

Ronald Vladimir Oropeza Velásquez

La eficacia de biocidas
microencapsulados a modo de
pinturas y emulsiones para el
control del *Aedes* (*Stegomyia*)
albopictus (Skuse, 1894)
(Díptera: Culicidae) en
condiciones de laboratorio

Director/es

Lucientes Curdi, Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Tesis Doctoral

LA EFICACIA DE BIOCIDAS
MICROENCAPSULADOS A MODO DE PINTURAS Y
EMULSIONES PARA EL CONTROL DEL ***Aedes***
(*Stegomyia*) ***albopictus*** (Skuse, 1894)
(DÍPTERA: CULICIDAE) EN CONDICIONES DE
LABORATORIO

Autor

Ronald Vladimir Oropeza Velásquez

Director/es

Lucientes Curdi, Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

98-Medicina y Sanidad Animal

2023



**Universidad
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

EFICACIA DE BIOCIDAS
MICROENCAPSULADOS A MODO DE
PINTURAS Y EMULSIONES PARA EL
CONTROL DE *Aedes (Stegomyia) albopictus*
(Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

Autor

Ronald Vladimir Oropeza Velásquez

Director

PhD. Javier Lucientes Curdi

FACULTAD DE VETERINARIA

2022



Universidad
Zaragoza



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD
ANIMAL

**EFICACIA DE BIOCIDAS
MICROENCAPSULADOS A MODO DE
PINTURAS Y EMULSIONES PARA EL
CONTROL DE *Aedes (Stegomyia) albopictus*
(Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), EN
CONDICIONES DE LABORATORIO**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
VETERINARIAS

Ronald Vladimir Oropeza Velásquez

Director: PhD. Javier Lucientes Curdi

FACULTAD DE VETERINARIA

2023



Universidad
Zaragoza



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza

D. Javier Lucientes Curdi, Catedrático Emérito del Departamento de Patología Animal (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, y como Director del Trabajo de Tesis Doctoral

Informa:

Que el presente trabajo de investigación del programa de Doctorado de Medicina y Sanidad Animal, que lleva por título: “EFICACIA DE BIOCIDAS MICROENCAPSULADOS A MODO DE PINTURAS Y EMULSIONES, PARA EL CONTROL DE *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae), EN CONDICIONES DE LABORATORIO”, presentado por el Licenciado en Veterinaria D. Ronald Vladimir Oropeza Velásquez, ha sido realizado bajo su Dirección, cumpliendo las condiciones exigibles para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Director: PhD. Javier Lucientes Curdi

2023

Un insecto que estuvo vivo hace aproximadamente siete millones de años
fue encontrado en la fosilizada resina de un árbol.

El descubrimiento fue realizado en la isla de Java, Indonesia.

Por: UNIVISION[®]. Publicado 8 FEB 2019 – 03:21 PM EST | Actualizado 8 FEB 2019 – 03:21 PM EST.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Director de esta tesis doctoral PhD. Javier Lucientes Curdi por la dedicación y apoyo que me ha brindado, por haber dedicado con mucha paciencia sus sugerencias e ideas, por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a esta Facultad y por permitirme ser partícipe en uno de sus tantos proyectos dentro de la Universidad.

Asimismo, agradezco al PhD. Carlos Calvete Margollés, por su apoyo desinteresado, personal y humano, sus aportaciones, correcciones, sus conocimientos rigurosos y precisos que me han dejado ver la luz en la construcción del trabajo.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de la constancia, ideas en los proyectos y esfuerzos previos, tomar el conocimiento de quienes lo tienen es también una forma de reconocerlos. En este caso, mi agradecimiento al profesorado de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda. Gracias por su amabilidad para formarme en las Ciencias Veterinarias, una tan apasionante carrera. Mi agradecimiento a la Comisión de Doctorado del Sistema de Gestión de la Calidad (Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal) coordinador PhD. Cristina Acín Tresaco, por la orientación facilitada y las sugerencias recibidas.

Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y la energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Por lo tanto, nunca dejaré de agradecer a mi familia, a mis padres Gonzalo y Amalia por su ejemplo a la dedicación, por su sacrificio, su comprensión y apoyo en brindarme las herramientas necesarias en la vida y así seguir la profesión de la Medicina Veterinaria. Gracias por alentar mis aspiraciones poniendo fé en mis sueños. A mis hermanos Alvaro, Christian, Boris y Erland, porque con ellos compartí una infancia feliz, que guardo en el recuerdo; me alentaron y me siguen brindando el apoyo necesario en los momentos difíciles. Gracias a ellos por apoyarme siempre, por eso, este trabajo es también el suyo.

Gracias a mis amigos, en especial a Esther y Helen, gracias por su aliento y el tiempo muy especial que me han concedido. Gracias a todos los compañeros de la Facultad, que siempre me han prestado su amistad y amabilidad desde el inicio.

A todos, muchas gracias!!!

EFICACIA DE BIOCIDAS MICROENCAPSULADOS A MODO DE PINTURAS Y EMULSIONES PARA EL CONTROL DE *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Díptera: Culicidae), EN CONDICIONES DE LABORATORIO

RESUMEN

PRUEBA I.- La eficacia de polímeros enriquecidos con insecticidas microencapsulados PI (pinturas insecticidas) Inesfly[®] contra *Aedes albopictus* se evaluó en condiciones controladas de laboratorio, utilizando la técnica de contacto forzado (OMS). Se analizó tres formulados con diferentes ingredientes activos (i.a.) combinados con piriproxifeno (PPF): una contenía dos piretroides (PY) y dos contenían organofosforados (OP). Se aplicó las pinturas sobre dos tipos de superficies y a dos concentraciones. Se utilizó hembras adultas nulíparas sin ingestión de sangre para determinar el efecto knock-down (KD) en los primeros 30 minutos, la tasa de mortalidad y el tiempo para alcanzar el 50% (la media) de mortalidad (TD₅₀) hasta las 72 horas. Se realizó diez bioensayos durante 27 meses después de un único tratamiento inicial de las superficies.

Se observó un mayor efecto cuando la superficie era más porosa y con una doble concentración de formulado que contenía PY: KD= IC 25,4% $p > (0,05)$ y TD₅₀= 16,1% IC 95% $p > (0,05)$. Cada formulado mostró un grado diferente de probabilidad para KD y TD₅₀ basados en los i.a.

Las implicaciones para el control de vectores se discuten con base en estudios de diferentes formulados y concentraciones de biocidas microencapsulados en el laboratorio y en bioensayos de campo en diferentes superficies.

Palabras clave— *Aedes albopictus*, pinturas insecticidas, microencapsulados, Inesfly[®].

PRUEBA II.- Para esta prueba se compararon tres concentraciones emulsionables (lacas) Inesfly[®] EM HOUSE IGR NG de piriproxifeno (PPF) al 0,0063%, 0,063% y 0,2%, cada una por triplicado y con un control. Se comparó la eficacia en la mortalidad acumulada contra larvas y pupas, el% de IE, el efecto de la hormona juvenoide (HJ)

contenida en las tres concentraciones y su relación con las consecuentes alteraciones morfogénicas ocurridas en los estadios larvarios y las pupas y la consiguiente alteración del ciclo gonotrófico normal de la siguiente generación F2.

La prueba duró dos años y medio, que fueron distribuidos en distintos intervalos de bioensayos independientes con una sola aplicación inicial, para lo cual se utilizó dos tipos de materiales comúnmente encontrados en entornos sinantrópicos y disponibles para que las hembras puedan realizar la ovoposición y se realice el desarrollo larval: pequeños contenedores o macetas de plástico y otro sustrato utilizado como ovitrampas y detección de especies: varillas de Masonite[®] denominado (tablex[®]) .

La mortalidad para los contenedores de plástico (macetas) en la fase de pupa para las tres concentraciones, fue significativamente distinta respecto a los demás estadios (100 %). La inhibición de la emergencia (% IE) para la concentración al 0,2 % (E3) se observó hasta los 21 meses y con un porcentaje del 93 %, 7 meses para 0,0063 % (E1) y 10 - 18 meses para 0,063 % (E2) con el 90 % y 92 % respectivamente. Del mismo modo para las tablillas de Masonite (tablex[®]) la mortalidad en las pupas (95 % - 100 %) en la concentración de PPF al 0,2 % (E3) fue significativamente distinta a las demás concertaciones.

El comportamiento de la mortalidad en todos los estadios larvales se mantuvo constante a la concentración del 0,2 %, por lo que el % IE fue significativamente diferente de las otras concentraciones (100 %). Sin embargo, se observó una mayor mortalidad en las concentraciones de PPF moderadamente bajas durante la etapa larvaria inicial.

La relación ovicida de las concentraciones de PPF fue efectivamente dosis-dependiente, ya que se registró un mayor % IE de adultos (F2) cuando la concentración aplicada fue más alta (2 %). En las tres concentraciones y en ambos materiales, se observó mayor tasa de alteraciones morfogénicas en pupas melanizadas o pupas blancas, y estadios de larvas LL₄ a pre - pupa, atribuidas a la acción de la hormona juvenil (HJ) de PPF que alteró determinados procesos fisiológicos ligados al desarrollo o crecimiento de los mecanismos de comunicación a la siguiente generación (F2), evidenciando el anormal ciclo gonotrófico.

Se discute el tratamiento de superficies de materiales únicamente con biocidas que no contengan insecticidas convencionales, especialmente aquellas que pueden ser utilizadas como transportadores de huevos (neumáticos de desecho...), sustratos aptos para la ovoposición, lugares aptos para el desarrollo larvario (imbornales) y utensilios domésticos como recipientes o contenedores ubicados en hábitats crípticos ocultos o abiertos que pueden almacenar agua en entornos urbanos y suburbanos.

Este método de acción (larvicida) podría proporcionar una estrategia complementaria para el control y manejo de los sitios de ovoposición, que podrían estar rezagados de los programas de control vectorial, o aportar una mejor comprensión del efecto de toxicidad en los estadios inmaduros y pupas de *Ae. albopictus*

Palabras clave— *Aedes albopictus*, microencapsulados, IGR.

SUMMARY

TEST I.- The efficacy of polymers enriched with PI microencapsulated insecticides (insecticidal paints) Inesfly was evaluated under controlled laboratory conditions, using the forced contact technique (WHO). Three formulations with different active ingredients (a.i.) combined with pyriproxyfen (PPF) were tested: one contained two pyrethroids (PY) and two contained organophosphates (OP). The paints were applied on two types of surfaces and at two concentrations. Adult nulliparous females without blood ingestion were used to determine the knock-down (KD) effect in the first 30 minutes, the mortality rate and the time to reach 50 % (mean) mortality (TD₅₀) up to 72 hours. Ten bioassays were conducted for 27 months after a single initial surface treatment.

A greater effect was observed when the surface was more porous and with a double concentration of PY-containing formulate: KD= CI 25.4 % (0.05) and TD₅₀= 16.1 % CI 95 % (0.05). Each formulated showed a different degree of probability for KD and TD₅₀ based on the a.i.'s.

Implications for vector control are discussed based on studies of different formulations and concentrations of microencapsulated biocides in the laboratory and in field bioassays on different surfaces.

Keywords— *Aedes albopictus*, insecticidal paints, microencapsulation, Inesfly®.

TEST II.- For this test, three emulsifiable concentrations (lacquers) of Inesfly® EM HOUSE IGR NG, at concentrations of pyriproxyfen (PPF) at 0.0063 %, 0.063 % and 0.2 %, respectively, were compared in triplicate and with a control. It was applied against eggs and larvae of *Aedes albopictus*, and two types of materials commonly found in synanthropic environments and available to females for oviposition were used: plastic pots and coatings of rough materials: mansonite® rods (tablex®). The test lasted two and a half years, which were distributed in different bioassay intervals with a single initial application.

Mortality for the plastic material (pots) at the pupal stage for the three concentrations was significantly different from the other stages (100 %). The inhibition of emergence (% EI) for the concentration 0.2 % (E3) was observed up to 21 months with a percentage of 93 %, 7 months for 0.0063 % (E1) and 10 - 18 months for 0.063 % (E2) with 90 % and 92 % respectively. Similarly, for the coating material (tablex®), mortality in pupae (95 % - 100 %) at the PPF concentration of 0.2 % (E3) was significantly different from the other concentrations.

The behavior of mortality in the larval stages was constant at the 0.2 % concentration, thus significantly different from the other concentrations, and almost zero percentages of emerged adults were observed. However, in the initial larval

stages, higher mortality was observed at moderately low concentrations. The ovicidal relationship of the PPF concentrations was effectively dose-dependent, since a higher % IE of adults (F2) was recorded when the concentration applied was the highest (2%). In all three concentrations and in both materials, a higher rate of morphogenetic alterations was observed in melanized pupae or white pupae, and larval stages L₄ to pre-pupae attributed to the action of the juvenile hormone (JH) of PPF.

The efficacy of PPF altered certain physiological processes linked to development or growth, and of the mechanisms of communication to the next generation (F2), evidencing the abnormal gonotrophic cycle.

The treatment of surfaces of materials only with biocides that do not contain conventional insecticides is discussed, especially those that can be used as egg transporters (waste tires ...), substrates suitable for ovoposition, places suitable for larval development (scuppers) and household utensils such as containers or containers located in hidden or open cryptic habitats that can store water in urban and suburban environments. This method of action (larvicidal) could provide a complementary strategy for the control and management of oviposition sites, which may be lagging behind vector control programs, or provide a better understanding of the effect of toxicosis on the immature stages and pupae of *Ae. albopictus*.

Key words— *Aedes albopictus*, microencapsulated, IGR.

Índice

1. Introducción y Objetivos	1
Introducción.	5
2. Revisión Bibliográfica	9
2.1. Taxonomía y Morfología de <i>Aedes albopictus</i>	9
2.2. Bioecología de <i>Aedes albopictus</i>	15
2.2.1. Ovoposición	15
2.2.2. Biología larvaria	16
2.3. Distribución de <i>Aedes albopictus</i>	17
2.4. Control de <i>Aedes Albopictus</i>	20
2.5. Insecticidas	23
2.5.1. Organofosforados	24
2.5.2. Piretroides	25
2.5.3. Reguladores del crecimiento IGR	27
2.6. Microencapsulación de insecticidas	29
2.6.1. Características de la microcápsula polimérica (MPI) Inesfly®	29
2.6.2. Polímeros biocidas microencapsulados a modo de pinturas	33
2.6.3. Desarrollo químico de los formulados Inesfly®	33

2.6.4.	Solución acuosa emulsiones Inesfly [®] EM HOUSE	34
2.6.5.	Pintura Iesfly [®] IGR SIN	36
3.	Materiales y Métodos	37
3.1.	Manejo de <i>Aedes albopictus</i> en el laboratorio	37
3.2.	Metodología de las pruebas	41
3.2.1.	Prueba I. polímeros (pinturas)	41
3.2.2.	Prueba II. solución acuosa emulsiones (lacas)	45
3.3.	Análisis estadístico	54
3.3.1.	Prueba I polímeros (pinturas insecticidas)	54
3.3.2.	Prueba II. solución acuosa emulsiones (lacas)	55
4.	Resultados	57
4.1.	Prueba I (pinturas insecticidas)	57
4.1.1.	Superficie más porosa (escayola)	57
4.1.2.	Superficie menos porosa (madera de pino)	61
4.1.3.	Análisis del modelo para el efecto KD para los dos tipos de superficies	63
4.2.	Prueba II	71
4.2.1.	Contenedores de plástico (macetas)	71
4.2.2.	Tablillas de Masonite [®] (tablex [®])	88
5.	Discusión	105
5.1.	Prueba I (pinturas insecticidas)	105
5.2.	Prueba II (emulsiones microencapsuladas)	115
5.2.1.	Contenedores de plástico (macetas)	116
5.2.2.	Tablillas de Masonite [®] (tablex [®])	118

5.3. Efecto de Piriproxifeno en las malformaciones morfogénicas de <i>Aedes albopictus</i>	124
6. Conclusiones	129
6.1. Prueba I	129
6.2. Prueba II	130
6.3. Recomendaciones	131
Referencias	133
Lista de Figuras	155
Lista de Tablas	163

Capítulo 1

Introducción y Objetivos

Quizás ningún otro animal sea más dañino para los seres humanos que los mosquitos, éstos, transmiten agentes infecciosos de diferentes enfermedades y se han convertido en un flagelo colosal en la historia de la humanidad. Además de la Malaria y la Filiariasis, transmiten otras enfermedades, algunas causadas por virus. Inicialmente, éstas infecciones virales se limitaban a entornos silvestres, pero han pasado y continúan causando problemas de salud pública para las personas que viven en entornos urbanos y periurbanos y ahora se han diseminado a casi todo el mundo (Lwande y cols., 2020)

Actualmente, las enfermedades emergentes y reemergentes transmitidas por insectos vectores en el contexto de la globalización, el desarrollo urbano y los estilos de vida cambiantes, continúan siendo variables de una amenaza para la salud pública. Pero además, el incremento de la temperatura media y el consiguiente cambio climático ha hecho que las enfermedades transmitidas por mosquitos vectores sigan siendo una de las mayores preocupaciones por el impacto en la mortalidad y morbilidad, principalmente porque representan alrededor del 17% de la carga mundial estimada de las enfermedades transmisibles y que causan más de 700.000 muertes al año (A. M. WHO, 2017)

Este panorama, hace que los métodos para su control se centren cada vez más en el comportamiento sinantrópico de las distintas especies de mosquitos y más aún con la marcada tendencia antropofílica de *Aedes albopictus* (Delatte y cols., 2010). Las hembras de esta especie entran voluntariamente al interior de las viviendas para alimentarse de sangre y reposar, sobre todo, si no cuentan con abundante vegetación durante el día para permanecer al aire libre. Además, en áreas urbanizadas *Ae. albopictus* coloniza los sistemas de alcantarillado, lo que le proporciona abundantes sitios de reproducción y reposo que facilitan el contacto con superficies artificiales (Montalvo y cols., 2022)

Uno de los sistemas utilizados para el control de estos vectores es la pulverización insecticida de nebulización residual y térmica de insecticidas denominado *Indoor Residual Spraying* (IRS) (Wahid y cols., 2019). Aunque la OMS recomienda aplicar este tratamiento en interiores y exteriores, el IRS no pudo producir la residualidad

esperada. Además, si persisten los brotes de mosquitos los tratamientos necesariamente se tendrían que repetir a intervalos que coincidan con el ciclo gonotrófico de esta especie (WHO y cols., 2019). Por lo tanto, dado que el sistema de aplicación IRS es muy limitado en algunos países, especialmente en los países occidentales (UE, EE. UU.) debido a su impacto en la salud humana, una composición de control integrado de plagas compuesto por metodologías simultáneas combinadas con recubrimientos insecticidas (PI) puede generar un enfoque alternativo más eficiente (Erlanger, Keiser, y Utzinger, 2008)

Como hemos mencionado, *Ae. albopictus* como insecto vector, se ha diseminado a nivel mundial, principalmente debido entre otros, al comercio de bienes como por ejemplo los neumáticos usados (Knudsen, 1995) o el bambú de la fortuna *Dracaena spp* (Madon, Mulla, Shaw, Kluh, y Hazelrigg, 2002); (Scholte y cols., 2008) facilitando así en gran medida su transporte entre los diferentes continentes, tanto de los adultos como sus huevos, éstos últimos, resistentes a largos periodos con poca humedad (P. R. D. Sprenger, 1987). Un estudio reciente (Carrilho, 2021) mostró que *Ae. albopictus* se ha asentado en las principales áreas urbanas de Europa. Ésta afirmación está basada en el uso de modelos estadísticos de registros de la presencia de esta especie en Europa, así como en las variables relacionadas más relevantes para su distribución y basada en el elevado grado de antropofilia de la especie.

Otros parámetros de su propagación, son también la abundancia y diversidad de los sitios de ovoposición adecuados, ya que *Ae. albopictus* primero desarrolla su ciclo fuera de las habitaciones humanas y los lugares más comunes de ovoposición o desarrollo de sus estadios ocurren en contenedores, ya sean naturales o artificiales, pequeños o medianos, que pueden contener agua (macetas, jarrones, platos, botellas, etc.) y que suelen encontrarse también en zonas ajardinadas, especialmente en zonas urbanas o periurbanas. De acuerdo a esto, una vez que la especie ha colonizado una nueva área, estas variables dificultarían en gran medida las medidas de control.

Pero además de la preferencia de la especie hacia los humanos, no se puede dejar de lado las molestias que causa su picadura, por supuesto no menos importante en las explotaciones ganaderas. Pero aún es mayor su importancia como vector de enfermedades conocidas como arbovirosis. Sus agentes se denominan arbovirus y presentan diferentes características moleculares y antígenas. Entre las arbovirosis transmitidas por mosquitos del género *Aedes* con mayor incidencia en el entorno urbano, destacan el Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), Fiebre amarilla (YFV), Fiebre del Oeste del Nilo (WNV) y otros arbovirus causantes de algunas encefalitis en las regiones tropicales y templadas de todo el mundo (Mitchell y cols., 1995); (Gratz, 2004); (Eritja y cols., 2005); (Kumar y cols., 2008); (La Ruche y cols., 2010). Tanto el DENV, ZIKV, YFV, CHIKV son transmitidos por el mismo vector (*Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*).

El DENV ha sido uno de los principales problemas de salud pública mundial desde la década de 1980 y la reciente propagación de los virus CHIKV y ZIKV en países donde ya se tenía casos de DENV ha desestabilizado aún más sus sistemas de salud. La OMS estima que más de 2500 millones de personas viven con el riesgo de contraer una de estas enfermedades, por lo que la rápida aparición de casos de ZIKV en varios

países del continente americano a llevarlo a declararlo una emergencia de salud pública internacional, debido principalmente a la asociación de ZIKV con casos de microcefalia congénita y otras complicaciones neurológicas durante la epidemia de 2015 en Brasil (Castro y Castro, 2020).

En los mosquitos de la especie *Ae. albopictus* una vez eclosionada la fase adulta es cuando se inicia la búsqueda de fuentes de sangre, ya que en condiciones naturales las hembras se alimentan de forma oportunista y de una amplia variedad de vertebrados (Chaves, Harrington, Keogh, Nguyen, y Kitron, 2010); (Richards, Ponnusamy, Unnasch, Hassan, y Apperson, 2006), pero con igual disponibilidad de huéspedes tienen una preferencia significativa hacia los humanos (Delatte y cols., 2010); (Curcó y cols., 2008); (Pombi, Costantini, y Torre, 2003); (Deichmeister y Telang, 2011); (Tandon y Ray, 2000). Por lo tanto, *Ae. albopictus* se adapta bien al interior de las viviendas (Dieng y cols., 2010), lo que puede implicar que esta adaptación a sitios con un alto grado antropofílico es beneficioso para un ciclo gonotrófico de mayor rendimiento, además de favorecer al ciclo reproductivo del vector.

Con lo cual, independientemente de su efectividad y residualidad, los controles generales como son los IRS en el interior y el exterior de las viviendas, que consiste en recubrir las paredes y otras superficies con un insecticida residual (incluidos los sistemas de alcantarillado) continúen utilizándose. Estas acciones (IRS), tienen repercusiones en la contaminación ambiental y en la tendencia a la aparición de resistencia a los insecticidas, por lo que han resultado en un cambio de políticas respecto a la fumigación generalista en espacios al aire libre a un uso más específico y duradero (Erlanger y cols., 2008).

El uso de recubrimientos que incorporan PI, sugiere el aumento de la persistencia de los plaguicidas, lo que ampliaría su residualidad o disminuiría el número de aplicaciones, reduciendo así los costes generales en las campañas de control. A este respecto un trabajo (Schjøler, Alifrangis, Kitron, y Konradsen, 2016) hace mención sobre el empleo de pinturas a las que se ha incorporado insecticidas (PI) que podrían resultar en una herramienta adicional de control de los estadios inmaduros o de la fase adulta, aumentando la persistencia de los ingredientes activos (i.a.) insecticidas (químicos o no), ampliando su periodo de acción, disminuyendo el número de veces que se tienen que aplicar, abaratando costes globales de las campañas de control y resaltando su fácil aplicación a distintas superficies, ya que no sería necesario un entrenamiento específico y de planificación logística a gran escala como se requiere para el IRS.

Por lo tanto, en este estudio, para analizar la eficacia de las PI microencapsuladas en *Aedes albopictus* se ha considerado la selección dentro de una variedad de opciones de superficies y composición de materiales, basados en los tipos y diferencias de varios aspectos relacionados con el comportamiento sinantrópico de la especie y su interacción y/o relación con los mismos, argumentado en que los mosquitos, al tener una fuente potencial de alimentación y con mayor preferencia antropofílica indican que la relación de los materiales o sustratos, además de ser comúnmente utilizados en la construcción de las viviendas y en su mayoría de elementos de madera y de materiales más porosos (hormigón, adobe, escayola. . . entre otros) podrían resultar determinantes a la hora de que las hembras eligen el lugar que este estrechamente relacionado con la presencia de

fuente de alimento, reposo, sitios adecuados para la ovoposición y el desarrollo larvario.

Es así, que esta investigación se ha fundamentado en la evaluación de la eficacia residual de biocidas microencapsulados para el control de *Ae. albopictus* mediante el diseño de bioensayos comparativos que permitan obtener conclusiones de los de distintos i.a. microencapsulados en base a formulados y concentraciones que sean aplicados a distintas superficies o tipo de materiales y bajo condiciones controladas de laboratorio.

Las PI para este estudio están basadas en la tecnología Inesfly[®] que se trata de una tecnología de microencapsulación de los i.a. elaborada en base a una cadena de polímeros vinil VeoVa en los que se ha microencapsulado el o los i.a. insecticidas, lo que se denomina microcápsula polimérica insecticida (MPI), que en su composición incluyen insecticidas convencionales en bajas dosis y un regulador del crecimiento de insectos (IGR), cuyo objetivo es que sean transportados a los sitios de ovoposición y de desarrollo larval por los mismos mosquitos adultos al tener contacto con la superficie tratada.

De acuerdo con la tecnología Inesfly[®], la microcápsula posee una estructura morfológica relativamente simple y está compuesta por dos elementos claramente diferenciados: el núcleo activo y un fino armazón polimérico que envuelve al primero. Por el contrario, el proceso de obtención es un procedimiento bastante complejo por el cual los i.a. (los insecticidas y el IGR) son introducidos en la matriz o sistema de pared de naturaleza polimérica, lográndose por las propiedades del polímero una liberación gradual de los i.a., insertados en función de los requerimientos concretos de aplicación del sustrato en el que se depositen las microcápsulas. Éste núcleo está compuesto por sustancias de naturaleza líquida que se incorporan los i.a. insecticidas (Herrero, 2009).

Estos insecticidas e IGR son efectivos cuando se aplican en cantidades muy pequeñas y generalmente tienen poco o ningún efecto sobre los humanos y la vida silvestre, ya que en lugar de matar a los insectos, directamente interfieren en los mecanismos normales de su desarrollo y hacen que mueran antes de llegar a adultos. Es así, que las PI que son polímeros en base a una sustancia química compuesta por macromoléculas, generalmente orgánicas que se han formado por la unión de moléculas más pequeñas que se repiten llamadas monómeras.

