 119 p.
36. Matheson, R. 1929. A handbook of the mosquitos of Nor- - thamerica. Charles C. Thomas Publishier. Illinois, USA. p. 268.
37. Mc Kague, A.B., R.B. Pridmore and P.M. Wood. 1978. Effects of altosid and dimilin on black flies (Dipte- - ra: Simullidae): laboratory and field tests. Can. - Ent. 110: 1103-1110.
38. Meola, S.M. and R.T. Mayer. 1980. Inhibition of cellu- - lar proliferation of imaginal epidermal cells by di- - flubenzuron in pupae of the stable fly. Science. -- 207: 985-87.
39. Miller, R.W., C. Corley and K.P. Hill. 1975. Feeding TH 6040 to chickens effect on larval house flies in ma- - nure and determination of residues in eggs. J. Econ. Ent. 68: 181-82.

40. Miller, R.W., C. Corley and S.R. Schufett. 1976. Effects of feeding TH 6040 to two breeds of chickens. J. Econ Ent. 69: 741-43
41. Mitlin, N., Wiygul, G., and Haynes, J.W. 1977. Inhibition of DNA synthesis in boll weevils (Anthonomus grandis Boheman) sterilized by dimilin. Pestic. Biochem. Physiol. 7: 559-563.
42. Mulla, M.S., H.A. Darwazeh and R.L. Norland. 1974. Insect growth regulators: Evaluation procedures and activity against mosquitoes. J. Econ. Ent. 67: 329-32.
43. Mulla, M.S. and H.A. Darwazeh. 1975. Activity and longevity of insect growth regulators against mosquitoes. J. Econ. Ent. 68: 791-94.
44. Mulla, M.S. and H.A. Darwazeh. 1976. The IGR dimilin - and its formulations against mosquitoes. J. Econ. Ent. 69: 309-12.
45. Nebeker, A.V., P. Mc Kinney and M.A. Cairns. 1983. - - Acute and chronic effects of diflubenzuron (dimilin) on freshwater fish and invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 2: 329-36.
46. Neville, A.D. 1975. Biology of the arthropod cuticle. Zoophysiology and ecology. Vol. 4/5. Springer-Verlag. Berlin, p. 447.
47. Pacheco, C.J.J. 1983. Búsqueda de sustancias tóxicas - en plantas medicinales contra larvas de mosquito case ro Culex quinquefasciatus Say (Díptera: Culicidae). Tesis Profesional, UACh. Chapingo, México, 63. p.
48. Pickens, L.G. and De Milo. 1977. Face fly: Inhibition of hatch by diflubenzuron and relates analogues. J. Econ. Ent. 70: 595-97.
49. Post, L.C., B.J. de Jong and W.R. Vicent. 1974. 1-(2,6-disubstitued benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibitors of chitin synthesis. Pestic. Biochem. Physiol. 4: 473-83.

50. Rodrigues, C.S. and R.E. Wright. 1978. Evaluation of the insect growth regulators methoprene and diflubenzuron against floodwater mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Southwestern Ontario. Can. Ent. 110: 319-24.
51. Salama, H.S. Motagally, Z.A., and Skatulla, U. 1976. On the mode of action of dimilin as a moulting inhibitor in some lepidopterous insects. Z. Ang. Ent. 80: 396-407.
52. Santiago-Alvarez, C. et. M.J. Sarasua. 1983. Reponse de Ceratitidis capitata web. (Diptera: Trypetidae) au diflubenzuron. A.A. Belkema, Rotterdam (Netherlands). p. 219-25.
53. Schaefer, C.H. Wilder and F.S. Mulligan III. 1975. A practical evaluation of TH 6040 as a mosquito control agent in California. J. Econ. Ent. 68: 183-85.
54. Self, L.S., M.J. Nelson, C.P. Pant and S. Usman. 1978. Field trials with two insect growth regulators - - - against Culex quinquefasciatus. Mosquito News 38: 77-79.
55. Shepard, H.H. 1951. The Chemistry and action of insecticides. Mac Graw Hill Book Co, New York. p. 413--38.
56. Verloop, A. and Ferrell, C.D. 1977. Benzoylureas-A new group of larvicides interfering with chitin deposition in pesticide chemistry in the 20th century. Ed. Plimer J. R. ACS Symposium Series. Washington, D.C. p. 237-70.
57. Wigglesworth, V.B. 1978. Fisiología de los insectos. Ed. Acribia, España. 115. p.
58. Wright, J.E. 1974. Insect growth regulators: Laboratory and field evaluations of Thompson-Hayward T-H-6040 -- against the house fly and the stable fly. J. Econ. -- Ent. 67: 746-47.

59. Wright, J.E. 1975. Insect growth regulators: Development of the house flies in feces of bovines fed TH - 6040 in mineral blocks and reduction in field populations by surface treatment with TH 6040 or a mixture of stirofos and cichlorvos at larval breeding areas. J. Econ. Ent. 68: 322-24.
60. Wright, J.E. and G.E. Spates. 1976. Reproductive inhibitions activity of the insect growth regulator TH - 6040 against the stable fly and the house fly: Effects on hatchability. J. Econ. Ent. 69: 365-68.
61. Wright, J.E., G.E. Spates and S.E. Kinz. 1978. Diflubenuron: ovicidal activity against adult stable -- flies exposed to treated surfaces or to treated animals. So. West. Ent. 3: 5-13.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de las diferentes etapas del presente trabajo, contraí deudas de gratitud con numerosas personas a quienes deseo expresar aquí mi reconocimiento.

A mi Maestro, Don Efraín Hernández-Xolocotzi Guzmán, Profesor-Investigador del Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, director de este trabajo y a quien agradezco sinceramente la ayuda de muy distinta naturaleza que me brindó. Para él, mi mayor reconocimiento.

A los campesinos de nuestro país, de quienes obtuve conocimientos y facilidades para desempeñar mi labor de colecta de materiales regionales de "frijol de milpa".

Al Sr. Carlos Cruz Gómez, amable e infatigable colaborador en mis exploraciones de colecta por el Estado de Oaxaca.

Al Ing. Carlos Solano Solano, Director del Centro Regional Universitario Sur de la Universidad Autónoma Chapingo, por su apoyo para la realización de los recorridos de campo en el Estado de Oaxaca.

Al Dr. Josue Kohashi Shibata, Profesor-Investigador del Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados, por todas las facilidades recibidas para la realización de mi trabajo experimental.

A mis apreciados amigos, Enrique Martínez V. y J. Alfredo Andrade A., Ingenieros Agrónomos de quienes recibí enseñanzas y ayuda constante.

A Armando Cervantes S., colega y amigo, por su ayuda en el análisis estadístico de los resultados.

A mi amigo, el Biol. Alejandro Tecpa Jiménez y a la M. en C. Herminia Loza Tavera, por la minuciosa y responsable revisión que hicieron del manuscrito de este informe, así como por sus oportunas observaciones y sugerencias.