



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE FORMULACIÓN DE UN BIOINSECTICIDA**  
**CON BASE EN EL HONGO**

*Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL DE

*Meccus pallidipennis*

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. JIMÉNEZ SANTIAGO BERENICE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARGARITA CABRERA BRAVO**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

CD. MX.,

AGOSTO, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

OFICIO CPCB/758/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de abril de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **JIMÉNEZ SANTIAGO BERENICE** con número de cuenta **307273013**, con la tesis titulada "**DESARROLLO DE PROTOTIPOS DE FORMULACIÓN DE UN BIOINSECTICIDA CON BASE EN EL HONGO *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL DE *Meccus pallidipennis***", realizada bajo la dirección de la **DRA. CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA**:

Presidente: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR  
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR  
Secretario: DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN  
Suplente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO ALICIA REYES MONTES  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 20 de junio de 2019



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de otorgada CVU 822510

Al proyecto de CONACyT: Desarrollo de una formulación del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de insectos transmisores (triatóminos) de la enfermedad de Chagas, No de proyecto: 2015PN 1247

A mi tutora principal la Dra. Conchita Toriello

Por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su paciencia, sus enseñanzas y todo su gran apoyo

A los miembros del comité

Por todo su apoyo, sus valiosas aportaciones y sugerencias

Dra. Margarita Cabrera Bravo

Dra. María Graciela García Guzmán

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A los miembros de mi jurado, al Dr. Alejandro Córdoba Aguilar, a la Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor, a la Dra. María del Rocío Alicia Reyes Montes, a la Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro, por tomarse el tiempo de leer mi tesis y sus valiosos comentarios que ayudaron a mejorar considerablemente mi trabajo.

A la Dra. Karla Tatiana Murillo Alonso, por el asesoramiento en los experimentos realizados y el análisis de los resultados. Gracias por ayudarme a vislumbrar mis inquietudes, brindarme tu conocimiento y sobre todo tú sincera amistad.

A la M. en Ciencias Hortensia Navarro Barranco, Técnico Académico Titular "B" T.C. adscrita al laboratorio de Micología Básica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM; por tus enseñanzas en el manejo de hongos entomopatógenos. Gracias por todo tu cariño.

A la Q.F.B. Amelia Pérez Mejía, Técnica Académica Titular "B" T.C., adscrita al laboratorio de Micología Básica, por ayudarme a resolver los problemas que se me presentaron con el manejo del equipo de laboratorio. Gracias por tu linda amistad.

A los integrantes de la Unidad de Micología de la Facultad de Medicina Dra. Esperanza Duarte Escalante, Dra. Francisca Hernández Hernández, Dra. Edith Sánchez Paredes, Q.FB. Erika Córdoba Martínez por todo los consejos y el invaluable apoyo que me han brindado.

Al Biól. Mauro Vences Blanco, Técnico Académico Asociado "A" T.C., adscrito al laboratorio de Biología de Parásitos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM; por proporcionarme los triatóminos empleados en los bioensayos. Gracias por toda tu buena disposición.

A la Dra. en Ciencias Laura Flores Villegas, Técnica Académica Titular “A” T.C., adscrita al laboratorio de Biología de Parásitos, por ayudarme en cualquier duda existencial, a cuestionar mi trabajo de investigación y por todas las sugerencias en los experimentos. Gracias por tus palabras de apoyo.

Al Biól. Luis Ángel Jiménez Santiago por ayudarme con mis experimentos, con la revisión de la literatura citada y porque ante cualquier dificultad que se me presentaba podía recurrir a ti.

A las Técnicas del Laboratorio de Micología Básica Angélica Peña Becerril y Jazmín Ortega Méndez, por siempre facilitarme el material para la realización de mis experimentos.

A los administrativos del Posgrado en Ciencias Biológicas, por la facilidad otorgada en los trámites.

A mis queridos amigos los “muéganos” Anita, Angy, Isabelita, Diego e Isai quienes hicieron mi estancia el laboratorio un lugar placentero y lleno de alegría.

A amigas del alma Yael, Citla, Karen, Ivett, Xat, Cigla, Monse, Marianita, Aida, Karla, Liz confidentes que me han brindado su apoyo cuando más lo he necesitado. Gracias por esas risas y por esos buenos tiempos a su lado.

A mis queridos amig@s Biólog@s Gaby, Sebas, José, Marco, Monse, Flow, Toño, Vicente, Pepillo, por permitirme aprender más de la vida a su lado.

## DEDICATORIA

A Lidia, mi mami

Gracias por impulsarme a seguir siendo una mejor persona cada día y alentarme a perseguir mis sueños. Eres la mejor, todo te lo debo a ti.

A Luis, mi hermano

Por todo tu apoyo incondicional, por escucharme, por quererme y siempre estar ahí para mí.

A Omar, mi Polar

Agradezco a la vida por haber unido nuestros caminos, gracias por todo el cariño que demuestras día a día y todos los buenos momentos que hemos pasado.

De todo quedaron tres cosas:  
la certeza de que estaba siempre comenzando,  
la certeza de que había que seguir  
la certeza de que sería interrumpido antes de terminar.

Hacer de la interrupción un camino nuevo,  
hacer de la caída, un paso de danza,  
del miedo, una escalera,  
del sueño, un puente,  
de la búsqueda...un encuentro.

-Fernando Pessoa

De todo tres cosas

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABLAS</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
Insectos vectores de la enfermedad de Chagas	5
<i>Meccus pallidipennis</i>	7
Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana	8
Control de vectores de la enfermedad de Chagas	9
Control biológico	10
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>13</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
Regulación de plaguicidas microbiales	15
<i>Metarhizium anisopliae</i> como agente de control biológico	16
Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos vectores	17
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
Aislado fúngico de <i>Metarhizium anisopliae</i>	19
Obtención de ejemplares	19
Reactivación de la cepa fúngica	19
Producción de los conidios (principio activo)	20
Extracción del principio activo	21
Determinación de parámetros de calidad: concentración conidial, porcentaje humedad, viabilidad y pureza	22
Desarrollo de prototipos de formulación	25
Vida de anaquel y condiciones de almacenamiento	27
Termotolerancia de los prototipos de formulación	27
Radiación ultravioleta (UV-C)	28
Evaluación de la funcionalidad de los prototipos de formulación	29
Análisis estadístico	32
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
Determinación de parámetros de calidad: concentración conidial, porcentaje humedad, viabilidad y pureza	33
Vida de anaquel y condiciones de almacenamiento	35
Termotolerancia de los prototipos de formulación	36
Radiación ultravioleta (UV-C)	39
Evaluación de la funcionalidad de los prototipos de formulación	40
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>55</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo biológico del triatómimo <i>Meccus pallidipennis</i> (Cortesía del Lab. de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM)	5
2	Hembra y macho de <i>Meccus pallidipennis</i> (tomado de Flores-Villegas, 2011)	7
3	<i>Meccus pallidipennis</i> infectado con <i>Metarhizium anisopliae</i>	12
4	Proceso de reactivación la cepa 473/4 de <i>M. anisopliae</i> A: tren de lavado. B: infección del hongo en el pronoto del triatomino C: ninfa de <i>Meccus pallidipennis</i> infectado con <i>M. anisopliae</i> . D: hongo cultivado en tubos con APD	20
5	Producción masiva de conidios de <i>M. anisopliae</i> . A-E. preparación del sustrato. A: el arroz se lavó. B: se dejó escurriendo C: se depositaron 300 g del sustrato en una bolsa de polipapel. D: el sustrato se esterilizó en autoclave. E: las bolsas se dejaron enfriar 24 h. F: las bolsas se inocularon con 5 ml de una suspensión de conidios ( $1 \times 10^8$ conidios/ml).	21
6	Proceso de extracción de conidios (ingrediente activo). A: bolsas con sustrato inoculado durante 25 días. B: bolsas abiertas en el deshumidificador ambiental. C-D: cosecha de conidios. E: cosechador. F: conidios extraídos en cajas Petri. G: deshumidificación de conidios extraídos	22
7	Homogeneización de sustrato inoculado con <i>M. anisopliae</i>	23
8	Conidio germinado después de 24 h	24
9	Proceso de elaboración de prototipos de formulación. A: conidios deshumidificados. B: vehículos de formulación. C: adyuvantes D: mezcla de componentes de formulación. E: bolsas metalizadas. F: bolsa sellada al calor.	27
10	Conidios formulados y sin formular expuestos a radiación UV-C	29
11	Bioensayos del hongo en el triatómimo. A: tren de lavado. B: transferencia de ninfas de <i>M. pallidipennis</i> a cajas Petri. C: insectos expuestos a conidios formulados en el papel filtro. D: registro de la mortalidad de las ninfas.	32
12	Porcentaje de germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> no formulados (C) y los conidios contenidos en los diez diferentes prototipos de formulación almacenados a 28°C durante 24 y 72 h. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix: vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya. Las letras encima de las columnas indican las significancias (prueba de Tukey, $P < 0.05$ ).	37
13	Porcentaje de germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> no formulados (C) y los conidios contenidos en los diez diferentes prototipos de formulación almacenados a 37°C durante 24 y 72 h. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix: vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya. Las letras encima de las columnas indican las significancias (prueba de Tukey, $P < 0.05$ ).	38

14	Porcentaje de germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> no formulados (C) y los conidios contenidos en los diez diferentes prototipos de formulación almacenados a 45°C durante 24 y 72 h. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix: vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya. Letras distintas encima de las columnas indican significancias (prueba de Tukey, P < 0.05).	38
15	Porcentaje de germinación de conidios de <i>M. anisopliae</i> no formulados (C) y los conidios contenidos en los diferentes prototipos de formulación (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) después de 0, 3 y 6 h de exposición a UV-C. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc. Las letras distintas encima de las columnas indican las diferencias significativas (prueba de Tukey, P < 0.05).	39
16	Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con <i>M. anisopliae</i> , en conidios no formulados y formulados (C+Ca; C+TD4) durante 1 y 10 minutos. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín.	41
17	Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con <i>M. anisopliae</i> en formulaciones a diferentes dosis (A = 1 x 10 <sup>6</sup> conidios/cm <sup>2</sup> ; B = 2 x 10 <sup>6</sup> conidios/cm <sup>2</sup> ). C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín	42
18	Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con conidios no formulados y formulados (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) de <i>M. anisopliae</i> durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con agar-agua (1%). C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc	43
19	Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con conidios no formulados y formulados de <i>M. anisopliae</i> (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con papel filtro estéril. C: conidios; TD: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.	43
20	Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de <i>Meccus pallidipennis</i> infectadas con conidios no formulados y formulados de <i>M. anisopliae</i> (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con papel filtro previamente humedecido con 200 µl de agua estéril. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.	44
21	Curva de porcentaje de sobrevivencia del estadio ninfal 3 de <i>M. pallidipennis</i> infectados con conidios no formulados (C) y formulados (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) de <i>M. anisopliae</i> (EH-473/4) expuestos durante durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con papel filtro previamente humedecido con 200 µl de agua estéril. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.	47

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Listado de prototipos de formulación de <i>M. anisopliae</i>	26
2	Prototipos de formulación de <i>M. anisopliae</i>	28
3	Prototipos de formulación de <i>M. anisopliae</i> expuestos a radiación UV-C	28
4	Bioensayos de triatóminos por tiempos de exposición	30
5	Bioensayos de infección de triatóminos por 2 concentraciones del hongo	30
6	Bioensayos de infección de triatóminos con 1 concentración fúngica durante 5 min	31
7	Parámetros de calidad de conidios de <i>M. anisopliae</i>	34
8	Parámetros de viabilidad y pureza de prototipos de formulación de <i>M. anisopliae</i>	34
9	Porcentaje de germinación (viabilidad) de conidios formulados y sin formular de <i>M. anisopliae</i> almacenados a diferentes temperaturas	35
10	Mortalidad acumulada de ninfas en estadio N3 de <i>M. pallidipennis</i> expuestas a vehículos (TD4: tierra de diatomeas y Ca: Caolín), conidios sin formular (C) de <i>M. anisopliae</i> (EH-473/4) y conidios formulados	46

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas sigue siendo un grave problema de salud en América Latina donde el modo de transmisión más común al ser humano es por el contacto con las heces de un triatómino infectado (insecto vector). En México, el triatómino con predominio peridomiciliar endémico del país *Meccus pallidipennis*, es considerado uno de los principales responsables de la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad. Actualmente, la estrategia más utilizada para el control de los transmisores se basa en la aplicación de insecticidas químicos de tipo piretroides. Sin embargo, su uso provoca efectos adversos en el humano, en el ambiente y en la resistencia de los triatóminos. Una alternativa es el uso de hongos entomopatógenos. Especialmente, *Metarhizium anisopliae* ha demostrado tener una alta virulencia y afectar la sobrevivencia de huevos, ninfas y adultos de *M. pallidipennis*. Para su empleo en campo es necesario el desarrollo de una formulación que mantenga estable al propágulo fúngico, que sea efectivo y fácil de aplicar. El propósito de esta investigación fue diseñar, elaborar y evaluar una formulación que contenga como principio activo conidios de *M. anisopliae* cepa EH-473/4 para el control biológico de *M. pallidipennis*. Se realizó la producción masiva y la obtención del principio activo, y se determinaron distintos parámetros asociados con su calidad (concentración de conidios, porcentaje de viabilidad, porcentaje de pureza). Se desarrollaron distintas formulaciones en polvo de contacto, empleando como vehículo inerte caolín (Ca) y las tierras de diatomeas Celite 400 (TD4) y Celite 281 (TD2) y como adyuvantes vitamina E (Vit.E), óxido de zinc (ZnO) y lecitina de soya. Se determinaron los parámetros de calidad (viabilidad y pureza) del producto formulado. Se evaluó la vida de anaquel de los conidios sin formular (C) y de los conidios formulados almacenados a -20, 4 y 28°C durante 12 semanas. Se evaluó la termotolerancia de conidios sin formular (C) y las mejores formulaciones a 28, 37 y 45°C durante 24 y 72 h. Las mejores formulaciones resultantes y los conidios sin formular también fueron expuestos a radiación ultravioleta (UV-C) durante 0, 3 y 6 h. Se evaluó la efectividad biológica (virulencia) de los prototipos de formulación mediante bioensayos en condiciones de laboratorio empleando ninfas del tercer estadio de *M. pallidipennis*. Los insectos se infectaron con el hongo, empleando conidios sin formular (C) y los mejores formulados con diversos reactivos a una concentración promedio de  $1.5 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup>. Se registró la mortalidad diariamente para determinar el Tiempo de Sobrevivencia Media (TSM), mediante el análisis estadístico de Log-rank. Se obtuvo una concentración de  $4.64 \times 10^9$  conidios/g de arroz, se logró reducir la humedad de los conidios al 7.3% y se obtuvo una concentración de  $2.63 \times 10^{10}$  conidios deshumidificados /100 mg de polvo de conidios con una viabilidad de 94% y pureza de 98%. Se encontró que las formulaciones C+Ca y C+TD4 almacenadas a -20 y 4°C mantuvieron una alta viabilidad, > 84% en

comparación a las mantenidas a 28°C. Los experimentos de termotolerancia mostraron que conidios sin formular y los conidios formulados almacenados a 28°C durante 24 y 72 h mantuvieron una viabilidad > 93 y > 90%, respectivamente. Cuando se expusieron a 37°C durante 24 h las mejores formulaciones C+Ca, C+Ca+Vit.E, C+Ca+ZnO presentaron una viabilidad > 83% y los conidios sin formular 58%; a las 72 h las formulaciones antes mencionadas presentaron una viabilidad > 74% y los conidios sin formular de > 39%. A 45°C las formulaciones arriba mencionadas presentaron una viabilidad de 47% y los conidios sin formular de 25.33%, a las 72 h los conidios formulados presentaron una viabilidad > 14% mientras que los conidios sin formular de > 5.33%. La exposición a UV-C mostró que los conidios sin formular y las formulaciones presentaron una viabilidad > 93% al tiempo 0. Después de 3 h los conidios no formulados mantuvieron una viabilidad de 75.66%, las formulaciones C + TD4 + Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca, C+Ca+Vit.E y C+Ca+ZnO presentaron una viabilidad > 89%. Al ser expuestos por 6 h a UV-C los conidios sin formular presentaron germinaciones de 67% y las formulaciones C+Ca+Vit.E y C+Ca+ZnO viabilidades de > 87%. En la efectividad biológica, se observó que los conidios sin formular y los formulados de *M. anisopliae* ocasionaron una mortalidad en las N3 de *M. pallidipennis* superior al 93% al día 10 y se obtuvo un TSM de 3 días para los conidios sin formular (C) y para las formulaciones C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E. El TSM fue de 4 días para las formulaciones C+TD4+ZnO y C+Ca+ZnO, sin ninguna diferencia entre ellos (conidios sin formular y formulaciones). Se desarrolló una formulación eficiente con el hongo probado. Esta formulación mostró alta virulencia y aumentó las tasas de mortalidad del insecto.