El polímero es un copolímero obtenido por polimerización en emulsión de acetato de vinilo y el VeoVa tipo 10 (un ácido mono carboxílico saturado sintético con una estructura altamente ramificada que contiene diez átomos de carbono). El primero nos daría un polímero excesivamente rígido ($T_g > 30\text{ }^\circ\text{C}$), es decir, una temperatura de transición vítrea (T_g) que es la temperatura a la que se da una pseudo transición termodinámica en algunos materiales. Como en este caso, los polímeros son muy sensibles a la hidrólisis, descompondrían al grupo éster. Por su parte, el VeoVa 10, un éster del ácido versático, se caracteriza por su mayor flexibilidad ($T_g < 3\text{ }^\circ\text{C}$) y resistencia a la hidrólisis, debido a que el carbono adyacente al grupo éster se encuentra completamente unido a radicales alquílicos, lo que impide el ataque y degradación del grupo éster.

El peso molecular de este polímero es de 850 g/mol aproximadamente y con un tamaño de partícula: 280 nm (nanómetros) o 0,280 micras. Esta macromolécula está formada por cadenas que contienen 7,5 moles de acetato de vinilo ($\text{CH}_3 - \text{CHOO} - \text{CH} - \text{CH}_2$) por cada mol de VeoVa 10 ($\text{R} - \text{COO} - \text{CH} = \text{CH}_2$) (relación 7,5/1). Se sintetiza a través de un proceso de polimerización en medio acuoso, por lo que las macromoléculas de polímero Vinil - VeoVa se encuentran emulsionadas en agua en una concentración del 55% de sólidos. Además, confiere a la estructura final la elasticidad necesaria para que se produzca la liberación de los i.a. insecticidas incluidos en el polímero (Fig. 1.1). Su resistencia al agua y a la intemperie es importante, siendo un polímero que no presenta toxicidad alguna. El resultado final es un polímero vinil - VeoVa que se encuentra emulsionada en agua y sólidos.

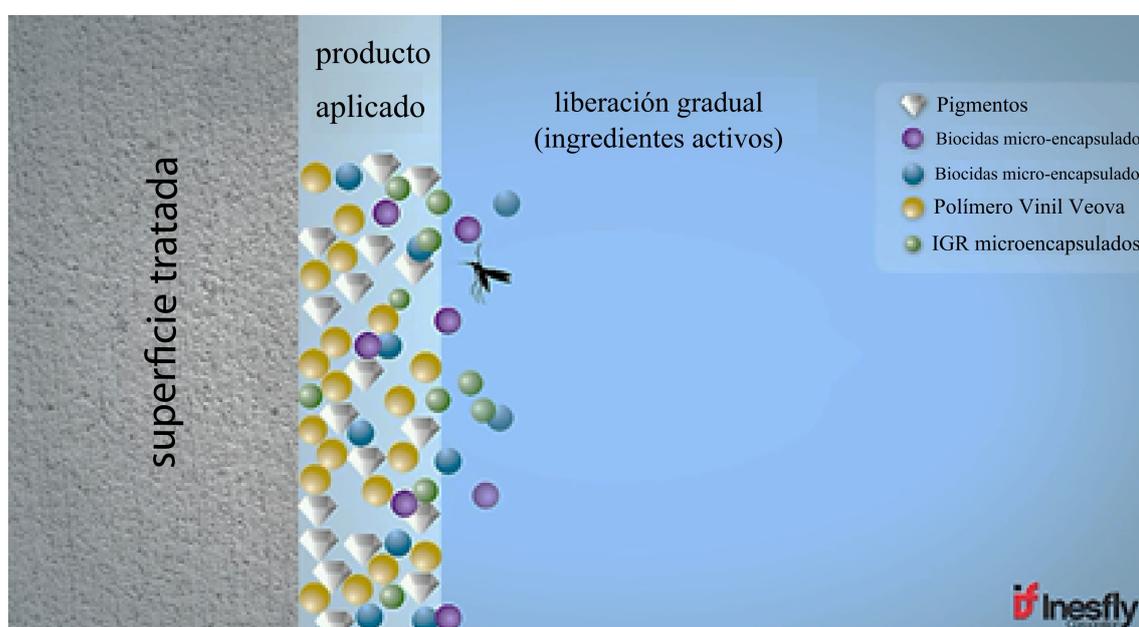


Figura 1.1: Representación de la liberación gradual de los i.a. microencapsulados de la PI. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

Así pues, la microcápsula, como hemos mencionado posee una estructura morfológica relativamente simple, en función de los requerimientos concretos de aplicación del substrato en el que se depositen las microcápsulas (Prueba I). En tanto para las emulsiones que contienen IGR (Prueba II) poseen las mismas características que los polímeros (pinturas), pero no poseen insecticidas convencionales, por lo que toda la actividad biocida se apoya en la presencia de IGR (Fig. 1.2). Por lo cual, la nula toxicidad de esta tecnología (IGR) radica en no incorporar ingredientes activos convencionales, actuando de manera que las partículas IGR antes de su aplicación están dispersas en el agua, donde tras la aplicación, el solvente (agua) se evapora y las partículas se aproximan hasta unirse unas con otras. Con el paso del tiempo y la acción de los agentes externos (calor y humedad) las partículas más próximas a la superficie se van liberando al ambiente y se forma una película estable, donde los IGR son protegidos y liberados muy lentamente.

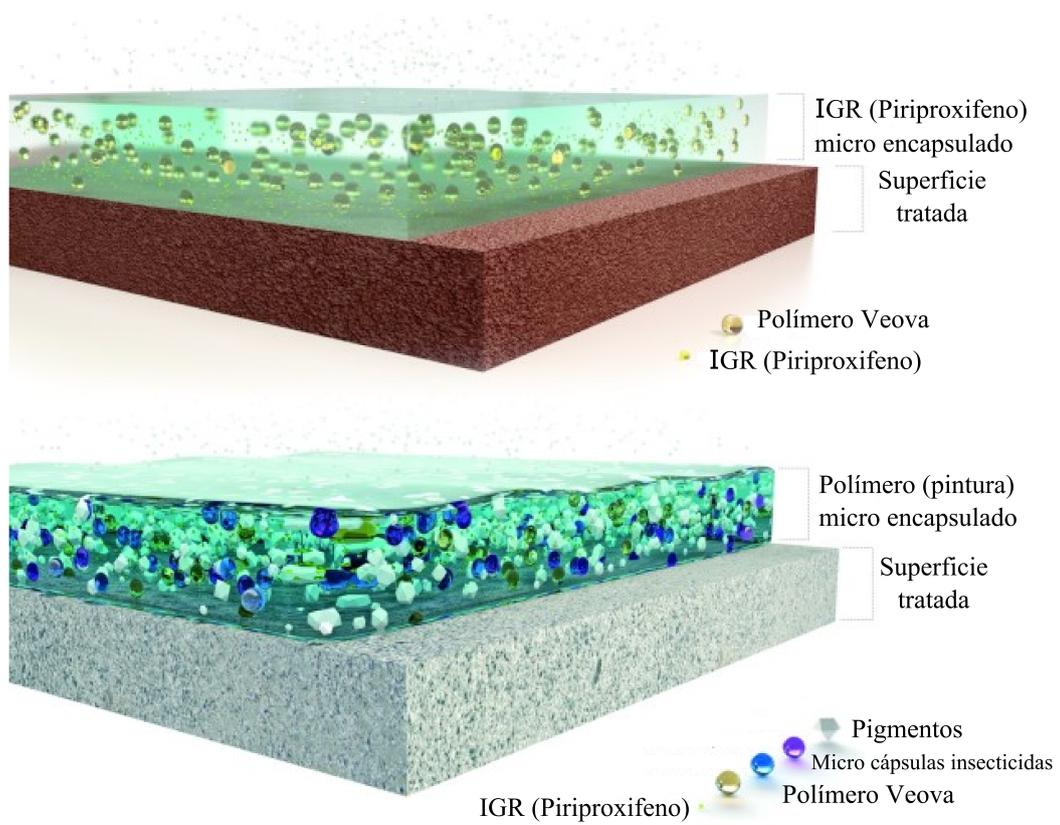


Figura 1.2: Biopolímeros de liberación lenta. Otorgan un elevado poder residual manteniendo la no interacción de los i.a. (Modificado a partir de:<http://www.inesfly.com>)

Objetivos

Objetivo I

Prueba I.- Comparar la eficacia de la mortalidad y la residualidad de tres distintos formulados insecticidas que contienen combinaciones de alfa-cipermetrina, d-aletrina, diazinón, clorpirifós y piriproxifeno, basados en la tecnología de microencapsulación Inesfly[®] y que son contenidos en polímeros con base de pinturas, con una única aplicación inicial, en distintos bioensayos independientes, a dos concentraciones y en dos tipos de superficies: una superficie de material más poroso (escayola) y una superficie de material menos poroso (madera de pino).

Evaluar las interacciones de los formulados insecticidas con respecto a sus ingredientes activos, la concentración aplicada y la superficie en que se los aplica.

Estimar los valores de tiempo en el que ocurre el efecto knock-down (KD) y la posterior mortalidad retardada en el menor tiempo del 50 % de los individuos (TD₅₀) y/o supervivencia hasta las 72 h de ser expuestas al contacto forzado (30 min) según el protocolo estandarizado de la OMS.

Objetivo II

Prueba 2.- Comparar la eficacia y residualidad en tres concentraciones de piriproxifeno basado en la microencapsulación de la tecnología Inesfly[®] contenidos en forma de emulsiones con base acuosa (lacas) y con una única aplicación inicial y en distintos bioensayos independientes en dos tipos de materiales: 1) revestimiento de virutas de madera (tablillas de masonite[®]) denominado (tablex[®]) y 2) un contenedor pequeño de plástico (macetas).

Determinar la eficacia de las concentraciones de piriproxifeno en ambos materiales:

- Los parámetros de viabilidad y eclosión de huevos (únicamente tablillas de masonite)
- La mortalidad a partir del estadio larval inicial L₁ hasta la fase de pupa

(contenedores de plástico y tablillas de masonite)

- La capacidad de eficacia residual de las concentraciones consecutivamente en cada bioensayo; la consiguiente inhibición de la emergencia (% IE) atribuidas al efecto de piriporxifeno y el análisis de las posibles nuevas generaciones que puedan completar el desarrollo gonotrófico normal y (o) atribuidas al efecto de piriproxifeno en los dos materiales (contenedores de plástico y tablillas de masonite)
- Obtener evidencias de las malformaciones morfogenéticas de los distintos estadios larvales y pupas, atribuidas al efecto de las concertaciones del i.a. (piriproxifeno) en contenedores de plástico y tablillas de masonite.

Capítulo 2

Revisión Bibliográfica

2.1. Taxonomía y Morfología de *Aedes albopictus*

Los mosquitos se encuentran entre los insectos mejor evolucionados (Goma, 1966); (Clements y cols., 1999) con aproximadamente 3500 especies divididas en 41 géneros y más de 135 subgéneros (Clements y cols., 1992); (Reinert y cols., 2000); (Foster y Walker, 2019). Específicamente el género *Aedes* de la tribu Aedini es uno de los tres géneros más conocidos (junto con *Culex* y *Anopheles*) y muchas de sus especies son importantes vectores de arbovirus y patógenos. En una revisión (Reinert, Harbach, y Kitching, 2004) de su taxonomía (tribu Aedini) propusieron cambiar el nombre de la especie a *Stegomyia albopicta*.

Ae. albopictus fue descrito inicialmente como el mosquito a “*bandas de bengala*” por Skuse (1894) (Skuse, 1899) sobre los ejemplares capturados en Calcuta (India). Aunque debido a la pérdida de individuos originales su neo tipo fue nombrado por Huang (1968) (Huang, 1968). Pertenece al orden Díptera, suborden Nematóceras, familia Culícida, tribu Aedini, género *Aedes*, subgénero *Stegomyia*, grupo *scutellaris* y subgrupo *albopictus* SKUSE, 1894 (Hawley, 1988).

Imago— Las características generales de *Ae. albopictus* en su morfología son más obvias a la hora de identificar a los mosquitos adultos con la de otros dípteros. Por ejemplo, en la combinación de escamas en las venas alares, en el margen posterior de las alas, en la probóscide y en las antenas, que son largas y filamentosas, conteniendo 14 o 15 artejos (Robertson, Hu, y cols., 1935). Anatómicamente el cuerpo se compone de tres partes principales: Cabeza, tórax y abdomen. En el tórax se encuentran los apéndices locomotores comprendidos de tres pares de patas, un par de alas y un par de alterios. Además, presentan dos pares de espiráculos laterales por donde respiran. Sin embargo, es precisamente en el torax donde se encuentran las características morfológicas externas para diferenciarlas de otras especies *Aedes* (*Aedes aegypti* y *Aedes polynisiensis*), en *Ae. albopictus* se muestra una nítida banda longitudinal de escamas blancas sobre el escudo torácico de tonalidad negruzca (Fig. 2.1)

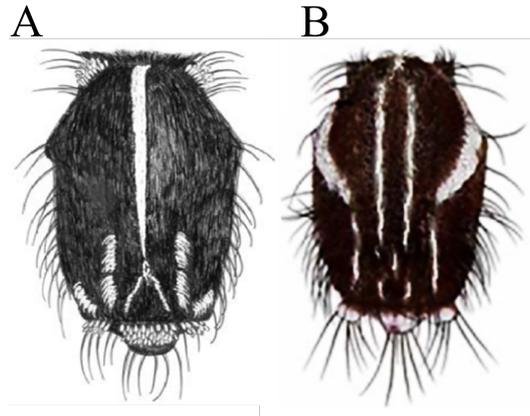


Figura 2.1: Diferencia de la cabeza y Scutum *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* (A)= Dorsum de la cabeza y Scutum con conspicuos de *Ae. albopictus*, raya media blanca plateada; *The Connecticut Agricultural Experiment Station* (2005). (B)= Diferencia entre Dorsum de la cabeza y Scutum con Conspicuous de *Aedes aegypti*. Modificado a partir de Rueda LM, *Magnolia Press*. (2004)

En el abdomen (lado dorsal) de *Ae. albopictus* se encuentran y se observa una banda formada por manchas de escamas blancas situadas lateral y transversalmente. Las patas presentan segmentos revestidos de escamas oscuras intercalados con otros de escamas blancas. En la cabeza se localizan los principales órganos sensoriales: un par de ojos compuestos, un par de antenas, un par de palpos maxilares y los palpos labiales (éstos últimos ubicados en la punta de la probóscide).

Los ojos están formados por un conjunto de omatidios capaces de detectar la luz, cada omatidio posee su cristalino, su cornea propia y un nervio óptico individualizado responsable de conducir la información al cerebro. El cerebro forma parte de sistema nervioso central y esta conectado con el resto del cuerpo a través de la cadena ganglionar ventral, compuesta por tres pares de ganglios en el tórax y seis pares en el abdomen. Las antenas se componen de 15 a 16 segmentos y son esencialmente órganos sensoriales; en los machos son exuberantes, mientras que en las hembras son discretas. Entre los ojos y debajo de las antenas se ubica un par de palpos maxilares (más cortos en las hembras).

Poseen un aparato bucal adaptado solo para la ingestión de alimentos líquidos o fácilmente solubles en saliva, cuyas mandíbulas y maxilas no son funcionales y las partes restantes forman una probóscide fina (Fernández Rubio, Moreno Fernández-Caparrós, y Soriano, 2014) donde se distinguen dos estructuras: el labio y el labelo, el primero es una estructura en forma de canal alargado y flexible que sirve para albergar los seis elementos alojados longitudinalmente en su interior, éstos son: un par de maxilas, un par de mandíbulas, el canal alimenticio y la hipofaringe. A lo largo de esta última, pasa el canal donde fluye la saliva. La saliva tiene acción anticoagulante y vasodilatadora, además sirve para lubricar el conjunto de estiletes del aparato bucal y de ese modo facilitar la alimentación. El canal salivar está conectado a la bomba salivar y a las glándulas salivales, donde la saliva es producida y almacenada. El canal alimenticio está conectado a los órganos del tracto digestivo, que son: el aparato cibario (conocido también como trompa o probóscide a contar de afuera hacia adentro) y la bomba cibariana, la faringe y la bomba faríngea, el esófago, los divertículos dorsales, el divertículo ventral, el estómago o intestino medio, la válvula pilórica, los tubos de

Malpighi (implicados en la excreción y reabsorción de agua), el íleon, el colon, el recto y el ano. El aparato reproductor femenino consta de: vagina, glándula accesoria, espermatecas, oviducto común, oviductos laterales, y una par de ovarios (compuestos por conjuntos de ovariolas) (Macias, 1968).

La alimentación de la forma adulta o alada tiene como principal objetivo suministrar nutrientes para su metabolismo energético. Tanto los machos como las hembras dependen de los carbohidratos que obtienen del néctar de las flores o de la pulpa de las frutas. A medida que ingieren el alimento, éste, se almacena en el diventrículo ventral para ser utilizado de acuerdo con las necesidades energéticas del mosquito.

La alimentación sanguínea o hematofagia es exclusiva de las hembras, la sangre es de vital importancia, tanto para la reproducción de la especie como para la propagación de los virus. Las hembras se alimentan de sangre para garantizar la maduración de los ovocitos, y es precisamente durante ésta actividad que se transmiten agentes patógenos de enfermedades. La alimentación sanguínea ocurre generalmente tras la cópula, y la hembra introduce en su huésped el conjunto de estiletes del aparato bucal en busca de los capilares sanguíneos localizados en la dermis. Si el huésped picado contiene patógenos en la circulación sanguínea, éstos, serán ingeridos junto con la sangre. Una vez saciada, la hembra buscará refugio en un lugar oscuro, húmedo y protegido de corrientes de aire para realizar la digestión de los nutrientes necesarios para la ovogénesis. Posteriormente, a medida que los ovocitos maduran, la hembra buscará un lugar adecuado para la ovoposición, y después de la puesta regresará nuevamente en busca de sangre para un nuevo ciclo de maduración y ovoposición. Este comportamiento se repite aproximadamente cada tres o cuatro días (Hawley, 1988); (Diniz, s.f.).

Huevos— Inicialmente (realizada la ovoposición) miden aproximadamente 1 mm de longitud, son de color blanco, alargados y en forma de habano. Posteriormente se oscurecen, llegando a ser negro azabache brillante y bastante duros, son capaces de resistir la desecación y pudiendo permanecer viables por meses e incluso años una vez completado el desarrollo embrionario (Nelson, 1986); (Linley, 1989); (Schlaeger y Fuchs, 1974); (Chadee y Beier, 1996). No poseen un volante ni flotadores (Goma, 1966) y si las condiciones ambientales son adecuadas (húmedas y cálidas) el desarrollo embrionario se completará en 48 h y las larvas eclosionarán en un lapso de dos a tres días, prolongándose hasta cinco cuando las temperaturas son más bajas.

Larvas— Son acuáticas, apodas, poseen tórax en forma de bulbo que es más ancha que la cabeza y el abdomen, tienen una cápsula cefálica completa y un solo par de estigmas funcionales dorsales en el octavo segmento abdominal. El tamaño de las larvas de *Ae. albopictus* y la duración de su desarrollo está determinada por la temperatura, el alimento, la densidad y el sexo (Hawley, 1988). Aunque se ha informado que el aumento de la densidad de larvas y la reducción de la disponibilidad de alimentos aumentan el riesgo de mortalidad y reducen el tamaño corporal (Laird, 1959).

En la etapa larvaria inicial (L_1) la longitud promedio varía de 1 mm hasta alcanzar 6 a 7 mm en L_4 . En L_1 (la forma que emerge del huevo) después de la ecdisis inicial la cápsula cefálica y el sifón son transparentes y blandos, posteriormente se endurecen y oscurecen. El estadio L_2 es la etapa que suele ocurrir posterior a la primera alimentación y después de uno a dos días de crecimiento sin cambios en el tamaño de la cápsula cefálica y el sifón. Sin embargo, el tórax y el abdomen crecen durante cada etapa (Laird, 1959). Entre el tercer (L_3) y cuarto estadio (L_4), son más robustos (Figura 2.2) debido al desarrollo de yemas torácicas y la acumulación de grasa corporal, donde se muestran los rudimentos de las trompetas respiratorias de la pupa (Hawley, 1988).

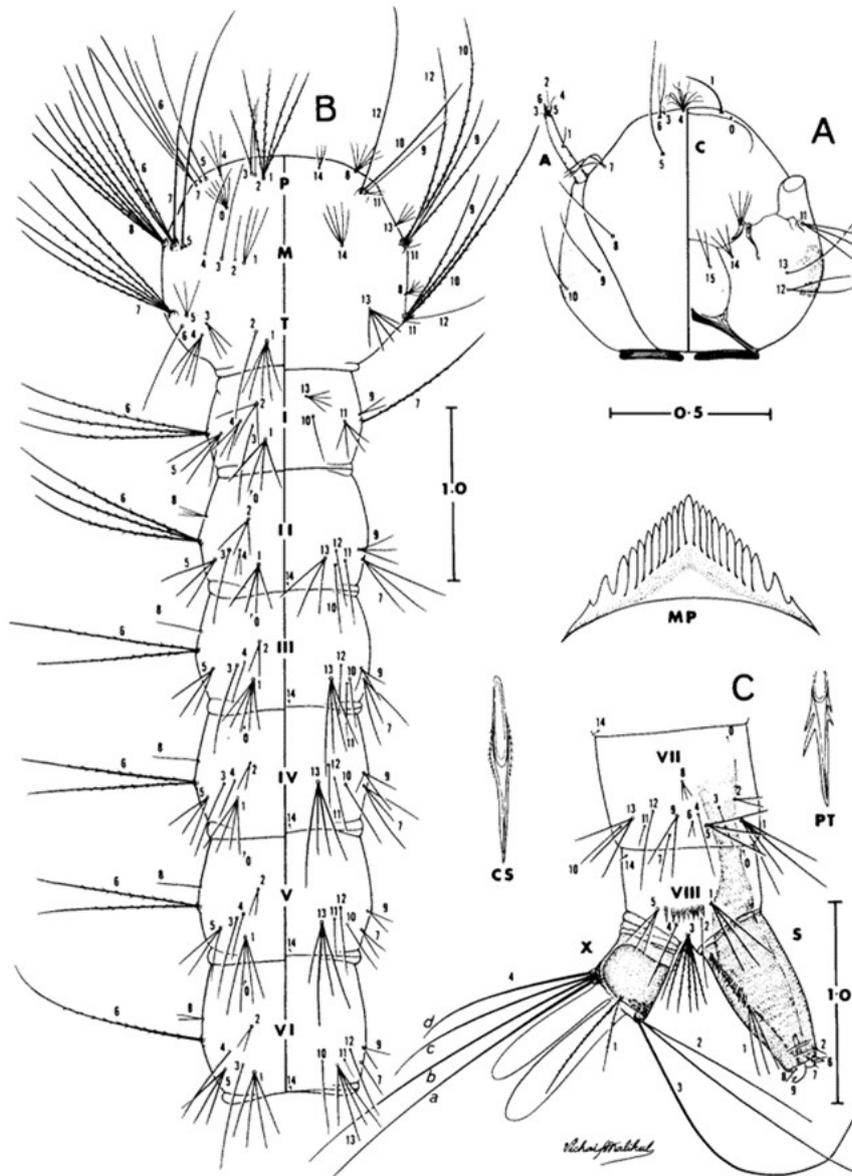


Figura 2.2: Larva de cuarto estadio de *Ae. albopictus*, dorsal-izquierda, ventral derecha. (A)= Cabeza; (B)= Tórax y abdomen; (C)= Segmentos abdominales terminales. A= antena, C= cabeza, CS= dientes del peine, M= mesotórax, MP= mentón, P= protórax, PT= espina del pecten, S= sifón, T= metatórax, I-X= segmentos abdominales. Modificado a partir de Huang (1971 y 1972)

Pupas– Al final del desarrollo del estadio L₄ se observa una morfología cada vez más gruesa y turgente (Goma, 1966) y cesa la alimentación, quedando en reposo en la superficie del agua, que es donde se produce la ecdisis emergiendo la pupa (Fig. 2.3). Cuando la pupa emerge por primera vez es blanca, pero en un corto período de tiempo mostrará cambios en la pigmentación, volviéndose negra (Chadee y Beier, 1996) y tomando una morfología peculiar en forma de “coma”(Goddard, 2016). Esta etapa es corta, dura uno o dos días y suele ser más activa que las pupas de la mayoría de las demás especies de mosquitos (Bates y cols., 1949); (Harwood y James, 1987).

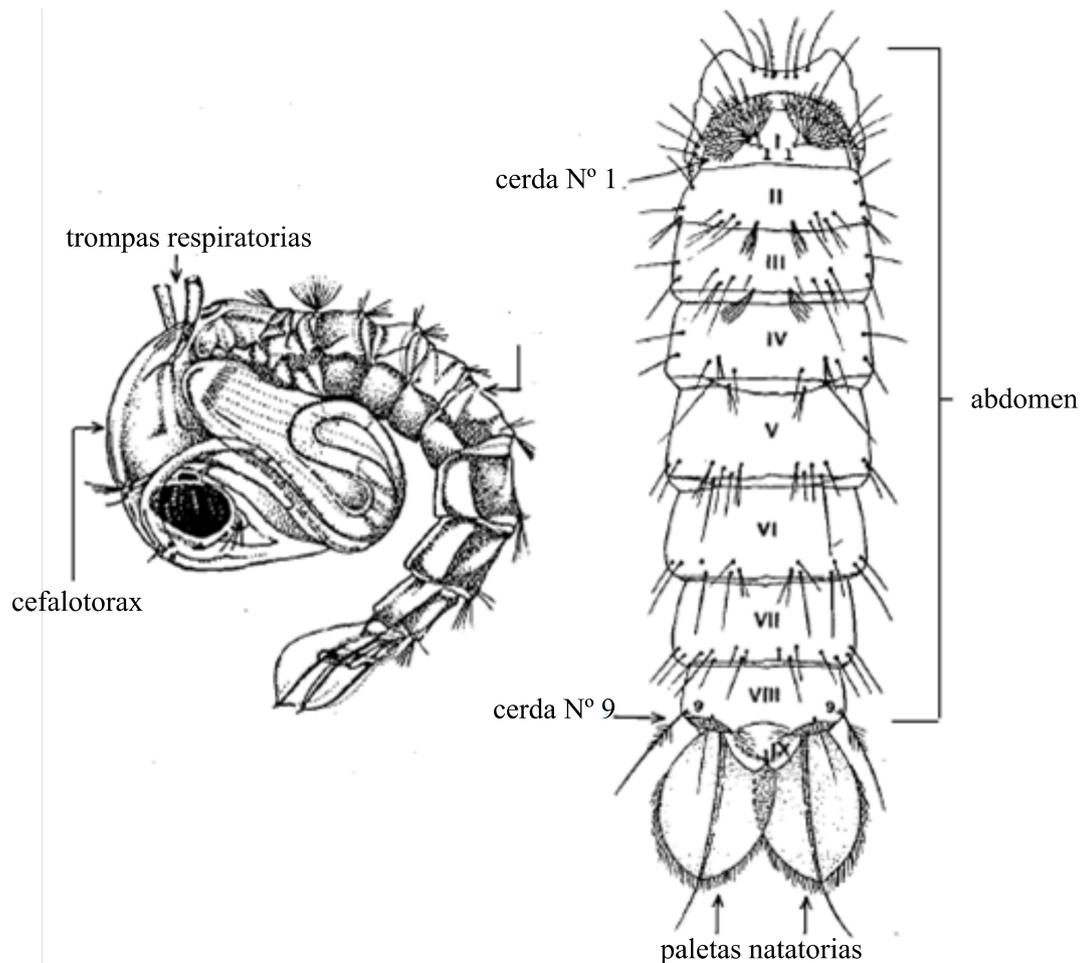


Figura 2.3: Morfología de una pupa de *Ae. albopictus* visión dorsal y lateral (modificado a partir de Hawley, 1988)

Es en ésta etapa donde se producen importantes modificaciones anatómico fisiológicas hasta la emergencia del adulto. Éstos cambios, son posibles gracias a la energía acumulada durante el estadio de larva. Reaccionan inmediatamente a estímulos externos, como vibraciones y se desplazan activamente por las paletas natatorias que poseen. Se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad, propiedad que contribuye a la emergencia del adulto (Goma, 1966). En la Figura 2.4 se observa algunas pautas donde se puede identificar a los machos según las claves de identificación publicadas por Belkin (Belkin, Heinemann, y Page, 1970) y Huang (Huang, 1968).

