

**EFFECTO DEL PODER RESIDUAL DE TRES FORMULACIONES CON  
BACILLUS THURINGIENSIS H-14 VAR. ISRAELENIS CULTIVADO EN  
“SANGUAZA” SOBRE EL PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN  
LARVAS DE *AEDES AEGYPTI***

Effect of residual power of three formulations H-14 *Bacillus thuringiensis* var. israelensis grown in "sanguaza" on the percentage of mortality in larvae of *Aedes aegypti*

Edit Untol- Paredes\*, Gina Zavaleta –Espejo, José Saldaña-Jiménez, Willian Blas-Cerdán, Juan Muro-Morey.

hikari10\_16@hotmail.com\*

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

**RESUMEN**

La presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto del poder residual de tres formulaciones con *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis sobre el porcentaje de mortalidad en larvas de *A. aegypti*. Se preparó tres formulaciones de Bti con harina de maíz morado, maíz morado - carragenina y carragenina a las concentraciones de 0.5 y 2% de ingrediente activo (i.a.), exponiéndose las larvas de tercer estadio de *A. aegypti* a 0.1g de cada formulación; la mortalidad de larvas se registró mediante observación directa a las 48 horas de aplicados los tratamientos. Posteriormente un lote nuevo de 25 larvas de *A. aegypti* se introdujo en los contenedores a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días post aplicación de las formulaciones. Los resultados muestran que el poder residual se incrementa con la formulación Bti - harina de maíz morado al 2% de i.a. produciendo un  $LT_{50}$  hasta los 28 días post aplicación, por otro lado la formulación Bti - carragenina al 2% de ia, produjo el mínimo poder residual que se expresa en un  $LT_{50}$  a los 2 días de aplicado el tratamiento, por su parte, la formulación Bti - maíz morado - carragenina logró una  $LT_{50}$  hasta los 18 días post aplicación. Se concluye que se logró aumentar el poder residual de Bti al formularlo con harina de maíz morado a 2% i.a.

Palabras clave: Residualidad, Formulaciones, *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis, sanguaza, carragenina.

**ABSTRACT**

The present research aimed to evaluate the effect of residual power of three formulations with H-14 *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on the percentage of mortality in larvae of *Aedes aegypti*. Three formulations of Bti were prepared with purple corn flour, purple corn - carrageenan and carrageenan at concentrations of 0.5 and 2% active ingredient (ai), exposing the third stage larvae of *A. aegypti* to 0.1g from each formulation; larvae mortality was recorded by direct observation within 48 hours of applying the treatments. Subsequently a new batch of 25 *A. aegypti* larvae was introduced into the containers at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 days after applying the formulations. The results show that the residual power is increased with Bti formulation - purple corn flour to 2% a.i., producing  $LT_{50}$  until 28 post application days. The formulation Bti 2% carrageenin ai, on the other hand, produced the minimum residual power which is expressed in  $LT_{50}$  at 2 days after applying the treatment. On its part, the formulation Bti - purple corn - carrageenan achieved  $LT_{50}$  until 18 post application days. It is concluded that it was possible to increase the residual power of Bti at formulating purple corn flour to 2% ai.

**Keywords:** Residual activity, Formulations, *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis, Blood water, carrageenan.

Recibido 3 de octubre de 2014

Aceptado: 15 marzo de 2015

## INTRODUCCIÓN

El “dengue” es una de las arbovirosis más frecuentes que afecta al hombre; constituyéndose en un severo problema de salud pública en el mundo, especialmente en los países donde las condiciones ambientales favorecen la proliferación del vector *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). El Perú constituye una de las áreas geográficas con mayor índice aéreo juntamente con otros países tropicales, por ello en nuestro país se realiza el control del vector mediante el uso del larvicida Temephos (Abate), un organofosforado y cipermetrinas para adultos del vector, estos han dado buenos resultados hasta el momento, sin embargo en otros países se han informado casos de resistencia, además, el uso indiscriminado de éstos afectan al ecosistema debido a su falta de selectividad, causando daño a otras formas de vida; por ello, actualmente, se está utilizando controladores biológicos como *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.</sup>

La acción tóxica de Bti se debe a la presencia de inclusiones citoplasmáticas (cristales parasporales) en la célula bacteriana, que al esporular los libera. Los cristales están formados por la glicoproteína  $\delta$  - endotoxina, con una sub unidad tóxica de forma bipiramidal (agregados de una proteína grande 130 - 140 Kda) que es una protoxina insoluble en condiciones normales y solo se activa cuando es ingerida por insectos que tienen en sus células epiteliales del intestino medio receptores específicos para ligarla. La protoxina se solubiliza en el ambiente alcalino y reductor de la larva hospedera y bajo la acción de las proteasas, se transforma en su forma activa de 60 Kda, atraviesa la membrana peritrófica y se une a la caderina, iniciando una cascada de señalización dependiente del ion magnesio, aumenta el número de receptores, lo que recluta mayor número de toxinas.

El tejido intestinal de la larva del vector *A. aegypti* resulta dañado gravemente, producto de la deshidratación en el insecto, esto impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y finalmente muere. La gran actividad y especificidad de Bti sobre las larvas de *A. aegypti*,

su velocidad de acción, aunado a su ausencia de efectos sobre otros organismos no blanco, propició su rápido desarrollo comercial a partir de su descubrimiento, de manera que, a la par que se efectuaban estudios de clasificación y caracterización, se realizaban pruebas de toxicidad tanto en laboratorio como en campo frente al vector *A. aegypti*<sup>14, 15, 16, 17.</sup>

Las primeras formulaciones experimentales de Bti para su comercialización se hicieron a base de polvos primarios, elaborados por los laboratorios Roger Bellon en Paris- Francia, con los cuales se obtuvo control de larvas de simulados vectores de la Oncocercosis en Africa. Posteriormente se desarrollaron formulaciones con sustratos como atrayentes alimenticios y otros que poseen propiedades de adherencia, para esto probaron mezclas de diversas sustancias, tales como granulos de talco, formulados con azúcar y polvo de polipropileno (29.8% de ingrediente activo), aceite de maíz, lecitina de soya, alginato y harina de maíz que resultó ser un buen fagoestimulante, posteriormente se elaboraron formulados con polietileno de baja densidad, adicionando extracto de levadura como fagoestimulante y se obtuvo una alta efectividad en larvas de *A. aegypti* hasta por 37 días en agua con cieno, con una concentración de 0.4ppm en condiciones de laboratorio y campo simulado. También se realizaron experimentos con el empleo de formulaciones WDG de Bti y polvos técnicos, (formulados de esporas y cristales de Bti), entre los resultados encontrados tenemos que los valores de  $CL_{90}$  fue de 0.30 mg/l y 0.59 mg/l para polvos técnicos y WDG de Bti respectivamente<sup>18, 19, 20.</sup>