## ABSTRACT

Chagas disease is a serious health problem in Latin America, where the most common mode of transmission to humans is through contact with the feces of an infected triatomine (vector insect). In Mexico, *Meccus pallidipennis* is an endemic triatomine with peridomiciliar predominance in the country, and is considered one of the main transmission agents of *Trypanosoma cruzi*, causal agent of this parasitic disease. Currently, the most used strategy in the control of transmitters is based on the application of pyrethroid-type chemical insecticides. However, they have adverse effects on humans, the environment, and trigger resistance of triatomines. An alternative is the use of entomopathogenic fungi. Particularly, *Metarhizium anisopliae* is a high virulence fungus that affects the survival of eggs, nymphs and adults of *M. pallidipennis*. However, the use of this fungi in field conditions requires the development of a formulation able to maintain the stability of the fungal propagule during storage, effective and easy to apply. The aim of this study was to design, develop and assess a formulation containing as active principle conidia of *M. anisopliae* EH-473/4 for the biological control of *M. pallidipennis*. Mass production and the obtaining of the active principle were carried out, and the different parameters associated to its quality were determined (concentration of conidia, percentage of viability and of purity). Different contact powder formulations were developed using as an inert carrier kaolin (Ca) and the diatomaceous earth Celite 400 (TD4) and Celite 281 (TD2) and as adjuvants vitamin E (Vit.E), zinc oxide (ZnO) and soy lecithin. The quality parameters (viability and purity) of the formulated product were determined. The shelf life was evaluated of the unformulated conidia (C) and the formulated conidia stored at -20, 4 and 28°C for 12 weeks. The thermotolerance was evaluated of conidia without formulating (C) and the best formulations at 28, 37°C and 45°C for 24 and 72 h. The best resulting formulations and the unformulated conidia were also exposed to ultraviolet (UV-C) radiation for 0, 3 and 6 hours. The functionality of the formulation prototypes was evaluated by bioassays under laboratory conditions using nymphs from the third stage of *M. pallidipennis*. The insects were infected with the fungus, using conidia without formulating (C) and the best formulated with various reagents at an average concentration of  $1.5 \times 10^6$  conidia / cm<sup>2</sup>. The mortality was recorded daily to determine the Mean Survival Time (STM), through the statistical analysis of Log-rank. A concentration of  $4.64 \times 10^9$  conidia/g of rice was obtained, it was possible to reduce the humidity of the conidia to 7.3% and a concentration of  $2.63 \times 10^{10}$  dehydrated conidia /100 mg with a viability of 94% and purity of 98% was obtained. It was found that the formulations C+Ca and C+TD4 stored at -20 and 4°C maintained a high viability > 84% compared to those maintained at 28°C. The thermo tolerance experiments showed that unformulated and formulated conidia stored at 28°C for 24 and 72 h maintained a viability of > 93 and > 90%, respectively. When

the best formulations, C+Ca, C+Ca+Vit.E, C + Ca + ZnO were exposed at 37°C for 24 h, they showed a viability of > 83% and the conidia without formulating of 58%; at 72 h the afore mentioned formulations showed a viability > 74% and the unformulated conidia of > 39%. At 45°C, the formulations mentioned above had a viability of 47% and the unformulated conidia of 25.33%, at 72 h the formulated conidia showed a viability of > 14% while the unformulated conidia of > 5.33%. The exposition to UV-C showed that the formulations and the unformulated conidia presented a viability > 93% at time 0. After 3 h the unformulated conidia maintained a viability of 75.66%, the formulations C+TD4+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca, C+Ca+Vit.E and C+Ca+ZnO showed a viability > 89%. When exposed for 6 h, the unformulated conidia presented a viability of 67% and the formulations C+Ca+Vit.E and C+Ca+ZnO viabilities of > 87%. Concerning the biological efficiency, unformulated and formulated conidia of *M. anisopliae* produced a mortality > 93% on day 10 and a STM of 3 days for unformulated conidia (C) and for formulations C + Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E. A TSM of 4 days was obtained for C+TD4+ZnO and C+Ca+ZnO, without any difference between formulations and unformulated conidia. An efficient formulation of the fungus with a high insect mortality and good virulence was developed.

## INTRODUCCIÓN

### Insectos vectores de la enfermedad de Chagas

En el mundo, se han identificado más de 140 especies de insectos vectores del parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas que pertenecen al orden Hemiptera, suborden Heteroptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (Schofield y Galvão 2009; Bargues *et al.*, 2010).

Los triatóminos son insectos hemimetábolos cuyo ciclo de vida inicia con el huevo, seguido de cinco estados ninfales antes de pasar a la fase adulta, éstos se diferencian de las ninfas por la presencia de alas y genitales externos bien desarrollados (Fig. 1). Las hembras ponen sus huevos sobre diferentes sustratos; cuando la chinche emerge del huevo, se dedica a buscar fuentes de alimento. Estos insectos son de hábitos principalmente nocturnos; suelen encontrarse en sus refugios durante el día y salir a buscar alimento por la noche. Cuando encuentran a su fuente de alimento ya sean humanos o animales domésticos y silvestres, despliegan su probóscide y la clavan en la piel comenzado a succionar sangre. Durante o después de la alimentación, el triatómino defeca y la forma infectiva del parásito se libera en las heces del vector. Debido a la reacción urticante causada por la picadura, lleva al hospedero a rascarse y así introducir al parásito. También el parásito puede penetrar a través de la mucosa de los ojos, la nariz o la boca, eventualmente llegando al torrente sanguíneo (Jurberg y Galvão, 2006).



**Figura 1.** Ciclo biológico del triatómino *Meccus pallidipennis* (Cortesía del Lab. de Biología de Parásitos, Facultad de Medicina UNAM)

Los vectores de mayor importancia epidemiológica en el continente americano son: *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú; *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica; *T. dimidiata* en Ecuador y Centroamérica; y *R. pallescens* en Panamá (PAHO, 2019).

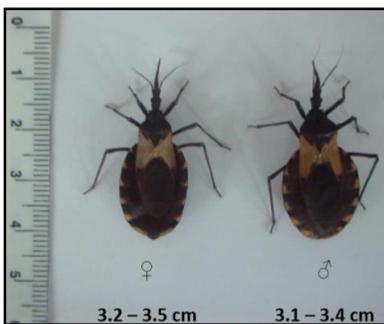
En México, los triatóminos comúnmente son conocidos como chinches besuconas, chinches hociconas, chinches picudas, chinches piedra, chinches voladoras (García-Ramírez, 2016). Actualmente, se han reportado más de 32 especies de triatóminos con capacidad vectorial, siendo uno de los países con mayor número de especies. Sin embargo, son consideradas de importancia epidemiológica 13 especies, debido a que se encuentran asociadas a las viviendas, destacando los géneros *Meccus* y *Triatoma* como los de mayor importancia epidemiológica. Además, los géneros *Dipetalogaster*, *Meccus* y ocho especies del género *Triatoma* son endémicos del país (Salazar-Schettino *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2011).

Los triatóminos de acuerdo a sus hábitos y a su asociación con asentamientos humanos se pueden clasificar en intradomiciliados, peridomiciliados y silvestres. Los insectos de hábitos intradomiciliarios son aquellos que han logrado colonizar viviendas rurales y/o suburbanas, se encuentran en grietas en las paredes, pisos y techos de las casas; espacios entre los muebles; agujeros entre las palmas de los techos; alimentándose de las personas y los animales domésticos que las habitan (Paredes *et al.*, 2015; García-Ramírez, 2016). Entre las especies intradomiciliadas en el país se encuentran *Triatoma barberi* y *Triatoma dimidiata* (Salazar *et al.*, 2010). Por otra parte, los triatóminos con hábitos peridomiciliarios se encuentran en los alrededores de la vivienda en corrales, establos, gallineros, nidos y madrigueras, alimentándose de animales domésticos, de corral y pueden también tener contacto con el humano (Benítez-Alva *et al.*, 2012; Paredes *et al.*, 2015). Las especies más frecuentes del peridomicilio son: *Meccus longipennis*, *M. mazzottii*, *M. pallidipennis*, *M. phyllosomus*, *M. picturatus*, *Triatoma gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *Dipetalogaster maxima*, *Panstrongylus rufotuberculatus* y *Rhodnius prolixus* (Salazar *et al.*, 2010).

## ***Meccus pallidipennis***

En el país, uno de los vectores con predominio peridoméstico más importantes de la enfermedad de Chagas es *Meccus pallidipennis*, debido a su contacto frecuente con el hombre como fuente de alimento y al alto índice de infección con *T. cruzi* (Martínez-Ibarra *et al.*, 2012; Benítez-Alva *et al.*, 2012) Además, este triatómino tiene una amplia distribución, ya que se ha reportado en trece estados del país (Colima, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas) (Martínez-Ibarra *et al.*, 2012; Salazar-Schettino *et al.*, 2010). Se ha encontrado a una altura de 200 a 1580 m sobre el nivel del mar (Carcavallo *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 2000). Este triatómino es el único que ha sido observado desplazándose en el día en tecorales (bardas de piedra), entre pilas de leña, cúmulos de piedra o ladrillos y huecos en las paredes; también se ha reportado que este insecto no es atraído por la luz artificial (Salazar-Schettino *et al.*, 2005).

Las hembras de esta especie endémica miden entre 32 a 35 mm de largo y entre 13 a 16 mm de ancho del abdomen, reconocidas por presentar el ápice abdominal truncado, los machos miden entre 30 a 34 mm de largo y entre 11 a 13 mm de ancho del abdomen con ápice en forma redondeada (Figura 1). Su cabeza es de color negro pequeña, generalmente cilíndrica y poseen ojos compuestos. Presentan un color que va del café oscuro al negro, conexivo color oscuro con marcas características de color anaranjadas; poseen alas angostas, que no cubren la totalidad del conexivo; el corium del hemiélitro es de color blanco-amarillento (Figura 2) (Lent, 1979; Flores-Villegas, 2011)



**Figura 2.** Hembra y macho de *Meccus pallidipennis* (tomado de Flores-Villegas, 2011)

## **Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana**

La enfermedad de Chagas debe su nombre al médico brasileño Carlos Justiniano Ribeiro Das Chagas (1879-1934), quien la descubrió en 1909 mientras investigaba reportes de un extraño mal que causaba fiebre, falta de apetito, dolor de articulaciones e hinchazón en los párpados. La gran proeza de Carlos Chagas fue lograr describir el microorganismo que produce la enfermedad, el insecto que la transmite e informar de los signos y síntomas clínicos presentes en cada fase de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2000; Murcia *et al.*, 2013).

Se trata de una infección parasitaria causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* que se encuentra en las heces de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae y se transmite principalmente a los seres humanos y a otros mamíferos por las heces infectadas. También, existen otras formas de transmisión menos frecuentes como la transfusión de sangre, trasplantes de órganos, de madre a hijo durante el embarazo y el parto (Rassi *et al.*, 2012; Martínez-Ibarra *et al.*, 2012).

La enfermedad de Chagas tiene dos etapas o fases clínicas. La primera es la fase aguda y ocurre a partir de la infección del parásito, la cual suele durar aproximadamente de dos semanas a meses y puede ser sintomática o asintomática. En la fase aguda sintomática, se pueden presentarse señales visibles como una roncha o pápula en el sitio de la picadura llamado "chagoma de inoculación". En casos de una picadura cercana al ojo es posible identificar el "signo de Romaña" que se presenta como una inflamación en el párpado. En esta fase también se pueden manifestar síntomas tales como fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, dolores musculares, dificultad para respirar, náuseas, diarrea, vómitos y dolor abdominal o en el pecho. La segunda fase se conoce como fase crónica asintomática, en la cual la infección puede permanecer asintomática durante décadas o incluso de por vida. Sin embargo, alrededor del 30 % de los enfermos crónicos desarrollarán complicaciones, que afectan órganos internos y se caracterizan fundamentalmente en las siguientes: complicaciones cardiacas, las cuales pueden incluir agrandamiento del corazón, insuficiencia, alteración del ritmo

o frecuencia y paro; y por otro lado complicaciones intestinales, que pueden incluir un agrandamiento del esófago o del colon (OPS, 2018; OMS, 2019).

En la actualidad los dos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad son Benznidazol y Nifurtimox. Se administran por vía oral, durante 60-90 días, ambos medicamentos son efectivos cuanto menor sea la edad del paciente y más reciente sea la infección. Sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección (OMS, 2019).

La importancia de esta parasitosis radica en su elevada prevalencia, aunado a que no existe vacuna contra el agente causal, su falta de curación en la fase crónica, las grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral (Silveira y Dias, 2011; Carabarin *et al.*, 2013). Esta enfermedad figura entre las parasitosis más importantes de América Latina, recientemente la Organización Mundial de la Salud la designó como una de las principales enfermedades tropicales desatendidas, por ser un serio problema de salud pública. Esta enfermedad endémica del continente americano está ampliamente distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Chile y Argentina afectando a 21 países (Murcia *et al.*, 2013). Se estima que 8 millones de personas están infectadas y alrededor de 70 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad en Latinoamérica. La incidencia anual es de 30,000 casos nuevos y 14,000 muertes por manifestaciones clínicas de la enfermedad (PAHO, 2019; WHO, 2019). En México, la cifra de infectados asciende a 1'100,000 millones de personas y 29'500,000 personas en riesgo de contraer la infección. Además, se estima que anualmente se producen en el país más de 7,700 nuevos casos (OPS, 2006; Médicos Sin Fronteras-MSF, 2015).

### **Control de vectores de la enfermedad de Chagas**

El método más eficaz para prevenir la parasitosis es el control vectorial. El combate a los insectos vectores de la enfermedad comenzó en la década de los 50's con la aplicación de Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) en millones de viviendas en zonas con mayor incidencia de malaria que a su vez coincidió con las áreas donde también se encontraban triatóminos, realizado en la Campaña Nacional de Erradicación

Palúdica (CNEP) resultando poco eficiente contra los triatóminos y altamente tóxico (Velasco y Rivas, 2008). Posteriormente, se comenzó a emplear el insecticida organoclorado hexaclorociclohexano (HCH) para el control de vectores de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, este insecticida químico se acumula en el ambiente y se concentra en los seres vivos, provocando riesgo toxicológico y ecotoxicológico (Moriarty, 1999; Stenersen, 2004; Alzogaray, 2006). Por lo tanto, a finales de la década de 1960, el HCH fue reemplazado por insecticidas anticolinesterásicos como los fosforados y carbamatos. En Chile, entre 1969 y 1971 se realizaron aplicaciones en campo del carbamato propoxur (Gualtieri *et al.*, 1985; Alzogaray 2006). En programas de control vectorial de triatomínicos en Argentina, además de emplear propoxur también se usaron los fosforados malationes y fenitrotión, presentaban buena actividad triatomocida pero una alta toxicidad en mamíferos. Por este motivo, se siguieron buscando alternativas más seguras (Picollo *et al.*, 1976, Alzogaray, 2006). En los años '80 comienza la aplicación de piretroides, entre estos insecticidas los más utilizados para el control de triatóminos destacan deltametrina, lambda-cihalotrina, alfacipermetrina, betacipermetrina y cipermetrina (Zerba *et al.*, 1997). Estos insecticidas son actualmente la herramienta más usada para el control de vectores de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, la reinfestación y resistencia son fenómenos que se han reportado para diferentes especies de triatóminos como *T. infestans*, *R. prolixus* y *T. dimidiata* (Zerba, 1999; Schofield, 2001; Dumonteil *et al.*, 2004, Pedrini *et al.*, 2009 Mougabure-Cueto y Picollo, 2015). Por todo lo anteriormente expuesto, se ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas.

### **Control biológico**

Una de estas alternativas es el control biológico que emplea enemigos naturales de los insectos tales como los parasitoides, depredadores, microorganismos antagonistas y entomopatógenos. Estos últimos destacan por la enfermedad producida que conduce a la muerte de los insectos. Estos microorganismos pueden ser bacterias, virus, nemátodos y hongos los cuales son utilizados como agentes microbianos en el control biológico (Guédez *et al.*, 2008).

Entre los microorganismos más empleados como insecticidas biológicos para el control de plagas agrícolas (Pell *et al.*, 2010) e insectos transmisores de enfermedades en el humano (Scholte *et al.*, 2004) se encuentran los hongos entomopatógenos. Se conocen aproximadamente 750-1000 especies en 100 géneros (Samson *et al.*, 1988; Zimmerman, 2007).

Los hongos actúan por contacto y generalmente emplean conidios o blastosporas para infectar a los insectos, iniciando el proceso infectivo cuando los conidios encuentran la cutícula de un hospedero susceptible, entonces se adhieren a la superficie del integumento a través de interacciones hidrofóbicas, entre las proteínas de la superficie del conidio (hidrofobinas) y la capa lipídica que cubre la cutícula de insectos (Schrank *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2007). Posteriormente se da la germinación de conidios donde se inicia la formación de una estructura denominada apresorio y de la cual sale la clavija de penetración, la cual ejerce una presión hacia el interior del insecto facilitando la invasión del hongo. En ese momento, el hongo también comienza a secretar enzimas como las proteasas (Pr1, Pr2 y Pr4), quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas. Estas enzimas no solamente intervienen en la degradación de la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, sino que también le sirven al hongo en su nutrición. Una vez dentro del insecto, el hongo presenta una diferenciación celular de hifas a cuerpos hifales y blastosporas que se van diseminando a través del hemocele del insecto evadiendo el sistema inmune e invadiendo diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos. Además, durante el proceso de invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos como las dextruxinas en el caso del hongo *M. anisopliae* que pueden actuar como inmunomoduladores que suprimen la respuesta inmune del hospedero ocasionando la muerte del insecto (Pal *et al.*, 2007). Cuando el insecto muere y una vez agotados los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial y las hifas penetran la cutícula del hospedero desde el interior del insecto y emergen a la superficie del cadáver del insecto, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de conidióforos y la producción de conidios comenzando el ciclo de infección (Pucheta *et al.*, 2006).

Entre los diversos hongos entomopatógenos está *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) descrito por Sorokin en 1883, es uno de los principales agentes microbianos empleados como bioinsecticida y el cual tiene un amplio rango de insectos hospederos (Zimmermann, 2007). Este hongo desarrolla colonias de color verde; caracterizadas por la formación de micelio septado con producción de conidios basípetos y catenulados, los cuales presentan dimensiones de aproximadamente (6.3 - 9.8 de longitud x 2.1 - 2.5  $\mu\text{m}$  de diametro) éstos pueden presentar formas alargadas, cilíndricas o ligeramente ovoides.

Los insectos que mueren por este hongo se pueden observar inicialmente cubiertos de forma total por micelio de color blanco, el cual se torna verde cuando el hongo esporula (Fig. 3) (Wraight *et al.*, 2007).



**Figura 3.** *Meccus pallidipennis* infectado con *Metarhizium anisopliae*

Para poder emplear este hongo como un bioinsecticida eficiente y virulento, se debe comenzar por el estudio de sus condiciones fisiológicas óptimas, como la temperatura de germinación y de crecimiento, así como su virulencia en diversos insectos. Los bioensayos en laboratorio son necesarios para comparar diversas cepas de hongos, principalmente para seleccionar los aislados más adecuados para estudios posteriores relacionados con su producción masiva, formulación y propiedades de almacenamiento, con miras a realizar ensayos en campo (Butt y Goettel, 2000).

## **HIPÓTESIS**

Los prototipos de formulación desarrollados con el hongo *Metarhizium anisopliae* serán capaces de ser altamente virulentos contra *Meccus pallidipennis*, vector de *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas y presentarán una viabilidad favorable después de ser almacenados, expuestos a luz UV-C y a temperaturas mayores de 35°C.

## **OBJETIVO GENERAL**

Diseño, elaboración y evaluación de una formulación que contenga como principio activo conidios de *M. anisopliae* (EH-473/4) para el control biológico del insecto vector *M. pallidipennis*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Producción y obtención del principio activo (conidios) de *M. anisopliae* (EH-473/4) y determinación de su calidad (pureza, concentración de conidios, porcentaje de viabilidad).
2. Diseño y elaboración de diversos prototipos de formulación de *M. anisopliae* (EH-473/4).
3. Determinación de los parámetros de calidad de los prototipos de formulación del hongo (viabilidad y pureza).
4. Evaluación de la funcionalidad de la virulencia de los prototipos mediante bioensayos con el insecto transmisor, *Meccus pallidipennis*, en el laboratorio.