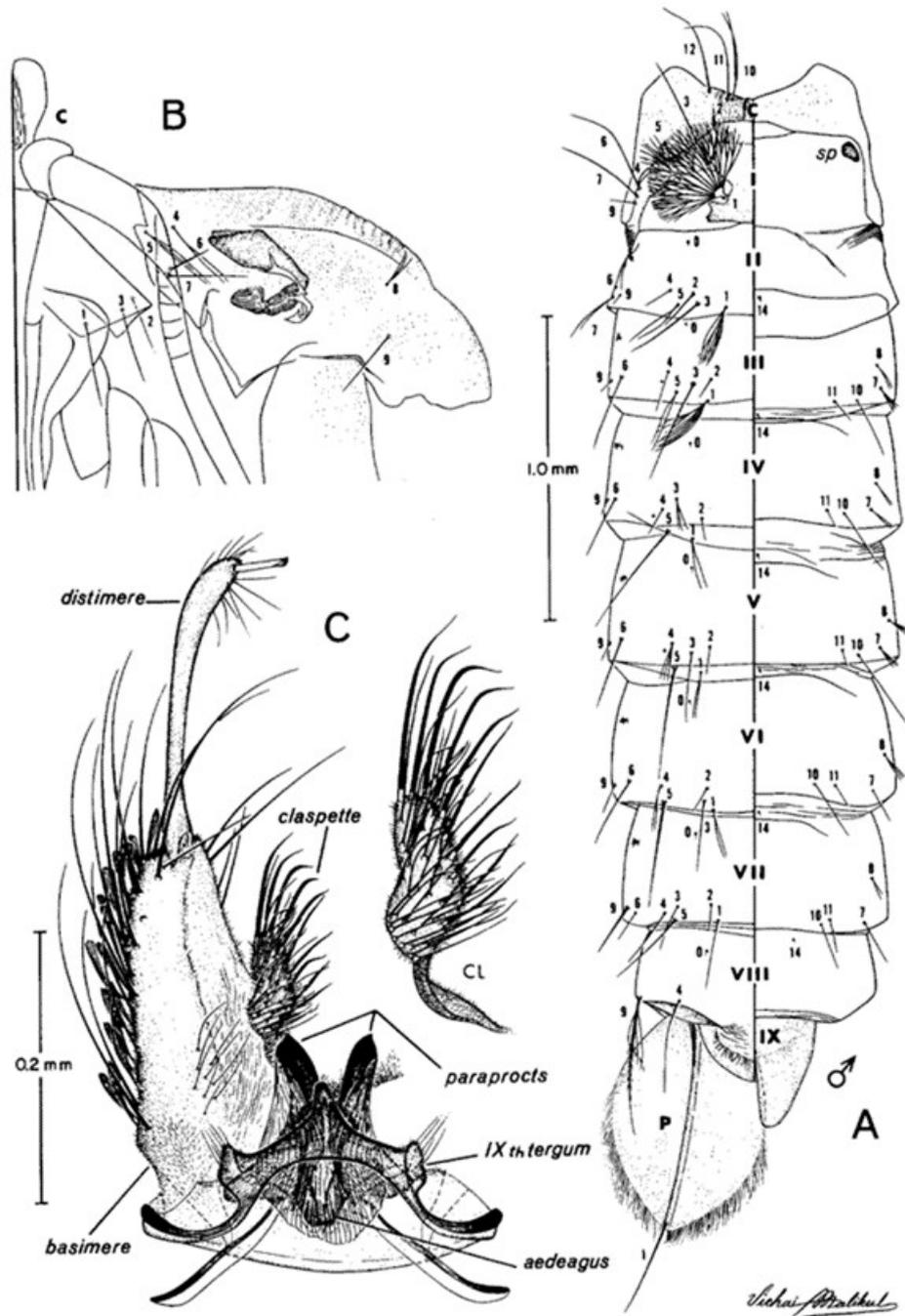


Figura 2.4: Pupa y genitalia del macho de *Ae. albopictus* (A)= abdomen pupal, dorsal a la izquierda, ventral a la derecha, P= paleta; (B)= cefalotórax de la pupa, (C)= cefalotórax; C= genitalia macho, CL= claspete. Modificado a partir de Belkin et al. (1970) y Huang (1968)

2.2. Bioecología de *Aedes albopictus*

Además de la pupa, los primeros cuatro estadios larvarios se desarrollan en el agua como se ha descrito anteriormente, pero los adultos son insectos alados que se alimentan de sangre (solo hembras) y de la savia azucarada de las plantas (tanto machos como hembras) (Burgess, Cowan, y cols., 1993). Luego de la eclosión del adulto, por lo general procuran lugares húmedos y sin corrientes de aire donde puedan reposar y si una hembra completa su alimentación (2 – 3 mg de sangre) se inicia la ovogénesis y ovopositarán aproximadamente 200 huevos dispersos en distintos sitios (Goma, 1966).

2.2.1. Ovoposición

Ae. albopictus prefiere realizar la ovoposición en zonas que estén provistas de contenedores con agua que ejercen una influencia sobre la decisión de los sitios donde se realice y la cantidad ovopositada, la cual es significativamente mayor especialmente si éstas están dotadas de una gran variedad de plantas con flores (Davis, Kaufman, Tatem, Hogsette, y Kline, 2016). Además, se ha informado que la textura, la reluctancia y la presencia de otros sustratos presentes en el recipiente de almacenamiento de agua afectan el comportamiento de ovoposición tanto para *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (O’gower y cols., 1957a; 1957b, 1963).

Es así, que la conformación del hábitat del sitio de ovoposición y la presencia de otras especies también tienen influencia significativa en los patrones de la ovoposición (Rey y O’Connell, 2014). Sin embargo, estudios previos señalan que la preferencia del hábitat se basa y destaca variables a nivel de parámetros de calidad, relacionadas con entornos urbanos y periurbanos (Rey, O’Meara, O’Connell, y Cutwa-Francis, 2006) y debido a que los huevos de *Ae. albopictus* son mucho más vulnerables a la desecación que los de *Ae. aegypti* sería de esperar que la frecuencia de la ovoposición en presencia de agua de *Ae. albopictus* sería mayor a la de *Ae. Aegypti*, sin embargo, esto no ocurre (Juliano, O’Meara, Morrill, y Cutwa, 2002).

Otros factores importantes que pueden afectar la capacidad de ovoposición son genéticos, bióticos y abióticos (Mayr, 1961). Dentro de estos factores el tamaño corporal del adulto, la edad gonotrófica, el volumen de sangre ingerida y la fuente de sangre son determinantes en la ovogénesis (D. Gubler y cols., 1970); (Mori y cols., 1979); (Grimstad y Haramis, 1984); (Blackmore y Lord, 2000). Una vez iniciada la ovogénesis, la ovoposición suele ocurrir hacia el final de la tarde, y cuando las hembras grávidas son atraídas a un recipiente oscuro o con sombra, los huevos son depositados en grupos separados, adhiriéndose a las paredes del recipiente a unos milímetros por encima de la superficie del agua y eclosionando sólo al contacto con ésta (Goma, 1966).

Bajo condiciones óptimas de laboratorio *Ae. albopictus* desarrolla un promedio de 42 a 88 huevos por cada ingestión de sangre para el primer ciclo gonotrófico y tiene una fecundidad media de por vida de 300 – 345 huevos (Hawley, 1988). Como ya se ha mencionado, estudios de laboratorio han encontrado que la limitación de alimentos

en las larvas podría reducir el tamaño de los adultos afectando la ovogénesis (Mori y cols., 1979).

2.2.2. Biología larvaria

Requieren de cinco a 10 días para la finalización de la fase larvaria, aunque podría variar dependiendo de la temperatura (Ponce, Flores, Badii, y cols., 2004) o la dieta (Hawley, 1988). Otras variables relacionadas con su abundancia (como cobertura arbórea o la precipitación) juegan un papel importante, aunque la temperatura afecta la densidad larvaria, ésta, tiene poco efecto (Franco Morales, 2020).

Las larvas no se encuentran en aguas turbulentas, debido a que no pueden soportar la acción de la corriente (Bates y cols., 1949), así que se encuentran en todo tipo de hábitats acuáticos estancados y más comúnmente en las aguas que contienen flora y fauna o conteniendo residuos de origen vegetal y animal (Clements, 2013). Se mueven de una forma característica y de dos maneras: por sacudidas del cuerpo por propulsión con los cepillos de la boca y mediante el buceo para ir al fondo cuando la superficie del agua es alterada o si de repente pasa una sombra sobre ellos o hay algún movimiento repentino (Goma, 1966); (WHO y cols., 1967).

Su alimentación se basa en microorganismos como bacterias, levaduras, protozoos y detritos orgánicos (animales y vegetales) que la larva lleva hacia la boca gracias al movimiento de sus cerdas bucales (Rossi y Almirón, 2004). El agua que contiene aminoácidos, amoniaco de ácidos grasos y en general un alto contenido de nitrógeno orgánico (resultado de una alta oxidación) parece ser el hábitat ideal para *Ae. albopictus* (Laird, 1959). El desarrollo de las larvas de *Ae. albopictus* en condiciones naturales puede ser en aguas con turbieza baja y un amplio rango de pH que va de 5,2 a 7,6 siendo el pH óptimo entre 6,8 y 7,6.

En la fase alada las hembras se alimentan de una amplia variedad de vertebrados (Chaves y cols., 2010), también se ha informado que de vez en cuando lo realizan en presencia de aves (Richards y cols., 2006). En el comportamiento de la alimentación podría suponerse que *Ae. albopictus* tiene una preferencia significativa hacia los humanos, aún con igual disponibilidad de huéspedes (Tandon y Ray, 2000). Cuando las hembras suelen alimentarse de sangre, generalmente, para acudir a dicha fuente vuelan en sentido contrario al viento, siguiendo la corriente de dióxido hasta su huésped objetivo, ya estando cerca utilizan estímulos visuales mientras sus receptores térmicos las guían.

En los machos, las partes bucales no están adaptadas para la succión de sangre, por lo que procuran su alimento de carbohidratos como el néctar. Las hembras también se alimentan de jugos de plantas y después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de huevos, pero si ésta es perturbada antes de estar completamente repleta puede realizarlo más de una vez entre una y otra ovoposición (Nelson, 1986). Debido a la estrecha relación entre el apareamiento y la alimentación de sangre, los machos pueden obstaculizar el comportamiento alimentario de las hembras. Es así,

como tanto los machos de *Ae. aegypti* como los de *Ae. albopictus* se localizan cerca de los hospedadores, probablemente para aumentar la probabilidad de apareamiento (Hartberg, 1971); (Cator, Arthur, Ponlawat, y Harrington, 2011).

2.3. Distribución de *Aedes albopictus*

Se encuentra ampliamente distribuido, sin embargo, las consecuencias de su presencia son diferentes en los países más desarrollados, y pese a que algunas variables como la globalización, el cambio climático y sus efectos lleguen a ser iguales en países menos desarrollados, el riesgo de su propagación ha ido aumentando mucho más (Juliano y Philip Lounibos, 2005); (Hales, De Wet, Maindonald, y Woodward, 2002); (Liu-Helmersson y cols., 2016); (McMichael, 2013); (Murray, Quam, y Wilder-Smith, 2013).

Su distribución original incluía el sudeste de Asia, las islas del Pacífico y el Índico, el norte de China, Japón y Madagascar. Desde entonces se ha extendido a todos los continentes (Lounibos, 2002); (Kraemer y cols., 2015). Un estudio realizado por Pasquali (Pasquali y cols., 2020) podría prever la presencia de la especie en Europa e indica que las características favorables permitieron su establecimiento alcanzado la distribución potencial máxima en Europa tomando en cuenta la simulación del proceso de diapausa y hace que la supervivencia y el establecimiento de la especie ocurra durante todo el año, relativa e independientemente de las condiciones climáticas. En Europa, cinco especies de mosquitos *Aedes* invasoras se han establecido hace tiempo: *Ae. albopictus*; *Ae. aegypti*; *Ae. japonicus japonicus*; *Ae. koreicus* y *Ae. atropalpus* (Baldacchino y cols., 2015). La figura 2.5 muestra la distribución actual en Europa, el mapa muestra la distribución actual conocida de *Ae. albopictus* a nivel administrativo “regional.” a partir de marzo de 2021. Se presentaron 5706 nuevos informes desde la actualización anterior (Octubre de 2020).

Con el fin de apoyar y armonizar las actividades de vigilancia el ECDC puso en marcha la producción de directrices para la vigilancia de los mosquitos invasores en Europa (ECDC y cols., 2018). Ya que desde hace tiempo su llegada a España se consideraba inevitable, puesto que el país reúne las condiciones adecuadas para esta especie.

En España, Sant Cugat del Vallés en la provincia de Barcelona fue la primera localidad donde se identificó su presencia (Aranda, Eritja, y Roiz, 2006). Posteriormente se detectó en otras regiones y provincias: País Vasco (Guipúzkoa 2014), Cataluña (Girona 2008, Tarragona 2005), Comunidad Valenciana (Castellón 2010, Valencia 2013, Alicante 2005), Islas Baleares (Mallorca 2014), la Región de Murcia (Murcia 2011) y Andalucía (Almería 2014, Granada 2014, Málaga 2014) (Roiz y cols., 2007); (Alarcón-Elbal y cols., 2013); (Alarcón-Elbal y cols., 2014); (Delacour-Estrella y cols., 2014); (Barceló y cols., 2015); (Collantes y cols., 2015); (Delacour Estrella y cols., 2015); (Miquel y cols., 2019). La distribución conocida en España se ha incrementado a partir de 2014 en 70 municipios 3 provincias (Huesca, Lleida y Cádiz) y las islas de

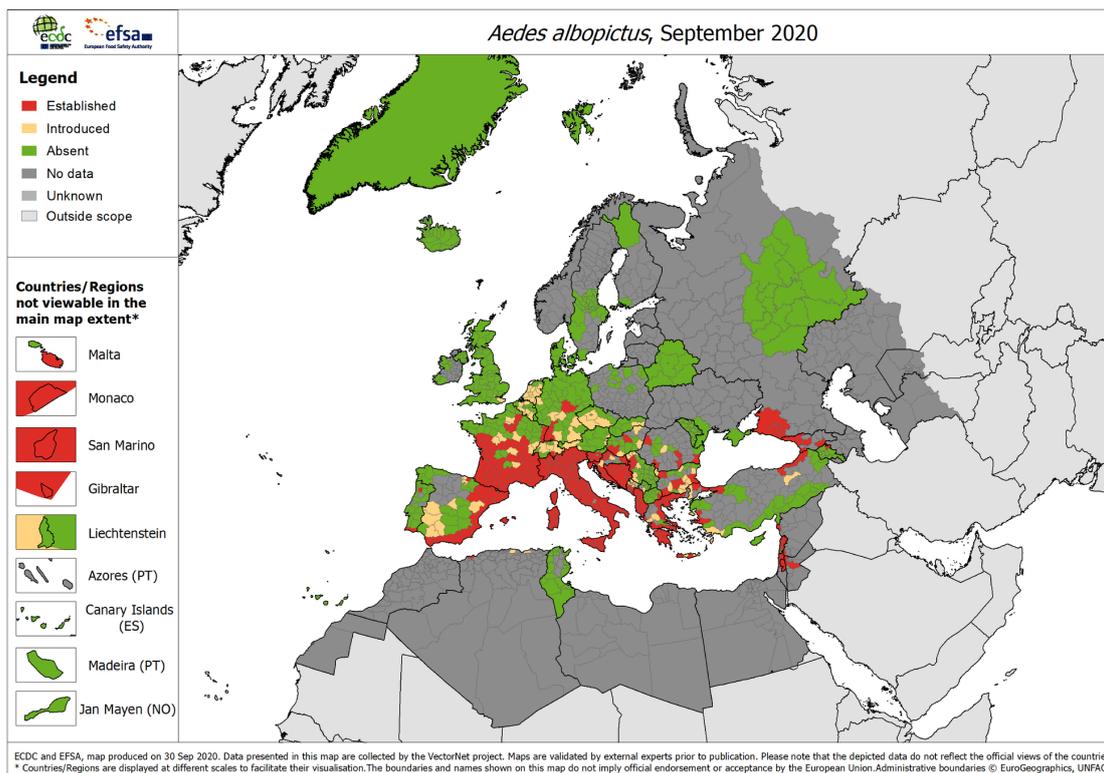


Figura 2.5: Distribución de *Ae. Albopictus* en Europa. Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades y Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Mapas de mosquitos [internet]. Estocolmo, ECDC; 2021

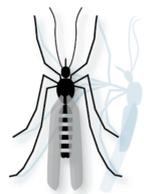
Menorca e Ibiza (Islas Baleares) (Delacour Estrella y cols., 2015).

En Cataluña, los hallazgos más notables fueron, por un lado, los de la provincia de Lleida, que incorporan definitivamente esta provincia a la lista de colonizados. En 2008, en el municipio de Maials (Collantes y cols., 2015). En el País Vasco e Irún en 2014 (provincia de Gipuzkoa) (Delacour Estrella y cols., 2015). El hallazgo de 2015 ocurrido en la ciudad de Huesca (Aragón) (Delacour-Estrella y cols., 2016). En las Islas Baleares, además de la expansión en las islas de Mallorca e Ibiza, y los acontecimientos más notables fueron que la última de las tres islas principales (Menorca) ha sido colonizada (Bengoa y cols., 2018), así como en la isla menor de Formentera. Después de la revisión de Collantes y cols. (2015), los últimos muestreos desde 2015 han aumentado dramáticamente el rango conocido de esta especie en España (Fig. 2.6).

En Andalucía, se han detectado nuevos municipios positivos específicamente en la provincia de Almería (Bueno-Marí y García-Mújica, 2015), además de los municipios costeros también se estudió la ciudad de Granada, en referencia a las alertas del proyecto “Mosquito Alert”, y algunos puntos resultaron positivos (Collantes y cols., 2015). Recientemente se ha informado su detección en cuatro municipios diferentes en Extremadura (Bravo-Barriga y cols., 2019). Así como la invasión progresiva en el norte de España (Goiri y cols., 2020) y en casi todos los municipios de la región han observado la presencia de *Ae. albopictus* en la región de Murcia (Collantes, Méndez, Soto-Castejón, y Muelas, 2020). En la comunidad de Madrid dos ciudadanos enviaron

Distribución del mosquito tigre (*Aedes albopictus*)

Mayo 2020



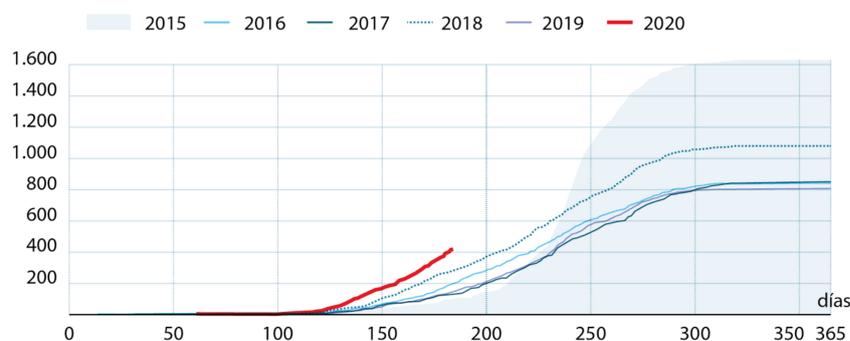
Tamaño
Entre 5 y 10 mm

- Presente
- Introducido
- No se ha observado
- Desconocido



Acumulación diaria de mosquito tigre

Valores corregidos considerando el esfuerzo de captura / En individuos



Fuente: Centro europeo para la prevención y el control de enfermedades / Mosquito alert

ABC

Figura 2.6: Distribución de *Ae. Albopictus* en España, 2020. Centro europeo para la prevención y control de enfermedades / Mosquito alert / ABC

en 2018 fotos de mosquitos tigre adultos encontrados en Velilla de San Antonio y Rivas-Vaciamadrid que fueron confirmados en el laboratorio de entomología de una universidad. Las fotos fueron confirmadas como *Ae. albopictus* por el departamento de biología de la Universidad Complutense de Madrid. El seguimiento posterior de estos municipios mostró que aunque Rivas-Vaciamadrid no confirmó ningún ejemplar de *Ae. albopictus* en 2018, sin embargo, se produjo otra reintroducción allí en 2020 (Iriarte y cols., 2021).

Así mismo, durante el periodo 2016 - 2018 se notificaron y gestionaron un total de 21 casos de enfermedades arbovirales en el municipio de Valencia: 8 casos de DENV, 7 casos de CHIKV y 6 ZIKV, en 8 de los cuales (38 %) se detectó actividad del vector *Ae. albopictus* (Bueno Marí y Quero de Lera, 2021). En el verano de 2020, en la Comunidad Autónoma de La Rioja, se detectó por primera vez la presencia de huevos en un área urbana, el primer registro de esta especie en la región (Ruiz-Arrondo, Delacour-Estrella, Santibáñez, y Oteo, 2021).

En otros continentes, más específicamente en América del Norte, el primer registro

oficial en los EE. UU. se realizó en Texas (1985) (Sprenger y Wuithiranyagool, 1986) con excepción de Hawái, donde se considera que habita desde principios del siglo XX (Mitchell y cols., 1995). Sin embargo, se ha indicado que pudo haberse establecido años antes (Reiter y Darsie Jr, 1984). Dos años después de haberlo detectado en Texas se reportó en 26 de los 50 estados norteamericanos, especialmente en Florida (Moore y Mitchell, 1997); (Parker, Ramirez, y Connelly, 2019).

En América del Sur, el primer registro se realizó en Brasil en 1986 (Forattini, 1986) donde se ha distribuido ampliamente y donde ha llegado a colonizar 20 de los 27 estados (Santos, 2003). Otros países donde se había detectado han sido, cronológicamente, Bolivia en 1995 (OPS, 1987), Colombia en 1998 (Vélez y cols., 1998), Argentina, Uruguay (Rossi, Pascual, y Krsticevic, 1999); (Rossi y Almirón, 2004) y Venezuela en el 2009 (Navarro, Zorrilla, y Moncada, 2009). Aunque no se incriminó como un vector importante del DENV, CHIKV y ZIKV en América del Sur, su importancia a este respecto ha sido ampliamente discutida desde que se está propagando rápidamente y la tendencia es alta a migrar a entornos selváticos y urbanos. Por lo tanto, las iniciativas de monitoreo de resistencia a los insecticidas también tienden a extenderse a *Ae. albopictus* en Brasil para mantener los compuestos químicos como una herramienta eficiente de control de vectores cuando sea necesario (Aguirre-Obando, Martins, y Navarro-Silva, 2017); (Ferreira-de Lima, Câmara, Honorio, y Lima-Camara, 2020)

Actualmente la distribución geográfica de *Ae. albopictus* en las regiones tropicales y subtropicales ha provocado varios brotes (Rodríguez-Morales, 2015); (Zanluca y cols., 2015), seguido de otros 29 países que reportaron transmisión del ZIKV antes de 2016 (Hennessey, Fischer, y Staples, 2016) siendo Brasil el país más afectado (Ventura y cols., 2016); (Petersen y cols., 2016); (Mlakar y cols., 2016); (Rubin, Greene, y Baden, 2016); (Musso y cols., 2015) y desde entonces se ha experimentando una superposición de epidemias, especialmente en las áreas urbanas (Vicente, Silva, Pereira, y Miranda, 2021).

2.4. Control de *Aedes Albopictus*

El control de este vector es de importancia sanitaria a nivel global, dado que *Ae. albopictus* es (junto a otras especies de *Aedes*) vector de varios arbovirus (Bueno Marí y Jiménez Peydró, 2010) incluyendo el DENV (Simmons, Farrar, y van Vinh Chau, 2012), Fiebre amarilla (Jentes y cols., 2011), CHIKV (Leparc-Goffart, Nougairede, Cassadou, Prat, y De Lamballerie, 2014), y puede infectarse naturalmente o en el laboratorio con numerosos arbovirus (Marques, Marques, y Degallier, 1998); (Lambrechts, Scott, y Gubler, 2010); (Mitchell y Gubler, 1987). Por lo tanto, esta especie podría establecer un enlace entre formas selváticas y urbanas de varias enfermedades, incluida la encefalitis equina venezolana (Lambrechts y cols., 2010).

Ae. albopictus es también un vector conocido de la Dirofilariosis (*D. immitis* y *D. repens*). La evidencia ha demostrado la transmisión del parásito por las poblaciones italianas (Cancrini, Romi, y cols., 2003); (Cancrini, Di Regalbono, y cols., 2003) junto

con un aumento en la prevalencia de la *Dirofilariosis* humana en Italia (Pampiglione y cols., 2001). Por otra parte, es un vector competente de CHIKV y bajo ciertas circunstancias puede ser mejor trasmisor que *Ae. aegypti* (Vazeille y cols., 2007). Los virus del DENV, ZIKV y CHIKV son transmitidos a los seres humanos durante la picadura de mosquitos hembra del genero *Aedes* y dentro de éste la especie *Ae. aegypti* es el principal implicado en la transmisión de estos virus, sin embargo, otra especie de mosquitos del genero *Aedes* como *Ae. Albopictus* y *Ae. polynisiensis* han sido descritos como transmisores de uno o mas de los citados virus.

A nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo, la principal arma utilizada contra los mosquitos es la aplicación de insecticidas mediante nebulización de ultra-bajo-volumen (ULV) diseñado y dirigido exclusivamente contra los mosquitos adultos. Por otro lado, uno de los factores más importantes en la mortalidad de las larvas es la presión que ejercen sus propias poblaciones sobre los criaderos por el consumo de nutrientes cuando la densidad es alta. Por esta razón, las medidas de control están más dirigidas a controlar a los adultos (Service, 1992); (D. J. Gubler y Clark, 1996).

A pesar de las campañas de fumigación a gran escala, ésta situación muestra un progreso en las poblaciones de mosquitos, aunque algunos estudios sugieren que la erradicación de la especie *Aedes* es imposible una vez que se ha asentado en un área (Hernández Chavarría y García, 2000). Entonces, se puede decir que son solo medidas de control en lugar de medidas de eliminación, ya que esto aparentemente no se puede lograr. Sin embargo, al menos un estudio ha demostrado lo contrario (Kay, Marten, y Reid, 1998).

Desafortunadamente, esta reducción de la densidad de los adultos suele ser solo temporal, porque en primer lugar, la fumigación no afecta a las larvas que aún están vivas en los criaderos, y en segundo lugar, la fumigación generalmente se realiza fuera de las viviendas, lo que significa que algunos mosquitos pueden sobrevivir porque se encuentran reposando o escondidos en el interior de las viviendas (Brown, Williams, Gwinn, y Melson, 1998). Por lo tanto, existe la necesidad de optimizar el despliegue de la fumigación residual en interiores con nebulización de ultra-bajo-volumen para la respuesta a brotes de enfermedades (Cavany y cols., 2020).