Diversos investigadores en Estados Unidos, han desarrollado formulados en matrices de almidón, incorporando diversos cromóforos como protectores de luz UV, debido a que la toxina de Bti al igual que todas las serovariedades de Bt se destruyen por la luz ultravioleta del sol, entre estos cromóforos que utilizaron está el rojo de congo y el verde de malaquita. También se investigó al pigmento melanina producido por *Streptomyces lividans* 66, en la protección de la actividad larvicida de Bti, al exponer la toxina a dosis de

radiación ultravioleta de  $1.34 \times 10^5$  J/ m<sup>2</sup>, a la longitud de onda de 253nm., determinaron que la actividad tóxica de Bti fue casi completamente protegida de la radiación UV a la dosis de 0.8 a 3.4 ug/ml. de melanina<sup>21,22.</sup>

Las características de una formulación de Bti deben ser: lenta liberación, mayor efectividad del ingrediente activo, extendiendo así su vida residual; atrayentes que aseguren la ingestión del producto por la larva, facilidad de manejo y almacenamiento. La actividad residual de Bti contra larvas de *A. aegypti* es una desventaja por la cual no ha podido sustituir a los insecticidas químicos, siendo la máxima residualidad encontrada en los últimos trabajos de hasta 37 días de actividad tóxica bajo sombra. En Brasil se han utilizado diferentes formulaciones de Bti (VATIBEC) en los distritos de Parque Flora, Ponto Chico, Figueiras y en el Estado de Río de Janeiro, obteniéndose buenos resultados. El uso del biolarvicida aunado a una activa participación comunitaria demostró una estrategia adecuada en

el programa de control de *A. aegypti*, por ello la Organización Mundial de la Salud recomienda seguir con el desarrollo de investigaciones que abaraten los costos de producción y proporcionen mayor efectividad a Bti<sup>10,23,24.</sup>

Los insecticidas biológicos solucionan el problema con los vectores de enfermedades, sin embargo en el Perú su difusión y aplicación no ha sido completa debido a los elevados costos y a la falta de investigaciones que estandaricen un medio de cultivo para su producción y formulación con materiales alternativos y componentes que produzca la propia localidad, disminuyendo así los costos de producción y formulación, cumpliéndose con los requisitos de un formulado eficaz sobre las larvas de *A. aegypti* vector del dengue; por ello en el presente trabajo se evaluó el efecto del poder residual de *Bacillus thuringiensis* H – 14 var. israelensis cultivada en “sanguaza” y formulada con harina de “maíz morado”, “maíz morado - carragenina” y carragenina sobre el porcentaje de mortalidad larval de *A. aegypti*.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO:

#### 1.1. Cepa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis (Bti).

La cepa de *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis (Bti) se obtuvo de la Universidad Cayetano Heredia y pertenece al lote N° 91509 del Instituto Pasteur de París – Francia.

#### 1.2. Cepa de *Aedes aegypti*.

Los especímenes de *Aedes aegypti* se obtuvieron en el distrito de Laredo, colectando huevos de los cilindros y depósitos con agua.

#### 1.3. *Zea mays* “maíz morado” y *Chondrocanthus chamisoi* “cochayuyo”.

*Zea mays* “maíz morado” y *Chondrocanthus chamisoi* “cochayuyo” se obtuvieron en el mercado Palermo de la ciudad de Trujillo.

### 2. METODO:

#### 2.1. Desarrollo del ciclo biológico de *Aedes aegypti* para obtener larvas de tercer estadio.

El ciclo biológico de *A. aegypti* se inició colocando dos cintas de papel filtro con huevos del vector en depósitos con agua de caño previamente decolorada, las larvas fueron alimentadas desde el primer estadio con conejina triturada, se observó diariamente hasta la evolución de las larvas pues al formarse el pupario (9 días aproximadamente), estas se colocaron en una jaula forrada con tela de “organza” hasta la emergencia de hembras (hematófagas), siendo éstas alimentadas con sangre de *Mus musculus*, (procedimiento que se repitió cada diez días); los adultos machos (fitófagos) se alimentaron con glucosa al 10 %. Posteriormente se acondicionó un vaso descartable con agua, dentro del cual se colocó papel filtro adherido a las paredes, sobre éste las hembras

realizaron la ovoposición (aproximadamente 100 huevos por hembra)<sup>6</sup>.

## 2.2. Cultivo de *Bacillus thuringiensis* SH-14 var. israelensis en agar TPH.

Primero se reactivó la cepa de Bti en caldo TPH (Triptosa fosfato)<sup>15</sup> y posteriormente se tomó una asada y se realizó la siembra en placa (con agar TPH), luego estas placas se incubaron a 30°C por 48 horas<sup>15</sup>.

## 2.3. Producción de *Bacillus thuringiensis* SH-14 var. israelensis en “sanguaza”.

### 2.3.1. Acondicionamiento de los biorreactores.

Se acondicionaron tres biorreactores aireados de tanque cilindro aireado y agitado (TCAA), cada uno de dos litros de volumen de trabajo, los cuales se esterilizaron con luz UV (285 a 320 de longitud de onda) por 15 minutos a 30 cm de distancia, previo tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm durante 30 minutos. Los flujos de aire utilizados (0.5 vvm) fueron esterilizados por burbujeo en una solución de NaCl al 20%. Los biorreactores presentaron dispositivos de salida de CO<sub>2</sub> y toma de muestra.

### 2.3.2. Preparación del medio fermentativo.

El medio fermentativo fue acondicionado en base a un medio de producción a gran escala según Abarca<sup>17</sup>, en el que se adicionó sanguaza como fuente nitrogenada. La sanguaza fue recolectada y transportada al laboratorio, manteniéndose en congelación a -5°C por un tiempo no mayor de 5 días hasta su utilización, ésta fue diluida conjuntamente con el medio fermentativo a concentración de 20% v/v, el pH fue ajustado a 7.0 con HCl 1N y/o NaOH 1N, y el medio esterilizado en autoclave (121°C/15min/1atm.)<sup>16</sup>.

### 2.3.3. Estandarización del inóculo de Bti.

En una cámara de bioseguridad, se cosechó un cultivo de Bti (48h / 30°C) en solución salina fisiológica estéril a partir de placas petri con agar nutritivo TPH, y se estandarizó hasta el tubo N° 3 ( $9 \times 10^8$  cel. /ml) del nefelómetro de Mac Farland. Posteriormente se agregó 200 ml del inóculo a 1800 ml de medio fermentativo preparado; el contenido se llevó a los biorreactores, donde permaneció por 48 horas a una temperatura de 30°C y agitación constante a 200 rpm<sup>17</sup>.