## ANTECEDENTES

El desarrollo industrial de bioinsecticidas enfrenta muchos desafíos entre ellos, maximizar la producción del ingrediente activo, reducir humedad de éste para asegurar una adecuada vida de estante, desarrollo de formulaciones con el establecimiento de las condiciones de almacenamiento, así como bioensayos de laboratorio, invernadero y campo que confirmen la efectividad del bioinsecticida formulado (Carballo, 1998).

Debido al interés en estos hongos para el control de plagas de insectos se continúa en la búsqueda de estrategias para mejorar el proceso de producción en la elaboración de bioinsecticidas. La producción masiva de la forma infectiva como el conidio, la blastospora o micelio, puede ser producida usando sustrato sólido y/o cultivo líquido. El cultivo en sustrato sólido implica la inoculación del aislado fúngico en un material estéril basado en medio de agar (por ejemplo, agar papa dextrosa) o en un sustrato natural (por ejemplo, cebada, arroz, trigo, maíz) que les permita esporular y de esta manera producir gran cantidad de propágulos fúngicos (Vélez *et al.*, 1997; Grace y Jaronski, 2005).

La formulación del hongo es un proceso mediante el cual el ingrediente activo se mezcla con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes, gelificantes, protectores de luz UV, y otros aditivos. Los materiales inertes ayudan a que el hongo se encuentre protegido al momento de la aplicación, facilitan su manejo y mejoran su desempeño en el campo (Urtubia y France, 2007). Además, los materiales utilizados en la formulación deben mantener la estabilidad de los propágulos fúngicos durante su almacenamiento, reduciendo la pérdida de viabilidad por un tiempo considerable (Batidas *et al.*, 2009). Es importante considerar que los materiales inertes no deben tener actividad biológica sobre flora y fauna, ni afectar la actividad del hongo, deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas que permitan la mezcla de los propágulos, faciliten la aplicación del bioinsecticida y que sean económicamente rentables (Carballo, 1998).

Existen diferentes tipos de formulaciones tales como polvo de contacto, polvo humectable, granulados solubles, suspensiones concentradas, entre otras. De acuerdo con el tipo de vehículo empleado pueden clasificarse en formulaciones líquidas y sólidas.

Las formulaciones líquidas son normalmente a base de agua o aceite y emulsiones. Si el vehículo inerte utilizado en la formulación es agua, entonces se debe usar un agente humectante (también conocido como surfactante). Estos se utilizan para reducir la tensión superficial, lo que permite la dispersión de conidios. Cuando se usa un agente humectante, es importante evaluar su posible toxicidad para el conidio (Burges, 1998). Una emulsión es un líquido disperso en otro, por ejemplo, aceite en agua. Los aceites vegetales y los derivados del petróleo son compatibles con los conidios hidrófobos y son utilizados como ingredientes de las formulaciones líquidas (Bateman y Alves 2000).

Las formulaciones sólidas incluyen polvos humectables, polvos de contacto, gránulos y cebos. Los vehículos sólidos inertes que comúnmente se emplean son sales solubles en agua como cloruros, carbonatos, sulfatos, fosfatos. También se usan tierras inertes como talco, arcillas, caolín, bentonita, silicato, zeolita, tierra de diatomeas. Se pueden emplear como adyuvantes protectores de radiación, agentes de fluidez (silicatos de aluminio y sodio). Las tierras de diatomeas se componen de remanentes de diatomeas fosilizadas (algas unicelulares), tienen baja toxicidad en los mamíferos y su uso es compatible con hongos entomopatógenos (Subramanyam y Roesli, 2000). Las partículas de las tierras de diatomeas se adhieren al cuerpo del insecto causando daño a la capa cerosa protectora de la cutícula de insectos por absorción y también causan abrasión a la cutícula, lo que facilita la entrada del hongo (Mewis y Ulrichs, 2001; Athanassiou *et al.*, 2004).

### **Regulación de plaguicidas microbiales**

Para utilizar agentes microbianos como bioinsecticidas, éstos tienen que cumplir con protocolos de bioseguridad internacionales y nacionales. En México, para la comercialización y uso de bioinsecticidas se requiere una autorización sanitaria que

emite Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en coordinación con Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y/o Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), que garantizan la seguridad y eficacia del producto registrado. La información solicitada para el registro de plaguicidas microbianos comprenden la identidad y composición del agente microbiano (nombre científico, ingredientes inertes, tipo de formulación), propiedades físico-químicas del producto formulado (color, pH), propiedades biológicas (factores ambientales óptimos para la viabilidad y virulencia del microorganismo), información toxicológica (toxicidad dérmica y oral), ecotoxicología (efectos en flora y fauna terrestre y acuática) y estudios de estabilidad (vida útil del producto) (COFEPRIS, 2005).

### ***Metarhizium anisopliae* como agente de control biológico**

De Faria y Wraight (2007) compilaron una lista de micoinsecticidas y micoacaricidas que han sido desarrollados en todo el mundo desde la década de 1960. En total, identificaron 171 productos comerciales, basados en 12 especies, la mayoría de ellos basados en *Bauveria bassiana* (34%), *B. brongniartii* (4%), *M. anisopliae* (34 %) e *Isaria fumosorosea* (6%). Actualmente, a nivel mundial existen varios productos registrados a base de conidios de *M. anisopliae* (Jenkins y Gryzwacz, 2000). Por ejemplo, Biogen producido en Brasil y Bio-Green en Australia han empleado a *M. anisopliae* con bastante éxito para el control de la plaga mosca pinta o salivazo de los pastos (Hemiptera: Cercopidae), que ataca particularmente las plantaciones de caña de azúcar (Zimmermann, 2007; Toriello *et al.*, 2008). Otro micoinsecticida que también emplea como ingrediente activo este hongo en USA es Bio Path empleado para control de cucarachas (Butt *et al.*, 2001; Zimmermann, 2007). En México, los productos comercializados cuyo ingrediente activo es *Metarhizium anisopliae* son Meta-Sin para el control del picudo del chile, Bio-Blast para el control de termitas y cucarachas y Fitosan M para el control de gallina ciega y chapulines (Tamez *et al.*, 2001; Sahayaraj, 2014)

El hongo entomopatógeno *M anisopliae* es un agente eficaz de control biológico alternativo contra algunos insectos plagas agrícolas y de insectos que son vectores

de enfermedades humanas importantes como la enfermedad de Chagas, malaria y dengue (Scholte *et al.*, 2006; Garza-Hernández *et al.*, 2013).

### **Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos vectores**

En el contexto del control biológico, se ha demostrado que en condiciones de laboratorio algunos triatóminos como *T. infestans*, *T. sordida*, *R. prolixus*, *M. pallidipennis* son susceptibles a hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* (Luz y Fargues 1997; Luz *et al.*, 2004; Rocha y Luz 2011; Forlani *et al.*, 2015; Flores-Villegas *et al.*, 2016).

En un estudio realizado por Luz *et al.* (1998) emplearon 23 aislados de *B. bassiana* y 13 de *M. anisopliae* en ninfas del tercer estadio de *T. infestans* y reportaron mortalidades que variaron de 17.5 hasta 97.5% después de 15 días de la infección y estimaciones del tiempo medio de sobrevivencia que variaron de 6 a 11 días.

En otro estudio, se realizaron bioensayos para determinar la susceptibilidad del estadio ninfal cinco de *R. pallescens* al hongo entomopatógeno *Beauveria* spp. Los diferentes aislamientos produjeron varios grados de mortalidad en los insectos, desde 77.5% a 100% a los 22 días posteriores a la infección (Pineda *et al.*, 2003).

Rocha y Luz (2011) reportaron infecciones fúngicas de *M. robertsii* e *Isaria cateniannulata* en *T. infestans* en la región central de Brasil.

Los resultados de los estudios de laboratorio y de campo que utilizan una formulación en polvo o una base de aceite mineral, confirman que *B. bassiana* es un candidato prometedor para controlar *T. infestans* (Luz *et al.*, 1999, Pedrini *et al.*, 2009).

En trabajos previos desarrollados por el grupo de investigación del laboratorio de Micología Básica, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina (UNAM) en colaboración con el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico de Tecomán, Colima, se obtuvieron diversas cepas de hongos entomopatógenos. Entre ellas se estudiaron diversas cepas de *M. anisopliae* para constatar su

virulencia en diversos insectos. En estos estudios se demostró que la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* tiene una alta virulencia y afecta la sobrevivencia de huevos, ninfas y adultos en *M. pallidipennis* en condiciones de laboratorio (Flores-Villegas *et al.*, 2016; Flores-Villegas *et al.*, 2019; Jiménez-Santiago *et al.*, 2017; Toriello *et al.*, 2017). Además, las pruebas de bioseguridad del hongo muestran su inocuidad en mamíferos (Toriello *et al.*, 2006).

Actualmente, se está estudiando una formulación líquida (aceite adyuvante emulsionable) para el control de *M. pallidipennis*. Esta formulación se evaluó empleando paredes elaboradas con diferentes materiales para simular condiciones externas de las viviendas (peridomicilio). Los resultados mostraron que en tabique se obtuvo una mortalidad del 90%, en tabicón se logró una mortalidad del 100% y en montón de piedra texcal del 88%. Con los resultados obtenidos se demostró la funcionalidad de la formulación tipo aceite adyuvante emulsionable de *M. anisopliae* contra *M. pallidipennis* (Murillo *et al.*, 2019). Recientemente, también se evaluó la funcionalidad de esta formulación en peridomicilios de una localidad en Morelos donde se encuentra *M. pallidipennis*. En este estudio se encontró que hasta después de la tercera aplicación del bioinsecticida se identificó la presencia *M. anisopliae* en 5 especímenes (Murillo *et al.*, 2018).

## METODOLOGÍA

### **Aislado fúngico de *Metarhizium anisopliae***

Se utilizó la cepa EH-473/4 de *M. anisopliae* que ha sido previamente caracterizada fenotípica y genotípicamente y cuenta con pruebas de bioseguridad que comprueban su inocuidad en mamíferos (Toriello *et al.*, 2003; 2006; 2008). Esta especie fúngica fue aislada del insecto *Aeneolamia* sp. de un cultivo de caña de azúcar en San Luis Potosí, México y proviene del CNRCB, SENASICA. De la cepa se obtuvieron cultivos monospóricos, los que se encuentran depositados en la colección de cultivos del Laboratorio de Micología Básica, Depto. de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, registrada en la "World Federation of Culture Collections" (WFCC) como BMFM-UNAM 834.

### **Obtención de ejemplares**

Se utilizaron ninfas del tercer estadio de *M. pallidipennis*, de una colonia mantenida bajo condiciones controladas de  $60 \pm 5\%$  de humedad relativa,  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y 12/12 h luz/oscuridad en el insectario del Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

### **Reactivación de la cepa fúngica**

La activación de la cepa 473/4 de *M. anisopliae*, se llevó a cabo mediante pase por insecto. Previamente a la infección de los insectos con el hongo, los triatóminos fueron desinfectados por inmersión en agua destilada estéril, luego en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y por último en agua estéril. Al final los especímenes se colocaron en cajas de Petri con papel filtro previamente esterilizado en el fondo de la caja. Posteriormente, se realizó la infección con 30  $\mu\text{l}$  de una suspensión de  $1 \times 10^7$  conidios/ml en el pronoto de cada insecto. Después de 24 h se transfirieron a cajas de Petri con agar-agua (1%) y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ . Los triatóminos se monitorearon durante 10 días, para después aislar el hongo del insecto. Se tomó inóculo del hongo con un asa estéril del triatómino muerto y se sembró en tubos de

vidrio con medio APD (Agar Papa Dextrosa) y se incubaron a 28°C durante 10 días (Figura 4).



**Figura 4.** Proceso de reactivación la cepa 473/4 de *M. anisopliae* A: tren de lavado. B: infección del hongo en el pronoto del triatómino C: ninfa de *Meccus pallidipennis* infectado con *M. anisopliae*. D: hongo cultivado en tubos con APD

### Producción de los conidios (principio activo)

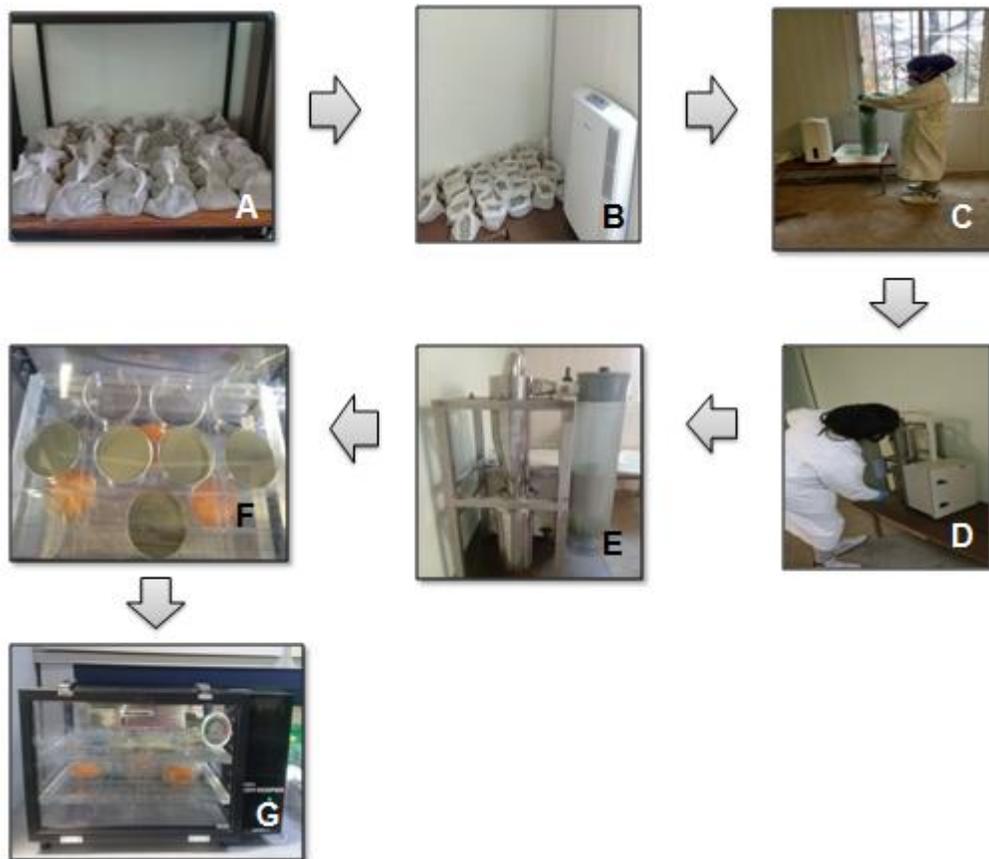
Para la producción de conidios se utilizó arroz como sustrato. El sustrato se lavó tres veces con agua, se hidrató a temperatura ambiente durante 30 min y se dejó escurrir durante 20 min. Posteriormente, se depositaron 300 g de sustrato en bolsas de polipapel de alta densidad (22 x 30 cm) y se sacó el aire contenido en la bolsa para prevenir su ruptura durante la esterilización. Las bolsas se cerraron con un nudo en la parte superior y se esterilizaron por 20 min a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> (121°C). Una vez concluida la esterilización, las bolsas se dejaron enfriar 24 h para ser inoculadas con el hongo (Murillo, 2015). Para preparar el inóculo; se tomaron 5 ml de una suspensión conidial de *M. anisopliae* en Tween 80 al 0.05% (v/v) a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/ml para inocular 300 g de sustrato. Después de la inoculación del hongo, se mezcló el conjunto y se incubó durante 20 días a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; cada tercer día las bolsas fueron homogenizadas manualmente (Figura 5).



**Figura 5.** Producción masiva de conidios de *M. anisopliae*. A-E. preparación del sustrato. A: el arroz se lavó. B: se dejó escurriendo C: se depositaron 300 g del sustrato en una bolsa de polipapel. D: el sustrato se esterilizó en autoclave. E: las bolsas se dejaron enfriar 24 h. F: las bolsas se inocularon con 5 ml de una suspensión de conidios ( $1 \times 10^8$  conidios/ml).

### **Extracción del principio activo**

Después de la producción masiva de conidios de *M. anisopliae* para separar los conidios del arroz, las bolsas se abrieron y llevaron al deshumidificador ambiental; el tiempo dependió de la humedad del sustrato (2-5 días). Posteriormente, se extrajeron los conidios usando un cosechador de conidios (Mycoharvester). Se colocaron 300 g del sustrato con hongo y se mantuvo el tiempo necesario. Los conidios cosechados se colocaron en cajas Petri para reducir el contenido de humedad hasta 5-7% con ayuda de un deshumidificador para su posterior formulación (Sanplatec, Dry-Keeper) (Figura 6).



**Figura 6.** Proceso de extracción de conidios (ingrediente activo). A: bolsas con sustrato inoculado durante 25 días. B: bolsas abiertas en el deshumidificador ambiental. C-D: cosecha de conidios. E: cosechador. F: conidios extraídos en cajas Petri. G: deshumidificación de conidios extraídos.

**Determinación de parámetros de calidad: concentración conidial, porcentaje humedad, viabilidad y pureza.**

#### **Concentración de conidios/ g de arroz**

A partir de bolsas de arroz inoculadas con el hongo durante 25 días, se tomaron muestras de 1 g y se suspendieron en 100 ml de Tween 80 al 0.05% (v/v). Una vez homogeneizada la suspensión se determinó la concentración mediante el conteo de conidios en cámara de Neubauer (Figura 7).



**Figura 7.** Homogeneización de sustrato inoculado con *M. anisopliae*

### **Porcentaje de humedad**

Se llevaron a peso constante crisoles de porcelana (95°C, 2 h), a los cuales se les depositaron 100 mg de los conidios cosechados. Con los conidios se volvió a llevar a peso constante los crisoles (95°C). Para obtener el porcentaje de humedad se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% \text{ humedad} = \frac{c2-c3}{c2-c1} \times 100$$

c1= peso del crisol

c2= peso del crisol +muestra húmeda (inicial)

c3= peso del crisol+ muestra seca

### **Concentración conidial**

La cuantificación de la concentración de conidios permite determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por unidad de peso o volumen existentes, lo cual permite establecer la dosis en una formulación. Para esto, se pesaron 0.1 g de los conidios deshumidificados y se suspendieron en 10 ml de Tween 80 al 0.05% (v/v). La suspensión obtenida se homogenizó y se realizó una dilución: 1:100 (10 µl de la suspensión de conidios obtenida inicialmente + 990 µl de Tween 80 al 0.05%). Los conidios se contaron en una cámara de Neubauer, adicionando 15 µl de la suspensión en cada extremo y contando los 25 cuadrantes de la cámara.