Erlanger y cols. (2008) concluyeron que el control integrado de vectores puede ser más efectivo, argumentando que la gestión ambiental por sí sola puede tener un impacto mínimo. Dos revisiones posteriores (Pilger, De Maesschalck, Horstick, y San Martin, 2010) y (Esu, Lenhart, Smith, y Horstick, 2010) se centraron en la pulverización espacial peri-doméstica y concluyeron que no había evidencia para respaldar su uso como intervención independiente o junto con otras para controlar los brotes de Dengue.

Por otro lado, entre los factores negativos asociados con el control químico de las poblaciones de mosquitos están: la falta de especificad, la selección de cepas resistentes, los efectos nocivos, los efectos corrosivos y coste. . . entre otros (Hernández Chavarría y García, 2000); (Service, 1992), y se ha sugerido que un enfoque más efectivo podría efectuarse mediante la auto-difusión por las hembras adultas que se impregnan con los insecticidas y su posterior propagación a nuevos lugares de reproducción (ovoposición

y desarrollo larval) (Caputo y cols., 2012); (Ranson, Burhani, Lumjuan, y Black IV, 2010); (Vontas y cols., 2012).

Por lo cual, el control basado en compuestos de origen natural ha demostrado que aún tienen potencial para controlar la proliferación de vectores, como por ejemplo, los compuestos aromáticos simples, que son efectivos contra los vectores adultos y sus larvas, e incluso sus huevos (Soares, Silva-Júnior, Moreira, y Aquino, 2022), y se consideran una alternativa mucho más segura y menos tóxica a los compuestos sintéticos, aunque una variedad de extractos de plantas tienen actividad mosaginoso o repelente contra los mosquitos vectores y su eficacia depende de pruebas de laboratorio, y su aplicabilidad en campo es limitada (Şengül Demirak y Canpolat, 2022).

Otro método de control es el biológico, que durante mucho tiempo ha logrado mayores avances en las estrategias de reducción del vector, incluida la producción de cepas de mosquitos manipulados genéticamente *Sterile Insect Technology*, (SIT). Un estudio de aplicación del SIT para el control de *Ae. albopictus* en la Isla Reunión (Gouagna y cols., 2020) se ha realizado exitosamente en cada uno de los periodos de las liberaciones de campo para evaluar el rendimiento de los machos estériles. Concluyendo, que los machos liberados son capaces de aparearse con hembras salvajes, lo que proporciona datos alentadores para futuras pruebas piloto. Aun así, para respaldar la evaluación de riesgos y el análisis de riesgos y beneficios antes de cualquier liberación en campo, especialmente para organismos no nativos, existe la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) (Mason, Everatt, Loomans, y Collatz, 2017); (Barratt y cols., 2021) y aunque existen diferencias entre países, el riesgo podría ser importante si la liberación de insectos no son completamente estériles, también podrían ser determinantes parámetros como la afección de depredadores que interactúan (Bonds, Collins, y Gouagna, 2022), la resistencia a la radiación, liberación errónea de hembras fértiles y el aumento de la densidad de las especies objetivo. Sin embargo, una evaluación integral de los riesgos ambientales asociados con SIT y la necesidad de hacer que sea más rentable, es aconsejable y esencial (Kapranas, Collatz, Michaelakis, y Milonas, 2022); (Oliva y cols., 2021).

En cuanto a el control larvario, se han definido una gama amplia de organismos que actúan como una forma biológica alternativa para reducir la densidad, que incluye copépodos, otros artrópodos, planarias, nematodos, peces de agua dulce y tortugas, entre otros...(Sulaiman, Pawanchee, Wahab, Jamal, y Sohadi, 1997); (Schaper, Hernández, y Soto, 1998); (Soto, Schaper, Angulo, y Hernández, 1999); (Zouache y cols., 2009); (Mason y cols., 2017) (Minard y cols., 2013); (Soumare y Cilek, 2011); (Nyamah, Sulaiman, Omar, y cols., 2011). *Bacillus thuringiensis* un larvicida (Avignone-Rossa y Mignone, 1995) que refleja las desventajas de los pesticidas químicos mostrando el uso beneficioso de los productos a base de toxinas Cry (Rao, Goswami, y Rawal, 2021), como se habría comprobado que varias cepas de *Wolbachia*, incluyendo (*w*Ri), (*w*MelPop), (*w*Pip), y (*w*Mel) se han transferido correctamente en *Ae. albopictus* a través de micro inyección embrionaria (Xi, Khoo, y Dobson, 2006); (Fu y cols., 2010); (Calvitti, Moretti, Lampazzi, Bellini, y Dobson, 2014); (Blagrove, Arias-Goeta, Failloux, y Sinkins, 2012).

En Europa, los IGR y los piretroides son los productos químicos más utilizados

en las estrategias de control como larvicidas y adulticidas, respectivamente. Aunque también se ha estudiado la autopropagación de IGR (Caputo y cols., 2015); (Ohba y cols., 2013); (Snetselaar y cols., 2014); (Suman, Wang, Bilgrami, y Gaugler, 2013). El control en España está basado en parámetros generales como el control para las zonas periurbanas y en la información a la población sobre los riesgos que implican su presencia en los municipios donde se ha establecido (Laycock, Paniego, y Javier, 2022). En el plan nacional de preparación y respuesta se ha estructurado planes de vigilancia epidemiológica, que incluyen gestión e información de casos mediante la sanidad ambiental y sobre todo el control del vector e identificación de su presencia, su densidad, los parámetros entomológicos y otros datos de estudios específicos como son la duración del ciclo gonotrófico, la actividad biológica del vector y el hábitat larvario. Estos datos de vigilancia se realizan mediante métodos de muestreo útiles para la identificación de la presencia del vector en nuevas zonas de España, tales como, la utilización de trampas de ovoposición y muestreos larvarios (Lucientes Curdi y Collantes Alcaraz, s.f.); (Rodríguez Villa y cols., 2020).

Tales medidas de control, no han de pasar de manera necesaria por la aplicación de productos biocidas, sino por llevar a cabo acciones de control físico o mecánico, como la destrucción de posibles objetos que acumulen pequeñas cantidades de agua o la renovación constante del contenido hídrico de diversos recipientes (Marí y Peydró, 2012). Sin embargo, el uso de productos químicos tiene la desventaja del desarrollo de resistencia y bioacumulación. Por lo tanto, en los últimos tiempos, se ha visto un cambio de acción hacia los bioplaguicidas. Varios extractos de plantas y aceites esenciales se encuentran en estudio y parecen ser efectivos contra el control de mosquitos (Singh y cols., 2018).

A este respecto Abramides y cols. (Abramides y cols., 2011), observaron que la fumigación de alfa-cipermetrina de la vegetación en los parques públicos fue eficaz para controlar *Ae. albopictus*, mientras que Bengoa (Bengoa, Eritja, y Lucientes, 2014) encontraron que un formulado de deltametrina (aplicada en ULV) mostró mayores tasas de mortalidad contra *Ae. albopictus* y tuvo un efecto residual más efectivo sobre la vegetación que un formulado de alfa-cipermetrina. Sin embargo, los enfoques cualitativos de las estrategias de control de arbovirus basadas en la educación, tales como: acciones de control de vectores dirigidas a desarrollar la capacidad de la comunidad, movilización social que combina el control de arbovirus con el control biológico y acciones integradas de control de arbovirus, sugieren que, la educación en salud es un elemento esencial del control de arbovirus y debe usarse junto con otras estrategias de control de vectores (Í. K. R. Dias, Martins, Sobreira, Rocha, y Lopes, 2022).

2.5. Insecticidas

Son mezclas de productos químicos orgánicos o inorgánicos de sustancias de naturaleza sintética o productos naturales, cuya función es prevenir, matar, repeler o mitigar la acción de cualquier insecto (volador o no). Pueden actuar tanto en

insectos adultos como en etapas inmaduras, por lo que se denominan adulticidas y larvicidas respectivamente. Se han utilizado en agricultura, salud pública, horticultura o almacenamiento de alimentos (Achudume, 2012). Fisiológicamente pueden llegar hasta el lugar donde ejercen su acción sobre el insecto por varias vías, a ser por contacto: al depositarse el producto sobre el insecto y penetrar a través de la cutícula; por ingestión: a través del tracto digestivo al alimentarse de líquidos o sólidos que contienen el producto y por respiración: desde el aire a través de la cutícula o la tráquea.

2.5.1. Organofosforados

Los organofosforados (OP), son un derivado del ácido fosfórico, son una de las principales clases de insecticidas en uso desde mediados de la década de 1940 (Gallo y Lawryk, 1991). Los más utilizados son: el malatión, el paratión, el clorpirifós y el diazinón (Manjarres y Olivero, 2013); (Mangas, Vilanova, Estévez, França, y cols., 2016). El objetivo principal de los OP es la interferencia irreversible con la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE). Esta inhibición de la AChE por OP provoca la acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, lo que sobre-estimula los receptores muscarínicos y nicotínicos con un consiguiente síndrome colinérgico (Caro-Gamboa, Forero-Castro, y Dallos-Báez, 2020). En insectos, el efecto de los OP y carbamatos es principalmente afectar el sistema nervioso central desde la unión neuromuscular no colinérgica. La única sinapsis colinérgica conocida en insectos es en el sistema nervioso central (Ware, 1983).

Los OP se han utilizado para controlar *Ae. aegypti* en las Américas durante los últimos 15 - 20 años. Sin embargo, son los piretroides (PY) uno de los insecticidas más utilizados actualmente para el control del género *Aedes* (Zimmerman y Voorham, 1997). A diferencia de *Ae. aegypti*, ha habido sólo unos pocos informes de resistencia a los insecticidas en *Ae. albopictus* en todo el mundo (Ranson y cols., 2010); (McAllister, Godsey, y Scott, 2012). Sin embargo, varios estudios realizados en la década de 1960 y resumidos por Mouchet (1972) (Mouchet, 1972) mostraron que varias poblaciones de *Ae. albopictus* procedentes del Sudeste Asiático y la India eran resistentes a algunos de los insecticidas utilizados en el momento para el control del vector, es decir, temefós y malatión (Bharati, Saha, y cols., 2021). A este respecto, la prevalencia de la resistencia a insecticidas en el género *Aedes* está en aumento y se informa que los mecanismos de resistencia están asociados con mutaciones en el sitio objetivo como la desintoxicación metabólica, reducción de la penetración de insecticidas a través de la cutícula y cambios de comportamiento de los mosquitos (Gan y cols., 2021).

***Clorpirifós* (O, O - dietil O - 3,5,6 - trichloropyridin - 2 - ilfosforotioato)**

— Es un insecticida OP no sistémico que actúa como un inhibidor de la colinesterasa con el contacto, la ingestión y la acción respiratoria (Kamt Quezada, 2020). En insectos actúa inhibiendo la AChE y causando envenenamiento por colapso del sistema nervioso. Figura como una de las diez principales sustancias peligrosas que presentan un alto riesgo para los ecosistemas acuáticos (Johnson y cols., 2017) y aunque recientemente

se prohibió en algunos países, todavía se usa en grandes cantidades a nivel mundial (Rahman y cols., 2021). En 2020 venció la actual autorización para su uso en Europa, y por lo tanto, la EFSA ha llevado a cabo la evaluación tanto del clorpirifós como del metil-clorpirifós. Su estudio de toxicidad en mosquitos relacionada con el calentamiento global también es considerada actualmente (Meng, Delnat, y Stoks, 2020); (Meng, Tran, Delnat, y Stoks, 2021); (Meng, Delnat, y Stoks, 2022).

Los formulados microencapsulados de clorpirifós han tenido un mejor desempeño en distintas superficies como insecticida residual en artrópodos (Rust, Reiersen, y Hansgen, 1991); (Llácer, Dembilio, y Jacas, 2010)... Sin embargo, debido al riesgo ambiental y la resistencia al uso de clorpirifós para *Ae. albopictus* es complejo y el principal desafío para esta especie es desarrollar e implementar medidas de control efectivas adaptadas a entornos urbanos y suburbanos. Según un informe de la calEPA de 2020 (Agencia de Protección Ambiental de California) para reemplazar el clorpirifós existen algunas alternativas como opciones, pero no brindan una solución adecuada, porque la alternativa puede ser menos efectiva para controlar la plaga objetivo o porque puede ser demasiado costosa, y aunque el uso de estas alternativas conocidas es legal, éstas podrían presentar ciertos riesgos para otros intereses públicos, incluida la salud pública y el medio ambiente.

Diazinón (O,O - Diethyl O - [4 - methyl - 6 - (propan - 2 - yl)pyrimidin - 2 - yl]) — Insecticida no sistémico, miticida y nematicida con contacto estómago y acción respiratoria. Utilizado para controlar una amplia gama de plagas de insectos en cultivos alimentarios sobretodo de invernadero. Es eficaz contra insectos voladores, insectos rastreros, ácaros, garrapatas y arañas (WHO y cols., 1998). La mayoría de su uso ha sido restringido en los EE. UU., Canadá y la Unión Europea desde la década de 1980 (IARC y cols., 2017). Al igual que clorpirifós, es un inhibidor de la AChE, bloqueando la acción de la enzima AChE e interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas. Debido a que diazinón y clorpirifós actúan por inhibición irreversible de la colinesterasa, fue imprescindible contar con productos seguros para su aplicación, por lo que se ha microencapsulado al fosforado para un uso más seguro logísticamente para su aplicación y eficaz contra el vector objetivo (Adams y cols., 2001). Su uso microencapsulado se ha enfocado especialmente en el control de cucarachas (Stejskal, Aulicky, y Pekar, 2009); (Bueno-Marí, Bernués-Bañeres, Peris-Felipo, Moreno-Marí, y Jiménez-Peydró, 2013).

2.5.2. Piretroides

Son derivados sintéticos de Piretrinas naturales extraídas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Comprenden ésteres del ácido de crisantemo: (etil 2,2 - dimetil - 3 - (1 -isobutenil) ciclopropano - 1 - carboxilato) y derivados halogenados de sus ácidos y alcoholes (Bradberry, Cage, Proudfoot, y Vale, 2005); (Soderlund, 2012). Los piretroides fueron conocidos durante años como productos naturales, comprenden el 25 % del mercado mundial de insecticidas, debido a su baja toxicidad para los seres

humanos y alta toxicidad para los insectos (Hemingway, Hawkes, McCarroll, y Ranson, 2004). Afectan el sistema nervioso central y el periférico de los insectos, inicialmente estimulan a las células nerviosas para producir descargas repetitivas y eventualmente causar parálisis, un efecto similar, pero más pronunciado que el del DDT. Sin embargo, con los piretroides (PY) el insecto produce una reacción incapacitante, un efecto subletal, afectando la generación y conducción de los impulsos nerviosos que produce el efecto knock-down (KD) (Bloomquist, 1996). Se clasifican en dos tipos: los PY tipo I, que carecen del grupo alfa-ciano, y los PY tipo II, los cuales poseen un grupo alfa - ciano - 3 - fenoxilbencil (Smith, Kasai, y Scott, 2016).

En particular, tres compuestos PY, a saber, deltametrina, permetrina y alfa-cipermetrina se usan comúnmente como insecticidas y se recomiendan para el control de insectos en el hogar porque se consideran relativamente no tóxicos para los humanos (Bradberry y cols., 2005). Sin embargo, uno de los principales mecanismos de resistencia a los PY en los mosquitos, es el aumento de la desintoxicación a través de las monooxigenasas del citocromo 450, una enzima oxidasa responsable de una amplia desintoxicación (Smith y cols., 2016). Algunos estudios también han investigado los factores biológicos que resultan en la resistencia a los PY en *Ae. aegypti* (Kawada y cols., 2014); (Campbell y cols., 2019). Se ha informado que los niveles de resistencia en adultos de *Ae. albopictus* son generalmente más bajos en Asia, África y EE. UU, y más alta en América Latina, aunque hay excepciones de poblaciones susceptibles que existen todavía, especialmente en Asia y América del Sur (Vázquez Orrego, 2021).

Alfa-cipermetrina (RS) - alfa - ciano - 3 - fenoxibencil(1RS) - cis, trans - 3 - (2,2 - diclorovinilo) - 2,2 - dimetilcloropropanocarboxilato— Pertenece al grupo de PY que poseen un grupo alfa-ciano en su molécula con un par de isómeros enantioméricos PY de tipo II debido a su grupo ciano (Kumar Singh, Nath Tiwari, Prakash, y Pratap Singh, 2012); (WHO y cols., 2014); (El Okda, Abdel-Hamid, y Hamdy, 2017). Son 2250 veces más tóxicos para los insectos que para los vertebrados debido al tamaño más pequeño de los insectos, a la menor temperatura corporal y a los canales de sodio más sensibles. Actúa por contacto a través de la cutícula por ingestión y por inhalación. Su efecto se basa en la similitud estructural de éstas moléculas con componentes de la membrana celular de las fibras nerviosas, para que penetren y así provoquen un cambio en la permeabilidad al calcio. Como resultado, se evita la despolarización de la membrana y la transmisión de los impulsos nerviosos que se producen sucesivamente en el insecto: alteración del movimiento, descoordinación, parálisis y muerte (Rivas Esteban, 2016).

Algunos usos de su aplicación de nebulización de ultra-bajo-volumen (ULV) se realizó contra *Ae. albopictus* (Bengoa y cols., 2014), y aunque este tipo de operaciones son muy relevantes en muchos programas de control, su eficacia real es a menudo desconocida. Para obtener una mejor aceptación y cumplimiento en el uso de sustratos impregnados de insecticida, éstas deberán tener un impacto notable en la reducción de esta molestia de plagas, por lo cual, alfa-cipermetrina realiza mejor efectividad cualquiera que sea la especie de mosquito (Hougard y cols., 2003).

2.5.3. Reguladores del crecimiento IGR

Se incluye a todos aquellos compuestos que alteran el crecimiento y desarrollo de los insectos, y todos ellos parecen interferir de alguna manera con la normal formación de la cutícula (Chen y Mayer, 1985), aunque todavía en muchos casos no se conoce con exactitud la forma de su actuación (Viñuela, Budia, y Del Estal, 1991). En mosquitos, Moreno (1997) (? , ?) sostuvo en que si la concentración en el medio de cría es baja antes del estadio de pupa su efectividad se reduce significativamente. También conduce a la aparición de individuos intermedios entre larva y pupas, que siempre son inviables e interrumpen la formación de embriones. Causan esterilización e infertilidad en adultos, otra característica es que son compuestos aceleradores de la muda de naturaleza esteroidea (molécula parecida a la ecdisona= hormona de la muda) que penetran difícilmente a través de la cutícula actuando principalmente por ingestión, seguido de anomalías en el exoesqueleto (? , ?).

El principal efecto de los IGR es perturbar el desarrollo y la metamorfosis y por lo tanto, su acción es mucho más lenta que la de los insecticidas convencionales. Estos compuestos afirman ser seguros para los enemigos naturales y proporcionan una alternativa a los insecticidas convencionales, ya que los efectos letales y subletales de estos últimos se consideran generalmente de mucho riesgo para las especies beneficiosas (Ruberson, Nemoto, y Hirose, 1998).

Piriproxifeno— Es un análogo de la hormona juvenil, con baja toxicidad para los mamíferos que altera el crecimiento y desarrollo en los insectos. Actúa de tres maneras: como hormonas juveniles, como precocenos, y como inhibidores de la síntesis de quitina. Las hormonas juveniles (HJ) incluyen: ecdisona, el imitador de la HJ, el análogo de la HJ, y se conocen por sus sinónimos más amplios como son los juvenoides y juvegenos, ellos alteran el desarrollo inmaduro y la emergencia como adultos. Los precocenos interfieren con la función normal de las glándulas, que producen las hormonas juveniles y los inhibidores de la síntesis de la quitina: benzoilúreas convencionales, buprofezin y ciromazina, afectan la habilidad de los insectos para producir nuevos exoesqueletos durante la muda.

Específicamente piriproxifeno (PPF) es un IGR que inhibe la metamorfosis y la embriogénesis en varias familias de insectos (Dhadialla, Carlson, y Le, 1998). Cuando se aplica en los hábitats de cría de larvas de mosquitos a bajas concentraciones es altamente eficaz en la inhibición de emergencia de adultos (Estrada, Mulla, y cols., 1986); (Hirano, 1998). Sin embargo, el uso de PPF contra los vectores del Dengue, se ve dificultada por el gran número de hábitats larvarios crípticos. Por lo tanto, se ha considerado su utilidad en la autodifusión del producto en los criaderos de larvas de mosquitos (Itoh, 1994); (Devine y cols., 2009); (Gaugler, Suman, y Wang, 2012).

La eficacia de la utilización de *Ae. albopictus* como un vehículo para la transferencia de PPF en hembras adultas a los hábitats larvarios se ha evaluado en condiciones de campo en Roma (Achudume, 2012); (Caputo y cols., 2012) y se demostró una

reducción significativa en la fecundidad de las hembras después del contacto tarsal con una superficie tratada con PPF (Ohba y cols., 2013). Por lo tanto, pueden existir dos posibles efectos de supresión reproductiva mediada por PPF: (1) las hembras alimentadas con sangre expuestas a PPF pueden llevar el producto a los hábitats de larvas, lo cual inhibe la emergencia de los adultos, y (2) el contacto tarsal con PPF puede inhibir la maduración de los óvulos en los mosquitos adultos. Estos efectos representan partir de este estudio posibles medidas para combatir los vectores del DENV resistentes a los PY (Itoh, 1994); (Itoh y cols., 1994).

Otro método de control observado en el efecto de mosquiteros tratados con PPF sobre poblaciones de *Ae. albopictus* en condiciones semi-campo (Ohba y cols., 2013) han dado como resultado que el número de huevos y pupas generados a partir de la primera generación de adultos liberados en dos experimentos fueran menores en el tratamiento con PPF que en el control sin tratar. Este efecto de acción lenta es una característica de PPF y podría permitir que los mosquitos adultos actúen como vehículo para la transferencia a los hábitat de cría.

Estos estudios dan como resultado e indican que PPF puede reducir significativamente el número de huevos, pupas, larvas y la próxima generación de adultos por: (1) la inhibición de la producción de huevos de las hembras adultas, tras el contacto con PPF y/o (2) provocar la muerte de las larvas inmaduras, tras la transferencia de las hembras adultas. En el contacto tarsal con PPF se ha demostrado que puede suprimir la maduración del óvulo en hembras adultas de *Aedes aegypti*, antes o hasta 24 h después de la alimentación con sangre (Judson y de Lumen, 1976).

Pero por otro lado, existe la preocupación de que PPF podría afectar el desarrollo de las larvas de los organismos no objetivo que coexisten con las larvas de especies de mosquito objetivo (Hirano, 1998); (Axtell, Rutz, y Edwards, 1980); (Mulla, Darwazeh, Kennedy, y Dawson, 1986). Un ejemplo sobre la efectividad de PPF fue una revisión sistemática de estudios la hormona juvenil contra *Aedes spp.* Maoz (2017) (Maoz y cols., 2017) sugiere que PPF podría controlar efectivamente la emergencia adulta y las etapas inmaduras de los mosquitos en una variedad de hábitats. Por cuanto el debate se referiría a la concentración y la frecuencia de la aplicación en los diversos tratamientos.

2.6. Microencapsulación de insecticidas

Fueron desarrollados entre los años 1930 a 1940 por la NCR (*National Cash Register*) para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación (que son métodos fisicoquímicos, definido como la separación de un coloide muy solvatado en dos fases líquidas, una de las cuales contiene una alta proporción de coloide (capa de coacervado) y la otra, una baja proporción) (Florence y Attwood, 2016); (Popplewell, Balck, Norris, Porzio, y Pszczola, 1995). La microencapsulación de compuestos de actividad biológica (ADN, fármacos, proteínas, probióticos, enzimas, etc.) desde el punto de vista tecnológico podría definirse como el proceso de recubrimiento de dichos compuestos bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza y para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de microesfera o microcápsula, dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna (Lopretti y cols., 2007) y se clasifican según el tipo de estructura formada (Sparks y Jacobs, 1999).

Los formulados microencapsulados comerciales de insecticidas se diferencian por el tipo de formulados contenidos y sus ingredientes activos, pudiendo presentarse mediante varios tipos (González, 1999) y cada formulado tiene características particulares y distintas destinadas a un mejor uso específico o especie objetivo (Pardey, s.f.). La liberación de sus ingredientes activos es realizada por difusión a través de su bicapa o por destrucción de la vesícula por medio de una concentración crítica de iones calcio o por un cambio de pH o presión osmótica, hidrólisis, degradación térmica o enzimática (Chiappetta, 2006).

2.6.1. Características de la microcápsula polimérica (MPI) Inesfly®

Tiene una estructura morfológica relativamente simple, conformada por un núcleo activo y un esqueleto de polímero delgado que rodea al primero. El proceso de producción es complicado en el cual los principios activos (insecticidas e IGR) se introducen en la matriz o sistema de pared con propiedades poliméricas, que debido a las propiedades del polímero, estos se liberan gradualmente.

El i.a. se inserta de acuerdo con los requisitos de aplicación específica de la matriz sobre la que se deposita las microcápsulas. El núcleo consta de una sustancia líquida mezclada con los i.a. insecticidas. Su formación se puede obtener mediante suspensiones de microcápsulas que van desde un micrómetro hasta varios cientos. Como se observa (Fig. 2.7 al 2.14) la imagen tomada por microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid), el polímero envuelve a los i.a. en microcápsulas de distinto tamaño en función de la naturaleza de su contenido.