### 2.3.4. Control de la producción del bioinsecticida.

El proceso fue controlado durante todo el periodo de fermentación para ello se realizó la toma de muestras cada 8 horas, extrayéndose 3 ml de los medios fermentativos, realizándose las siguientes pruebas:

#### A. Recuento de células viables.

Se realizó por la técnica de recuento en placa - siembra por incorporación del medio Agar NYSMA<sup>15</sup>.

#### B. Crecimiento de Bti y observación del cristal bioinsecticida.

Se realizaron coloraciones Gram y verde de malaquita al 1% modificado, para la observación microscópica a inmersión de esporas, fases vegetativas y cristales (bioinsecticida). Se realizó en cada muestreo la medición del pH y temperatura<sup>15</sup>.

### 2.3.5. Obtención del bioinsecticida (Abarca<sup>17</sup>)

Terminado el proceso de producción luego de 48 horas de incubación, el medio fermentativo fue centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos, eliminándose el sobrenadante. El precipitado se deshidrató a 60°C por 24 horas, obteniéndose biomasa seca (conteniendo total de esporas, cristales

proteicos y residuos celulares) que luego fue triturada en mortero. Posteriormente se determinó la concentración (esp/mL de Bti) por el método de recuento en placa.

## **2.4. Elaboración de los formulados de Bti cultivado en “sanguaza”.**

### **2.4.1. Elaboración del formulado de Bti utilizando maíz morado como sustrato:**

La mazorca de maíz morado (grano y coronta) fue secada en estufa a 50°C, y luego sometido a molienda hasta obtener harina con partículas sólidas con tamaño uniforme, posteriormente se realizó el tamizado, utilizando una malla de gasa. Se pesaron 99.5 y 98 gramos del sustrato en dos morteros y se agregaron a cada uno 0.5 y 2 gr. de Bti (principio activo) respectivamente, se agregó 50 ml de agua a 50°C de temperatura a cada formulado, se homogenizó la mezcla y luego se secó en estufa a 40°C; se trituró en mortero hasta obtener un polvo homogéneo que finalmente fue tamizado con malla de gasa.

### **2.4.2. Elaboración del formulado de Bti utilizando maíz morado - carragenina como sustrato:**

Se pesó 49.75 gr de harina de maíz morado y 49.75 gr de carragenina, se mezcló y adicionó 0.5 gr de Bti más 50 ml de agua a 50°C, se homogenizó y secó en estufa a 40°C, finalmente fue triturado en mortero hasta obtener un polvo uniforme. Por otro lado se pesaron 49 gr de harina de maíz morado y 49 gr de carragenina, se mezcló y adicionó 2 gr de Bti más 50 ml de agua a 50°C, se homogenizó y secó en estufa a 40°C, finalmente se trituró en mortero hasta polvo homogéneo.

### **2.4.2. Elaboración del formulado de Bti utilizando carragenina como sustrato:**

Para la obtención de carragenina se lavó *Ch. chamisoi* “cochayuyo”; luego se cortó en trozos de aproximadamente 2 cm de longitud y se sometió a decocto hasta visualizar un aspecto denso, se filtró en caliente a través de una gasa, el filtrado se secó en estufa a 50°C y posteriormente se trituró en mortero, del material obtenido se pesó 99.5 y 98 g y se agregaron 0.5 y 2 gr. de Bti (principio activo) respectivamente más 50 ml de agua 50°C por cada formulación se homogenizó, secó en estufa a 40°C y finalmente se trituró en mortero hasta obtener un polvo homogéneo.

## **2.5. Evaluación del poder residual de tres formulaciones de Bti sobre el porcentaje de mortalidad en larvas de *Aedes aegypti*:**

Se agregó 0.1gr de cada formulación de Bti (con su respectiva concentración de ingrediente activo) y 0.1gr de Bti sin formular a cada uno de los depósitos con 1 litro de agua más 25 larvas de tercer estadio de *A. aegypti*. Se trabajó un testigo (T) en depósitos con agua y el mismo número de larva.

La mortalidad larval se registró mediante observación directa de los indicadores a las 48 horas de colocadas las larvas, las mismas que fueron contadas, removidas y descartadas con una pipeta plástica. Posteriormente un lote nuevo de 25 larvas de *A. aegypti* se introdujeron en los contenedores a los 1, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días post aplicación de las formulaciones y 48 horas después se registró la mortalidad en todos los casos. En cada tratamiento se realizó con tres repeticiones, donde los tratamientos son las concentraciones y las repeticiones el número de veces en

que se realizó la evaluación de los mismos que fueron expuestos a condiciones ambientales, las evaluaciones se realizaron in situ.

#### 2.6 Indicadores del efecto de las formulaciones de Bti cultivado en “sanguaza” sobre las larvas de *A. aegypti*:

Las larvas que fueron afectadas por las formulaciones de Bti H-14 var. israelensis presentaron color negruzco, producto de la deshidratación y sin movimiento. El tratamiento se considera efectivo si el porcentaje de mortalidad es mayor al 50%<sup>18</sup>.

La Tabla 1, expresa los promedios de los porcentajes de mortalidad de larvas de *A. aegypti* por efecto de las formulaciones aplicadas con relación al tiempo en días, (poder residual de las formulaciones), observando que la formulación de Bti con harina de maíz morado al 2% de ingrediente activo presentó una mortalidad de 5.2% de larvas de *A. aegypti* hasta los 60 días después de la aplicación de las formulaciones a las unidades experimentales, asimismo las formulaciones restantes, redujeron su efecto a 0% de mortalidad hasta los 30 días de evaluación. Las figuras 1, 2, 3 y 4, expresan el efecto del poder residual (porcentaje de mortalidad de

En la actualidad la aplicación de Bti no ha sido del todo exitosa en países sub desarrollados como el nuestro debido a ciertas desventajas como: el elevado costo económico para su producción y tiempos de permanencia de las proteínas delta endotoxinas en el ambiente muy cortos, (bajo poder residual); por ello en la actualidad, universidades, centros de investigación y compañías privadas llevan a cabo investigaciones que implican el uso de ingredientes locales como fuente proteica para la producción de Bti, así como el empleo de biopolímeros naturales para aumentar el poder residual frente a las condiciones ambientales adversas sin perjudicar el

#### 2.7. Análisis estadístico de los datos:

Los datos obtenidos, se analizaron con las pruebas estadísticas correspondientes (promedios, error estándar, LSD-Fisher, análisis de varianza), los programas estadísticos utilizados para dicho fin fueron STATGRAPHIC plus 5.1 para Windows versión de prueba, además se incluyó el programa EPA Probit versión 1.5, para la determinación de la concentración letal media con relación al tiempo de evaluación de los tratamientos.