## Viabilidad

Para determinar la viabilidad se tomó una muestra de 0.1 g de los conidios deshumidificados para realizar una suspensión de los conidios en Tween 80 al 0.05% (v/v) y se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidios/ml. Posteriormente, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l y se esparció con un triángulo de vidrio estéril en una caja Petri con medio de agar papa dextrosa (APD) y se incubó a 28°C durante 24 h. Posteriormente, se cortó una porción de agar se colocó sobre un portaobjetos y se agregó azul de lactofenol. En cada caja de Petri se examinó un total de 100 conidios, utilizando un microscopio óptico con el objetivo de 40 X. La viabilidad de los conidios se evaluó por el porcentaje de germinación y el criterio de conidio germinado utilizado fue que la longitud del tubo germinativo fuera igual o mayor que el largo del conidio (Goettl e Inglis, 1997) (Figura 8).



**Figura 8.** Conidio germinado después de 24 h

## Pureza

A partir de una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/ml se realizaron diluciones para obtener una suspensión de  $1 \times 10^3$  conidios/ml la cual se diluyó 1:2 con Tween 80 al 0.05%. De esta dilución se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l la cual se sembró por triplicado en cajas de Petri con medio APD. Las cajas inoculadas se incubaron a una temperatura de 28°C, con el fin de promover el desarrollo de las UFC. Después de 5 días se contó el número de UFC de *M. anisopliae* y el número de UFC de otros microorganismos contaminantes (hongos, bacterias y levaduras). Para el cálculo de pureza (P) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% P = \frac{\text{UFC del hongo deseado}}{\text{UFC total}} \times 100$$

### **Desarrollo de prototipos de formulación**

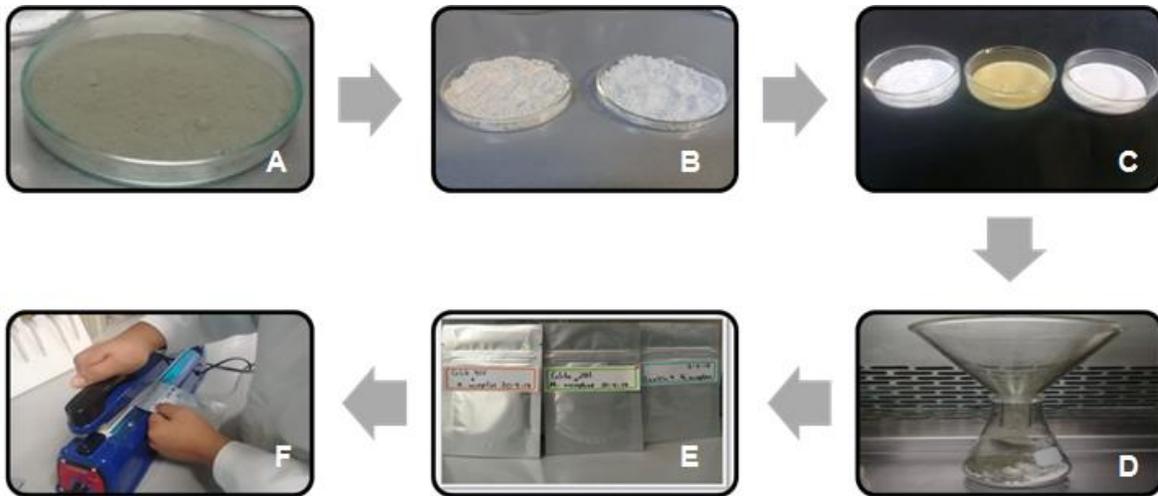
La formulación de los micoinsecticidas es de gran importancia ya que propicia el mejor resultado al aplicarla en el campo (Rodrigues *et al.*, 2019). De ahí la relevancia de evaluar diferentes componentes para una formulación con el aislado fúngico. Se investigaron 15 prototipos de formulación descritos en la Tabla 1. Para la preparación de los prototipos se utilizaron como vehículos de formulación caolín y las tierras de diatomeas Celite® 400 y Celite® 281. La tierra de diatomeas está compuesta de sílice amorfo que se origina a partir de algas microscópicas fosilizadas y tiene propiedades abrasivas y de absorción en la cutícula del insecto (Korunic, 1998). Este producto natural se usa a menudo para proteger los granos almacenados contra insectos plaga y se conocen diversos informes sobre un efecto combinado con hongos entomopatógenos (Akbar *et al.*, 2004, Dal Bello *et al.*, 2006, Batta, 2008, Vassilakos *et al.*, 2006, Athanassiou y Steenberg, 2007). También se emplearon los adyuvantes vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya al 2% para proteger al aislado fúngico de factores bióticos y abióticos encontrados en la naturaleza donde se aplicará el micoinsecticida. Se mezclaron manualmente 5 g de vehículo junto con  $1 \times 10^{11}$  conidios/g de *M. anisopliae* y 0.1 g (2%) de adyuvante (Figura 9). Posteriormente, se realizaron pruebas de viabilidad y pureza para cada prototipo de manera independiente siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Cada prototipo de formulación fue envasado en bolsas metalizadas con doble sellado, zipper propio de las bolsas y al calor con una máquina selladora de impulso (DILTOOLS PM300) (Figura 9).

Tabla 1. Listado de prototipos de formulación de *M. anisopliae*

Prototipo	Adyuvante	Vehículo	Principio activo	Fórmula
1	SA	Celite® 400	<i>M. anisopliae</i>	C+TD4
2	Vitamina E	Celite® 400	<i>M. anisopliae</i>	C+TD4+Vit.E
3	Óxido de Zinc	Celite® 400	<i>M. anisopliae</i>	C+ TD4+ZnO
4	Lecitina de soya	Celite® 400	<i>M. anisopliae</i>	C+TD4+Lec.S
5	Mix	Celite® 400	<i>M. anisopliae</i>	C+TD4+Mix
6	SA	Caolín	<i>M. anisopliae</i>	C+Ca
7	Vitamina E	Caolín	<i>M. anisopliae</i>	C+Ca+Vit.E
8	Óxido de Zinc	Caolín	<i>M. anisopliae</i>	C+Ca+ZnO
9	Lecitina de soya	Caolín	<i>M. anisopliae</i>	C+Ca+Lec.S
10	Mix	Caolín	<i>M. anisopliae</i>	C+Ca+Mix
11	SA	Celite® 281	<i>M. anisopliae</i>	C+TD2
12	Vitamina E	Celite® 281	<i>M. anisopliae</i>	C+TD2+Vit.E
13	Óxido de Zinc	Celite® 281	<i>M. anisopliae</i>	C+TD2+ZnO
14	Lecitina de soya	Celite® 281	<i>M. anisopliae</i>	C+TD2+Lec.S
15	Mix	Celite® 281	<i>M. anisopliae</i>	C+TD2+Mix
16	SA	SV	<i>M. anisopliae</i>	C

SA: sin adyuvante; SV: sin vehículo; C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; TD2: tierra de diatomea Celite 281; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec: lecitina de soya; Mix = vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya.



**Figura 9.** Proceso de elaboración de prototipos de formulación. A: conidios deshumidificados. B: vehículos de formulación. C: adyuvantes D: mezcla de componentes de formulación. E: bolsas metalizadas. F: bolsa sellada al calor.

### **Vida de anaquel y condiciones de almacenamiento**

Los conidios de *M. anisopliae* no formulados y los conidios contenidos en los diferentes prototipos de formulación (C+TD2, C+TD4, C+Ca) fueron almacenados a diferentes temperaturas, -20, 4 y 28°C. Se determinó la viabilidad del hongo a las temperaturas mencionadas por el porcentaje de germinación a la semana 1, 2, 3, 4, 8 y 12, como se describió anteriormente.

### **Termotolerancia de los prototipos de formulación**

Se evaluaron 10 prototipos de formulaciones en polvo que contienen como principio activo  $1 \times 10^{11}$  conidios/g de *M. anisopliae*. Se probaron tres adyuvantes (óxido de zinc, vitamina E y lecitina de soya), así como vehículos inertes como caolín y tierra de diatomeas Celite® 400, para observar su efecto sobre los conidios (Tabla 2). Las formulaciones fueron envasadas y empaquetadas en porciones de 5 g, en bolsas metalizadas (Fig. 9 E). Estas fueron almacenadas a 28, 37 y 45°C durante 24 y 72 h. Posteriormente, se evaluó la viabilidad de los conidios tomando 100 mg de cada formulación y se suspendieron en 10 ml de agua con Tween 80 al 0.05% siguiendo la metodología antes descrita.

**Tabla 2. Prototipos de formulación de *M. anisopliae***

Prototipo	Fórmula
1	C + TD4
2	C + TD4 + Vit.E
3	C + TD4 + ZnO
4	C + TD4 + Mix
5	C + TD4 + Lec.S
6	C + Ca
7	C + Ca + Vit.E
8	C + Ca + ZnO
9	C + Ca + Lec.S
10	C + Ca + Mix

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: Caolín; Vit.E: Vitamina E; ZnO: Óxido de zinc; Lec: Lecitina de soya; Mix (Vitamina E, Óxido de zinc y Lecitina de Soya).

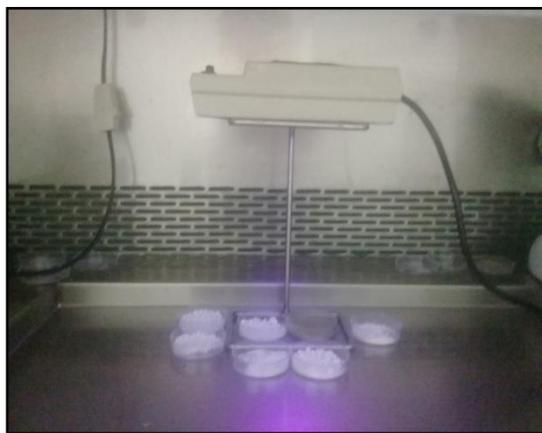
### **Radiación ultravioleta (UV-C)**

Se evaluaron 6 formulaciones en polvo con un principio activo de  $1 \times 10^{11}$  conidios/g de *M. anisopliae*, dos vehículos inertes (caolín y tierras de diatomea) y dos adyuvantes (vitamina E y óxido de zinc) (Tabla 3). Para evaluar las 6 formulaciones en polvo, se colocaron 1 g de cada formulación en cajas Petri individuales y se emplearon 200 mg de conidios como testigo. Las cajas Petri se irradiaron con una lámpara de luz ultravioleta (254 nm, longitud de onda UV-C) de 4 watts de potencia, a una distancia de 20 cm. Dicha exposición se realizó a 0, 3 y 6 horas. Posteriormente, se evaluó la viabilidad de los conidios tomando 100 mg de cada formulación (Figura 10).

**Tabla 3. Prototipos de formulación de *M. anisopliae* expuestos a radiación UV-C**

Prototipo	Fórmula
1	C+TD4
2	C+TD4+Vit.E
3	C+TD4+ZnO
4	C+Ca
5	C+Ca+Vit.E
6	C+Ca+ZnO

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; vit.E: Vitamina E; ZnO: óxido de zinc



**Figura 10.** Conidios formulados y sin formular expuestos a radiación UV-C

### **Evaluación de la funcionalidad de los prototipos de formulación**

Debido a la importancia de evaluar la virulencia de los formulados se realizaron diferentes bioensayos preliminares. Para todos los bioensayos realizados, los triatóminos fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 4.5%, posteriormente en agua estéril, y al término se colocaron los insectos en cajas de Petri (55 x 15 mm) con papel filtro previamente esterilizado en el fondo de la caja. En el primer bioensayo se emplearon 49 insectos N3 (7 especímenes por 7 tratamientos) de *M. pallidipennis*. Posteriormente, se colocaron 7 ninfas en un recipiente de plástico (17 x 16 cm) que contenía en el fondo papel filtro estéril con 100 mg conidios sin formular como testigo y 2.5 g de las formulaciones de prueba durante 1 y 10 min. Se emplearon 7 tratamientos (Tabla 4): Transcurrido el tiempo de exposición, cada triatómino se transfirió a cajas de Petri con agar-agua (1%) y se incubó a 28°C. Se registró la mortalidad (considerada como ausencia de movimiento aún con estímulo físico) y surgimiento de hifas diariamente.

**Tabla 4: Bioensayos de triatóminos por tiempos de exposición**

Tratamiento	Fórmula	Tiempo de exposición
1	C	1 min
2	C	10 min
3	Ca	10 min
4	C + Ca	1 min
5	C + Ca	10 min
6	C+TD4	10 min
7	TD4	10 min

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín

En el segundo bioensayo se colocaron 500 mg de los prototipos de formulación en cada recipiente mencionado arriba, se determinó y ajustó la concentración de conidios por cm<sup>2</sup>. Se emplearon 4 tratamientos colocando en el recipiente 5 ninfas por tratamiento durante 5 min (Tabla 5). Posteriormente, cada triatómino se transfirió a cajas de Petri con agar-agua (1%) y se incubaron a 28°C. Se registró la mortalidad y surgimiento de hifas diariamente.

**Tabla 5: Bioensayos de infección de triatóminos por 2 concentraciones del hongo**

Tratamiento	Fórmula	Concentración
1	C + Ca	1 x 10 <sup>6</sup> conidios/cm <sup>2</sup>
2	C + Ca	2 x 10 <sup>6</sup> conidios/cm <sup>2</sup>
3	C+TD4	1 x 10 <sup>6</sup> conidios/cm <sup>2</sup>
4	C+TD4	2 x 10 <sup>6</sup> conidios/cm <sup>2</sup>

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín

Para el tercer bioensayo, con los resultados arriba mencionados, donde se observó que los triatóminos expuestos por diferentes tiempos (1 min y 10 min) y por diferentes concentraciones presentaron resultados similares logrando matar a los insectos en el mismo tiempo. Por lo cual, se emplearon conidios sin formular y formulados a una concentración promedio de 1.5 x 10<sup>6</sup> conidios/cm<sup>2</sup> durante 5 min (Tabla 6). Se colocaron en el recipiente 5 ninfas por tratamiento durante 5 min. Posteriormente, cada triatómino se transfirió a cajas de Petri con agar-agua (1%), cajas Petri con papel filtro y cajas Petri con papel filtro previamente humedecido con

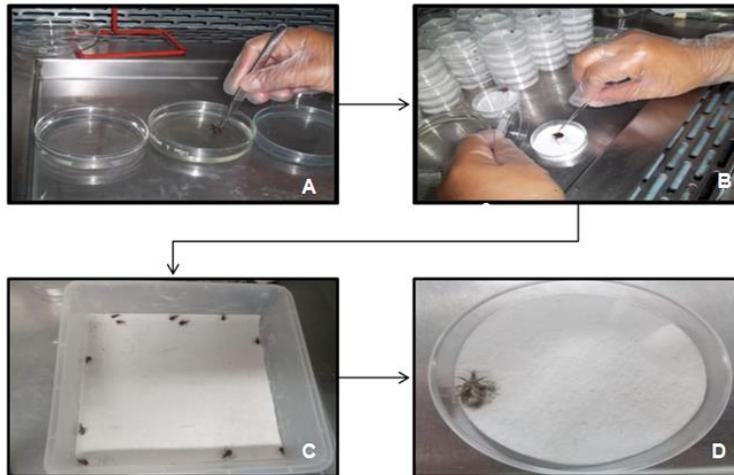
200 µl de agua estéril. Se registró la mortalidad y surgimiento de hifas de los insectos diariamente.

**Tabla 6: Bioensayos de infección de triatóminos con 1 concentración fúngica durante 5 min**

Tratamiento	Fórmula
1	C
2	Ca
3	TD4
4	C+TD4
5	C+Ca
6	C+TD4+Vit.E
7	C+Ca+Vit.E
8	C+TD4+ZnO
9	C + Ca + ZnO

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc

Finalmente, con base en los resultados obtenidos mediante los bioensayos preliminares se optó por emplear el tercer método. Para cada bioensayo se utilizaron 10 ninfas N3 de *M. pallidipennis* por triplicado para cada tratamiento (tratamientos = 9 total = 270 N3). Posterior a la exposición con los conidios formulados, conidios sin formular y los vehículos como testigo, cada triatómino se transfirió a cajas Petri con papel filtro previamente humedecido con 200 µl de agua estéril. Las cajas de Petri fueron mantenidas a 28°C y a una humedad relativa del 80%. Se registró la mortalidad y surgimiento de hifas de los insectos diariamente (Figura 11).



**Figura 11.** Bioensayos del hongo en el triatómino. A: tren de lavado. B: transferencia de ninfas de *M. pallidipennis* a cajas Petri. C: insectos expuestos a conidios formulados en el papel filtro. D: registro de la mortalidad de las ninfas.

### **Análisis estadístico.**

*Vida de anaquel y condiciones de almacenamiento:* El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. La variable de respuesta fue la viabilidad calculada por el porcentaje de germinación. Para las variables representadas en porcentaje se realizó una transformación angular  $\arcsen \sqrt{\frac{\%}{100}}$ . Se realizó un ANOVA y comparación múltiple de medias mediante el análisis estadístico de Tukey ( $\alpha$  0.05). (SAS 9.1 Institute Inc., 2000).

*La exposición a la radiación ultravioleta (UV-C) y Termotolerancia:* igual que la evaluación de la vida de anaquel la variable evaluada fue la viabilidad medida mediante el porcentaje de germinación como indicador del número de conidios que sobrevivieron a la exposición de la radiación y a exposición a altas temperaturas, respectivamente.

*Funcionalidad de los prototipos mediante bioensayos de triatóminos en el laboratorio:* Para determinar el TSM se utilizó el análisis estadístico de Log-rank empleando el Kaplan-Meier para las diferencias entre curva y el tiempo de sobrevivencia media (TSM  $\pm$  ES) (GraphPad Prism).

## RESULTADOS

Se seleccionó un cultivo monospórico de la cepa *M. anisopliae* EH-473/4 previamente caracterizada (Toriello *et al.*, 2006; 2008). Para todos los experimentos que se llevaron a cabo, la cepa se reactivó previamente para infectar triatóminos con el objetivo de mantener al hongo virulento en el insecto transmisor de la enfermedad de Chagas. Este paso es relevante porque se conoce que las cepas de hongos mantenidos por mucho tiempo en las colecciones de cultivos de las instituciones pueden perder la virulencia (Butt *et al.*, 2006).

### **Determinación de parámetros de calidad: concentración conidial, porcentaje humedad, viabilidad y pureza**

La concentración de conidios de *M. anisopliae* varió del 1.92 a 7.32 x 10<sup>9</sup> conidios/g de arroz. Después del proceso de deshumidificación de los conidios cosechados se obtuvo una concentración de 1.36 a 4.56 x 10<sup>10</sup> conidios por 100 mg (deshumidificados). El contenido de humedad de los conidios recién cosechados fue entre el 35 al 42% y se redujo este porcentaje en un deshumidificador (Sanplatec, Dry-Keeper) hasta obtener una humedad entre 5-8.5%. La viabilidad de los conidios producidos fue siempre mayor a 90% y la pureza calculada por el número de UFC siempre fue mayor al 95% (Tabla 7).