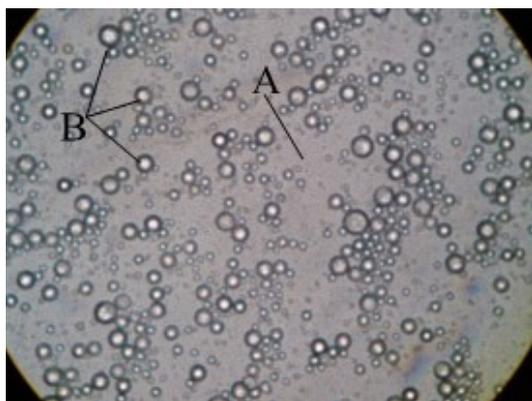


Figura 2.7: Vista a microscopio óptico de micro cápsulas en suspensión acuosa. (A)= líquido con componentes disueltos en el que se encuentran en suspensión las microcápsulas; (B)= microcápsulas: cubierta de resina que atrapa en su interior los insecticidas. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

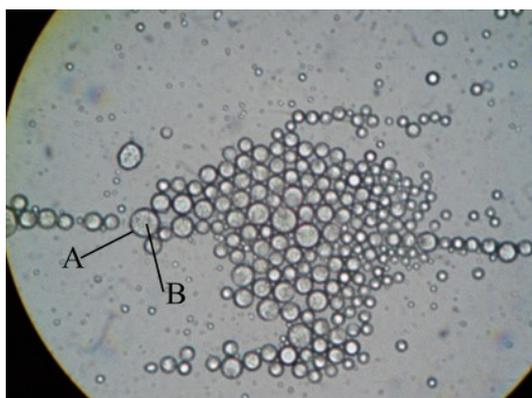


Figura 2.8: Aspecto de las microcápsulas al evaporarse el solvente (agua) al microscopio óptico (A)= cubierta de resina; (B)= interior con los insecticidas. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

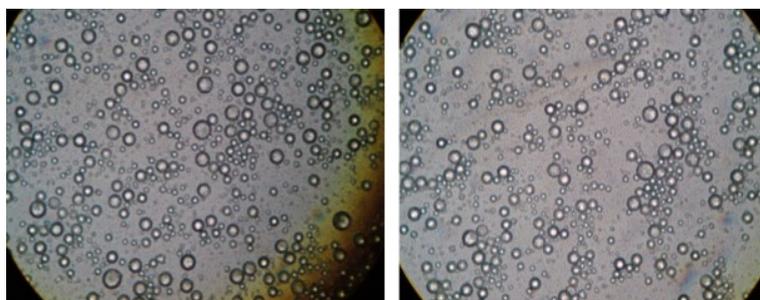


Figura 2.9: Detalle de las microcápsulas a 40 aumentos con la muestra húmeda. Se observan perfectamente microcápsulas redondeadas con las partículas de activos en su interior. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

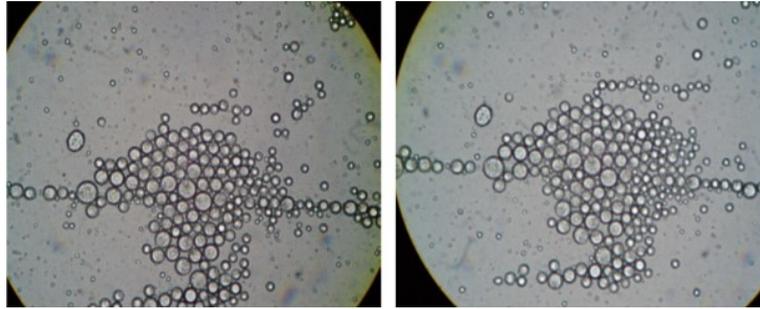


Figura 2.10: Detalles de las microcápsulas a 40 aumentos con la muestra seca. Al evaporarse el solvente (agua) las microcápsulas se juntan compactándose, lo que dará a la formación de una película estable con liberación controlada de los activos. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

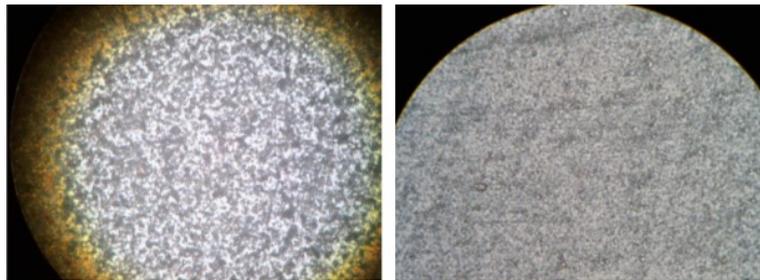


Figura 2.11: Detalles de las microcápsulas a 40 aumentos con la muestra húmeda. En este caso los pigmentos y cargas enmascaran la presencia de microcápsulas. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

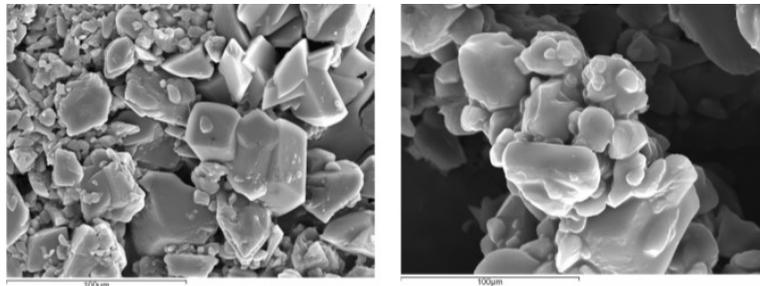


Figura 2.12: Muestra a 25°C en estufa a 1000 aumentos. Detalle de los cristales del polímero sometidos a desgaste por temperatura (100 µm). Las cargas y pigmentos se mueven agrupándose y las microcápsulas se abren liberando los ingredientes activos. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

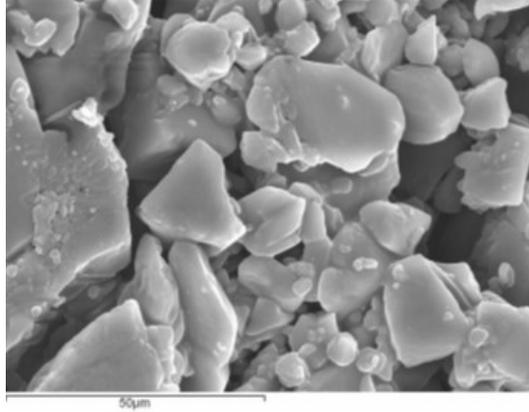


Figura 2.13: Detalle de los cristales del polímero (50 μ m), sometidos a desgaste por temperatura. Las cargas y pigmentos se mueven agrupándose y las microcápsulas se abren liberando los ingredientes activos. Detalle de la muestra a 1000 aumentos tras un proceso de liofilización que simula las condiciones ambientales reales al eliminar la totalidad del solvente (agua). (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

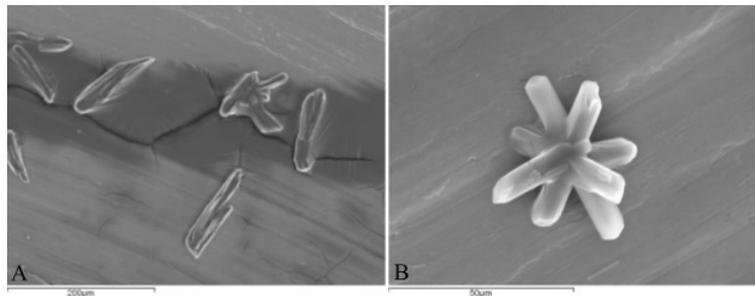


Figura 2.14: Detalle de los cristales (200 μ m) del polímero a 200 aumentos, en una muestra 25 oC; (B)= detalle del cristal (50 μ m) a 1000 aumentos a T^o ambiente. (Modificado a partir de: <http://www.inesfly.com>)

2.6.2. Polímeros biocidas microencapsulados a modo de pinturas

El ingrediente básico de todas los formulados son las microcápsulas de polímero insecticida, que también pueden contener otros ingredientes. Además de MPI, los recubrimientos también contienen pigmentos, cargas y polímeros en un vehículo volátil (siempre agua). El pigmento principal es el dióxido de titanio de alta luminosidad, la carga principal es el carbonato cálcico y el polímero es el vinilo VeoVa 10. El insecticida por incorporarse es según el tipo de vector a controlar, lugar de aplicación, la estrategia de control y las distintas normativas y leyes que existen en cada país.

En este caso, siempre son i.a. insecticidas y acaricidas con una amplia gama de efectos, y se utilizan a menudo en muchos formulados insecticidas. Por lo tanto, los piretroides se pueden usar para un control inmediato y lograr buenos efectos de choque o KD sin necesidad de una residualidad mayor. Y si se precisa que un efecto prolongado es más valioso que obtener un efecto más directo, se emplean OP. En todos los casos, la pintura contiene IGR, que interfiere con el proceso normal de maduración o desarrollo en diferentes etapas del ciclo de los insectos. Estos compuestos son inofensivos para los vertebrados porque son específicos del metabolismo de los insectos.

2.6.3. Desarrollo químico de los formulados Inesfly®

Esta macromolécula (Fig. 2.15) consta de cadenas que contienen 7,5 moles de acetato de vinilo ($\text{CH}_3 - \text{CHOO} - \text{CH} - \text{CH}_2$) por mol de VeoVa 10 ($\text{R} - \text{C}00 - \text{CH} = \text{CH}_2$) (relación 7,5 / 1). Se sintetiza mediante un proceso de polimerización en medio acuoso, por lo que el contenido de sólidos emulsionados de macromoléculas de polímero Vinil-VeoVa en agua es del 55 %. Su proceso químico se muestra en la siguiente figura.

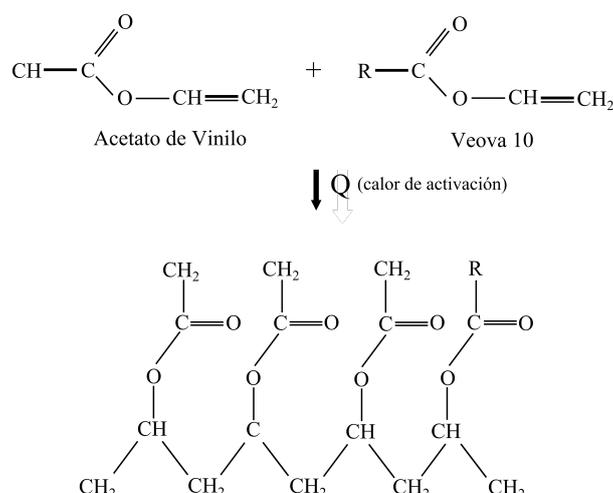


Figura 2.15: Proceso químico de polimerización de Inesfly® (Modificado a partir de <http://www.inesfly.com>)

2.6.4. Solución acuosa emulsiones Inesfly[®] EM HOUSE

Las principales características de la tecnología radican fundamentalmente en: 1) utilización de la técnica de microencapsulación para la incorporación de los elementos activos, con lo que se consigue una mayor eficacia y durabilidad de los mismos, disminuyendo al mismo tiempo la posibilidad de contacto de los mismos con personas y animales durante la aplicación de la pintura y con ello la toxicidad. 2) la utilización de sustancias modificadoras del crecimiento de insectos, inocuas para mamíferos y por tanto para personas y animales. 3) su aplicación a modo de pinturas (polímeros) o emulsionados. EM HOUSE es un formulado líquido blanquecino compuesto principalmente por la microcápsula polimérica insecticida con el polímero VeoVa 10 y agua como diluyente. Se puede decir que es como la pintura, pero sin pigmentos ni cargas.

Por tanto, la obtención de un formulado con una liberación gradual y eficaz depende en gran medida de la relación de estos dos monómeros para formar el resultado, así como de otros factores inherentes al proceso de fabricación. La incorporación del insecticida activo, la temperatura alcanzada y la temperatura de transición vítrea (Tg) de diferentes fases (preparación, aplicación, etc.) de diferentes tipos de polímeros. Primero, en la etapa de preparación, el polímero se dispersa en agua y su Tg desciende por debajo de la temperatura ambiente, después de su aplicación y secado, su Tg aumenta (Fig. 2.16). En el caso de los polímeros duros, las microcápsulas serán tan duras que no permitirán una fácil liberación del i.a. Por el contrario, en el caso de los polímeros blandos, la liberación de las microcápsulas será tan rápida que la eficacia persiste también sería baja. En el caso del polímero Inesfly[®], debido a la liberación controlada del i.a., se logra un adecuado equilibrio entre dureza y flexibilidad, obteniendo mayor residualidad.

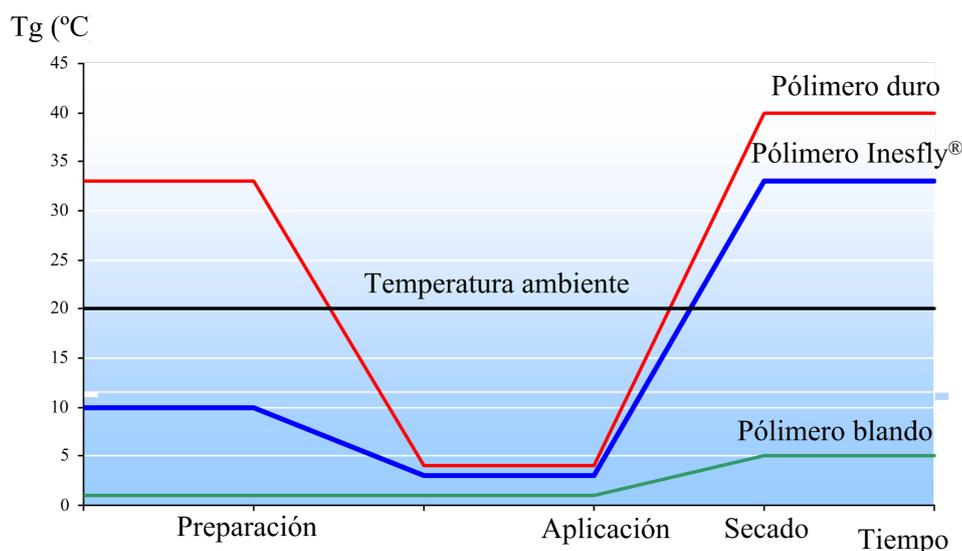
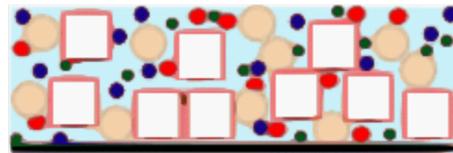


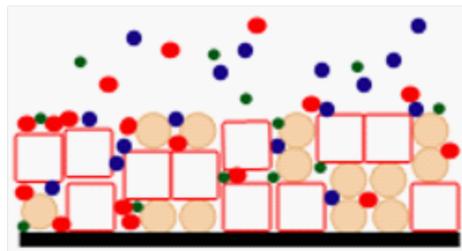
Figura 2.16: Dureza del polímero Inesfly durante el proceso de fabricación y aplicación. (Modificado a partir de <http://www.inesfly.com>)

El mecanismo de estabilización se puede ver que proviene de una estructura líquida a base de agua en la que el i.a. está incrustado con la matriz polimérica y después de la aplicación, el agua evaporada concentra la compacidad de las partículas (Fig. 2.17). De esta forma se regula el polímero vertido del pesticida al exterior. La estructura final es completamente estable y compacta, dando a la fórmula un residuo característico. De esta forma, son la abrasión y las condiciones ambientales (temperatura, humedad) de la propia pintura las que regulan la descarga de los i.a. insecticidas, lo que prolonga en gran medida la eficacia insecticida del formulado.

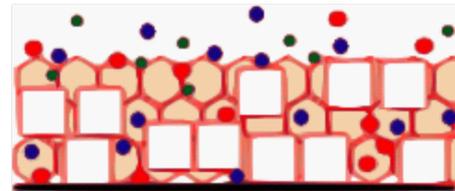
Pintura INESFLY antes de la aplicación las partículas de las materias activas están dispersas en el agua



Tras la aplicación el solvente (agua) se evapora y las partículas se aproximan hasta unirse unas con otras



Con el paso del tiempo y la acción de los agentes externos -temperatura, humedad, desgaste- las partículas más próximas a la superficie se van liberando al ambiente. Se va formando una película cada vez más lentamente



Película estable con difusión regulada de los activos insecticidas

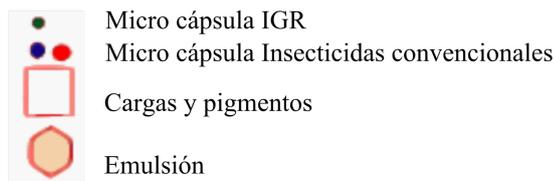
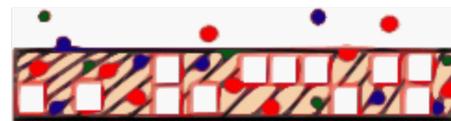


Figura 2.17: Mecanismo de estabilización de los i.a. Inesfly. (Modificado a partir de <http://www.inesfly.com>)

2.6.5. Pintura Iesfly® IGR SIN

Tiene la misma composición que la pintura, pero no existe un pesticida convencional, por lo que la existencia de IGR puede respaldar todas las capacidades de control de vectores. Esta fórmula es muy adecuada para situaciones que no requieren un control inmediato de plagas. Su ventaja es que no añade i.a. insecticidas convencionales, por lo que no es tóxico. En este caso, el proceso de estabilización es similar al de la pintura (Fig. 2.18).

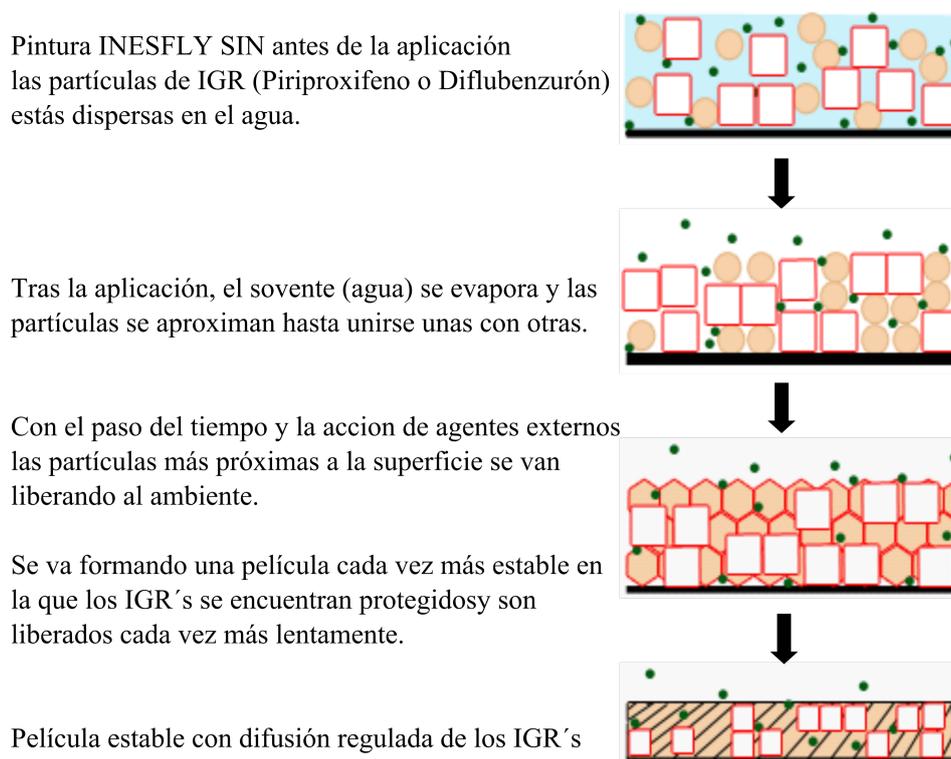


Figura 2.18: Mecanismo de estabilización de los i.a. Inesfly SIN. (Modificado a partir de <http://www.inesfly.com>)

Estas microcápsulas tienen en cuenta las recomendaciones de la OMS a través de sus informes OMSPEs: (<http://www.OMS.int/OMSpes/pdtunderOMSPESevalSep2010.pdf>) por lo que respecta a tipos y porcentaje de activos en la composición. La metodología toxicológica está constatada científicamente en algunos estudios, para la cual, se ha realizado ensayos de toxicología aguda, analíticas sobre población y personal aplicador.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

El estudio se realizó con una cepa de *Aedes*(*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) establecida y mantenida desde 2009 en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España. Para su mantenimiento se utilizó los protocolos de cría habituales (Elbal y cols., 2010). La colonia de mosquitos se ha utilizado en varias investigaciones y no ha estado expuesta previamente a insecticidas.

3.1. Manejo de *Aedes albopictus* en el laboratorio

Para un mantenimiento óptimo y continuo de la colonia se utilizó cámaras climatizadas (Radiber, Barcelona, Spain) con parámetros de temperatura y humedad relativa constantes a 25 ± 1 °C y HR 75 ± 5 % respectivamente, y con un foto-periodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad (Elbal y cols., 2010). Como mencionamos anteriormente, la colonia estudiada ha sido utilizada en varios trabajos de investigación, y dado que no fue expuesta previamente a insecticidas puede considerarse como no resistente, ya que en poblaciones naturales al quitar la presión selectiva de insecticidas en el ambiente se acaba generando poblaciones susceptibles (HiangHao, Zairi, y cols., 2013).

Los mosquitos adultos se mantuvieron cohortes con número de aproximadamente 400 adultos, criados en cajas de retención de $30 \times 30 \times 30$ cm BugDorm 1[®] (*Mega View Science Education Services Co. Ltd.*, Taichung, Taiwan) con la misma edad e igual número de machos y hembras. Se les alimentó diariamente con una solución de sacarosa al 10 % (100 g de azúcar/1000 ml de agua deionada) previamente almacenada y congelada a -5 °C para uso continuo, con intervalos de tres cambios semanales, evitando de esta forma cualquier tipo de contaminación. En cada caja de cría se colocó un matraz Erlenmeyer (100 ml) y se introdujo una pieza de papel de filtro doblada en forma de “abanico” por la cual la solución azucarada ascendía por capilaridad, quedando la solución de sacarosa a disposición de los mosquitos en toda la superficie del papel (Fig. 3.10 B) y éste se reemplazó aproximadamente cada dos a tres días (Mahmood y Maramorosch, 1999).

Para la ingestión de sangre por parte de las hembras se utilizó el método de alimentación por membrana (*membrane-feeding*) y se utilizó el sistema Hemotek PS5 Power Unit, (*Discovery Workshops. England*) (Fig. 3.1) proporcionando una fuente de sangre (desfibrinada) de cerdo, obtenida del matadero porcino de la plataforma logística Mercazaragoza del Valle del Ebro, Zaragoza, España. Ésta metodología consistió en la versión original del sistema Hemotek (Hemotek PS5A/220), el cual posee una placa de aluminio de 3,7 cm de diámetro, un espesor de 1,3 cm y una capacidad total de depósito de 5 ml (Cosgrove, Wood, Petric, Evans, y Abbott, 1994), donde la temperatura de la placa calefactora se verificó con un termómetro IR de precisión (Omega, Stamford, CT) a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se fijó una membrana Parafilm "M" de 2,5 x 2,5 cm (Pechiney, Chicago Il., EE. UU.) a cada placa, que se aseguró alrededor de la placa de calentamiento de aluminio con un anillo de goma.

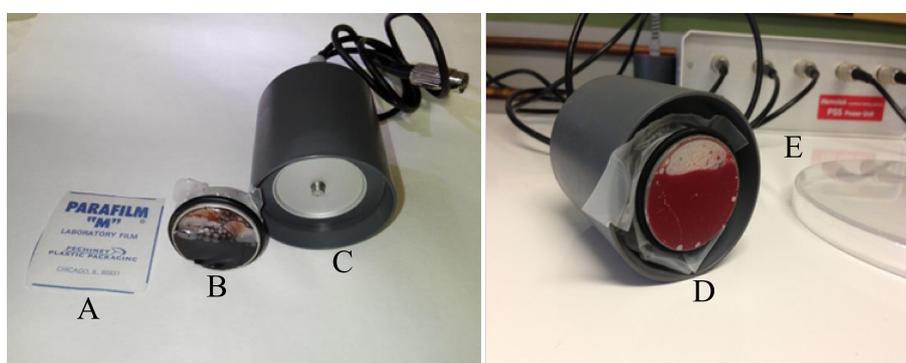


Figura 3.1: Sistema de alimentación de membranas Hemotek PS5A/220: (A)= membrana (ParafilmTM); (B)= el depósito con sangre del dispositivo; (C)= placa calefactora del dispositivo; (D)= ensamblaje del dispositivo; (E)= unidad de potencia PS5

El banco de sangre obtenido, se mantuvo, almacenó y congeló en tubos de EDTA en un congelador a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, 15 minutos antes de cada alimentación el tubo que contenía la sangre se llevó gradualmente a temperatura ambiente y utilizando una jeringa luerlock desechable (BD. Franklin Lakes, NJ 50) con una capacidad de 5 ml se introdujo 4 ml de sangre entre la placa calefactora de aluminio y la membrana ParafilmTM. Las placas se sostuvieron y mantuvieron en contacto con la parte superior de la caja de cría, a las cuales se introdujeron alrededor de 400 mosquitos entre hembras y machos. Durante la alimentación y para mejorar la respuesta de alimentación de sangre las cajas fueron cubiertas con una tela oscura.

Veinticuatro horas después de la ingestión de sangre se realizó la ovoposición en macetas de plástico Eurotubo[®] de 100 ml (Deltalab S.A., Barcelona, España) en los que se colocó previamente cortes de papel filtro (15 x 10 cm) y aproximadamente 60 ml de agua declorada y una porción de 0,01 g de alimento comercial para peces (con el fin de estimular la ovoposición). Se colocó tres macetas simultáneamente en cada caja de cría y las hembras realizaron la ovoposición en papel de filtro por encima del nivel del agua que cubría el interior de la maceta (Fig. 3.2). Posteriormente, el papel de filtro con los huevos adheridos se almacenó en una bandeja de plástico con la fecha específica de cada ovoposición. El almacenamiento de los papeles de filtro con los huevos adheridos se realizó en un ambiente oscuro a temperatura moderada sin humedad, y se etiquetó

la fecha, el número de hembras alimentadas y el número de huevos ovopositados.

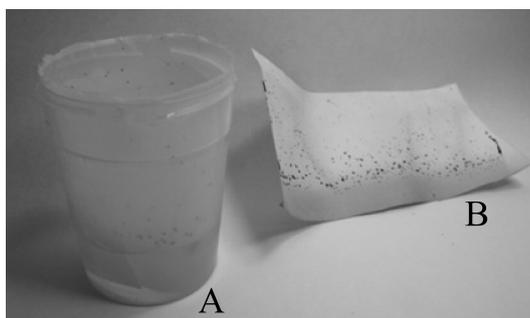


Figura 3.2: Papel de filtro con huevos ovo puestos (A)= maceta de plástico; (B)= papel de filtro con huevos adheridos (Modificado a partir de Alarcón-Elbal et al., 2010)

Manejo de los estadios larvarios— Para activar la embriogénesis, el papel filtro con los huevos adheridos a éstos, se sumergieron en agua de clorada dentro de bandejas de plástico de 30 x 15 x 6 cm con una capacidad de 1500 ml (Fig. 3.3). Cuando ocurría la eclosión larvaria en cada bandeja de plástico se dispuso de un número aproximado de 300 larvas (macetas) y 700 huevos (tablillas de masonite). Para su alimentación se optó por utilizar compuesto básico para peces de acuario TetraMin[®] *Tropical Fish Flakes* (Tetra Sales, Blacksburg, Virginia, EE. UU.) a base de algas y subproductos animales, a una dosis aproximada de 0,1 mg/larva/día para larvas de estadio inicial ($L_1 - L_2$) y 0,4 mg/larva/día para estadios finales ($L_3 - L_4$).

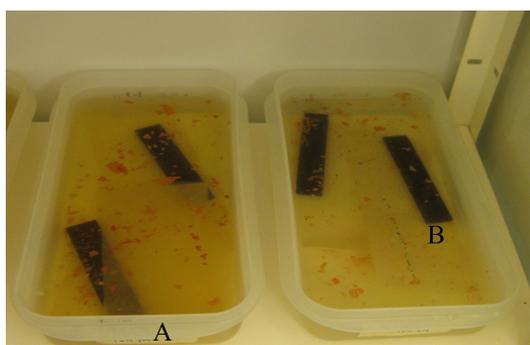


Figura 3.3: (A)= bandejas de plástico donde se efectuó la emergencia de larvas L_1 . Fueron introducidos los papeles de filtro con los huevos adheridos, sumergidos a los cuatro días después de la ovoposición; (B)= tablillas de masonite[®] (tablex) cuyo objetivo fue la oxigenación del agua al inicio de la emergencia larval

En el manejo de las pupas, después de completado el desarrollo larval (el cual duró aproximadamente de ocho a nueve días) las pupas viables se recolectaban con una pipeta de plástico, trasladándolas a un matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con unos 60 ml de agua de clorada y fueron introducidas en las cajas de cría, permitiendo así recuperar los mosquitos adultos que emergían, iniciando nuevamente el proceso para la obtención de las siguientes generaciones.