### RESULTADOS

larvas de *A. aegypti* con respecto al tiempo), de las formulaciones de Bti con maíz morado, maíz morado-carragenina, carragenina y Bti sin formular respectivamente.

La Figura 5, expresa los valores de tiempo letal TL de 50, 90, 95 y 99% de mortalidad de larvas del vector por efecto de las formulaciones aplicados a las unidades experimentales con relación al tiempo de evaluación. Dichos valores confirman un mayor efecto residual del formulado de Bti-maíz morado al 2% de ingrediente activo (LT50 = 28 días después de haber aplicado el tratamiento), los formulados restantes muestran un efecto residual menor.

### DISCUSIÓN

medio ambiente.<sup>25</sup> La evaluación del poder residual de los formulados se realizó mediante el análisis cuantitativo en base al mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti* en relación al tiempo y a la concentración de ingrediente activo (i.a). Los resultados obtenidos muestran que la actividad residual de la formulación de Bti – maíz morado a 2 y 0.5% de i.a., produjo un 73.2% y 26.8% de mortalidad respectivamente, hasta los 20 días de aplicada la formulación; a los 30 días de evaluación, dicha formulación redujo su actividad residual al 41.8% y 10.8% de mortalidad de larvas respectivamente (Fig. 1, Tabla 1).

TABLA 1: Porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti* por efecto del poder residual de tres formulaciones de *B. thuringiensis* H- 14 var. israelensis cultivado en “sanguaza”

FORMULACION DE Bti:	CC. DE INGREDIENTE ACTIVO	TIEMPO (DIAS)						
		1	10	20	30	40	50	60
<b>Porcentaje de Mortalidad</b>								
MAIZ	0.5%	98.8%±3.90	42.8%± 3.32	26.8%±2.25	10.8%± 1.69	4%± 1.69	1.2% ± 0.92	0% ± 0.41
	2%	100%±3.90	93.2%± 3.32	73.2%±2.25	41.8%± 1.69	34.8%± 1.69	16% ± 0.92	5.2% ± 0.41
	T (0%)	0%±3.90	0%± 3.32	0%± 2.25	0%± 1.69	0%± 1.69	0%± 0.92	0% ± 0.41
CARRAGENINA - MAIZ	0.5%	68%±3.90	40%± 3.32	16%±2.25	8%± 1.69	1.2% ± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
	2%	97.2%±3.90	78.8%± 3.32	60%±2.25	32%± 1.69	21.2% ± 1.69	5.2%± 0.92	0% ± 0.41
	T (0%)	0% ±3.90	0%± 3.32	0%± 2.25	0%± 1.69	0% ± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
CARRAGENINA	0.5%	58.8%±3.90	5.2%± 3.32	0%± 2.25	0%± 1.69	1.2% ± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
	2%	68% ±3.90	17.2%± 3.32	9.2%±2.25	0%± 1.69	2.8% ± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
	T (0%)	0% ±3.90	0%± 3.32	0%± 2.25	0%± 1.69	0%± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
BTI SIN FORMULAR	0.5%	100%±3.90	0%± 3.32	1.2%±2.25	0%± 1.69	0%± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
	2%	100%±3.90	0%± 3.32	0%± 2.25	1.2% ± 1.69	0%± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41
	T (0%)	0% ±2.760	0% ± 3.32	0%± 2.25	0%± 1.69	0%± 1.69	0% ± 0.92	0% ± 0.41

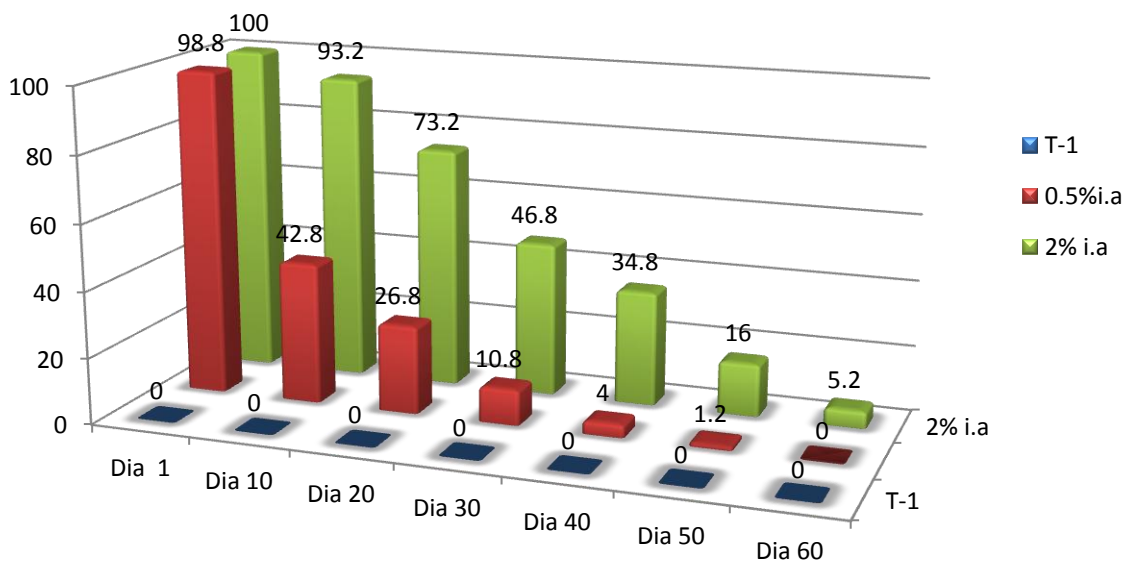


Fig. 1: Efecto del poder residual de la formulación de *B. thuringiensis* H - 14 var. israelensis cultivado en “sanguaza” con maíz morado frente al porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti*.