**Tabla 7. Parámetros de calidad de conidios de *M. anisopliae*\***

Concentración de conidios/ g de arroz	Concentración conidios deshumidificados /100 mg	Porcentaje de humedad	Porcentaje de viabilidad conidios deshumidificados	Porcentaje de pureza conidios deshumidificados
4.64 x 10 <sup>9</sup>	2.63 x 10 <sup>10</sup>	7.3%	94%	98%

\*Promedio de 4 lotes (3 muestras independientes)

Inmediatamente después del proceso de formulación, los valores promedio de la viabilidad fueron siempre superiores al 88% para todos los prototipos de formulación después de 24 h de incubación. Se encontró una pureza promedio del 90 al 95% para todas las formulaciones (Tabla 8).

**Tabla 8. Parámetros de viabilidad y pureza de prototipos de formulación de *M. anisopliae***

Prototipo	Fórmula	Viabilidad % de germinación	Pureza % UFC hongo
1	C+TD4	94	95.66
2	C+TD4+Vit.E	95.66	94.33
3	C+ TD4+ZnO	96.33	93.66
4	C+TD4+Lec.S	88.66	91.66
5	C+TD4+Mix	90.66	92.33
6	C+Ca	96.66	94
7	C+Ca+Vit.E	97	93.33
8	C+Ca+ZnO	97.33	94
9	C+Ca+Lec.S	89	90.66
10	C+Ca+Mix	90	91.66
11	C+TD2	92.66	92.66
12	C+TD2+Vit.E	93.33	93.33
13	C+TD2+ZnO	93	94.66
14	C+TD2+Lec.S	88	95.33
15	C+TD2+Mix	88.66	92.33

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); TD2: tierra de diatomeas Celite281; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix =vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya.

### **Vida de anaquel y condiciones de almacenamiento**

Cuando los conidios sin formular y conidios contenidos en formulaciones fueron empaquetados y almacenados a las diferentes temperaturas, se evidenció una disminución progresiva en la capacidad de germinación de los conidios durante 12 semanas de almacenamiento, presentando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) como se puede observar en la tabla 9. Con respecto a la temperatura de almacenamiento se observó que a  $-20$  y  $4^{\circ}\text{C}$  independientemente de la formulación, no se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la viabilidad del hongo. Entre estas temperaturas, se mantiene una viabilidad mayor en comparación con la temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$ .

Las formulaciones almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  después de 12 semanas, mostraron una viabilidad conidial de 86 y 84% para la formulación C+Ca y C+TD4, respectivamente, mientras que la formulación C+TD2 presentó una viabilidad del 80.33% y los conidios sin formular de 78%. A  $4^{\circ}\text{C}$  se obtuvieron valores similares,

86.33, 84.66 y 82% para la formulación C+Ca, C+TD4 y C+TD2, respectivamente, mientras que los conidios sin formular del 78.66%. A 28°C la disminución de la viabilidad de conidios fue más pronunciada con porcentajes de germinación de 69.66, 63 y 62.33% para las formulaciones C+Ca, C+TD4 y C+TD2, respectivamente, mientras que los conidios sin formular mostraron un 59%. Se observaron diferencias entre los tratamientos y la reducción de la viabilidad a 28°C (Prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

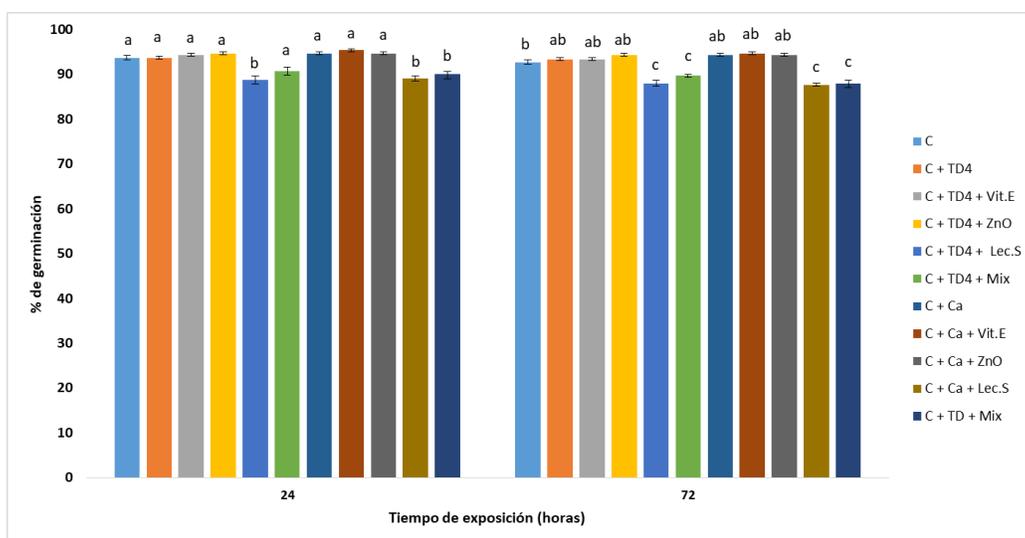
**Tabla 9. Porcentaje de germinación (viabilidad) de conidios formulados y sin formular de *M. anisopliae* almacenados a diferentes temperaturas**

Prototipos de formulación	Semana	Temperatura de almacenamiento					
		-20°C		4°C		28°C	
C	1	93	A a	93.33	A a	92	A a
	2	91	A ab	91.66	A b	90.66	A ab
	3	90.33	A b	90.66	A bc	87.66	B b
	4	87.66	A c	88.66	A c	84.66	B c
	8	82.33	A d	83	A d	80.33	B c
	12	78	A d	78.66	A e	59	B d
C+Ca	1	94.66	A a	94.66	A a	93.66	A a
	2	92	A b	93	A ab	92.33	A ab
	3	90.66	A bc	91	A b	89.33	A b
	4	89	A cd	89.33	A c	85.66	B c
	8	87	A de	87.33	A c	83	B c
	12	86	A e	86.33	A d	69.66	B d
C+TD4	1	93	A a	93.66	A a	93.33	A a
	2	91.66	A b	92.33	A a	91	A ab
	3	88.66	A c	90.66	AB b	86.66	B b
	4	88	A d	88.33	A c	81	B c
	8	86.66	A d	86.33	A d	74.33	B c
	12	84	A e	84.66	A d	63	B d
C+TD2	1	92.66	A a	92.66	A a	93	A a
	2	91	A a	91.66	A a	89.33	A ab
	3	90	A a	90.33	A a	85	B b
	4	86	A b	87	A b	79.33	B c
	8	83.33	A bc	84	A bc	73.33	B c
	12	80.33	A c	82	A c	62.33	B d

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; TD2: tierra de diatomeas Celite 281 y Ca: Caolín. Las letras mayúsculas distintas dentro de la misma columna corresponden a la viabilidad de los conidios (C) a tres diferentes temperaturas y tres formulaciones; las letras minúsculas dentro de la misma fila indican diferencia significativa en la viabilidad del hongo en comparación con el testigo positivo (C) y tres formulaciones durante 12 semanas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

## Termotolerancia de los prototipos de formulación

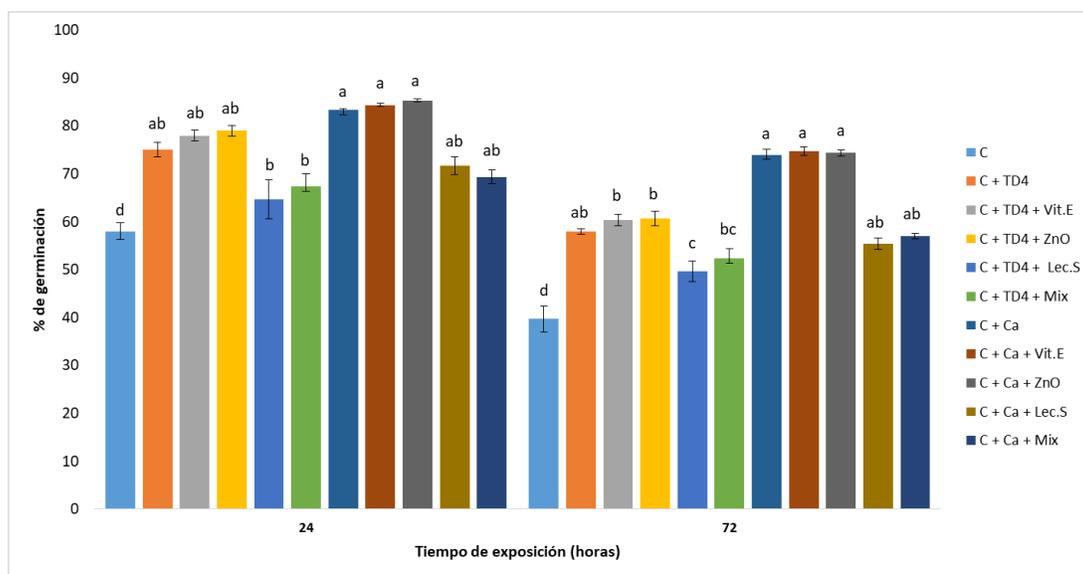
Debido a la importancia de obtener formulaciones que contengan ingredientes que favorezcan la resistencia de los conidios a altas temperaturas, se realizaron experimentos de termotolerancia, los cuales mostraron lo siguiente; las formulaciones C+TD4, C+TD4+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca, C+Ca+Vit.E, C+Ca+ZnO y los conidios sin formular presentaron porcentajes de germinación mayor al 93%, diferentes a las formulaciones C+TD4+Lec.S, C+TD+Mix, C+Ca+Lec.S y C+TD4+Mix cuya viabilidad fue menor al 90%, después de ser expuestos durante 24 h a 28°C ( $P < 0.05$ ). Cuando se almacenaron durante 72 h a 28°C la mejor formulación fue C + Ca + Vit.E con una viabilidad de 94.6% diferente de los conidios sin formular que presentaron porcentajes de germinación de 92.6% ( $P < 0.05$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* no formulados (C) y los conidios contenidos en los diez diferentes prototipos de formulación almacenados a 28°C durante 24 y 72 h. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix: vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya. Las letras encima de las columnas indican las significancias (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

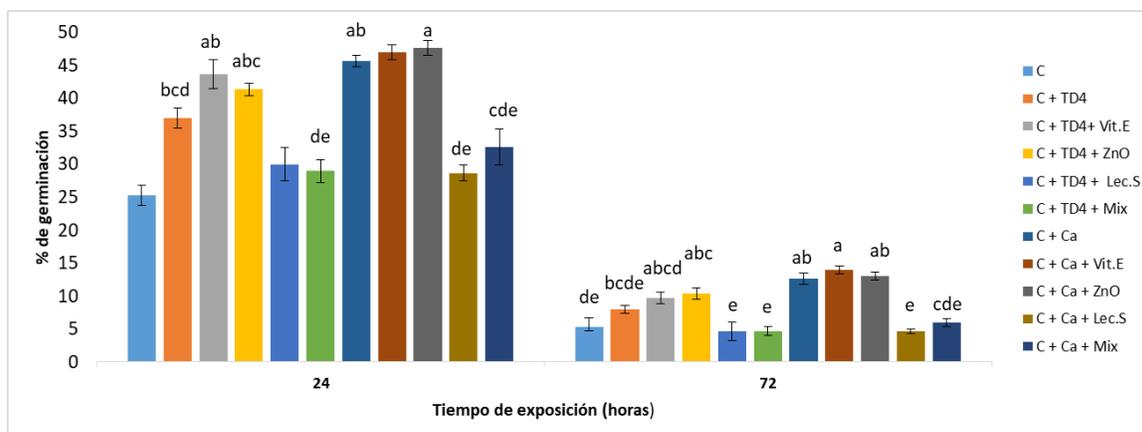
Al exponerse a 37°C durante 24 h las formulaciones C+Ca, C+Ca+Vit.E, C+Ca+ZnO presentaron germinación del 83.33, 84.33 y 85.33% respectivamente, mientras los conidios sin formular del 58% ( $P < 0.05$ ). Al ser almacenados durante 72 h las formulaciones con caolín y aquellas con caolín y adyuvantes antes mencionados

presentaron germinaciones del 74, 74.66 y 73.33% y los conidios sin formular del 39.66% ( $P < 0.05$ ) (Figura 13).



**Figura 13.** Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* no formulados (C) y los conidios contenidos en los diez diferentes prototipos de formulación almacenados a 37°C durante 24 y 72 h. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix: vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya. Las letras encima de las columnas indican las significancias (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

A 45°C durante 24 h las mejores formulaciones resultaron C+Ca+Vit.E, C+Ca+ZnO con porcentajes de germinación del 47 y 47.66% respectivamente, en comparación con los conidios sin formular con una viabilidad del 25.33% ( $P < 0.05$ ). Al ser almacenados durante 72 h los antes mencionados presentaron germinaciones del 14, 13 y los conidios sin formular de 5.33%, respectivamente (Figura 14).

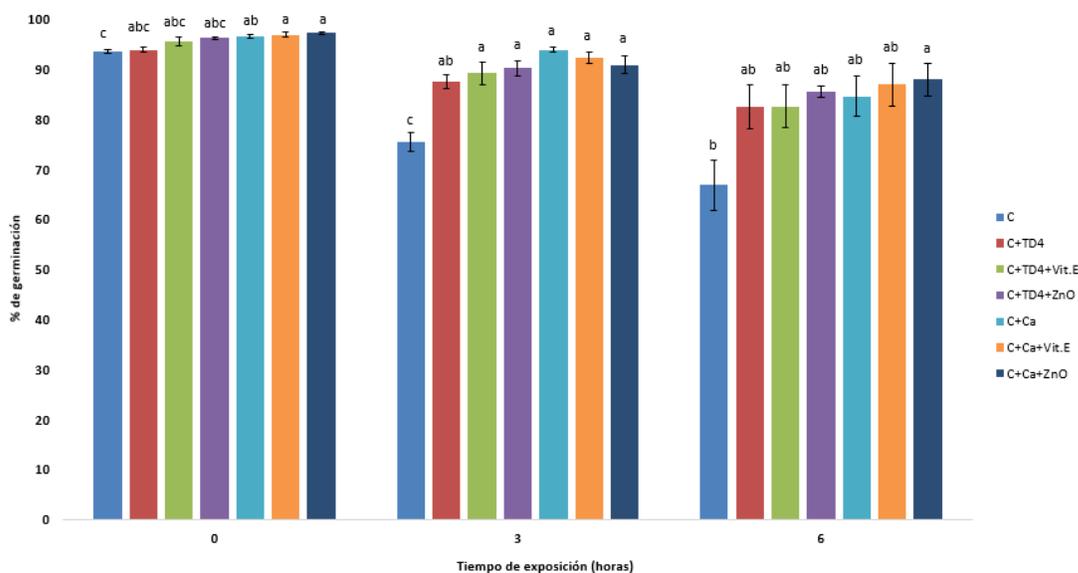


**Figura 14.** Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* no formulados (C) y los conidios contenidos en los diez diferentes prototipos de formulación almacenados a 45 °C durante 24 y 72 h.

C: conidios; TD4: tierra de diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc; Lec.S: lecitina de soya; Mix: vitamina E, óxido de zinc y lecitina de soya. Letras distintas encima de las columnas indican significancias (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

### Radiación ultravioleta (UV-C)

Los factores abióticos como la temperatura elevada ( $> 37^{\circ}\text{C}$ ) y la radiación ultravioleta (UV) limitan la sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de los hongos entomopatógenos. En el presente trabajo al evaluar la tolerancia de formulaciones en polvo con adyuvantes a la radiación UV-C se encontró que al tiempo 0 las mejores formulaciones e iguales entre ellas fueron C+Ca+Vit.E, C+Ca+ZnO con porcentajes de germinación de 97 y 97.33% diferentes de los conidios sin formular que presentaron porcentajes de germinación del 93.66% (Prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ). Después de 3 h de exposición a la radiación UV-C, se encontró que las mejores formulaciones fueron C+TD4+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca, C+Ca+Vit.E y C+Ca+ZnO con porcentajes de germinación de 89.33, 90.33, 91, 92.33 y 91%, respectivamente, con diferencias en comparación con los conidios no formulados que presentaron porcentajes de 75.66%. Cuando se expusieron por 6 h la mejor formulación fue Ca+ZnO con una viabilidad del 88% diferente a los conidios sin formular que presentaron germinación de 67% ( $P < 0.05$ ) (Figura 15).