Todos los biomateriales utilizados en las pruebas fueron manipulados siempre por el mismo personal investigador, con estricto apego a las medidas de seguridad previstas para lograr la continuidad del ciclo gonotrófico de la colonia. Éstos incluían, la neutralización rutinaria por ebullición a 100 °C durante 30 minutos de todos los materiales que entran en contacto con los mosquitos en cualquier etapa, especialmente los utilizados para la puesta de huevos (macetas y bandejas de plástico, matraces Erlenmeyer, pipetas, tiras de papel filtro con huevos eclosionados o no y material para la alimentación (azúcar y/o agua)

3.2. Metodología de las pruebas

3.2.1. Prueba I. polímeros (pinturas)

La eficacia y residualidad de los formulados se evaluaron en dos diferentes superficies de acuerdo con el poder de absorción del polímero. Una considerada más porosa, que por su capacidad de absorción son las placas de yeso laminadas (Pladur®) específicamente empleadas para la construcción de obras, y otra considerada como menos porosa como es la madera de pino, empleada generalmente en las construcciones y con más acentuación en viviendas más prolijas. Los tres formulados de PI contenían: formulado **5A NG IGR**® = PY (alfa-cipermetrina 0,7%; d-aletina 1% + PPF 0,063%); formulado **5A IGR**® = OP (diazinón 1,5%; clorpirifós 1,5% + PPF 0,063%) y formulado **5D IGR**® = OP (diazinón 3% + PPF 0,063%).

Inicialmente la superficie de madera fue cortada en cuadrados, y tuvieron un tamaño de 13 x 13 cm y 1,3 cm de grosor, en tanto la superficie más porosa (escayola) no fueron cortadas en cuadrados, sino que se utilizaron en su presentación comercial original 50 x 50 cm, 1 cm de grosor, lo que garantizó que cuando se realizó la manipulación en torno a la fijación de los conos de plástico (OMS) entre cada bioensayo no se corrió el riesgo de que estos vayan a romperse y así poder asegurar una superficie suficiente para la correcta fijación de los conos de contención a la totalidad de la superficie o área tratada. Se procedió al tratamiento de las superficies 48 horas antes del inicio de los bioensayos siguiendo las recomendaciones del fabricante. La aplicación de las pinturas fue mediante pintado manual utilizando una paletina sencilla de cerda pura N° 9; 19 x 6 mm, para así obtener una distribución homogénea del producto sobre la superficie.

Para la dosificación y aplicación de las PI denominamos a la concentración más baja de 1 kg / 6 m² (recomendada) imprimación o aplicación simple, que consistía en una sola capa de pintura, es decir, que con una pipeta de transferencia de plástico cuentagotas se aplicó 3.7 ml de producto en cada tipo de superficie, tanto a la más porosa como a la menos porosa y para observar la diferencia entre la porosidad de cada superficie y la efectividad del producto se empleó una imprimación o aplicación doble que denominamos la mayor concentración de 1 kg / 3 m², que comprendía dos capas aplicadas con 24 h de diferencia, es decir, el doble de la concentración recomendada (6,7 ml), ya que el tipo de superficie y las dosis de aplicación oscilan entre 1 kg / 6 m² hasta 1 kg / 3 m².

Para cada combinación de formulado, concentración y tipo de superficie se realizaron tres réplicas, cada una de ellas con su respectivo control, que consistió en el mismo tipo de pintura sin insecticidas ni IGR. La cantidad necesaria de pintura se aplicó en su totalidad en cada área a tratar con el fin de asegurar la obtención de una correcta aplicación. Posteriormente se procedió a individualizar las superficies por el tipo de concentración del producto y su formulado insecticida, almacenándolas individualmente e indistintamente de su concentración y superficie en un ambiente seco y ventilado. Todas las superficies tratadas que incluyeron el control fueron recubiertas, aisladas y almacenadas en papel aluminio para embalaje (13 µm. de espesor) para posteriormente

ser utilizadas entre los distintos intervalos de cada bioensayo. La cantidad de producto para las dos concentraciones fue:

- a) aplicación simple (concentración recomendada) para = $1 \text{ kg} / 6 \text{ m}^2 \rightarrow (3,7 \text{ ml} / 13 \times 13 \text{ cm}^2)$
- b) aplicación doble (doble concentración) para = $1 \text{ kg} / 3 \text{ m}^2 \rightarrow (6,7 \text{ ml} / 13 \times 13 \text{ cm}^2)$

A las 48 horas después del tratamiento de las superficies, se procedió a realizar los bioensayos de toxicidad con los parámetros acordes al método estándar de la OMS. Para ello se utilizó conos de bioensayo de la OMS (Bioassay Cones, University Sains Malaysia (USM), a OMS Collaborating Centre) exponiendo a los mosquitos a cada una de las superficies tratadas según la metodología de la OMS (OMS, 1981). Cada formulado se evaluó a distancias de al menos un metro para la superficie de la madera y 0,50 m para las placas de escayola y nunca entraron en contacto directo entre las mismas o viceversa con el control. La figura 3.4 representa el esquema de los OMS CONE TEST (OMS) utilizado en las superficies tratadas.

Los bioensayos se realizaron en las instalaciones del laboratorio de entomología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España, en un habitáculo especialmente acondicionado para pruebas con insecticidas, situado fuera de la cámara de cría de la colonia, por lo cual, los aspectos de traslado de los mosquitos en estudio fueron cuidadosamente manejados, tanto en lo referente a temperatura, humedad relativa y luz, para así no crear una alteración en el comportamiento de los individuos.

La prueba consistió en 10 bioensayos repartidos en 27 meses, con un intervalo aproximado de 3 meses entre cada uno para así poder comprobar el efecto residual de cada formulado en cada superficie tratada a lo largo de este período de tiempo. Cada formulado constó de tres replicas para cada superficie tratada y un control. Se utilizó diez hembras adultas nulíparas por cada replica y su control, las cuales se introdujeron con un aspirador de boca al interior del cono (OMS).

Para cada tratamiento y control de los formulados, se introdujo grupos de 10 hembras por cada réplica y control en el interior de los conos de plástico y utilizando un aspirador bucal se forzaron a entrar en contacto con la superficie tratada. Se realizó un análisis comparativo de cada formulado con el grupo control en base a la mortalidad potencial después de 30 min, discriminando a los individuos aún afectados por el efecto KD.

La eficacia se analizó en términos del efecto KD durante 30 minutos de contacto forzado con las superficies y se constató la mortalidad real de cada individuo, por lo que el criterio de muerte era admitido por la falta de movilidad total. Al cabo de los 30 minutos, aquellos individuos vivos, incluyendo a los que solo presentaba ataxias o incoordinaciones que no cumplían los criterios de muerte (Bank, WHO, y cols., 1994) fueron retirados y trasladados a los eclosionadores con el fin de monitorizar la muerte o supervivencia.

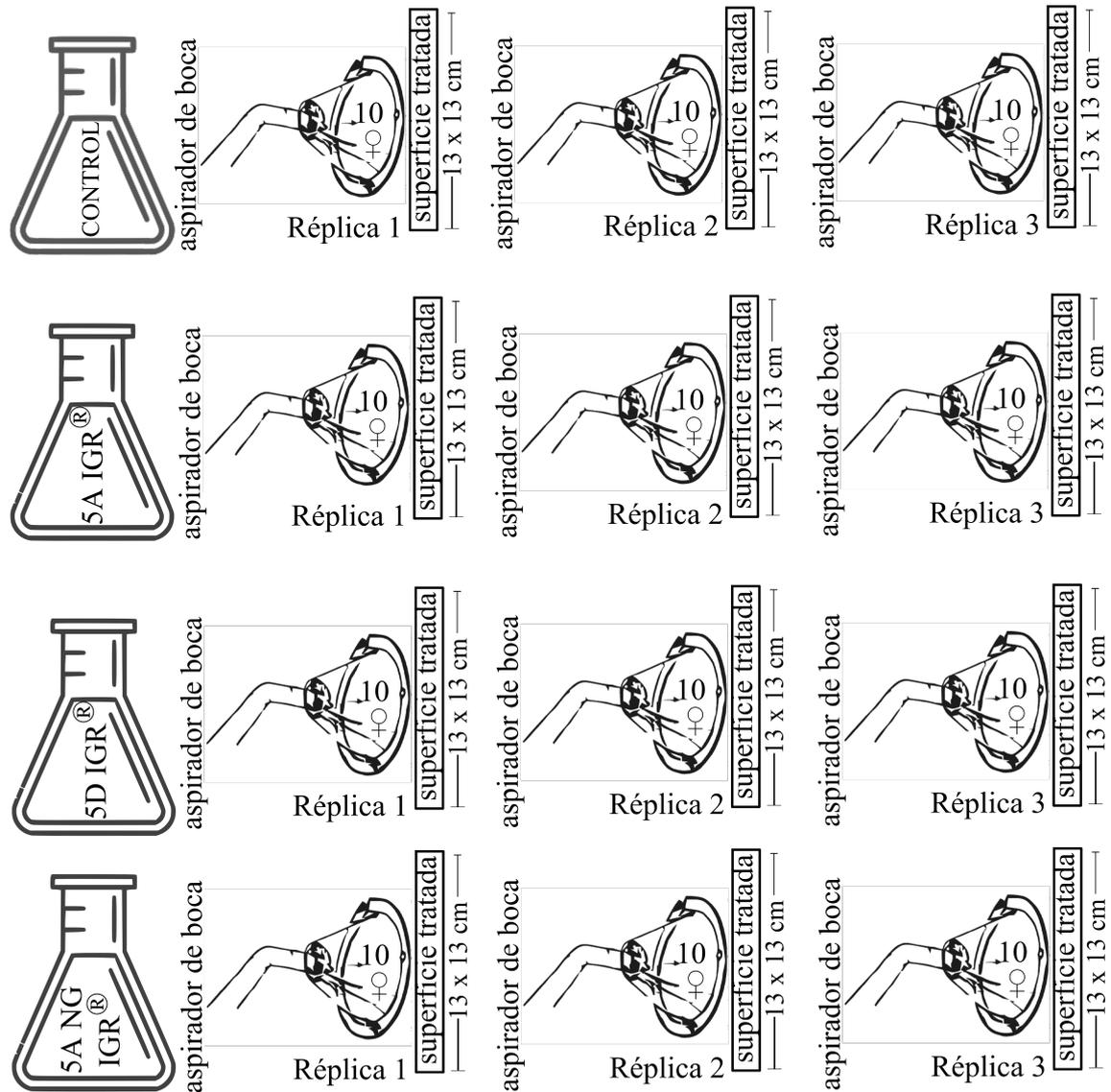


Figura 3.4: Esquema de los bioensayos mediante el CONE TEST (OMS) en dos tipos de superficies ya tratadas: una más porosa (escayola) y menos porosa (madera) a dos concentraciones (1 Kg / 6 m² y 1 kg / 3 m²). Estas fueron recortadas en cuadrados (13 x 13 cm)

Dado que es difícil en un inicio clasificar si un individuo expuesto está muerto o no durante el efecto KD y debido a la variedad de signos y/o efectos que pueden presentar durante esa fase se optó en un intento por calificar los individuos afectados y unificar el diagnóstico, por lo cual, se consideró el siguiente criterio de muerte: se considera muerto a un individuo que colocado sobre un papel de filtro no tiene actividad locomotora propia, ya sea en forma espontánea o cuando es estimulado con un pincel o una pinza (Bank y cols., 1994). Por tanto, un individuo fue registrado como muerto si colocado sobre una superficie limpia no presentaba movilidad ni movimiento alguno cuando fue estimulado con una pinza durante al menos 5 minutos.

Durante la observación del KD los individuos que aún presentaron signos de estar vivos, incluidos aquellos con signos de solo ataxia o falta de coordinación, fueron retirados y transferidos a eclosionadores (*Mosquito Breeders; Bioquip Products Inc.*) y así realizar el seguimiento posterior de la mortalidad.

Una vez en los eclosionadores, en la parte superior de las rejillas que sirve de entrada de aire del mismo se ofreció como alimento una solución de sacarosa al 10 % empapados en pequeños trozos de algodón y a la vez trozos de algodón humedecidos con agua de clorada para garantizar la humedad en su interior. Inmediatamente, se procedió a contabilizar el número de individuos muertos para cada réplica, incluyendo su control a los 30 a 60 min después del contacto forzado (KD) y se observó la mortalidad acumulada a los 60 min, 24 h, 48 h y 72 h. Los mosquitos que iban muriendo permanecieron dentro de los eclosionadores, ya que existía el riesgo de causar la muerte involuntaria por la manipulación constante de individuos aún vivos (Fig. 3.5).

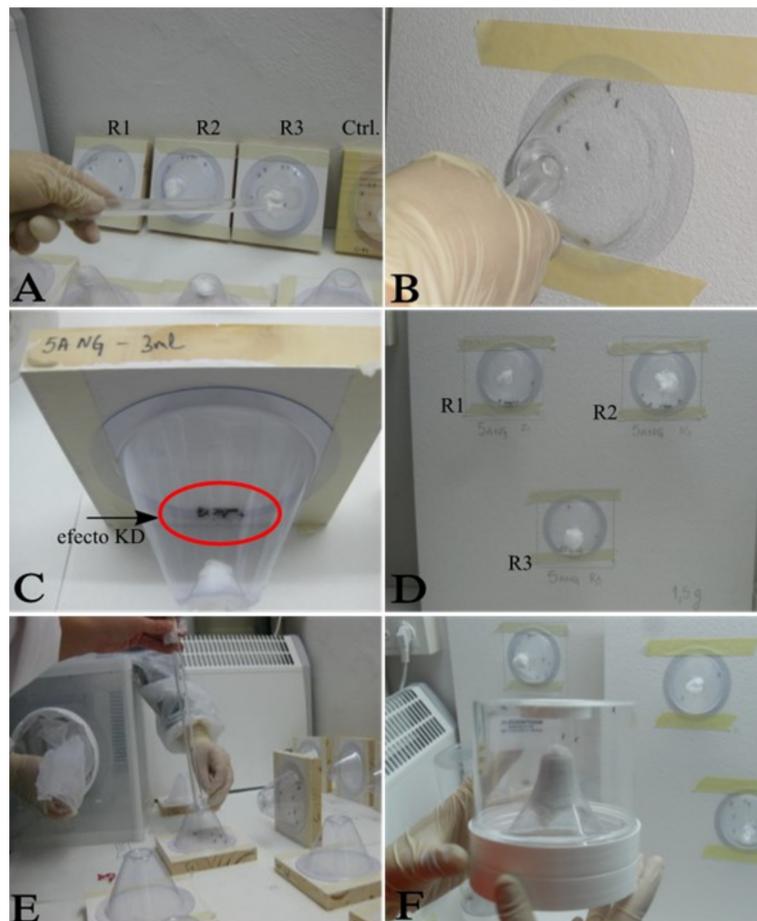


Figura 3.5: Procedimiento de la prueba en superficie menos porosa (madera de pino) y otra más porosa (escayola). (A y B)= tres réplicas para cada superficie tratada y un control; (C y D)= efecto KD durante los 30 minutos de exposición forzada (en la superficie escayola no se procedió al corte en cuadrados como en el caso de la madera A y D); (E)= succión con aspirador de boca (individuos aparentemente vivos); (F)= traslado a eclosionadores (después de los 30 min) suministrándose papel filtro humedecido y algodón con una solución azucarada

3.2.2. Prueba II. solución acuosa emulsiones (lacas)

Se analizó la residualidad de tres concentraciones diferentes de piriproxifeno (PPF) aplicadas a dos distintos tipos de materiales, y se comparó la eficacia en la mortalidad acumulada contra larvas y pupas, realizados en distintos bioensayos independientes y con una única aplicación inicial. Los materiales en su composición fueron distintos, pero son similares a los que las hembras eligen en un entorno natural para realizar la ovoposición. El primero fueron pequeños contenedores de plástico (macetas) como ejemplo de recipientes de superficie lisa por su uso común y que conforman lugares de puesta abiertas habituales. El segundo fue un sustrato poroso [tablillas de Masonite[®] (tablex[®])] que generalmente es utilizado en los métodos de ovitrampas y muestreos de poblaciones de mosquitos. La prueba tuvo un periodo de intervalo entre dos y tres meses entre cada bioensayo, y de acuerdo con los resultados obtenidos en comparación con el grupo control se realizó en total 11 bioensayos para los contenedores de plástico (maceta) y siete bioensayos para las tablillas de masonite (tablex[®]). La toxicidad de las concentraciones de PPF de las tres emulsiones se evaluó a concentraciones diferentes:

- a) emulsión 1 (E1) con una concentración al 0,0063 % de PPF
- b) emulsión 2 (E1) con una concentración al 0,063 % de PPF
- c) emulsión 3 (E1) con una concentración al 0,02 % de PPF

Se analizó tres réplicas para cada tipo de material y concentración, cada una de las cuales constaba de su respectivo control sin tratar. En los dos sustratos, las propiedades del material biológico utilizado se diferenciaron entre sí mediante el siguiente procedimiento:

Contenedores de plástico (macetas) : se utilizó únicamente larvas de un día de eclosión en el estadio larva 1 (L₁) obtenidas a partir de puestas de hembras alimentadas con sangre.

Tablillas de Masonite[®](tablex[®]) : se empleó individuos adultos (machos y hembras) con una edad aproximada de tres días, donde las hembras nulíparas fueron alimentadas con sangre y se obtuvo larvas del primer estadio L₁ que serían el material biológico de estudio utilizados en los bioensayos.

Para el análisis de los resultados, y dada la dificultad de poder discriminar en qué estadio larvario específico L₁, L₂, L₃ y L₄ tuvo lugar la mortalidad de los individuos o poder valorar el momento exacto de la ecdisis, la muda de estadio inicial a final o la mortalidad de estos, se optó por agruparlos en larvas iniciales (L₁-L₂) y larvas finales (L₃-L₄), estimando, de este modo las correspondientes tasas de mortalidad para cada uno de estos grupos.

La inhibición de la emergencia (% IE) se analizó a partir del número de pupas aparentemente viables (ausencia de malformaciones al inicio de la última ecdisis larval L_4 – pupa), y posteriormente se contabilizó las pupas desde la eclosión hasta la etapa adulta. A partir de este tramo, se observó los parámetros relacionados únicamente con los adultos emergidos (F2), utilizando el mismo protocolo de cría que las muestras tratadas inicialmente, pero no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento tóxico. Estos parámetros analizados incluían

- La capacidad de vuelo (observado tanto en las hembras como los machos)
- La capacidad de las hembras para alimentarse de sangre
- La capacidad de la ovoposición de las hembras alimentadas
- La viabilidad y eclosión de la ovoposición y posterior emergencia de larvas y pupas viables que puedan alcanzar a la fase adulta (F2).

Finalmente, otro parámetro de análisis paralelo de la prueba consistió en el efecto de los i.a. contenidos en las tres concentraciones y su relación con las consiguientes alteraciones morfogénicas ocurridas en los estadios larvarios y las pupas, y a medida que ocurrió la mortalidad, se contabilizaron y clasificaron según criterios de Yodbustra y cols. (1985) (Yodbustra, Ketavan, Suchartupatham, y Areekul, 1985).

- pre-pupa (estadio larval final L_3 – L_4 y ecdisis inicial a pupa)
- pupa blanca
- pupa melanizada
- pupa con adulto visible
- pupa con adulto parcialmente emergido

Procedimiento de bioensayos para los contenedores de plástico (macetas)—

Se realizó un total de 11 bioensayos independientes durante 27 meses, comprendidos en un periodo de intervalo de dos a tres meses entre cada uno (el intervalo de tiempo entre cada bioensayo se debió a la disponibilidad de individuos adultos y larvas que se obtuvo de la colonia). Las emulsiones se aplicaron sobre la superficie 48 horas antes del inicio del primer bioensayo siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además, se estimó previamente la superficie interior de los contenedores de plástico, que tenían una capacidad de 200 a 300 ml, y así calcular la cantidad de emulsión necesaria para establecer la dosis final de los i.a. en 2 mg / 100 cm².

La aplicación de las emulsiones se realizó utilizando una pipeta Pasteur, extendiendo la cantidad establecida de emulsionado por la base de la superficie y el borde y base interna de los contenedores de plástico, las cuales fueron giradas repetidas veces de forma manual mientras se mantuvieron expuestas a la corriente de aire impulsado

por un ventilador, lo que favoreció la rápida evaporación del agua y una óptima homogeneización en toda la superficie, evitando el encharcamiento al ser aplicada. Posteriormente, se dejaron en un lugar ventilado para su secado por completo y transcurridas 48 horas después del tratamiento, se introdujeron 30 larvas en el estadio inicial (L_1) para cada réplica por triplicado mas un control para cada concentración de PPF. Previamente a la introducción de las larvas se adicionaron 200 ml de agua declorada a cada maceta tratada más su control y se proporcionó 0,01 gr de alimento para peces como alimento de las larvas. Finalmente, se procedió a evaluar el efecto de toxicidad de las emulsiones. La Figura 3.6 detalla el procedimiento.

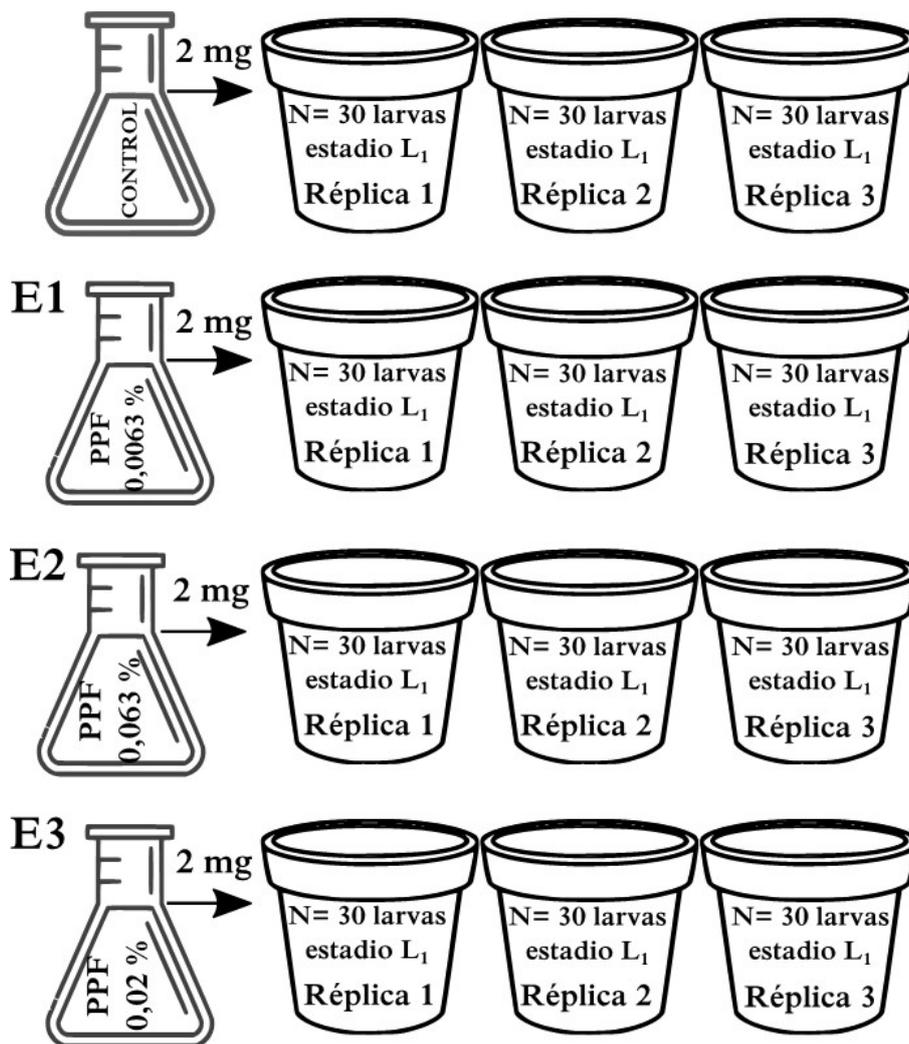


Figura 3.6: Esquema de la metodología emulsiones sobre contenedores de plástico (macetas); E1= (0,0063 %); E2= (0,063 %); E3= (0,2 %) de PPF. Cada recipiente contenía 2 mg de PPF, se añadió 200 ml de agua declorada y 30 larvas L_1 ; R= réplicas

Desde el inicio de la prueba, se examinaron las larvas diariamente para detectar alteraciones morfológicas y su supervivencia hasta la posible emergencia del adulto. Las larvas que sobrevivían hasta la fase de pupa fueron retiradas e introducidas en eclosionadores para larvas de insectos acuáticos (con agua declorada en su interior y sin tratamiento toxico). Las larvas se identificaron por procedencia de cada concentración de PPF, y se realizó el mismo procedimiento con las pupas muertas, que fueron

clasificadas por el tipo de malformación morfológica que presentaron.

Para poder constatar la toxicidad de PPF en las tres concentraciones y sus controles sin tratamiento, las pupas aparentemente viables se separaron de los contenedores tratados y se las introdujo en contenedores sin tratamiento dentro de cajas de cría de 30 x 30 x 30 cm. Una vez introducidas se observó la ecdisis a la fase adulta o su mortalidad. Este procedimiento se realizó con el objetivo de contabilizar y clasificar los efectos tóxicos de PPF en los adultos emergidos. Tales efectos observados fueron la capacidad de vuelo, la capacidad de realizar la ingestión de sangre y la posterior ovoposición, la viabilidad de huevos, la posterior eclosión larvaria, la mortalidad o supervivencia larvaria y la ecdisis a la fase adulta (siguiente generación).

Debemos aclarar que cada réplica (en el caso de que alguna pupa alcanzó la fase adulta) contó con una caja de cría para la observación de los efectos del PPF. En el caso del grupo control, el seguimiento solo se realizó hasta la emergencia de los adultos, ya que como cada réplica contó con un control implicaría una limitada capacidad de espacio en las instalaciones de la colonia.

En el siguiente diagrama de flujos (Fig. 3.7) se presenta el esquema que se realizó al inicio de la emergencia de los adultos ocurrida en cada bioensayo, es decir, que a medida se realizó un bioensayo y se observaba la eclosión de los adultos los parámetros del ciclo gonotrófico de los mismos eran observados en paralelo con su bioensayo correspondiente hasta la muerte o supervivencia de todas las larvas tratadas para cada concentración.