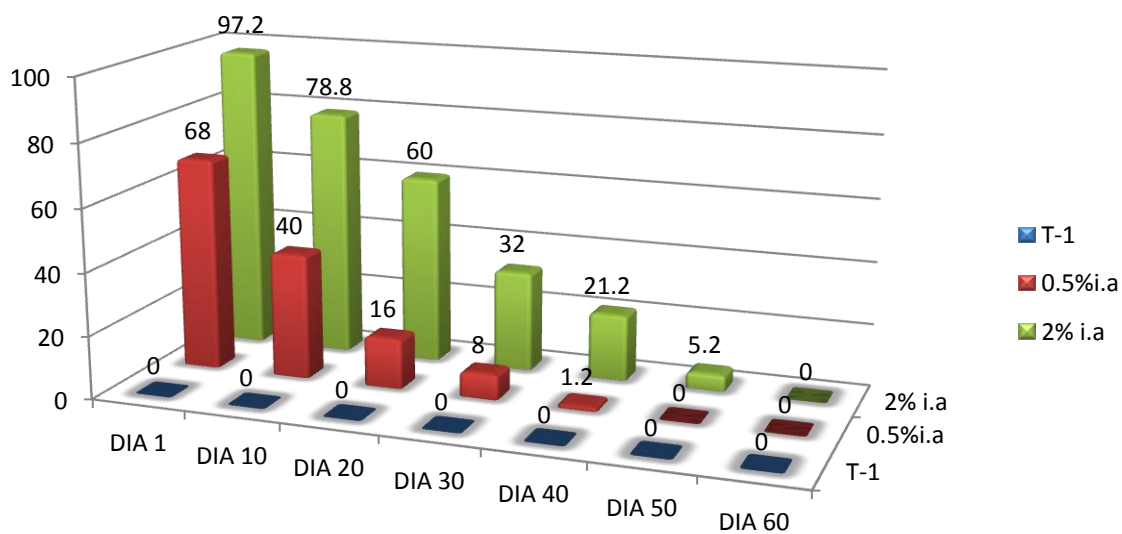


Fig. 2: Efecto del poder residual de la formulación de *B. thuringiensis* H - 14 var. israelensis cultivado en “sanguaza”; con harina de maíz morado y carragenina frente al porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti*.



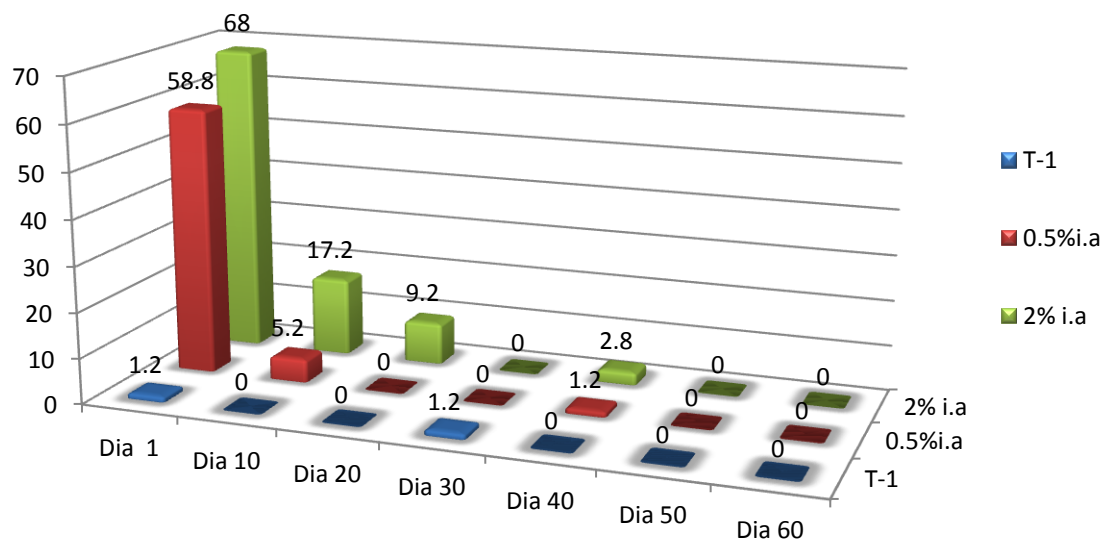


Fig. 3: Efecto del poder residual de la formulación de *B. thuringiensis* H - 14 var. israelensis cultivado en "sanguaza" con carragenina frente al porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti*.

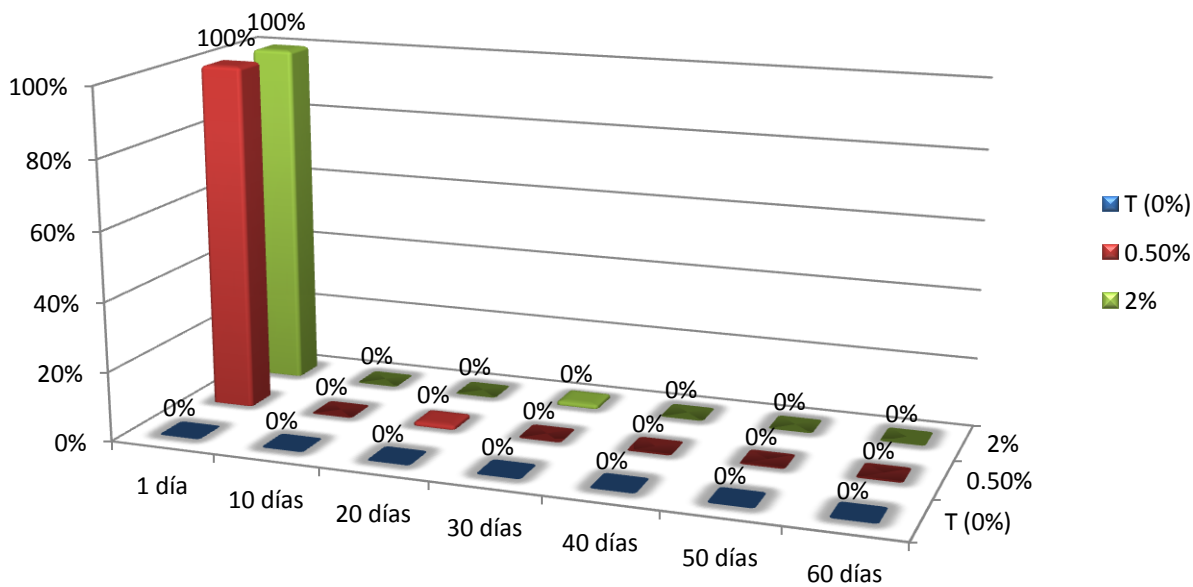


Fig. 4: Efecto del poder residual de *B. thuringiensis* H - 14 var. israelensis cultivado en "sanguaza" sin formular, frente al porcentaje de mortalidad de larvas de *A. aegypti*.