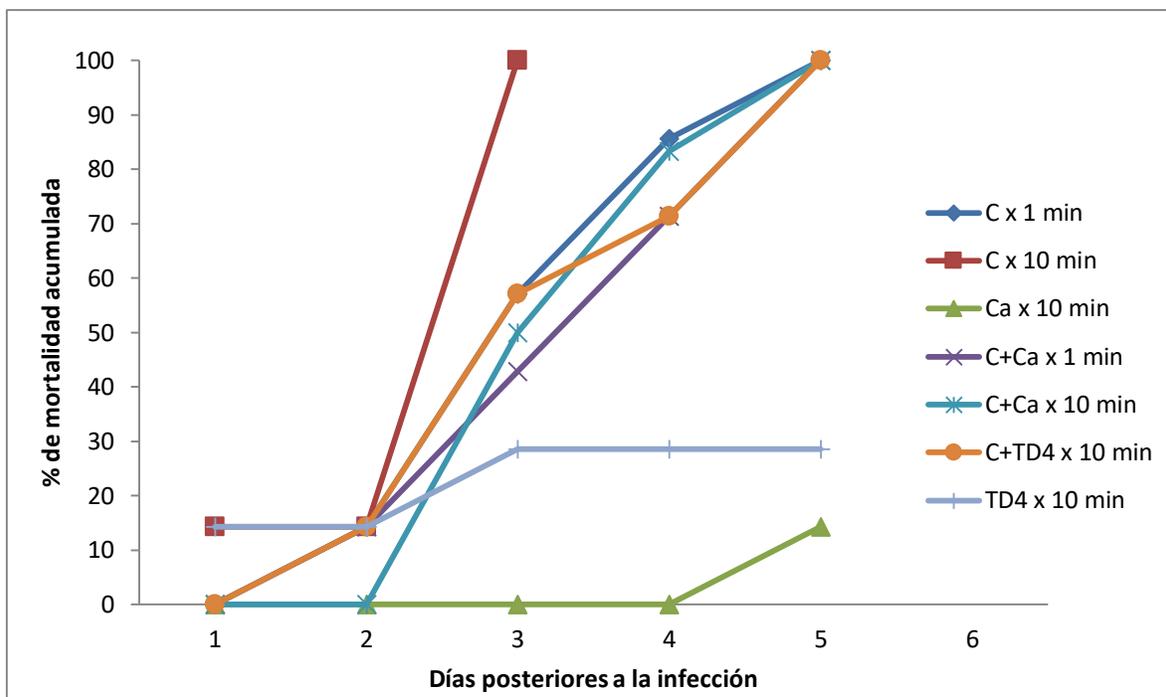
**Figura 15.** Porcentaje de germinación de conidios de *M. anisopliae* no formulados (C) y los conidios contenidos en los diferentes prototipos de formulación (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) después de 0, 3 y 6 h de exposición a UV-C. C: conidios; TD4: tierra de

diatomeas Celite 400; Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc. Las letras distintas encima de las columnas indican las diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

### **Evaluación de la funcionalidad de los prototipos de formulación**

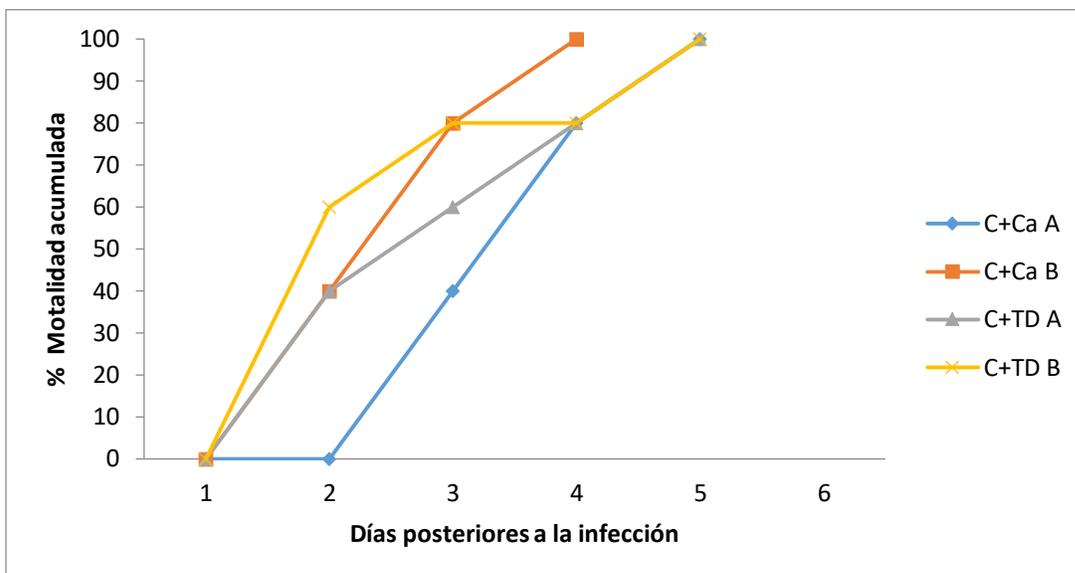
La eficacia de las formulaciones de los bioinsecticidas se determina mediante bioensayos en el insecto blanco siendo una de las herramientas de gran importancia en el control de calidad. Por lo tanto, se hicieron bioensayos de los conidios sin formular y otros formulados en el estadio N3 del triatómino *M. pallidipennis*. Para estos bioensayos que requieren de múltiples especímenes de insectos, se seleccionaron aquellos formulados que presentaron la mayor viabilidad. Los bioensayos preliminares fueron realizados para determinar el mejor tiempo de exposición y concentración de los conidios de los formulados para matar a los insectos prueba.

En el primer bioensayo preliminar con conidios sin formular se encontró una mortalidad del 100% de los triatóminos al día 5 cuando fueron expuestos al hongo durante 1 min. En el siguiente experimento los insectos se mantuvieron sobre los conidios sin formular por 10 min y la mortalidad total (100%) se observó al tercer día. Posteriormente, se hicieron los bioensayos con las formulaciones. Para los triatóminos expuestos a las formulaciones con caolín (C+Ca) la mortalidad del 100% se logró al día 5 para ambos tiempos (1 y 10 min). De igual manera ocurrió cuando se empleó la formulación con tierra de diatomea celite 400 (C+TD4). Por otra parte, cuando solo se emplearon los vehículos sin los conidios (testigo sin hongo), la mortalidad fue del 14.28 y 28.57% para caolín y tierra de diatomeas, respectivamente (Figura 16).



**Figura 16.** Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con *M. anisopliae*, en conidios no formulados y formulados (C + Ca; C + TD4) durante 1 y 10 minutos. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín.

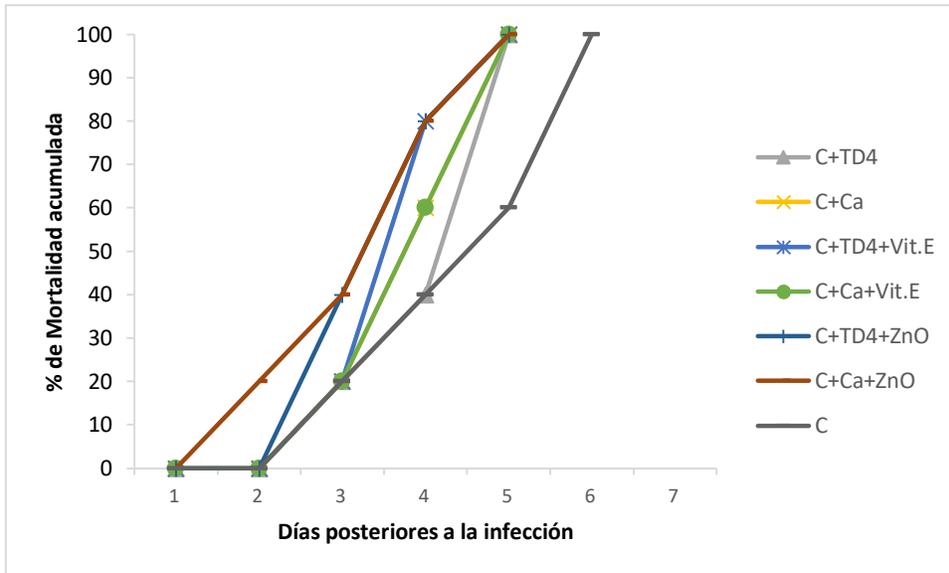
Para el segundo bioensayo, se determinaron las concentraciones de conidios más adecuadas para obtener la mayor mortalidad de los insectos. En este caso se probaron la formulación de caolín (C+Ca) y de tierra de diatomeas (C+TD4) y se usaron dos concentraciones fúngicas,  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup>. Se obtuvo una mortalidad del 100% de los insectos al día 4 cuando se utilizó la formulación de caolín a la concentración de  $2 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup>; y con las formulaciones de  $1 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup> se observó la mortalidad del 100% al día 5 (Figura 17).



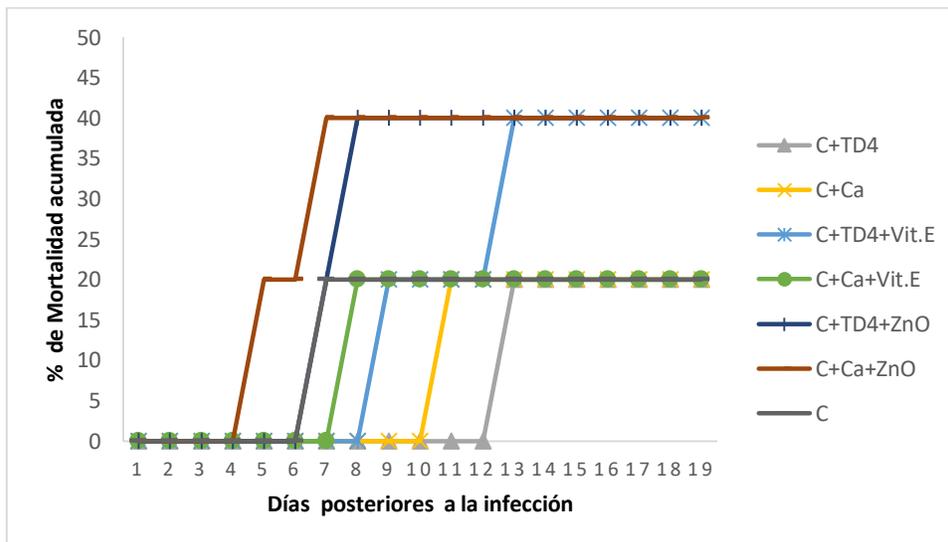
**Figura 17.** Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con *M. anisopliae* en formulaciones a diferentes dosis (A =  $1 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup>; B =  $2 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup>). C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín.

Para el tercer bioensayo, con los resultados obtenidos arriba mencionados, se emplearon conidios sin formular y formulados a una concentración promedio de  $1.5 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup> y los insectos se expusieron durante 5 min a los tratamientos. Los insectos después de ser expuestos a los tratamientos y transferidos a cajas de Petri con agar-agua (1%) presentaron una mortalidad del 100% a los 5 días para los insectos expuestos a todas las formulaciones, y los triatóminos expuestos a los conidios sin formular la mortalidad del 100% se observó al día 6 (Figura 18). Por otro lado, los triatóminos igualmente expuestos al hongo y formulaciones que fueron transferidos a cajas de Petri con papel filtro estéril posterior a su infección mostraron una mortalidad del 20 al 40% después de 19 días (Figura 19). Pero, para los triatóminos transferidos a cajas Petri con papel filtro previamente humedecido con 200 µl de agua estéril el tiempo al que se encontró la mortalidad del 100% fue diferente. Para los insectos expuestos a los conidios sin formular y la formulación C+TD4 se registró una mortalidad de 100% de los triatóminos al día 12, para los expuestos a las formulaciones C+Ca y TD4+ ZnO fue al día 11, para los expuestos a las formulaciones C+TD4+Vit.E y C+ Ca+

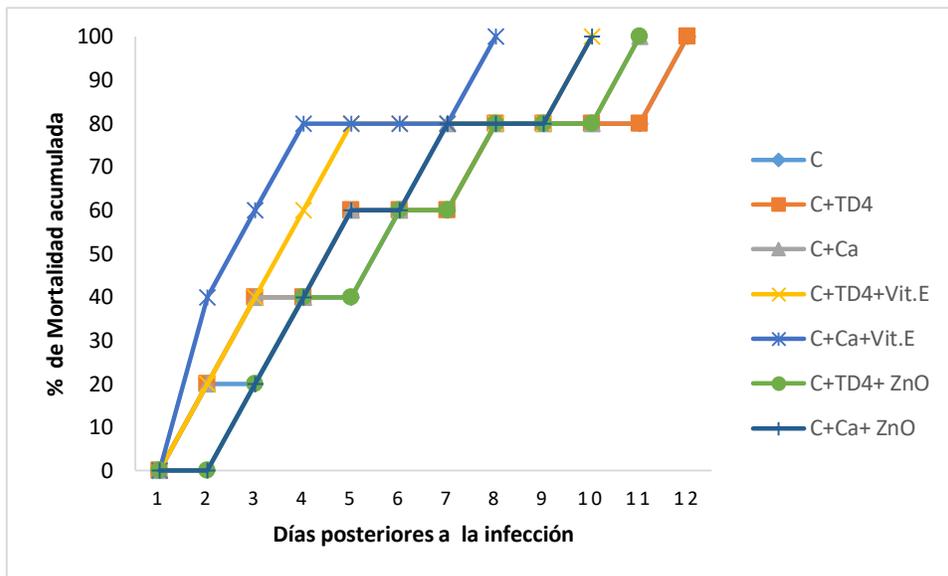
ZnO fue al día 10 y a los insectos expuestos a la formulación Ca+Vit.E fue al día 8 (Figura 20).



**Figura 18.** Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con conidios no formulados y formulados (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) de *M. anisopliae* durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con agar-agua (1%). C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.



**Figura 19.** Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con conidios no formulados y formulados de *M. anisopliae* (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con papel filtro estéril. C: conidios; TD: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.



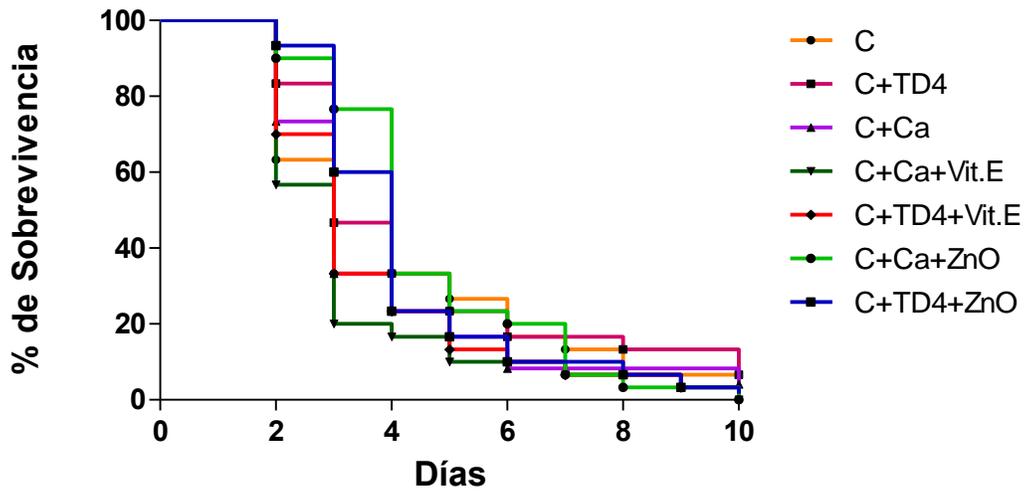
**Figura 20.** Porcentaje de mortalidad de ninfas 3 de *Meccus pallidipennis* infectadas con conidios no formulados y formulados de *M. anisopliae* (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con papel filtro previamente humedecido con 200  $\mu$ l de agua estéril. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos mediante los bioensayos preliminares se optó por emplear el tercer método transfiriendo a las ninfas a cajas de Petri con papel filtro previamente humedecido con 200  $\mu$ l de agua estéril, debido a que los resultados en estos bioensayos nos permitieron observar mayores diferencias entre las formulaciones. En estos bioensayos se encontró que a partir del segundo día se obtuvo una mortalidad acumulada de 36.66% (C), 16.66% (C+TD4), 26.66% (C+Ca), 20% (C+TD4+Vit.E), 43.33 (C+Ca+Vit.E), 6.66 (C+TD4+ZnO) y 10% (C+Ca+ZnO). Al cuarto día se encontró una mortalidad de 66.66% (C), 66.66% (C+TD4), 76.66% (C+Ca), 70% (C+TD4+Vit.E), 83.33 (C+Ca+Vit.E), 76.66 (C+TD4+ ZnO) y 66.66% (C+Ca+ZnO). Al sexto día se logró una mortalidad de 83.33% (C), 83.33% (C+TD4), 90% (C+Ca), 86.66% (C+TD4+Vit.E), 90 (C+Ca+Vit.E), 90 (C+TD4+ ZnO) y 80% (C+Ca+ZnO). La mortalidad del 100% de los triatóminos se observó a los 10 días para las formulaciones C+Ca+Vit.E y C+Ca+ZnO; a los 11 días para las formulaciones

C+TD4+Vit.E y C+TD4+ ZnO. Al día 12 se encontró una mortalidad de 96.66% para los insectos expuestos a conidios sin formular, de 93.33% y 96.66% al ser expuestos a la formulación C+TD4 y C+Ca, respectivamente. En cambio, en los triatóminos testigos (vehículos Ca y TD4 sin hongo) no hubo emergencia de micelio y la mayoría de los insectos testigo sobrevivieron al final del período del bioensayo, con un porcentaje de mortalidad de los insectos expuestos a caolín de 3.33% y para los expuestos a tierra de diatomeas del 6.66% (Tablas 10; Figura 21). El análisis de sobrevivencia (Kaplan-Meier) mostró que las ninfas que fueron expuestas a los conidios sin formular y aquellas que fueron expuestas a las seis formulaciones, no presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ , Figura 21). El TMS de los triatóminos expuestas al hongo sin formular (C) y a las formulaciones C+TD4, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E fue de 3 días, para los insectos expuestos a las formulaciones C+TD+ZnO y C+Ca+ZnO el TMS fue de 4 días para ambos.

**Tabla 10. Mortalidad acumulada de ninfas en estadio N3 de *M. pallidipennis* expuestas a vehículos (TD4: tierra de diatomeas y Ca: Caolín), conidios sin formular (C) de *M. anisopliae* (EH-473/4) y conidios formulados**

Días	TD	Ca	C	C+TD	C+Ca	C+TD4+Vit.E	C+Ca+Vit.E	C+TD4+ZnO	C+Ca+ZnO
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	36.66	16.66	26.66	20	43.33	6.66	10
3	0	0	66.66	53.33	66.66	53.33	80	40	23.33
4	0	0	66.66	66.66	76.66	70	83.33	76.66	66.66
5	0	0	76.66	76.66	83.33	80	86.66	83.33	76.66
6	3.33	0	83.33	83.33	90	86.66	90	90	80
7	3.33	0	86.66	83.33	90	93.33	93.33	90	93.33
8	3.33	3.33	93.33	86.66	90	93.33	93.33	93.33	96.66
9	6.66	3.33	93.33	86.66	90	93.33	96.33	96.66	96.66
10	6.66	3.33	93.33	93.33	93.33	93.33	100	96.66	100
11	6.66	3.33	96.66	93.33	93.33	100		100	
12	6.66	3.33	96.66	93.33	96.66				



**Figura 21.** Curva de porcentaje de supervivencia del estadio ninfal 3 de *M. pallidipennis* infectados con conidios no formulados (C) y formulados (C+TD, C+Ca, C+TD4+Vit.E, C+Ca+Vit.E, C+TD4+ZnO, C+Ca+ZnO) de *M. anisopliae* (EH-473/4) expuestos durante durante 5 min y transferidos a cajas de Petri con papel filtro previamente humedecido con 200  $\mu$ l de agua estéril. C: conidios; TD4: tierra de diatomeas (Celite 400); Ca: caolín; Vit.E: vitamina E; ZnO: óxido de zinc.

## DISCUSIÓN

Existen diferentes requisitos para que un hongo entomopatógeno sea considerado un agente de control biológico de insectos plaga; uno de esos requisitos es que las tasas de producción de propágulos infectivos sean altas. Por lo cual se continúa en la búsqueda de estrategias para mejorar el proceso de producción de estos propágulos fúngicos a fin de ser empleados como ingrediente activo en la elaboración de micoinsecticidas. Por otro lado, en ambientes tropicales, las temperaturas superiores a 30°C son muy comunes durante la primavera y el verano, por lo tanto, es importante conocer la capacidad de los conidios formulados para germinar a diferentes rangos de temperatura. Por ello, se desarrollan formulaciones con los hongos entomopatógenos, constituidas de vehículos inertes y adyuvantes que les puedan conferir protección a la temperatura y a la luz UV del medio ambiente.