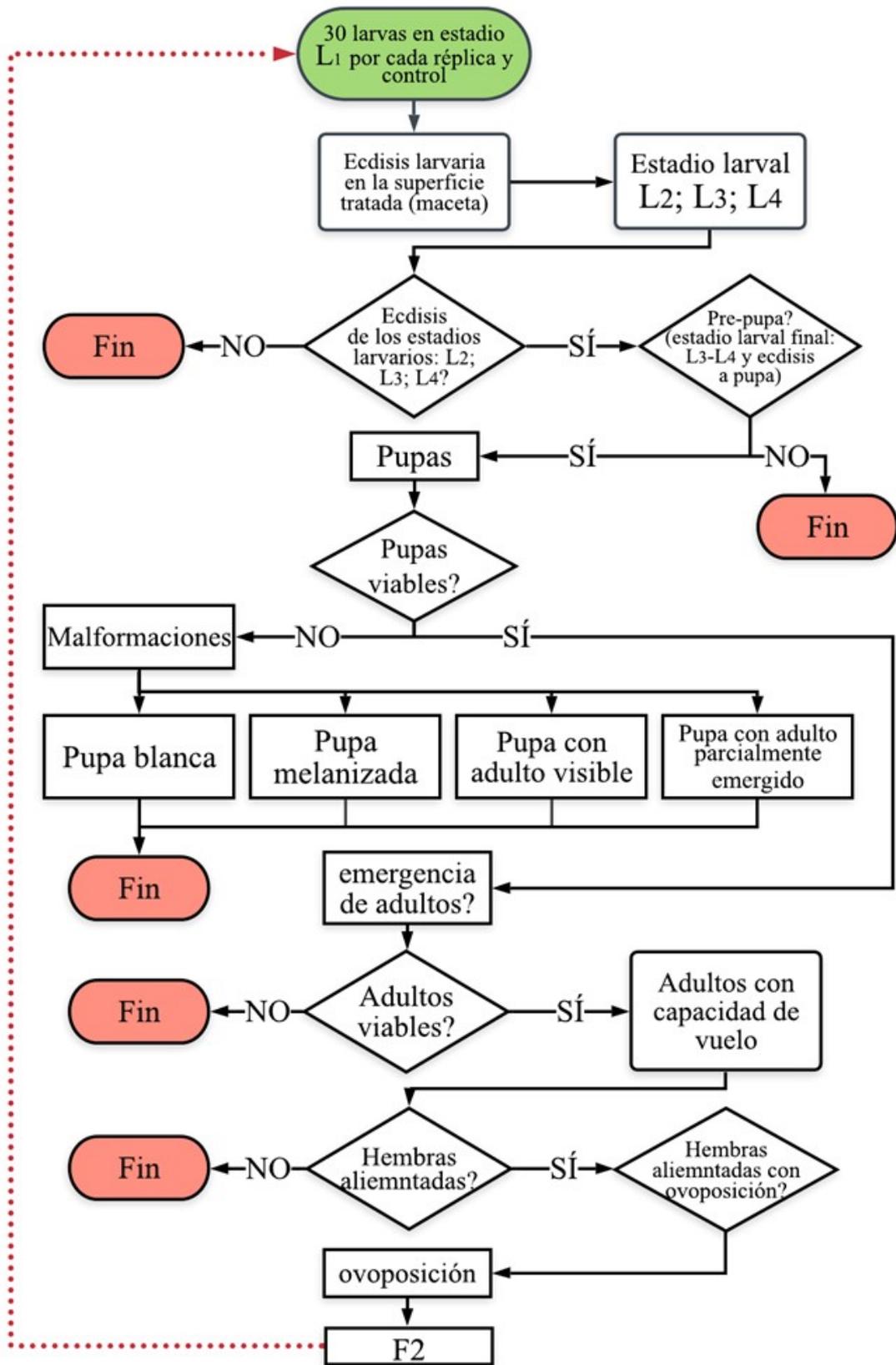


Figura 3.7: Esquema del procedimiento para el análisis de la eficacia residual de PPF en contenedores de plástico (macetas)

Tablillas de Masonite® (tablex®)— Se realizó siete bioensayos independientes, con un intervalo de entre dos a tres meses por cada bioensayo. Se utilizaron 400 hembras grávidas, separadas en cohortes de 100 hembras en cuatro cajas de cría correspondientes a las tres emulsiones y el control, y se introdujo además 200 machos para cada una, para así, poder estimular tanto la cópula y la ingestión de sangre en las hembras. Una vez realizada la ingestión de sangre y transcurridas 72 h, las hembras ya habían completado el proceso de ovogénesis y se introdujo en el interior de las cajas de cría los contenedores de plástico con agua de clorada (200 - 300 ml), que además incluían en su interior de las tablillas de masonite tratadas (Fig. 3.10 B). El objetivo de este procedimiento aseguró que las hembras realicen la ovoposición directamente o principalmente sobre toda el área tratada, también se introdujo alimento para peces dentro de las macetas con el objetivo de estimular la ovoposición.

Aunque algunos huevos fueron ovopositados fuera del área de superficie de las tablillas de masonite, tanto en la superficie interior de la maceta o en el agua, solo se optó a contabilizar los huevos contenidos dentro de la superficie tratada. Posteriormente, tres días después de la ovoposición, se retiró las macetas de las cajas de cría (incluidos las tablillas en su interior), donde, las mismas tablillas con los huevos opositados en su superficie fueron retirados de las macetas y se dejaron secar durante 48 horas dentro de placas Petri, dejándolos encima de un papel de filtro, lo que evitó la caída involuntaria de algún huevo a la hora del realizar el conteo. Posteriormente, se precedió al registro del número de huevos en el laboratorio con una lupa y se identificó su precedencia (concentración) y su respectiva replica y control. Finalmente, se estimó las variables de estudio, como la aparente viabilidad de los huevos, el porcentaje de huevos por hembra y el porcentaje de eclosión larvaria. En las figuras 3.8 se ilustra el procedimiento de los bioensayos, el esquema del procedimiento (Fig. 3.9) y el procedimiento de alimentación y monitoreo de huevos y eclosión de estadios larvales y pupas (Fig.3,10).

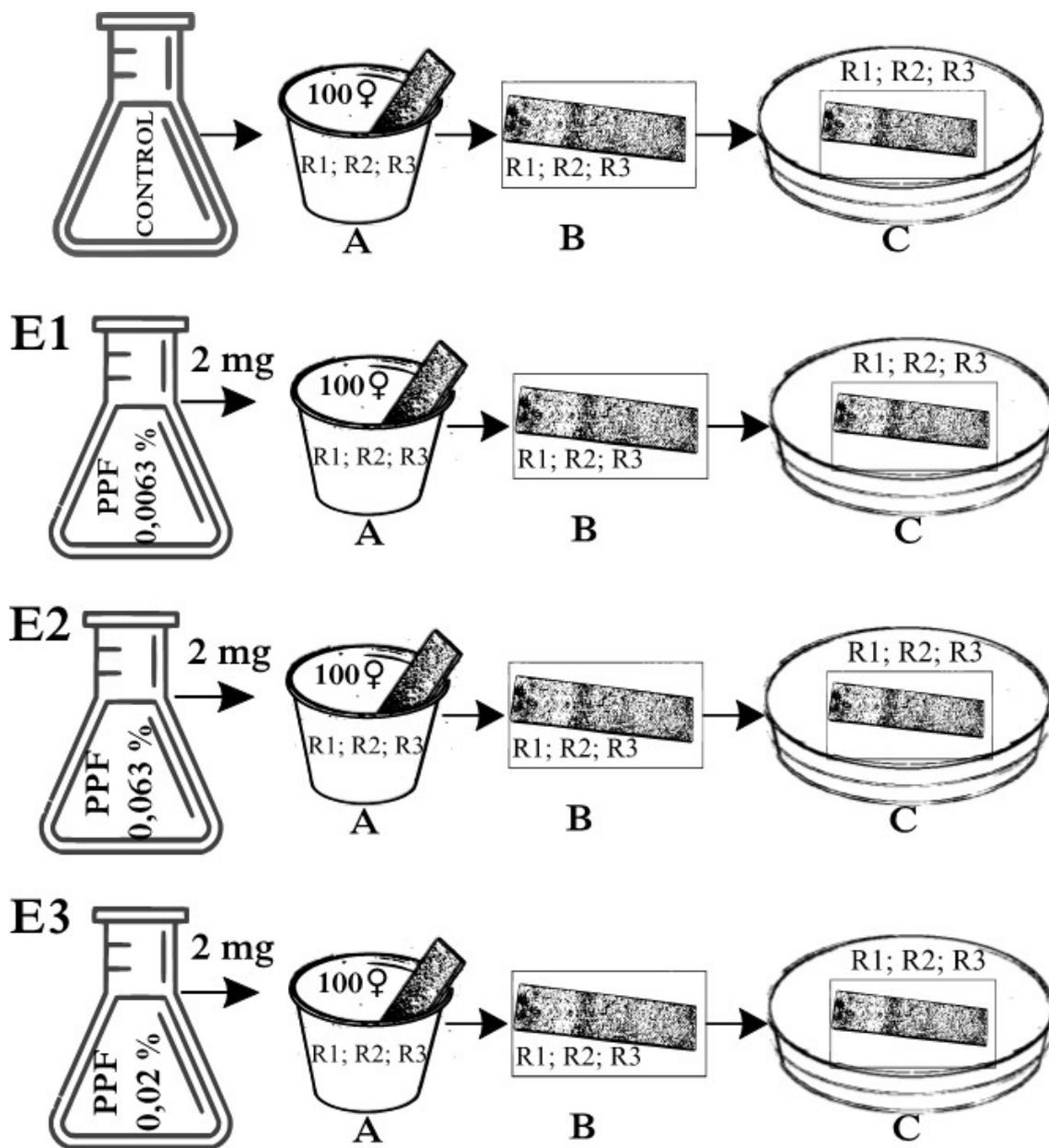


Figura 3.8: Procedimiento de la prueba emulsiones sobre las tablillas de masonite tratados, en el cual las hembras realizaron la ovoposición. (A)= contenedores de plástico, donde 100 hembras realizaron la ovoposición en las tablillas de masonite; (B)= papel filtro, donde se dejó secar las tablillas de masonite con los huevos; (C)= placa de Petri, donde se introdujo el papel filtro incluido las tablillas masonite y ocurrió la eclosión de huevos, los estadios larvales L₁; L₂; L₃; L₄ y pupas. E1= emulsión 1 (PPF 0,0063 %); E2= emulsión 2 (PPF 0,063 %); E3= emulsión 3 (PPF 0,2 %). R= Réplicas

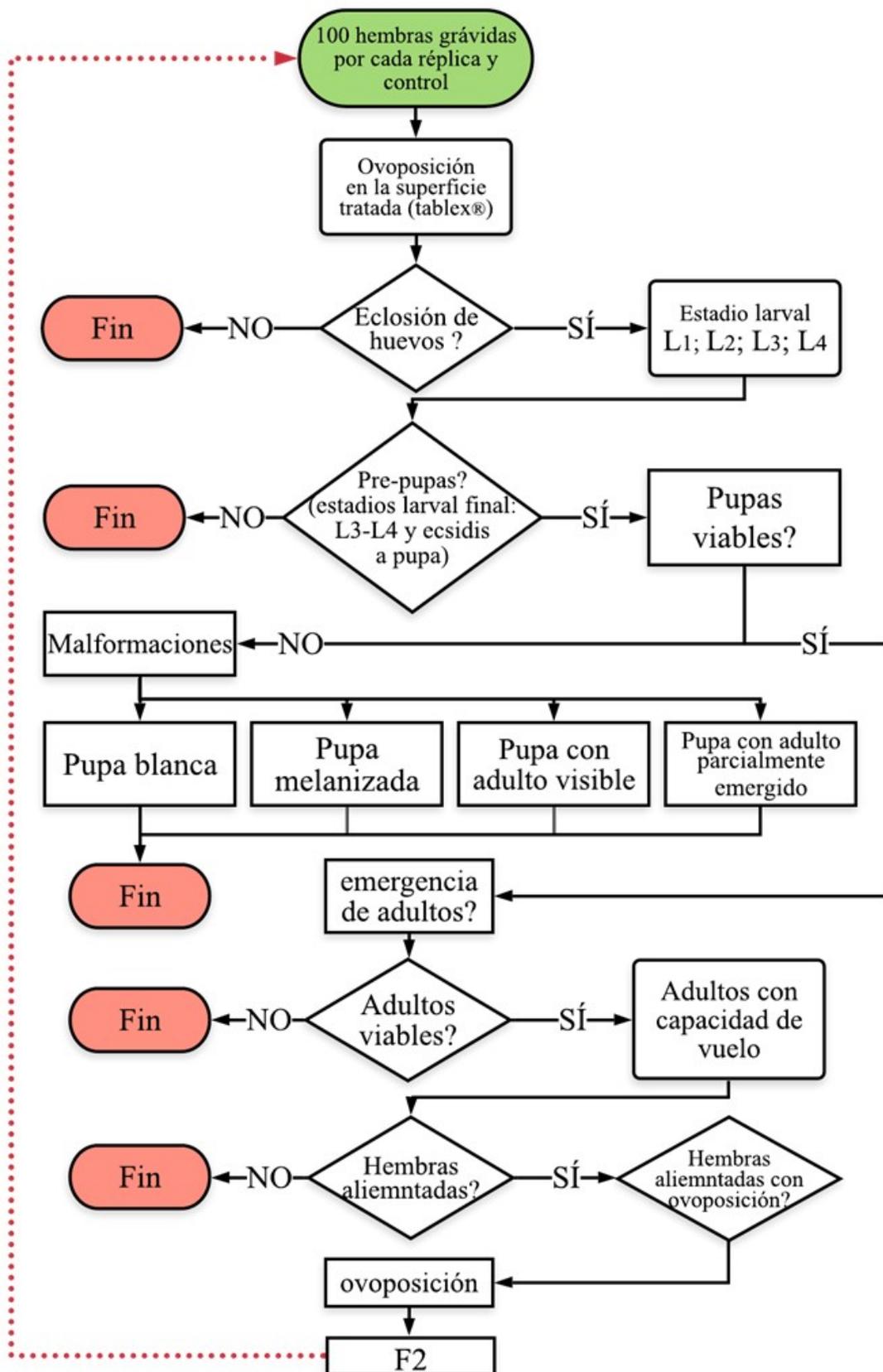


Figura 3.9: Esquema del procedimiento para el análisis de la eficacia residual de PPF en las tablillas de masonite[®] (tablex[®])

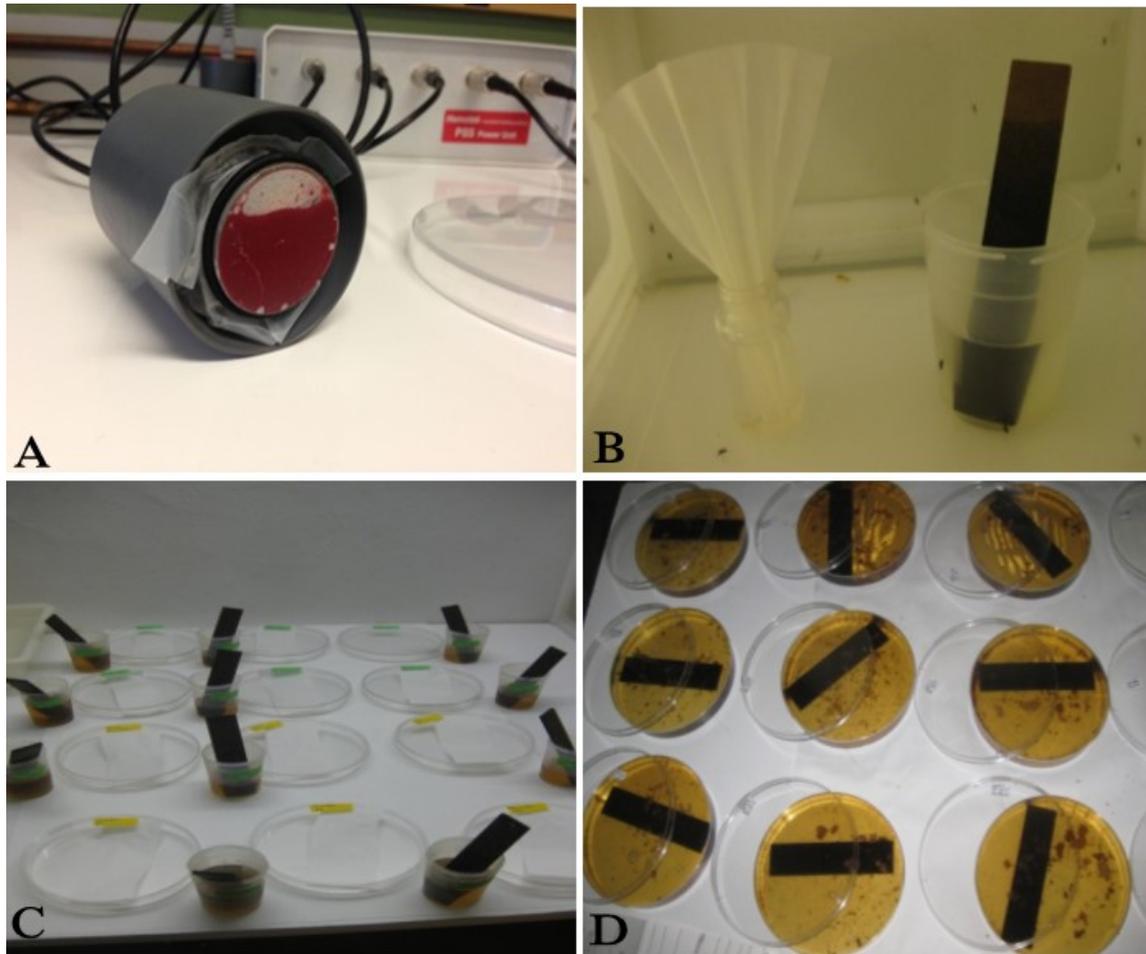


Figura 3.10: Procedimiento de la prueba en las tablillas de masonite® (tablex®) (A)= alimentación con sangre (membrane-feeding) (100 hembras por cada replica de cada formulado) (B)= tablillas de masonite, donde procedió la ovoposición introducido en la maceta de plástico con agua de clorada y con 0,2 mg de alimento para peces (atrayente ovoposición) y con el mismo procedimiento para el control. (C)= placas de Petri y papel filtro donde ocurrió la eclosión de larvas. (D)= tablillas de masonite tratados y controles sumergidos en agua de clorada dentro de placas Petri (monitorización de la ecdisis de los estadios larvales y pupas)

3.3. Análisis estadístico

3.3.1. Prueba I polímeros (pinturas insecticidas)

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la Prueba I, debido a la escasa variabilidad entre réplicas, se combinaron los resultados obtenidos en las tres réplicas de cada bioensayo. Posteriormente, debido a que la tasa de mortalidad en alguno de los controles osciló entre el 5% y el 20%, se procedió a aplicar la corrección de Abbott (Abbot, 1987) con el fin controlar la variabilidad en la mortalidad inherente a cada lote de mosquitos utilizados para cada bioensayo.

A partir de la tasa de mortalidad corregida se procedió a estimar el número corregido de ejemplares vivos o muertos en cada bioensayo, lo que conformó la matriz de datos finalmente analizada. Para valorar el efecto potencial de las diferentes variables (superficie, formulado, concentración y el tiempo) sobre el efecto KD y la mortalidad de los mosquitos, debido a la naturaleza de los datos obtenidos, éstos se analizaron en diferentes intervalos después de la exposición. En primer lugar, se exploraron las asociaciones de las diferentes variables con el efecto KD observado a los 30 minutos pos-exposición. En segundo lugar, se exploraron las posibles relaciones de las mismas variables con la mortalidad observada entre los 60 minutos y las 72 horas postexposición.

En este segundo caso, y debido a que la naturaleza de los datos (correlacionados en el tiempo) dificultan su análisis conjunto con el resto de variables experimentales, se procedió a crear una variable subrogada al desarrollo de la mortalidad a lo largo de este período, la cual consistió en estimar, para cada bioensayo, la mediana de la distribución de los valores de tiempo a los que se registró la muerte de los ejemplares, lo que equivale a estimar el tiempo (en horas) en el que tuvo lugar la mortalidad del 50% de los ejemplares (TD_{50}) de los ejemplares observados en cada ensayo. Para cada intervalo de observación (60 min, 24 h, 48 h y 72 h) el tiempo estimado de la muerte de los ejemplares se calculó como el punto medio entre el mismo intervalo de observación y el inmediatamente anterior.

Para el análisis del efecto KD se procedió a ajustar un modelo lineal generalizado multivariante (MLGz), en el que la variable dependiente, de naturaleza dicotómica, fue indicadora de si el ejemplar en cuestión presentaba (o no) efecto KD a los 30 min postexposición, utilizando para ello una función de enlace logit (regresión logística multivariante). Como variables predictoras incluidas en el modelo inicial se introdujeron todas las variables experimentales (superficie, formulado, dosis y tiempo) y sus interacciones de segundo grado. Todas ellas fueron introducidas como variables nominales o categóricas, con excepción del variable tiempo, la cual fue introducida como variable continua, representando los meses transcurridos desde la realización del primer bioensayo.

Para el análisis del TD_{50} y debido a que la variable fue de naturaleza continua, se procedió a ajustar un modelo lineal general multivariante (MLG), con la variable

(TD₅₀) como variable dependiente, y como predictoras las mismas que las consideradas en el KD, incluidas sus interacciones de segundo grado.

Con el fin de refinar los modelos estadísticos iniciales y obtener modelos finales más adecuados y simples, se aplicó un algoritmo de selección del mejor modelo basado en el criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1973). Ambos modelos fueron ajustados considerando la superficie menos porosa (madera), la concentración doble y el formulado 5D IGR como los niveles base de las variables categóricas. Este algoritmo es uno de los más utilizados para el análisis de datos complejos, ya que sus resultados no se ven influenciados por el tamaño de la muestra, tal y como ocurre con algoritmos más convencionales en los que un tamaño muestral elevado (como es el caso del presente trabajo) determina la existencia de resultados estadísticamente significativos pero carentes de fundamento biológico (Lehmann y Lösler, 2016). El criterio de Información de Akaike viene dado por la siguiente formula:

$$\text{AIC} = 2 (\mathbf{k} - 2) \ln (\mathbf{L})$$

Donde \mathbf{k} es el número de parámetros (o variables retenidas en el modelo final) y \mathbf{L} el valor máximo en la función de verosimilitud (Maximum likelihood). Por lo tanto, AIC mide la bondad de ajuste a partir de la máxima verosimilitud del modelo, pero teniendo en cuenta la complejidad del modelo a partir el número de parámetros incluidos en él. De este modo, el AIC se basa en el principio de parsimonia, al penalizar la adición de variables al modelo, siendo un algoritmo adecuado para obtener los modelos más simples posibles que permiten, a su vez, explicar el mayor porcentaje de variación de los datos analizados.

Aunque este algoritmo no está basado en la selección de variables en función de su valor \mathbf{p} , y éstos no tienen ningún papel, por lo tanto, en la interpretación de los modelos finales obtenidos, en el apartado de Resultados se ha representado, junto a cada variable retenida en el modelo final, el valor correspondiente de \mathbf{p} calculado según los algoritmos tradicionales. Esto se ha hecho así, simplemente, como nexo de unión entre ambos algoritmos.

La bondad de ajuste de los modelos finales obtenidos se ha valorado como el porcentaje de devianza explicado, estimándose como la diferencia entre la devianza del modelo nulo (aquel que solo contiene el parámetro intercepto, sin ninguna variable predictora) y la devianza del modelo final. En el caso del modelo linear general el valor de la devianza explicada coincide con la estimación de la varianza explicada definida por el parámetro \mathbf{R}^2 .

3.3.2. Prueba II. solución acuosa emulsiones (lacas)

Para el análisis estadístico, la curva de mortalidad o inhibición de la emergencia (% IE) a lo largo de los bioensayos (meses) no presentó una forma específica que pudiera ser ajustada con una función lineal ni tan siquiera con la misma función polinomial

para todos los casos. Por lo cual, se optó por considerar la variable tiempo (transcurrido desde la aplicación de las emulsiones) como variable categórica con tantos niveles como bioensayos realizados. Ello implicó que para obtener suficientes grados de libertad los modelos se han debido de ajustar sobre tasas de mortalidad estimadas para cada una de las réplicas por separado y no combinadas.

Por otra parte, dada la dificultad para poder discriminar en qué estadio larvario específico (L_1 , L_2 , L_3 y L_4) tuvo lugar la mortalidad se optó por analizarlos en dos grupos: larvas iniciales ($L_1 - L_2$) y larvas finales ($L_3 - L_4$), estimando de este modo las tasas de mortalidad correspondientes para cada uno de los estadios larvarios en ambos materiales. Las tasas de mortalidad que se calcularon como mortalidad acumulada para cada grupo. Al final de observación de la mortalidad, los resultados se expresaron como % IE, basado en el número de larvas que no se desarrollaron con éxito en adultos viables y ajustado para la mortalidad de pupas según la siguiente fórmula: (% IE) = $(100 - (100 - E/C))$, donde E= es el porcentaje de ocurrencia de los expuestos y C= el porcentaje de emergencia del control.

Aunque, la mortalidad en los controles resultó discreta en comparación con las réplicas tratadas (<15%) se aplicó la corrección de Abbott para ambos materiales. Paralelamente al análisis de mortalidad y % IE se analizaron parámetros de supervivencia a partir de la viabilidad de pupas en ambos materiales. Estos parámetros fueron el porcentaje los adultos emergidos, la capacidad normal de vuelo, el número de hembras alimentadas, la ovoposición, la viabilidad de los huevos ovopositados y la ecdisis de larvas hasta la posible eclosión de adultos (F2).

Para determinar las principales asociaciones entre las variables experimentales y las tasas de mortalidad se procedió a ajustar un GLM en ambos casos (contenedores de plástico o tabillas masonite), en el que la variable dependiente fueron las tasas de mortalidad corregidas para cada réplica, y como variables predictoras la concentración y el tiempo transcurrido desde su aplicación y el inicio del primer bioensayo (en meses), así como su interacción.

Se ajustó un modelo diferente para las tasas de mortalidad estimadas para cada uno de los estadios. En este caso, no se aplicó ningún algoritmo de selección para la obtención del modelo final, debido a que la variable tiempo y su interacción con las concentraciones se introdujeron en el modelo inicial con el fin de recoger la máxima variabilidad de los resultados asociada al desarrollo de los bioensayos. Las diferencias entre tratamientos se realizó mediante una comparación post hoc utilizando la prueba de Tukey y se estableció el criterio de significación $p > (0,05)$ y la prueba exacta de Fisher, realizando todas las comparaciones posibles dos a dos “two tailed”, 2 x 2 Tables ($X^2/V^2/Phi^2$, $(X^2/V^2/Phi^2)$, McNemar, Fisher exact) y se comparó el control con cada una de las concentraciones, y posteriormente todas entre sí. Dado que las probabilidades fueron muy bajas se aplicó la corrección de Bonferroni, que simplemente consistió en establecer el valor de $p > (0,05)$ a partir de las distintas concertaciones y su significancia entre sí y/o el control.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Prueba I (pinturas insecticidas)

En primer lugar, se presentan los resultados descriptivos de la Prueba I, seguidos de los resultados obtenidos con el análisis estadístico de los datos. Debido a la complejidad y extensión de la matriz de datos, el descriptivo, se ha desglosado en función de la superficie tratada y muestra los resultados obtenidos para la tasa de mortalidad estimada a partir de datos brutos (sin aplicar la corrección de Abbott). Posteriormente, se procedió a corregir la tasa de mortalidad para cada réplica (en tantos por uno) en función de la mortalidad de su propio control mediante la fórmula de Abbott (1925) (Abbott y cols., 1925), y así hallar las tasas de mortalidad corregidas.