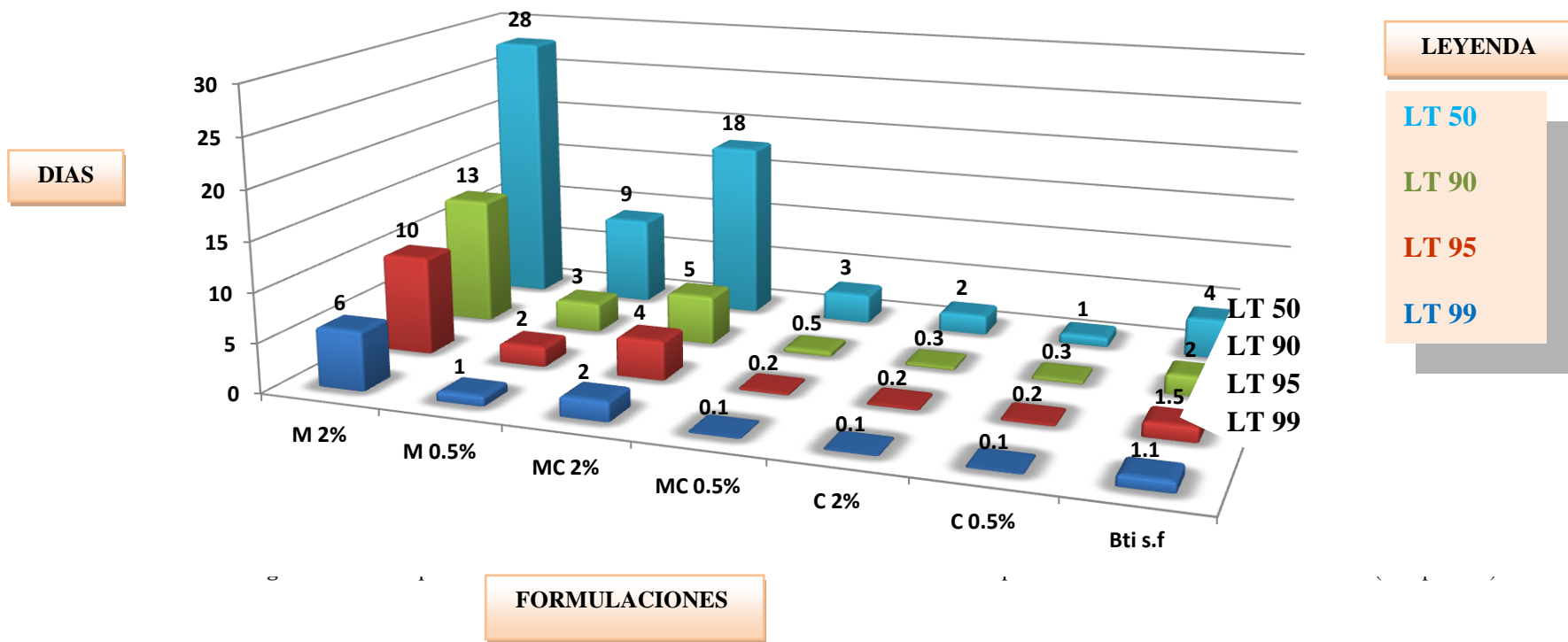


Fig. 5: Efecto del poder residual de las formulaciones de Bti con relación al tiempo de evaluación de los tratamientos LT (tiempo letal) sobre la mortalidad de larvas de *A. aegypti*.

La formulación con maíz morado aumentó la residualidad de Bti, resultado que se atribuye a la presencia de antocianinas que poseen grupos hidroxilo quienes posiblemente participan en las interacciones con los grupos funcionales presentes en la delta-endotoxina de Bti. Sin embargo, es importante recordar que la estructura tridimensional de la proteína Cry producida por Bti, (compuesta por tres dominios de hélices alfa antiparalelas, laminas plegadas beta y asas exteriores) no debe sufrir ninguna modificación conformacional al ser formulada, de lo contrario su actividad toxica se vería afectada. Además, está bien conocido el efecto de la radiación UV del sol sobre la pérdida de actividad toxica de Bti. Los resultados demuestran que la actividad toxica de Bti no sufrió alteraciones después de ser formulado con dicho biopolímero<sup>26,27</sup>.

Existen muchas investigaciones sobre los efectos de las antocianinas como protectores frente a daños oxidativos producidos por radiación UV; estas moléculas son pigmentos solubles en agua que forma parte de la familia de los polifenoles o flavonoides fenólicos, poseen muchos grupos hidroxilo quienes están implicados directamente en prevenir el daño oxidativo, a una molécula en este caso a la toxina de Bti. El aumento del poder residual de la formulación Bti-maíz morado, puede explicarse químicamente sabiendo que las antocianinas actúan como antioxidantes y en consecuencia tienen la capacidad para transferir hidrogeno fenólico al radical libre peroxilo procedente del terminal carboxilo de un aminoácido, de esta forma se evita la oxidación y se estabiliza proteína tóxica, que comparte interacciones electrostáticas con este cromóforo. Posiblemente estos eventos químicos dieron lugar a que las propiedades tóxicas de la proteína deltaendotoxina hayan permanecido inalteradas<sup>28</sup>.

La formulación Bti-maíz morado-carragenina con 2 y 0.5 % de i.a. produjo un 16 y 60% de mortalidad respectivamente hasta los 20 días después de su aplicación (Tabla 1, Fig. 2) esta disminución de la residualidad con relación a la formulación Bti – maíz morado, se debería a las interacciones entre ambos biopolímeros, que

generaron el fenómeno conocido como “copigmentación intramolecular” que genera la formación de un enlace fuerte entre el pigmento que es la antocianina y el copigmento que vendría a ser la carragenina. Estos enlaces fuertes posiblemente atraparon a la molécula proteica y al buscar químicamente su estabilidad, modificaron la conformación de la proteína tóxica, posiblemente estos enlaces fuertes se dieron debido a la adición de agua a 50°C de temperatura cuando se procedió a formular a Bti en estos biopolímeros<sup>29</sup>.

La formulación de Bti – carragenina, produjo el mínimo poder residual comparado a las dos formulaciones restantes, pues se obtuvo una mortalidad de 68% y 58% a 2 y 0.5% de i.a, porcentajes que disminuyeron notablemente a 9% y 0% respectivamente a los 20 días postratamiento (Fig. 3, Tabla 1). La disminución de la actividad tóxica de la formulación surgió como consecuencia de las interacciones entre carragenina y proteína Cry dando origen a enlaces fuertes de tipo covalente, que alteraron la conformación de las asas de la proteína tóxica de Bti, minimizando así su actividad letal contra larvas del vector *A. aegypti*. Asimismo, la baja residualidad se debió también a la falta de componentes en el biopolímero que protejan a la proteína toxica de la luz UV, lo que confirma una vez más que se puede extender la actividad residual de las formulaciones aplicadas en campo siempre que la formulación tenga componentes protectores contra los efectos de la luz UV<sup>30,34</sup>.