En este estudio el rendimiento de producción promedio fue de  $4.64 \times 10^9$  conidios /g de arroz y se obtuvo una concentración de  $2.63 \times 10^{10}$  conidios deshumidificados en 100 mg de conidios; esto coincide con los resultados informados por Barajas *et al.* (2010) para el hongo *M. anisopliae* con arroz como sustrato y rendimientos de  $10^9$  conidios/g de arroz. En trabajos previos se ha observado que la mayoría de las especies de hongos entomopatógenos producidos en arroz han alcanzado rendimientos del orden de  $10^9$  conidios/g (Jenkins *et al.*, 1998; Bhanu *et al.*, 2008). En otro estudio con el hongo *Nomuraea rileyi* (Mendez *et al.*, 2009) reportaron rendimientos de  $8.93 \times 10^9$  conidios/g de sustrato y  $2.7 \times 10^{11}$  conidios/g de polvo conidial utilizando como sustrato arroz. Murillo *et al.* (2015) reportaron la producción de conidios del hongo *I. fumosorosea* (ahora *Cordyceps javanica*, Kepler *et al.*, 2017) en sustratos sólidos como el arroz, plátano y mazorca de maíz con  $5.33 \times 10^9$ ,  $5.24 \times 10^9$  y  $4.8 \times 10^9$  conidios/g de sustrato, respectivamente, dando resultados muy similares a los arriba mencionados. Pham *et al.* (2010) también produjeron conidios de *B. bassiana* con arroz como sustrato. La producción obtenida en este estudio fue de 4.05 g de conidios/100 g de arroz, mientras que en otra investigación Taylor *et al.*, (2013) reportaron  $10^8$  a  $10^9$  conidios de *B. bassiana* /g

de arroz. Todos estos estudios muestran que el arroz es un sustrato excelente para la producción de conidios de hongos entomopatógenos.

Los parámetros de calidad como viabilidad, pureza, vida de anaquel y virulencia juegan asimismo, un papel importante en la evaluación de la eficiencia de bioinsecticidas (Jenkins *et al.*, 1998). En nuestro trabajo todos los prototipos de formulación mostraron una germinación mayor al 88%; característica deseable, debido a que los conidios de los hongos entomopatógenos deben presentar un rápido desarrollo del tubo germinativo, para acelerar el proceso infectivo y disminuir el tiempo de exposición a factores ambientales adversos como la radiación UV y temperatura cuando son aplicados en campo (Hajek y St. Leger 1994; Goettel e Inglis 1997). Una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas (Vélez *et al.*, 1997, Jenkins y Grzywacz 2000).

La pureza del bioinsecticida en este trabajo osciló entre 90 y 95% para todas las formulaciones, por encima del 90% recomendado por los estándares de control de calidad para los hongos entomopatógenos. Los microorganismos contaminantes que podrían encontrarse y ser permitidos, no deben causar daño a la salud humana, animal, vegetal ni al medio ambiente (Vélez *et al.*, 1997; Bastidas *et al.*, 2009).

Uno de los principales objetivos de la formulación de microorganismos para el control de insectos es evitar la pérdida de viabilidad del agente de control en almacenamiento (Burges 1998, Fravel, 2005). Por ello se deben de buscar nuevas formulaciones que permitan aumentar su vida de anaquel conservando su viabilidad. Al evaluar la vida de anaquel de los conidios formulados y almacenados a diferentes temperaturas durante un período de 3 meses, se encontró que la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* estudiado se redujo con el tiempo, dependiendo de las temperaturas de almacenamiento. Sin embargo, las formulaciones almacenadas a -20 y 4 ° C mantuvieron una alta germinación durante un período de tiempo más prolongado que las formulaciones a 28°C. Estos resultados coinciden con los reportados por Noor Hisham *et al.* (2005) donde mostraron que conidios de *M. anisopliae* también formulados en polvo utilizando

caolín como vehículo inerte almacenados a 5 y 15 ° C mantuvieron una viabilidad del 51.6 y 58.8 % respectivamente, después de 15 meses de almacenamiento; mientras que a una temperatura de 25 °C, la viabilidad de las esporas se redujo gradualmente desde 52.2% a los 9 meses, 28.5% a los 12 meses y 1.7% a los 15 meses. En otro trabajo, Hernández-Velásquez (2003) evaluó la viabilidad de conidios de *Metarhizium acridum* formulados en tierra de diatomeas Celite 289 y Celite 400 almacenados a 6°C. Después de 12 semanas de almacenamiento los conidios sin formular y los conidios formulados con Celite 289 presentaron viabilidades de 90.69 y 91.94% y Celite 400 tan solo del 77.75%; cuando las formulaciones fueron almacenadas por 60 semanas se encontró que tanto los conidios no formulados y con Celite 289 presentaron 87 y 86% de viabilidad; y con Celite 400 el porcentaje de germinación fue de 65.24%. Los conidios de *M. flavoviride*, utilizado para el control de la plaga de la langosta, formulados en aceite de queroseno y soya almacenados a 25°C mostraron una viabilidad mayor al 30% después de 6 semanas. Se observaron mejores resultados cuando las formulaciones fueron almacenadas a 5 y 15°C resultando en una viabilidad conidial de 71.9% con queroseno y 92.1% con soya después de 14 semanas de almacenamiento (Stathers et al., 1993). En otro trabajo, Hernández-Velásquez *et al.* (2000) evaluaron formulaciones de conidios de *M. anisopliae* con tres aceites: mezcla de aceite vegetales, queroseno y citrolina almacenada a temperatura de 7 y 27°C. De los tres aceites evaluados, se determinó que la citrolina produce un mayor porcentaje de germinación en ambas temperaturas a los 40 días; en la mezcla de aceites vegetales el porcentaje de germinación decreció alrededor del 50% en 15 días en ambas temperaturas y en queroseno, la viabilidad de los conidios permaneció cerca del 80% a 7°C, pero decreció rápidamente a 27°C.

Otras especies de hongos entomopatógenos formulados con vehículos inertes sólidos también han demostrado mayor viabilidad cuando son almacenados a temperaturas inferiores a 10°C. Por ejemplo, conidios de *B. bassiana* fueron formulados utilizando como vehículo bentonita y tierra de diatomeas y almacenados a temperaturas de 0, 7 y 27°C. Después de 180 días de almacenamiento los

conidios que presentaron mayor porcentaje de germinación fueron los almacenados a temperatura de 0 y 7°C (Berlanga *et al.* 1996).

Entre los factores más importantes para que una formulación de un bioinsecticida pueda ser empleada comercialmente, es el mantenimiento de la viabilidad y la virulencia de las unidades infectivas durante el almacenamiento y después de la aplicación. En general, antes de la aplicación se requiere que el producto mantenga sus propiedades durante al menos un año (Jackson *et al.*, 2010, Couch y Ignoffo, 1981). La exposición a altas temperaturas durante el transporte y el almacenamiento pueden afectar la viabilidad del ingrediente activo. Además, posterior a la aplicación de la formulación del micoinsecticida las condiciones del medio ambiente, en particular, altas temperaturas, la radiación solar y la humedad relativa son cruciales para la supervivencia, persistencia y la infectividad del propágalo fúngico (Lecuona y Alves, 1995; Castrillo *et al.*, 2005).

Los resultados de este estudio muestran que la viabilidad conidial se vio afectada por altas temperaturas y el tiempo de almacenamiento. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser comparados con diversos estudios que han reportado que las especies dentro de este género son mesofílicas con crecimiento de 10 a 40°C, el rango de temperatura óptima para su germinación y crecimiento de 25 a 30°C (Roberts y Campbell, 1977; Avila y Umaña, 1988; Fargues *et al.* 1992; Berlanga y Hernández, 2002) mientras que temperaturas de 55 a 60°C causan la muerte de los conidios (Walstad *et al.* 1970). Las temperaturas óptimas para el crecimiento de los aislados de México son 25 y 30°C. Sin embargo, algunas cepas han mostrado crecimiento a 35°C (Toriello *et al.* 2008; Brunner *et al.*, 2016; Navarro-Barranco *et al.*, 2019), lo que sugiere el ambiente tropical de las cepas estudiadas.

En un estudio, Keyser *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la exposición de aislados de *Metarhizium* a 40°C por diferentes periodos de tiempo, encontrando que los aislados sometidos a altas temperaturas sobreviven, sin embargo, la exposición a 40°C afecta de una forma importante el crecimiento, y cuando los conidios son llevados a una temperatura de incubación de 28°C el inicio del proceso de germinación se retrasa.

El punto de muerte térmica para conidios de *B. bassiana* reportados por Liu *et al.* (2009) está entre 45°C y 50°C. En otro trabajo, Fernandes *et al.* (2010) encontraron que a medida que incrementa el tiempo de exposición a temperaturas altas (45°C), los aislados de *Metarhizium spp.* disminuyen su germinación.

Sy *et al.* (2016) evaluaron el uso de materiales volcánicos para aumentar la termotolerancia de los conidios de *B. bassiana*. Las formulaciones se almacenaron a temperatura ambiente durante 30 días y luego se expusieron a 50°C durante dos horas, los conidios no formulados y las formulaciones con roca del volcán Puyehue y Palo Blanco mostraron una viabilidad de 72.8, 65.9, 69.5%, respectivamente, significativamente mayor en comparación con las formulaciones de zeolita y gel de sílice con una viabilidad menor al 30%.

La radiación ultravioleta (UV) es otro de los factores limitantes al emplear bioinsecticidas en el campo. La radiación UV-C tiene menor longitud de onda que la tipo A y tipo B, por lo que posee mayor energía y causa un daño mayor que el originado por los otros dos tipos de radiación UV (Grijalba *et al.*, 2009).

En este trabajo de investigación se observó la disminución de germinación de conidios en función del tiempo de exposición a la radiación UV-C. Sin embargo, las formulaciones que contenían caolín como vehículo inerte e incluían adyuvantes (vitamina E y óxido de zinc) protegieron al hongo, ya que se encontró que la viabilidad de los conidios sin formular y expuestos a esta radiación disminuyó significativamente con respecto a los conidios formulados, confirmando la eficacia de los adyuvantes contra la luz UV-C. El comportamiento biológico de los conidios fúngicos observado en este trabajo confirma lo reportado por otros investigadores. Por ejemplo, los hongos entomopatógenos *Paecilomyces sp.* y *B. bassiana* formulados como polvos humectables fueron expuestos durante 3, 6 y 24 h a radiación ultravioleta C (UV-C) en condiciones de laboratorio y expuestos a radiación solar durante 6 horas. Los conidios sin formular de *Paecilomyces sp.* expuestos a la radiación UV-C no presentaron una reducción significativa de su capacidad de germinación aún después de 24 h; mientras que la radiación solar redujo su viabilidad, los conidios sin formular presentaron una germinación de 57%

y los conidios formulados de 58%. Contrario a lo que ocurrió con los conidios de *B. bassiana*, tanto la radiación UV-C y la luz solar disminuyeron la germinación de conidios, a las 24 h de exposición UV-C los conidios sin formular presentaron una germinación de 57%. Cuando fueron expuestos a radiación solar los conidios de *B. bassiana* sin formular presentaron una germinación 54% y los conidios formulados de 73.64%, lo que indica que para este hongo la formulación protegió a los conidios de la radiación solar (Grijalba *et al.*, 2009).

La eficacia de los hongos contra los insectos puede aumentarse mediante métodos apropiados de formulación (De Faria y Wraight, 2007). En este estudio se observó que las ninfas de *M. pallidipennis* expuestas durante 5 min a una superficie de papel filtro estéril con conidios de *M. anisopliae* (EH-473/4) contenidos en 6 diferentes formulaciones en polvo empleando como vehículos inertes caolín y tierra de diatomeas Celite 400 y como adyuvante vitamina E y/o óxido de zinc y conidios sin formular (testigo positivo) aplicados a una concentración promedio de  $1.5 \times 10^6$  conidios/cm<sup>2</sup>. Se encontró que los triatóminos fueron altamente susceptibles a todos los tratamientos utilizados, mostrando una mortalidad superior al 93% en el día 10 del bioensayo con un TSM < 4 días. Además, se observó que los insectos exhibieron un comportamiento de camuflaje usando sus patas delanteras para cubrirse con la formulación en polvo en todo su cuerpo, tal comportamiento también fue reportado por Forlanni *et al.*, 2015 que demostraron la utilidad de una formulación en polvo de *B. bassiana* y tierra de diatomeas contra *T. infestans* encontrando una mortalidad de los insectos significativamente mayor a 59% cuando la formulación se combinó con una señal de agregación, en comparación con 33% de mortalidad cuando la caja de infección contenía solo el hongo.

Nuestros resultados muestran una virulencia similar de la misma cepa evaluada y también con el mismo triatómino reportada en trabajos previos desarrollados por nuestro equipo de investigación con suspensiones de conidios sin formular y con una formulación líquida (aceite adyuvante emulsionable) aplicadas directamente al pronoto de las ninfas. En los bioensayos con la cepa EH-473/4 no formulada probada en N2 la mortalidad del 100% se alcanzó al día 7 con un TSM de 4 días,

para N3 y N4 la mortalidad 100% se alcanzó en el día 8 con un TSM de 4 días para ambos estadios; en N5 mortalidad del 100% en el día 8 y un TSM en el día 5 (Jiménez-Santiago, 2016, Flores-Villegas *et al.*, 2016; Toriello *et al.*, 2017). Cuando se empleó la formulación líquida en N3 de *M. pallidipennis* se encontró una mortalidad de 97.33% al día 8 y un TSM de 5.5 días (Murillo *et al.*, 2019).

Diversos trabajos de investigación se han enfocado en probar cepas de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria* con una alta virulencia contra varias especies de triatominos de importancia epidemiológica. Incluyendo *R. prolixus*, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *P. megistus*, *T. sordida* con resultados alentadores (Romaña y Fargues, 1992; Luz y Fargues 1997; Luz *et al.*, 1998, Luz *et al.*, 2004; Rocha y Luz 2011; Forlani *et al.*, 2015), inclusive a nivel de campo con resultados promisorios (Pedrini *et al.*, 2009).

Luz *et al.* (2012) expusieron N3 de *T. infestans* a superficies tratadas con conidios de *M. anisopliae* formulados con tierra de diatomeas (DE) y/o un aceite vegetal. (oil). Cuando los insectos infectados fueron mantenidos a 75% de HR y a 25°C, los conidios no formulados (IP 46) causaron solo 25% de mortalidad después de 25 días de exposición, las formulaciones IP 46+DE una mortalidad 65 %, IP 46+oil de 77.5% y IP 46+DE+oil mostraron una mortalidad del 100%. En los bioensayos donde los triatominos infectados fueron mantenidos a humedades cercanas a la saturación (98%), todas las ninfas murieron al día 10 posterior a exposición de los conidios sin formular y los conidios formulados, independientemente de los aditivos probados

En pruebas de campo en el norte de Argentina para el control de *T. infestans*, Pedrini *et al.* (2009) obtuvieron un 52.4% de mortalidad de los insectos recolectados debido a la infección fúngica de *B. bassiana* formulado con tierra de diatomea. En otro bioensayo llevado a cabo en pruebas de semicampo en Brasil. Se aplicó una formulación de aceite-agua con *B. bassiana* ( $1 \times 10^6$  conidios / cm<sup>2</sup>) en gallineros infestados con *T. sordida*. Los resultados mostraron una mortalidad inicial del 34% en el día 10 y del 61.5% en el día 25 (Luz *et al.* 2004).

Sin embargo, hasta la fecha todavía no hay un micoinsecticida comercializado y disponible para su uso contra los insectos triatóminos.

## CONCLUSIONES

- Los conidios formulados y sin formular mantienen una viabilidad > 84% cuando son almacenados a temperaturas de -20°C y 4°C en comparación a la exposición a 28°C.
- Las formulaciones que contienen como vehículo caolín, caolín con vitamina E y óxido de zinc confieren mayor protección térmica a las temperaturas de 37 y 45°C, y permiten la germinación después de la exposición a radiación UV-C.
- Los vehículos de formulación caolín y tierra de diatomeas Celite 400 junto con los adyuvantes vitamina E y/o óxido de zinc no afectan la germinación de los conidios
- Los conidios sin formular y los conidios de las formulaciones con el hongo *M. anisopliae* produjeron en N3 de *M. pallidipennis* una mortalidad superior al 93%
- Las formulaciones probadas fueron funcionales y cumplen con el objetivo de conferir protección a temperaturas mayores 28°C y luz ultravioleta (UV-C), que son factores limitantes en el funcionamiento de los agentes de control biológico.

## PERSPECTIVAS

- Diseñar y desarrollar un dispositivo (trampa) que contenga la formulación de caolín + vitamina E+ Óxido de Zinc y otros compuesto como adyuvantes y atrayentes para ayudar en el combate del insecto vector de la enfermedad de Chagas.
- Evaluar el dispositivo (trampa) en condiciones de laboratorio y en campo

## LITERATURA CITADA

- Avila E, Umaña I. (1988). Aspectos de la biología y patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, sobre *Aenolamia varia* (F). Revista ICA. 23: 155-166.
- Alves SB (1986) Controle microbiano de insectos. Sac Paulo, Manole: 407.
- Alzogaray, RA. (2006). El control químico de *Triatoma infestans* en Argentina. Retel Revista de Toxicología en línea, 1: 1-18.
- Akbar W, Lord JC, Nechols JR, Howard RW. (2004). Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. Journal of Economic Entomology, 97: 273-280.
- Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Andris NS. (2004). Insecticidal effect of three diatomaceous earth formulations against adults of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) on oat, rye and triticale. Journal of Economic Entomology, 97: 2160-2167.
- Athanassiou CG, Steenberg T. (2007). Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granaries* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Biological Control, 40: 411-416.
- Barajas CG, del Pozo EM, García I, y Méndez A. (2010). Obtención de conidios del aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. Revista de Protección Vegetal: 174-180.
- Bargues MD, Schofield CJ, Dujardin JP. (2010). Classification and phylogeny of the Triatominae. En: Telleria J, Tibayrenc M (eds). American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. Elsevier, Amsterdam, pp 117-147.
- Barron, GL. (1983). The Genera of Hyphomycetes from Soil. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabor, Florida: 33- 35.
- Bastidas A, Velásquez SE, Marín P, Benavides P, Bustillo AE, Orozco FJ. (2009). Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (bálsamo) Vuillemin para el control de la broca del café. Agronomía, 17: 44-61.
- Bateman RP, Alves RT. (2000). Delivery systems for mycoinsecticides using oil-based formulations. Aspects of Applied Biology, 57: 163-170.
- Batta YA. (2008). Control of main stored grain insects with new formulations of entomopathogenic fungi in diatomaceous earth dusts. International Journal of Food Engineering, 4: 56-64.
- Benítez-Alva JI, Herón-Huerta, Téllez-Rendón JL. (2012). Distribución de triatominos (Heteroptera: Reduviidae) asociados a la vivienda humana y posibles zonas de riesgo en seis estados de la República Mexicana. Biología, Ciencia y Tecnología, 17: 327-340.
- Bhanu Prakash GVS, Padmaja V, Siva Kiran RR. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. Bioresource Technology, 99: 1530-1537.
- Brunner-Mendoza C, Moonjely S, Reyes-Montes MR, Toriello C, Bidochka M. (2017). Physiological and phylogenetic variability of Mexican *Metarhizium* strains Biological Control 62: 779-791.