El análisis estadístico de tiempo letal del 50 % y 99% de la población de larvas de *A. aegypti* (LT<sub>50</sub> y LT<sub>99</sub>) confirma la actividad residual más prolongada de la formulación Bti-maíz morado 2% de i.a., cuya tasa de mortalidad se consignó a los 28 y 7 días respectivamente después de su aplicación. Asimismo se verifica una LT<sub>50</sub> y LT<sub>99</sub> a los 2 y 10 días después de aplicados los formulados con carragenina 2% y 0.5% de i.a, respectivamente, además esta formulación no produjo mortalidades del 100% de la población de larvas de *A. aegypti* desde la primera evaluación realizada a 1 día de su aplicación (Fig. 4). Por otro lado en la Fig. 5 se observa que la letalidad

de Bti sin formular es excelente a las 24 horas de evaluación, sin embargo la exposición a condiciones de semi campo (principalmente la luz UV del sol) no permitieron mantener su efectividad a lo largo del tiempo observándose 0% de mortalidad a los 10 días de evaluación.

Si comparamos nuestros resultados con investigaciones realizadas, podemos observar que los esfuerzos se han enfocado a comercializar formulaciones con alta potencia y mínima dosis efectiva. En un estudio de semicampo con el fin de evaluar distintas formulaciones de los laboratorios Abbott contra larvas de *Aedes taeniorhynchus*, determinaron que todas las formulaciones produjeron 92% de mortalidad larval a los 6 días de pos tratamiento, mientras que una de las formulaciones fue ligeramente superior en actividad residual causando el 75% de mortalidad a los 9 días de postratamiento y a los 10 días bajo a 12%. La eficacia de nuevas formulaciones de Bti continua evaluándose alrededor del mundo, por otro lado se reportó la aplicación de un formulado de Bactimos alcanzó un 78% de mortalidad hasta los 35 días postaplicación<sup>31</sup>.

En Estados Unidos se han desarrollado formulaciones utilizando diversos cromóforos como protectores contra la luz UV, debido a la sensibilidad de la toxina de Bti frente a este espectro, entre las sustancias se encuentra el rojo de congo, verde de malaquita, carbón vegetal y melanina. Asimismo, en uno de los reportes más recientes sobre formulación de Bt utilizaron diversos polímeros para formular a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* como ingrediente activo contra larvas de *Ostrinia nubalis*, las formulaciones fueron preparadas con ingredientes tales como almidón de maíz pre gelatinizado, harina de maíz pregelatinizado, gluten, gelatina, azúcar, aceite y ácido láctico, con cantidades de 1 a 50% de i.a. las formulaciones hechas causaron la muerte del 80 % de las larvas hasta los 14 días postaplicación, aun a los 21 días, con una mortalidad mayor al 50%. Las formulaciones hechas a base de biopolímeros, son los producidos

a base de gelatina y goma acacia que mantuvieron de 60% a 80 % de mortalidad contra larvas de *A. aegypti* hasta por 35 días. Por lo tanto los resultados obtenidos en nuestra investigación en contraste con los antecedentes se muestran como una alternativa más, para la formulación de Bti, especialmente en harina de maíz morado<sup>32,33</sup>.

El efecto tóxico de Bti sin formular se expresó en el 100% de mortalidad de larvas de *A. aegypti* en el primer día de evaluación, porcentaje de mortalidad que se redujo a 0% a los 10 días de evaluación (Tabla 1, Fig. 4), indicando que indica que Bti sin formular tiene un poder residual estadísticamente igual al formulado de Bti – carragenina. Los resultados verifican la inactivación de la proteína toxica de Bti, debido a la alteración de su conformación por efecto de la luz UV, condición que proporciona la desventaja de un mínimo poder residual a los bioinsecticidas producidos de Bti, y el motivo por el cual su aplicación, no ha sido del todo exitosa en el control de vectores de enfermedades<sup>25,34</sup>.

Las concentraciones de i.a. de 2% y 0.5% de Bti se utilizaron, teniendo como referencia las usadas para formulaciones de Bti, que indican rangos entre 0.1 y 2.5%, de i.a., asimismo la cantidad de formulación aplicada a cada unidad experimental fue tomada como referencia las aplicaciones de Bti en trabajos anteriores, así como también la cantidad de organofosforado “Abate” que se viene utilizando en las campaña de salud contra el vector, estas cantidades son de 0.005 g. a 0.5g. de polvos técnicos para la aplicación de formulaciones de Bti por cada litro de agua, y 20 g. de “Abate” por cada 200 litros de agua<sup>8,9</sup>.

Los análisis estadísticos de comparación de medias de Fisher para las concentraciones de ingrediente activo utilizadas en las formulaciones demuestran diferencias significativas en sus efectos sobre la mortalidad de larvas del vector *A. aegypti*. Es posible que el aumento de la residualidad en las formulaciones con 2% de i.a, este representado por un mayor número de proteínas toxicas comparado al 0.5 % de i.a.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener una mortalidad significativo sobre larvas de *Aedes aegypti* utilizando *Bacillus thuringiensis* H-14 var. israelensis con diferentes formulaciones y distinto poder residual.

La formulación con harina de maíz morado junto a Bti al 2% de i.a., prolonga el poder residual sobre las larvas del vector *A. aegypti* matando al

50% de la población larval hasta los 28 días postaplicación.

La presencia de antocianinas en la harina de maíz morado, le proporcionó fotoprotección, a la proteína tóxica de Bti, frente a los daños de la luz UV, por lo cual se le atribuye el éxito de dicho formulado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Pérez D**, Sánchez L, Castro M, López M, Freyre B, Inerariti C y Zabala M. Contextualización de una estrategia comunitaria integrada para la prevención del dengue. Rev. Cub. Med. Trop. 2008; v.60 n.1.
2. **Fernández W**, Iannacone J, Rodríguez E, Salazar N, Valderrama B, Morales A, Distribución espacial, efecto estacional y tipo de recipiente más común en los índices entomológicos larvarios de *Aedes aegypti* en Yurimaguas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2005; Vol. 22- n 3.
3. **Kourí G**. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. Rev. Panam. Salud Pública. 2006; 19:143-5.
4. **Vargas J**. Prevención y control del dengue y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. Revista Peruana de Epidemiología. 2003; 11(1): e5.
5. **Pozo E**, Neyra M, Vílchez E, Meléndez M. Factores asociados a la infestación intradomiciliaria por *Aedes aegypti* en el distrito de Tambo grande, Piura; Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2004; v.24 n.2.
6. **Ávila M**, Segnini S, Osman Rosell. Metodología para la cría de *Anopheles nuñeztovari* Gabaldon (díptera: culicidae). Boletín entomológico venezolano. 1993; N. 58(1): 19 – 31.
7. **Reyes F**. El Dengue, Bionomía del Vector, Transmisión y Opciones para su Control en México. Ciencia. 1990; 41: 45 – 55.
8. **Guzmán M**, García G, Kouri G. El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación. Revista panamericana de salud pública. 2006; Vol. 19- N 3.
9. **Moncada D**, Leyva M, Castex M, Silva Y. Eficacia de los tratamientos intradomiciliarios con los insecticidas cipermetrina, lambdacialotrina y clorpirifos en una cepa de *Aedes aegypti* en Ciudad de la Habana. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58(2):148-53.
10. **Cruz P**, Montero L, Navarro O, Morejón M. Control de culicidos con el empleo de *Bacillus thuringiensis* h -14 var. israelensis en criaderos permanentes de la localidad de Fomento, provincia Sancti Spiritus Cuba. 2003; Vol. 11- N2.
11. **Ponce G**, Flores A, Badii M, Fernández I, Gonzales T, Rodriguez M, Chiu J. Evaluación de *Bacillus thuringiensis* h -14 var. israelensis (VECTOBAC) sobre la población larval de *Aedes aegypti* en el área metropolitana de Monterrey. Universidad Autónoma de Nuevo León (México). 2003; Vol. 4 N° 3.
12. **Federici A**. Site of action of the delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* and black fly larvae. Basic Biology of microbial larvicides of vector of human diseases, Geneva SWITZERLAND. 1982; p.37 – 47.

13. **De Barjac H.** Información técnica sobre el agente de control biológico *Bacillus thuringiensis* h -14 var. Israelensis. Serie ecológica 1. 1984.
14. **Montalván E.** *Bacillus thuringiensis* para controlar mosquitos culícidos en Sullana - Piura. Revista Peruana de Entomología. 1990; 32: 103- 109.
15. **Vargas F, Roldán J, Zavaleta G, Gil M, Ampuero C, Burga A, Moreno B, Vergara C, Ventosilla P.** producción de *Bacillus thuringiensis* h -14 var. *Israelensis* utilizando *Asparagus officinalis* "espárrago" y su uso potencial para el control de la malaria en la Libertad – Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental. 2001; vol18. n3 – 4.
16. **Organización Panamericana de la Salud.** (OPS). Producción de *Bacillus thuringiensis* h -14 var. Israelensis usando alternativas locales para el control de vectores de enfermedades. Rivers of the world, Lima – Perú. 2001.
17. **Abarca C, Martínez A, Cam M, Quintero R.** Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. Aisawai. Universidad de Ciencia y Tecnología. Mexico. 1992; 2 (3): 51 – 56.
18. **Meléndez Z, Rodríguez J, Gato R, Campanioni A, Díaz M, Bruzón Y.** Susceptibilidad de cepas de *Aedes aegypti* a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en la Habana. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2008; v.60 n.1.
19. **Gomes U, Da Costa W.** Aplicación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* H-14 variedad israelensis contra *Aedes aegypti*. Rev. Cubana Med. Trop. 2004.
20. **Ramirez S, Robles O, Ramirez L.** Spray -dried *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* formulations for control of *Aedes aegypti* larvae. J. econ. Entomology. 2005; 98: 1494- 1498.
21. **Morales R, Rosas G, Pérez D, Galán W.** Evaluación en campo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Diatraea* sp. ciencia UANL. 2005; 1: 74-79.
22. **Maldonado M.** Producción y Formulación de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis Sh- 14 para el control efectivo de larvas de *Aedes aegypti* por periodos mayores a 30 días. Universidad Autónoma de México, tesis para optar el grado de doctor en ciencias. México, diciembre – 2003.
23. **Rosas G.** Avances en el Desarrollo de Formulaciones Insecticidas a Base de *Bacillus thuringiensis*. Revista Colombiana de Biotecnología. 2008; Vol. X- N° 1, P 49- 63.
24. **Morales L.** Desarrollo de formulados granulares para incrementar la estabilidad ambiental de *Bacillus thuringiensis* usando diversos polímeros y su evaluación biológica. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis para optar el grado de doctor en ciencias con especialidad en Biotecnología. México, diciembre - 1996.
25. **Barrionuevo A.** Influencia del extracto de semilla de inga feuille "guaba" sobre la velocidad específica de crecimiento de microorganismos de interés industrial. Universidad Nacional de Trujillo- Facultad de Ciencias Biológicas – Escuela de Microbiología y Parasitología, Tesis Para Optar el Título de Biólogo Microbiólogo. 2002.
26. **Pereira B, Vieira D, Valle M.** Residual effect of two *Bacillus thuringiensis* h -14 var. israelensis products assayed against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in laboratory and outdoor at Rio de Janeiro- Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. 2005; 47 (3): 125-130.
27. **Masuh H, Seccacini E, De Licastro S, Zerba E.** Residualidad de un formulado sólido del insecticida microbiano Bti (H-14) en el control de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Revista peruana de epidemiología. 2002; Vol. 10 N 1.
28. **Arroyo M.** Inmovilización de enzimas; Fundamentos, métodos y aplicaciones. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I - Facultad de Ciencias

- Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 2008; 28040.
29. **Leal M.** Sobrevivencia y Actividad de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis en ambientes naturales contra larvas de mosquito. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis Para optar el Grado de Maestro en Ciencias. 1993.
  30. **Arroyo J, Raez E, Rodríguez M, Chumpitaz V, Burga J, De la Cruz W, Valencia J.** Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de Maíz morado (*Zea mays* L) en ratas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008; 25(2):195 – 99.
  31. **Córdova C, Estrada A.** Obtención de K-Carragenano y  $\Lambda$ -Carragenano a partir de macroalga *Chondracanthus chamissoi* y su aplicación en la industria alimentaria. UNMSM, Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial. Setiembre - 2008; Vol. 11(2): pp 52-58.
  32. **Solis I.** Estudio comparativo de las propiedades finales de extractos de carragenina K-I / K-II utilizando distintas algas productoras de carragenina K-II. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar el grado de Licenciado en Ciencia de los Alimentos. 2004.
  33. **Dunkle R y Shasha B.** starch- encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopatogens. Environ. Entomol. 1988; 17: 120- 126.
  34. **Soberón M, Bravo A.** Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Biotecnología, 2007; VI4CS3 indd 303.