- Burges HD. (1998). Formulation of Mycoinsecticides. En: Burges HD (eds). Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. pp. 131–185. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston Londres, pp. 412.
- Butt TM, Goettel MS. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. En: Navon, A. Ascher KRS (eds). Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, CAB International, Wallingford, UK, pp.141-195.
- Butt TM, Jackson C, Magan N. (2001). En: Butt TM, Jackson C, Magan N. (eds.). Introduction Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: Fungi as Biocontrol Agents CABI Publishing, Wallingford: 1-8.
- Butt TM, Wang C, Shah FA, Hall. R. (2006). Degeneration of entomogenous fungi. En: Eilenberg J, Hokkanen HMT. (eds). An ecological and societal approach to biological control. Springer, Netherlands: 213-226.
- Carballo M. (1998). Formulación de hongos entomopatógenos. Revista Manejo Integrado de Plagas, 47: 1-4.
- Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock I, Galíndez I, Jurberg J, Galvão C, Mena CA, Noireau F. (1999). Geographical distribution and Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. En: Carcavallo RU, I. Galindez, Jurberg J. and Lent H (eds.). Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 747-792.
- Castrillo LA, Roberts DW, Vandenberg JD. (2005). The fungal past, present and future: germination, ramification and reproduction. Journal of Invertebrate Pathology, 89:45-56.
- Carabarin A, González MC, Rodríguez O, Baylón L, Rosales JL, Reyes PA, Arce M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: Anupdate. Acta Tropica, 127: 126-135.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, COFEPRIS. (2005). Reglamento en material de registros, autorizaciones de importación y exportación y certificados de exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias y materiales tóxicos y peligrosos, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 28 de diciembre del 2004 y vigentes a partir de 29 de marzo del 2005
- Couch TL, Ignoffo CM. (1981). Formulation of insect pathogens. En: Burges, H. D (ed). Microbial Control of Pests and Plant Diseases. Academic Press, pp. 621-634.
- Dal Bello GM, Padín S, Juárez MP, Pedrini N, De Giusto M. (2006). Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus orizae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains Biocontrol Science and Technology, 16: 215-220.
- De Faria MR, Wraight SP. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological Control 43: 237-256.
- Dumonteil E, Ruíz H, Rodríguez E, Barrera M, Ramírez MJ, Rabinovich JE, Menu F. (2004). Reinfestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intradomicile insecticide application in the Yucatán Peninsula, Mexico. Memorias del Instituto. Oswaldo Cruz, 99: 253-256.
- Fang W, Pei Y, Bidochka MJ. (2007). A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. Microbiology. 153: 17-25.
- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Vidal C, Lacey LA, Lomer CJ, Rougier M. (1996). Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. Mycopathologia, 135: 171-181.
- Fravel DR (2005). Commercialization and implementation of bio control. Annual review of phytopathology. 43: 337-359.
- Flores-Villegas AL. (2011) Evaluación de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Meccus pallidipennis* en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp.1-118.
- Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Toriello C, Bucio-Torres M, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A. (2016). Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. Parasites y Vectors, 9: 176.
- Flores-Villegas AL, Cabrera-Bravo M, Pérez-Torres A. Bucio-Torres M, Salazar-Schettino PM, Hernández-Velázquez VM, Córdoba-Aguilar A, Toriello C. (2019). Effects on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) Eggs Exposed to Entomopathogenic Fungi: Exploring Alternatives to Control Chagas Disease. Journal of Medical Entomology. 56: 284.
- Forlani L, Pedrini N, Girotti J, Mijailovsky S, Cardozo R, Gentile A, Hernández-Suárez CM, Rabinovich J. y Juárez MP (2015). Biological Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* with the

- Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Combined with an Aggregation Cue: Field, Laboratory and Mathematical Modeling Assessment. PLoS Neglected Tropical Diseases 9: 1-23
- García-Ramírez B, Córdoba-Aguilar A, Gutiérrez-Cabrera AE. (2016). De chinches besuconas, parásitos y soluciones. Nuestra Tierra, 26: 16-20.
- Garza-Hernández JA, Rodríguez-Pérez MA, Salazar MI, Rusell TL, Adeleke MA, de Luna-Santillana EJ, Reyes-Villanueva F. (2013). Vectorial capacity of *Aedes aegypti* for dengue virus type 2 is reduced with co-infection of *Metarhizium anisopliae*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 7: e2013.
- Grace J, Jaronski S. (2005). The Joy of Zen and the Art of Fermentation or the Tao of Fungi. Solid Substrate Fermentation Workshop. Sydney: USDA Northern Plains Agricultural Research Laboratory.
- Goettel MS, Inglis DG. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En: L Lacey (ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, Londre. pp. 213-247.
- Gómez M, Villamizar L; Cotes A. (1997). Optimización de un preformulado a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides*. Resúmenes XXIV Congreso Colombiana de Entomología, pp. 107-108.
- Grijalba EP, Villamizar L, Cotes AM. (2009). Evaluation of the stability of *Paecilomyces* sp. And *Beauveria bassiana* under ultraviolet radiation. Revista Colombiana de Entomología, 35: 1-6
- Gualtieri J, Nelson M, Cichero J. (1985). Present and perspectives of the chemical control. En: Carcavallo R, Rabinovich J, Tonn R (eds). Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Tomo II. Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación. Buenos Aires, pp. 319-329.
- Guédez C, Castillo C, Cañizales, Rafael Olivar. (2008). Control biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. Academia, 7: 50-74
- Hajek AE, Leger St. RJ. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. Annual Review of Entomology, 39: 293:322.
- Hernández-Velázquez VM, Berlanga-Padilla AM, Barrientos-Lozano, L. (2000). Vegetable and mineral oil formulations of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* to control the Central American locust (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). Journal of Orthoptera Research, 9: 223-227.
- Hernández-Velázquez VM, Hunter DM, Barrientos-Lozano L. (2003). Susceptibility of *Schistocerca piceifrons* (Orthoptera: Acrididae) to *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes): Laboratory and Field Trials. Journal of Orthoptera Research, 12: 89-92.
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. Biological Control, 55: 129-145.
- Jenkins NE, Heviefo G, Langewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information, 19: 21-31.
- Jenkins, J. Grzywacz. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents Assurance of product performance. Biocontrol Science and Technology, 10: 753-777.
- Jiménez Santiago B. (2016). Virulencia de *Metarhizium anisopliae* en dos estadios de *Meccus pallidipennis*, insecto transmisor de la enfermedad de Chagas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Nacional de México, Ciudad de México, México, pp 46.
- Jiménez-Santiago B, Murillo-Alonso K, Navarro-Barranco H, López-Soriano L, Vences- Blanco M, Salazar-Schettino PM, Cabrera-Bravo, M, Hernández-Velázquez V, Toriello C. (2017). Virulencia de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) e *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) en triatomas adultos del *Meccus pallidipennis* (Hemiptera:Reduviidae). En: Memorias del XL Congreso Nacional de Control Biológico. Del Rincón Castro MC et al. (eds). Mérida Yucatán, 12-17 noviembre. pp 23.
- Jones KA, Burges HD. (1998). Technology of formulation and application. En: Burges HD. (ed.). Formulation of Microbial Biopesticides. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, Londres, pp. 7-30.
- Jurberg J, Galvão C. (2006). Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease and implications for human health. Denisia, 19: 1096-1116.
- Keyser CA, Fernandes KK, Rangel DE, Roberts Donald W. (2014). Heat-induced poststress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy. Journal of Invertebrate Pathology, 120: 67-73.
- Korunic Z. (1998). Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. Journal of Stored Products Research, 34: 87-97.
- Lent H, Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bulletin of the American Museum of Natural History, 163: 127-520.

- Lecuona ER, Alves S. (1995). Epizootología. En: Lecuona ER. (ed.) Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga., IMYZA-CICA-INTA Castelar, Buenos Aires: 17-34.
- Luz C, Fargues J. (1997). Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, 138: 117-25.
- Luz C, Silva IG, Cordeiro CM, Tigano MS. (1999). Sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Triatoma infestans* after infection at different temperatures and doses of inoculum. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 223-225.
- Li J, Feng M. (2009). Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological Research*, 113: 93-99.
- Liu Q, Ying. SH, Feng, M.G, Jiang XH. (2009). Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95: 65-75.
- Luz C, Tigano MS, Silva IG, Cordeiro CM, Aljanabi SM. (1998). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 839-846.
- Luz C, Rocha L, Nery G, Magalhães B, Tigano M. (2004). Activity of Oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in Peridomestic Areas in Central Brazil. *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 211-218.
- Luz C, Rodrigues J, Rocha LF. (2012). Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, 122: 29-35.
- Martínez-Ibarra JA, Noguera-Torres B, García-Benavides G, Vargas-Llamas V, Bustos-Saldaña R, Montañez-Valdez OD. (2012). Bionomics of populations of *Meccus pallidipennis* (Stal), (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico. *Journal of Vector Ecology*, 37: 474-477.
- Médicos Sin Fronteras (MSF, 2015) Chagas: El diagnóstico y tratamiento ya son una realidad en el Estado de Oaxaca disponible en: [https://www.msf.mx/web/MSF-chagas\\_el\\_diagnostico\\_y\\_tratamiento\\_ya\\_son\\_una\\_realidad\\_en\\_el\\_estado\\_de\\_oaxaca](https://www.msf.mx/web/MSF-chagas_el_diagnostico_y_tratamiento_ya_son_una_realidad_en_el_estado_de_oaxaca) [consultado 4 diciembre 2015].
- Méndez A, Del Pozo E, García I. (2009). Producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal*. 24: 156-161.
- Mewis I, Ulrichs C. (2001). Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal Stored Products Research*, 37: 153-164.
- Moriarty F. (1999). *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems* 3rd edition. Academic Press, Oxford: 347.
- Mougabure CG, Picollo MI. (2015). Insecticide resistance in vector Chagas disease: evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica*, 149: 70-85.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*, 31: 26-34.
- Murillo-Alonso KT, Peña-Chora G, Hernández-Baltazar E, Hernández-Velázquez VM. (2015). Conidia production by *Isaria fumosorosea* on solid substrates and its pathogenicity towards *Bemisia tabaci*. *Biocontrol Science and Technology*, 25: 175-184.
- Murillo-Alonso KT, Aguilar Salgado B, Navarro-Barranco H, Hernández-Velázquez, Victor M, Peña Chora G, Salazar-Schettino PM, Cabrera-Bravo M, Toriello Conchita. (2018). Aplicación de *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) en el peridomicilio de casas de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas. En: *Memorias del XLI Congreso Nacional de Control Biológico*. Del Rincón Castro MC et al. (Eds). Pto Vallarta Jal. 8-9 de noviembre.
- Murillo-Alonso KT, Hernández-Velázquez VM, Salazar-Schettino PM, Cabrera-Bravo M, Toriello C. (2019). Effects of *Metarhizium anisopliae* on *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) over different types of wall surfaces. *Biocontrol Science and Technology*. En prensa
- Noor Hisham H, Ramle M, Hasber S, Mohd Basri W, Norman K, Suhaidi H. (2005). Powder formulation of *Metarhizium anisopliae*, its stability and effects against *Oryctes rhinoceros*. *International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability)*: 914-927.
- Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) [Consultado el 10 de febrero 2019].

- Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2018). Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es) [Consultado el 10 de diciembre 2018].
- Organización Panamericana de la Salud (OPS/HDM/CD/425-06, 2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Disponible en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf> [Consultado el 4 de febrero 2019].
- Ouedraogo A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ. (1997). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137: 37-43.
- Pal S, St Leger RJ, Wu LP. (2007). Fungal peptide Destruxin a plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 8969-77.
- PanAmerican Health Organization (PAHO, 2019) Chagas in the Americas disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13566:chagas-in-americas&Itemid=40721&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566:chagas-in-americas&Itemid=40721&lang=en) [Consultado el 30 de enero 2019].
- PanAmerican Health Organization (PAHO, 2019) General Information Chagas Disease disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=en) [Consultado el 15 de febrero 2019].
- Paredes González E, Villa Velarde R, Sotelo Estrada MI, Ortega García J. (2015). Detección de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) domésticos, peridomésticos y silvestres en Guaymas, Sonora, México. *Biotecnia*, 17: 3-8.
- Pedrini N, Mijailovsky SJ, Girotti JR, Stariolo R, Cardozo RM, Gentile A, Juárez MP. (2009). Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *Neglected Tropical Diseases*, 3: 434.
- Pell JK, Hannam JJ, Steinkraus DC. (2010). Conservation biological control using fungal entomopathogens. *Biological Control*, 55: 187-198.
- Pham TA, Kim JJ, Kim K. (2010). Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as a mycoinsecticide. *Mycobiology*, 38: 137-143.
- Picollo MI, Wood E, Licastro SA de Zerba EN. (1976). Acción ovicida de insecticidas organofosforados en *Triatoma infestans*. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 10: 309-319.
- Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, de la Torre M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Journal Interciencia*, 3: 856-860.
- Rassi A. Jr, Rassi A, Little WC. (2000). Chagas heart disease. *Clinical Cardiology*, 23: 883-889.
- Rassi A. Jr., Rassi A, De Rezende JM. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26: 275-291.
- Roberts DW y Campbell AS. (1977). Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*, 10:19-76.
- Rocha LF, Luz C. (2011). Activity of *Metarhizium* spp. and *Isaria* spp. from the Central Brazilian Cerrado against *Triatoma infestans* nymphs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 105: 417-419.
- Rodríguez-Bataz E, Noguera-Torres B, Rosario-Cruz R, Martínez-Ibarra JA, Rosas-Acevedo JL. (2011). Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 en el estado de Guerrero, México. *Revista Biomédica*, 22: 31-38.
- Sahayaraj K. (2014). Basic and applied aspects of biopesticides. New Delhi: Springer
- Salazar-Schettino P, Rojas-Wastavino G, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres M, Martínez-Ibarra J, Monroy-Escobar M, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco M, Ruiz-Hernandez A, Torres-Gutierrez E (2010) A revision of thirteen species of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society* 1: 57-80.
- Samson R, Evans H, Latgé, JP. (1988). Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, New York, pp 187.
- Salazar-Schettino PM, De Haro-Arteaga I, Cabrera-Bravo M. (2005). Tres especies de Triatomíneos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. *Medicina*, 65: 63-69.
- Salazar-Schettino P, Rojas-Wastavino G, Cabrera-Bravo M, Bucio-Torres M, Martínez-Ibarra J, Monroy-Escobar M, Rodas-Retana A, Guevara-Gómez Y, Vences-Blanco M, Ruiz-Hernandez A, Torres-Gutierrez E. (2010). A revision of thirteen species of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas disease in Mexico. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1: 57-80.
- Schofield CJ, Galvão (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110: 88-100.

- Schofield CJ. (2001). Field testing and evaluation of insecticides for indoor residual spraying against domestic vectors of Chagas disease. WHO/CDS/WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES)/GCDPP: 62
- Scholte EJ, Knols BGJ, Takken W. (2006). Infection of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* reduces blood feeding and fecundity. *Journal of Insect Invertebrate Pathology*, 91: 43-49.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science*, 4: 19.
- Schrank A y Vainstein MH. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicology*, 56: 1267-1274.
- Silveira AC, Dias JC (2011). The control of vectorial transmission. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 44: 52-63.
- Stathers TE, Moore D, Prior C. (1993). The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 111-115.
- Stenersen, J. (2004). Chemical pesticides. CRC Press, Boca Raton.
- Subramanyam B, Roesli R. (2000). Inert dusts. En: B. Subramanyam, DW Hagstrum (eds). Alternatives to pesticides in stored-product IMP. Kluwer Academic Publishers. Boston, USA, pp. 321-379.
- Tamez-Guerra P, Galán-Wong LJ, Medrado-Roldán H. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL, San Nicolás de Los Garzas*, 4: 143-152.
- Taylor B., Edgington S., Luke B. y Moore D. (2013). Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *Journal of Stored. Products Research*, 53: 23-26.
- Toriello C, Pérez-Torres A, Burciaga-Díaz A, Navarro-Barranco H, Pérez-Mejía A, Lorenzana Jiménez M, Mier T. (2006). Lack of acute pathogenicity and toxicity in mice of an isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* from spittlebugs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 278-287.
- Toriello C, Montoya SE, Zavala RM, Navarro BH, Basilio HD, Hernández VV, Mier T. (2008). Virulencia y termotolerancia de cultivos monospóricos de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* de la mosca pinta (Hemiptera: Cercopidae). *Revista Mexicana de Micología*, 28: 57-66.
- Urtubia HI, France A. (2007). Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. *Revista Tierra Adentro Santiago de Chile*, 81: 46-49.
- Vassilakos TN, Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Vayias BJ. (2006). Influence of temperature on the insecticidal effect of *Beauveria bassiana* in combination with diatomaceous earth against *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* on stored wheat. *Biological control*, 38: 270-281.
- Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B. (2008). Apuntes para la historia de la enfermedad de Chagas en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65:57-79.
- Vélez PA, Posada FJ, Marín P; González MT, Osorio E; Bustillo E. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Colombia. Centro Nacional de Investigaciones del café. *Boletín Técnico No. 17*: 1-37.
- Vidal C, Fargues J, Lacey LA. (1997). Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70: 18-26.
- Watanabe T. (1994). Pictorial Atlas of Soil and Seed fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Keyto Species. Lewis Publishers, Tokyo, pp. 411.
- Wraight SP, Inglis GD. y Goettel MS. (2007). Over-view of pathogen groups: fungi. En: Lacey LA Kaya HK, (eds). Field manual of techniques in invertebrate pathology, second edition. Springer, Holanda, pp. 223-248.
- World Health Organization (WHO, 2019) Chagas disease (American trypanosomiasis) disponible en: <https://www.who.int/chagas/disease/en/> [Consultado el 9 de enero 2019].
- Zerba EN, Wallace G, Picollo MI, Casabé N, de Licastro S, Wood E. (1997). Evaluation of beta-cypermethrin for the control of *Triatoma infestans*. *Revista Panamericana de la Salud Pública*, 1: 133-137.
- Zerba EN. (1999). Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina*, 59: 41-46.
- Zimmermann G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science Technology*, 17: 879-920.