4.1.1. Superficie más porosa (escayola)

Porcentaje del efecto knock-down— Las siguientes tablas (4.1 y 4.2) muestran los resultados descriptivos obtenidos a partir de la mortalidad estimada obtenidos de los datos brutos del número total de individuos. Para la concentración recomendada (Tabla 4.1) se puede observar que los PY (5ANG IGR[®] y 5A IGR[®]) son los más efectivos, manteniéndose el efecto KD al 100 % hasta los 12 meses y con el 90 % hasta el final de la prueba. Los OP diazinón + clorpirifós (5A IGR[®]) registraron efectos de KD elevados, con tasas iguales o superiores al 90 % en la mayoría de los bioensayos. Aunque se evidenció variaciones en su eficacia llegó a descender hasta el 60 % en el último bioensayo (mes 27). En contraste con el OP diazinón (5D IGR[®]) este exhibió claramente el menor KD, y no fue nunca superior al 70 %, disminuyendo gradualmente con el tiempo hasta alcanzar valores de 30 – 40 % en los bioensayos finales.

Incluso usando el doble de concentración, estas diferencias aún se siguieron manteniendo (Tabla 4.2). De la misma forma, se observó que fueron los PY con mayor efecto KD con un valor constante del 100 % a lo largo de toda la prueba, mientras que para 5A IGR[®], el efecto registrado fue similar al efecto obtenido con la concentración

recomendada. Como se esperaba, diazinón (5D IGR[®]) mostró los peores resultados, con un valor de KD relativamente alto durante el primer bioensayo en comparación con los resultados obtenidos a la concentración recomendada, pero nuevamente mostró que su efectividad disminuye significativamente (30 - 40 %) a los 18 a 21 meses.

Porcentaje de la mortalidad observada— Posteriormente, se observó que la tasa de mortalidad en los PY (5A NG IGR) postexposición del efecto KD a una concentración recomendada y sobre una superficie más porosa (escayola) volvieron a mostrar mejores resultados, con un incremento claro de mortalidad a partir de los 60 min y una mortalidad acumulada del 100 % hasta las 72 h. De manera muy similar, en los OP diazinón + clorpirifós (5A IGR) se observó una tasa de mortalidad del 100 % hasta las 72 h, inclusive hasta el último bioensayo. Finalmente, OP diazinón 3 % (5D IGR), de manera similar al efecto KD, los resultados fueron más discretos y aún aceptables con tasas del 90 % en 72 h.

Cuando la concentración aplicada fue el doble (Tabla 4.2) el patrón de la eficacia resultó un tanto similar a la recomendada (100 %) hasta las 72 h, incluso hasta los 27 meses. Es así, que los PY exhibieron un efecto más rápido y acentuado. El OP diazinón 3 % (5D IGR) por su parte mostró evidentemente los resultados más discretos, aunque alcanzó una eficacia aceptable (80 – 90 %) en los últimos bioensayos y un incremento progresivo desde los 60 min hasta las 72 h postexposición.

T	F	tiempo (meses)									
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
30 min	5A IGR	100	90	90	80	100	100	70	90	90	60
	5D IGR	70	70	60	60	70	60	30	40	30	50
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	80	90	90	90	90
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 – 60 min	5A IGR	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5D IGR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5A NG IGR	0	20	27	0	0	0	80	20	0	0
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60 min –24 h	5A IGR	97	30	0	0	0	0	0	0	0	0
	5D IGR	50	13	0	13	0	0	0	0	0	0
	5A NG IGR	97	27	77	93	90	0	90	40	90	70
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 – 48 h	5A IGR	100	100	100	100	90	83	100	90	70	90
	5D IGR	100	76	20	100	30	27	80	30	40	50
	5A NG IGR	97	30	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	10	3	0	0	3	0	0	0	0
48 –72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	90	70	100	100	53	80	70	40	50
	5A NG IGR	100	33	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	7	13	3	0	0	0	3
72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	90	100	100	100	100	80	100	90	90
	5A NG IGR	100	43	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	23	0	0	7	27	10	0	0	7

Tabla 4.1: Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie más porosa (escayola) para 1 kg / 6m² (concentración recomendada). **5A IGR**= diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. **5D IGR**= diazinón 3 %; PPF 0,063 %. **5A NG IGR**= alfa-cipermetrina 0,7 %; d-aletrina 1 %; PPF 0,063 %; **B1 – B10**= bioensayos; **T**= tiempo de exposición; **F**= formulados

T	F	tiempo (meses)									
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
30 min	5A IGR	100	100	100	100	90	90	90	90	80	80
	5D IGR	100	80	70	40	40	30	40	40	30	40
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 – 60 min	5A IGR	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5D IGR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5A NG IGR	0	27	80	0	0	0	100	80	90	90
	Control	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0
60 min –24 h	5A IGR	93	70	0	10	0	0	0	0	10	0
	5D IGR	47	0	30	0	10	13	0	0	0	0
	5A NG IGR	33	37	80	90	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 – 48 h	5A IGR	100	100	100	100	93	93	100	100	100	100
	5D IGR	100	80	70	57	50	43	30	10	10	0
	5A NG IGR	100	93	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
48 –72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	93	90	57	100	90	70	70	60	80
	5A NG IGR	100	93	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	7	0	3	0	3	10	0	0
72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	97	100	100	100	100	70	90	90	80
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	10	0	0	10	3	0	0	10	7	3

Tabla 4.2: Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie más porosa (escayola) para 1 kg / 3m² (concentración doble). **5A IGR**= diazinón 1,5%; clorpirifós 1,5%; PPF 0,063%. **5D IGR**= diazinón 3%; PPF 0,063%. **5A NG IGR**= alfa-cipermetrina 0,7%; d-aletrina 1%; PPF 0,063%; **B1 – B10**= bioensayos; **T**= tiempo de exposición; **F**= formulados

4.1.2. Superficie menos porosa (madera de pino)

Asimismo, la superficie menos porosa tratada con el formulado a base de PY (5ANG IGR) fue significativamente más efectiva para el efecto KD y TD₅₀ en casi todos los bioensayos (100%), independientemente de la concentración (Tablas 4.3 y 4.4). En los formulados que contenían los OP basado en diazinón + clorpirifos combinados (5A IGR), se observó una tasa de efecto KD más alta que en el formulado que contenía solo el OP diazinón al 3% (5D IGR). Aunque la residualidad de la eficacia de los i.a. en ambos disminuyó significativamente con el tiempo. Como resultado, después de 27 meses, ambos mostraron valores nulos de eficacia, especialmente en la concentración recomendada. Sin embargo, cuando se duplica la concentración, éste mantuvo un efecto aún reducido (30 - 50%) (Tabla 4.4).

T	F	tiempo (meses)									
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
30 min	5A IGR	% efecto volteo KD									
	5D IGR	100	100	100	60	0	60	30	40	40	0
	5A NG IGR	80	70	30	10	0	30	30	30	30	0
	Control	100	100	100	80	100	100	100	100	100	100
30 - 60 min	5A IGR	% de mortalidad observada									
	5D IGR	47	0	23	0	0	0	0	0	0	0
	5A NG IGR	80	0	16	0	0	0	0	0	0	0
	Control	0	0	0	17	0	0	0	0	0	0
60 min -24 h	5A IGR	93	17	100	90	87	0	0	0	0	0
	5D IGR	97	43	100	90	40	0	0	0	0	0
	5A NG IGR	30	93	23	90	43	0	40	30	20	20
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
24 - 48 h	5A IGR	100	100	100	93	100	13	80	80	60	50
	5D IGR	100	100	100	97	100	100	60	60	60	70
	5A NG IGR	90	100	86	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	13	10	0	0	0	3
48 -72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5A NG IGR	93	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	13	7	0	3	0	0
72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5A NG IGR	93	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	20	0	0	10	3	3	7

Tabla 4.3: Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie menos porosa (madera) para 1 kg / 6m² (concentración recomendada). **5A IGR**= diazinón 1,5%; clorpirifós 1,5%; PPF 0,063%. **5D IGR**= diazinón 3%; PPF 0,063%. **5A NG IGR**= alfa-cipermetrina 0,7%; d-aletrina 1%; PPF 0,063%; **B1-B10**= bioensayos; **T**= tiempo de exposición; **F**= formulados

T	F	tiempo (meses)									
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	27
		B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
		% efecto volteo KD									
30 min	5A IGR	90	90	90	20	60	50	80	60	60	50
	5D IGR	90	90	70	30	40	40	40	30	30	30
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		% de mortalidad observada									
30 – 60 min	5A IGR	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0
	5D IGR	43	33	67	0	0	0	0	0	0	0
	5A NG IGR	100	83	100	0	0	0	0	0	0	0
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60 min –24 h	5A IGR	100	13	100	77	100	100	70	80	30	0
	5D IGR	97	57	97	90	100	100	50	50	30	10
	5A NG IGR	100	93	100	67	100	100	60	70	60	30
	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 – 48 h	5A IGR	100	100	100	93	100	100	100	100	100	80
	5D IGR	100	100	100	93	100	100	100	100	100	80
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	13	3	0	0	0	0
48 –72 h	5A IGR	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0
72 h	5A IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5D IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5A NG IGR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Control	0	0	0	0	0	13	7	3	3	7

Tabla 4.4: Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie menos porosa (madera) para 1 kg / 3 m² (concentración doble). **5A IGR**= diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. **5D IGR**= diazinón 3 %; PPF 0,063 %. **5A NG IGR**= alfa-cipermetrina 0,7 %; d-aletrina 1 %; PPF 0,063 %; **B1–B10**= bioensayos; **T**= tiempo de exposición; **F**= formulados

4.1.3. Análisis del modelo para el efecto KD para los dos tipos de superficies

Efecto volteo KD— El modelo final ajustado a los datos de el efecto KD retuvo ocho parámetros, incluyendo los efectos de las cuatro variables principales más cuatro interacciones (Tabla 4.5). Los formulados 5A NG IGR y 5A IGR exhibieron un 100 % del efecto KD significativamente altos durante un máximo de 12 meses. Posteriormente, presentaron valores del 90 %. En tanto, 5D IGR exhibió claramente el menor efecto KD y no fue nunca superior al 70 % al inicio de la prueba, disminuyendo progresivamente en el tiempo en los últimos bioensayos (30 – 40 %). El modelo final ajustado a todos los datos de KD conservó ocho parámetros que explicaron el 77 % de la devianza total.

Efecto	gl	Wald Stat.	<i>p</i>
Intercepto	1	1099,19	< 0,0000
Superficie	1	2,09	0,1481
Concentración	1	10,41	< 0,0013
Formulado	2	16,86	< 0,0002
Mes	1	54,99	< 0,0000
Superficie x Concentración	1	3,72	0,0539
Superficie x Formulado	2	29,01	< 0,0000
Superficie x Mes	1	2,91	0,0879
Formulado x Mes	2	25,33	< 0,0000
devianza explicada	76,97		

Tabla 4.5: Efectos generales estimados para el mejor modelo final de regresión logística obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue el efecto KD codificada como variable binaria

En la Tabla 4.6 según el modelo final obtenido, se han reflejado los coeficientes de regresión estimados para cada uno de los efectos retenidos en el modelo final. Tal y como se observa, la magnitud del efecto KD fue superior en la superficie más porosa e inferior a la concentración recomendada (coeficiente negativo), mientras que los coeficientes estimados para los diferentes formulados muestran que la tasa del efecto KD fue superior para los PY (5A NG IGR), seguida de los OP diazinón y clorpirifós (5A IGR), ambos con coeficientes positivos respecto al nivel base representado por el OP diazinón (5D IGR), que fué el de menor efecto KD. Por último, respecto al transcurso del tiempo representado por la variable meses, el coeficiente de signo negativo indicó una clara pérdida de la residualidad para el efecto KD a lo largo del período de estudio.

Respecto a las interacciones, el hecho de haber sido retenidas en el modelo final evidencia la complejidad de los factores que intervienen en la modulación del efecto KD. Para analizar con más detalle cada uno de ellos, en los siguientes apartados se procedió a examinar por separado cada uno de las variables principales y sus interacciones. Para ello, se han tenido en cuenta únicamente los valores de mínimos cuadrados estimados por el modelo, lo que representa el efecto medio de cada una de ellas una vez controlados los efectos e interacciones de las demás variables.

Efecto	Nivel de efecto	Coeficiente	ES	Wald Stat.	<i>p</i>
Intercepto		0,88	0,02	1099,19	<0,001
Superficie	Escayola	0,03	0,02	2,09	0,148
Concentración aplicada	1 kg/6 m ²	-0,04	0,01	10,41	<0,001
Formulado	5A IGR	0,05	0,03	2,1	0,147
Formulado	5A NG IGR	0,09	0,03	6,77	<0,009
Mes		-0,01	0,01	54,98	<0,001
Superficie x Concentración aplicada	1	0,02	0,01	3,71	0,053
Superficie x Formulado	1	0,09	0,01	24,65	<0,001
Superficie x Formulado	2	-0,08	0,01	18,41	<0,001
Superficie x Mes	1	0,02	0,01	2,91	0,087
Formulado x Mes	1	-0,03	0,02	2,5	0,113
Formulado x Mes	2	0,011	0,02	24,29	<0,001

Tabla 4.6: Coeficientes estimados para el mejor modelo de regresión logística final obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue el efecto KD codificado como variable binaria.

Interacción del efecto tipo de superficie y concentración (recomendada vs doble)— El efecto interacción entre las variables superficie y concentración retenida en el modelo final, evidencia claramente como el tipo de superficie condicionó la probabilidad del KD según la concentración (Fig. 4.1). En el caso de la superficie menos porosa (madera) la menor probabilidad del KD determinada por la naturaleza de la superficie evidencian un incremento sensible al duplicar la concentración de los i.a. Tal y como se puede observar, la probabilidad estimada del KD aumentó cuando se duplicó la concentración en un 5,2% o 1 vez superior en la superficie escayola 0,81 [IC 95% (0,75 – 0,86)] frente a la recomendada 0,77 [IC 95% (0,72 – 0,83)]. Mientras que, en el caso de la madera, la probabilidad aumentó en un 26,8% o 1,2 veces cuando fue doble 0,71 [IC 95% (0,65 – 0,76)] vs la concentración recomendada 0,56 [IC 95% (0,51 – 0,62)].

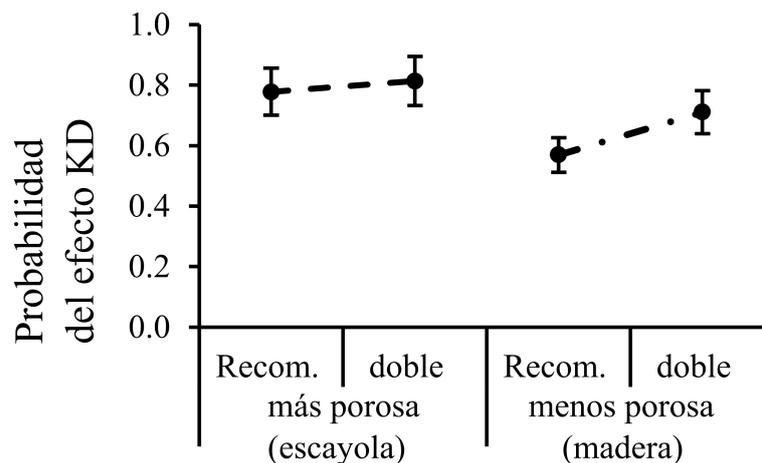


Figura 4.1: Valores mínimos al cuadrado (IC del 95%) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del efecto KD. Interacción del efecto del tipo de superficie y la dosis aplicada (recomendada vs doble). La probabilidad de KD depende del tipo de superficie y de la dosis aplicada: 1kg / 6 m² (recomendada); 1kg / 3 m² (doble)

Interacción del efecto para el tipo de superficie y los formulados— En el efecto entre el tipo de superficie y el formulado aplicado tal y como se observa en la figura 4.2, simplemente recoge la desigual disminución de la probabilidad del KD cuando la superficie tratada fue menos porosa (madera), ya que la magnitud del efecto fue diferente para cada uno de los formulados. Así, mientras para el formulado 5A NG IGR la probabilidad del KD fue prácticamente similar en ambos tipos de superficies, para 5D IGR la probabilidad de KD aumentó en un 33 % o 1,3 veces superior en la más porosa (escayola) 0,52 [IC 95 % (0,45–0,6)] frente a la menos porosa (madera) 0,39 [IC 95 % (0,32 – 0,45)], siendo el más afectado por el tipo de superficie. En el formulado 5A IGR, que en este caso la probabilidad del KD en escayola fue de 0,89 [IC 95 % (0,82 – 0,96)] se incrementó en un 64,8 % o 1,6 veces superior frente a la madera 0,54 [IC 95 % (0,48 – 0,61)].

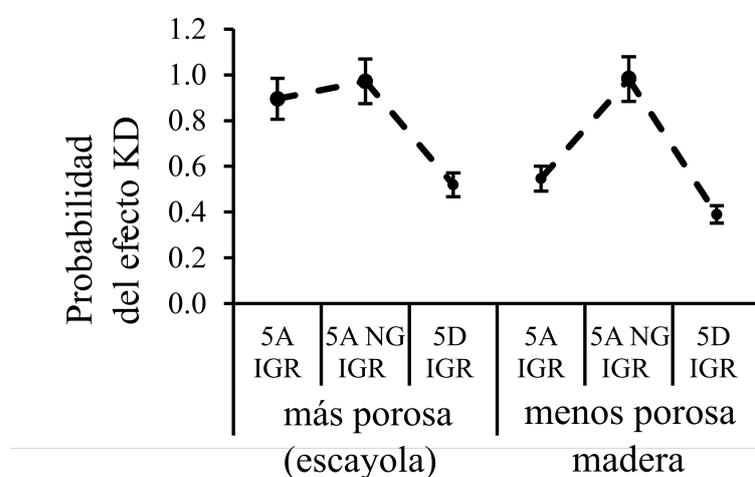


Figura 4.2: Interacción entre el tipo de superficie y el formulado. La probabilidad de KD depende de la superficie de aplicación, más porosa (escayola) o menos porosa (madera), dependiendo del formulado aplicado. 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-aletrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifós 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %

Las interacciones retenidas en el modelo final también mostraron que los efectos tanto de la concentración aplicada como el del formulado estaban condicionados al tipo de superficie (Fig. 4.1 y 4.2). Por lo tanto, la diferencia en la probabilidad de KD estimada para ambas concentraciones fue menor cuando la superficie era más porosa, mientras que el efecto KD de 5A IGR disminuyó considerablemente cuando se aplicó sobre una superficie menos porosa.

En cuanto al tiempo transcurrido (meses), el coeficiente de signo negativo indica una pérdida de residualidad para el efecto KD a lo largo de los bioensayos (Tabla 4.6, Fig. 4.3). La interacción entre el Formulado y el Tiempo (mes) marcó diferencias en el efecto residual de cada formulado. (Disminución estimada del 2 % para 5A NG IGR (IC 95 % $p > 0,05$) vs 44,5 – 73,2 % 5A IGR y 5D IGR respectivamente). La probabilidad del KD asociada al formulado 5A NG IGR prácticamente no sufre descenso a lo largo de los 27 meses, con tan solo una disminución estimada del 2 %, lo que subraya las diferencias en composición entre este formulado y los dos anteriores.

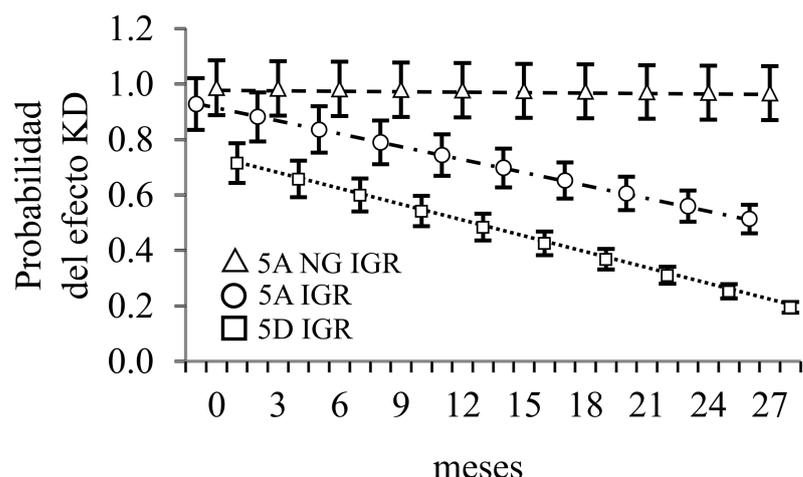


Figura 4.3: Valores mínimos al cuadrado (IC del 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del efecto KD. Probabilidad del KD en función del formulado aplicado y del tiempo (meses). 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-alettrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifos 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %

Mortalidad TD_{50} — El modelo final ajustado a los datos obtenidos respecto al tiempo de mortalidad transcurrido hasta la muerte del 50 % de los individuos retuvo siete parámetros, incluyendo únicamente los efectos de dos variables principales, Superficie y Tiempo (mes) más cinco interacciones (Tabla 4.7), evidenciando la complejidad de las interrelaciones entre los diferentes factores considerados. El modelo mostró un buen ajuste y una capacidad explicativa moderada (48 % de la devianza total explicada), inferior a la estimada para el modelo ajustado al efecto KD.

Efecto	gl	Wald Stat.	<i>p</i>
Intercepto	1	69,62	<0,001
Superficie	1	15,39	<0,001
Mes	1	16,78	<0,001
Superficie x Concentración	1	7,07	<0,007
Superficie x Formulado	2	22,25	<0,001
Superficie x Mes	1	11,21	<0,008
Concentración x Mes	1	11,05	<0,009
Formulado x Mes	2	37,72	<0,001
Devianza explicada	47,89 %		

Tabla 4.7: Coeficientes estimados para el mejor modelo de regresión logística final obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue el TD_{50} codificado como variable binaria.

Los coeficientes de regresión lineal estimados para cada uno de los efectos retenidos en el modelo final se encuentran en la tabla 4.8 observando el signo y magnitud de cada coeficiente. Esta interpretación del modelo indicó, que el número de horas transcurrido desde los primeros 30 minutos hasta la muerte del 50 % de los individuos fue mayor en la superficie más porosa (escayola), unas 1,91 ($\pm 7,51$) h más aproximadamente. Mientras que el paso del tiempo incrementó el TD_{50} en 0,11 ($\pm 0,46$) horas cada mes desde la aplicación de las PI.

Respecto a las interacciones, se observa que el efecto de la superficie sobre el TD_{50} ha sido diferente en función de la Concentración y/o Formulado, así como del tiempo transcurrido a lo largo de la prueba. La última interacción retenida también evidenció que el tipo de formulado condicionó la evolución del TD_{50} a lo largo del tiempo. Para analizar con más detalle cada uno de los efectos, y de manera similar a como se ha procedido para el análisis del efecto KD, en los siguientes apartados se ha procedido a examinar por separado cada uno de los factores retenidos en el modelo, incluyendo las dos variables principales y las interacciones. Para ello, se han tenido en cuenta únicamente los valores de mínimos cuadrados estimados por el modelo, lo que representa el efecto medio de cada uno de estos factores una vez controlados los efectos e interacciones de los demás factores retenidos en el modelo.

Efecto	Nivel de efecto	Coeficiente	ES	Wald Stat.	<i>p</i>
Intercepto		15,96	1,91	69,62	<0,001
Superficie	ESCAYOLA	7,5	1,91	15,39	<0,001
Mes		0,46	0,11	16,78	<0,001
Superficie x Concentración	1	-2,6	0,97	7,07	<0,007
Superficie x Formulado	1	3,7	1,38	7,16	<0,007
Superficie x Formulado	2	-6,5	1,38	22,11	<0,001
Superficie x Mes	1	-0,37	0,11	11,21	<0,008
Concentración x Mes	1	0,19	0,05	11,05	<0,009
Formulado x Mes	1	0,21	0,08	7,16	<0,007
Formulado x Mes	2	-0,5	0,08	37,52	<0,001

Tabla 4.8: Coeficientes estimados para el mejor modelo final de regresión lineal obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue la mediana de tiempo hasta la muerte (TD_{50})

El efecto de la superficie sobre el TD_{50} varió con la concentración y/o formulado aplicado, y el tiempo transcurrido. Asimismo, el tipo de formulado condicionó la variación del TD_{50} (Fig. 4.4, 4.5). Los formulados 5A NG IGR y 5A IGR produjeron tasas de mortalidad del 100 % después de 48 horas después de la exposición a alta concentración en la superficie porosa (escayola) en todos los bioensayos, mientras que las tasas de mortalidad del 90 % a las 72 horas, y del 80 - 90 % en los últimos bioensayos, se registraron para 5D IGR.

Interacción efecto tipo de superficie y concentración (recomendada vs doble)— Se puede observar en la figura 4.4 que el TD_{50} en la superficie menos porosa fue un 41,1 % mayor o 1,7 veces más rápida cuando la concentración era doble 15,3 h [IC 95 % (11,5 – 19)] con una diferencia aproximada de 9,2 horas respecto a la superficie más porosa 24,5 h [IC 95 % (21 – 28,2)], es decir, para que la TD_{50} suceda en un menor tiempo la superficie condiciona un 37,5 % más si se duplica la concentración.

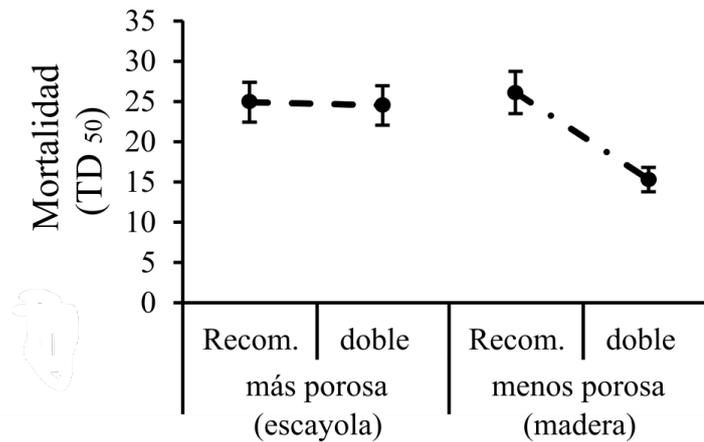


Figura 4.4: Valores de mínimos cuadrados (IC del 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad media de mortalidad del 50 % (TD_{50}) según el tipo de superficies y la dosis aplicada: 1kg / 6 m² (recomendada); 1kg / 3 m² (doble).

El TD_{50} para la superficie menos porosa fue significativamente menor, pero notablemente mucho más efectiva al comienzo de la prueba. El efecto entre el tipo de formulado y el tiempo (mes) también mostró diferencias entre los formulados que contenían PY vs OP, es decir, el TD_{50} de los tres formulados al inicio de la prueba fue similar, pero 5A NG IGR (PY) mantuvo su eficacia a lo largo de la prueba y el efecto se incrementó aún más a la doble concentración.

Interacción efecto tipo de superficie vs formulados — La figura 4.5 muestra la interacción entre el tipo de superficie con respecto a los formulados y la variabilidad de probabilidad del TD₅₀. Claramente se evidencia que 5A NG IGR fue más eficaz en la superficie más porosa, con una media estimada de 10,9 h [IC 95 % (6,4 – 15,4)] a diferencia de 5A IGR y 5D IGR, donde la TD₅₀ fue similar para ambas (31,5 h). Por lo que, la diferencia entre 5A NG IGR con las demás resultó un 65,3 % mayor o 2,8 veces más rápida. Contrariamente el TD₅₀ resultó condicionada por el tipo de superficie, en este caso para la madera, así, para 5A NG IGR fue de 19,9 h [IC 95 % (15,4 – 24,4)] o 9 h de diferencia con respecto a la superficie más porosa, un 45,2 % superior o 1,8 veces más rápida. En la superficie menos porosa no se observó diferencia en las estimaciones ya que fueron similares en los tres formulados.

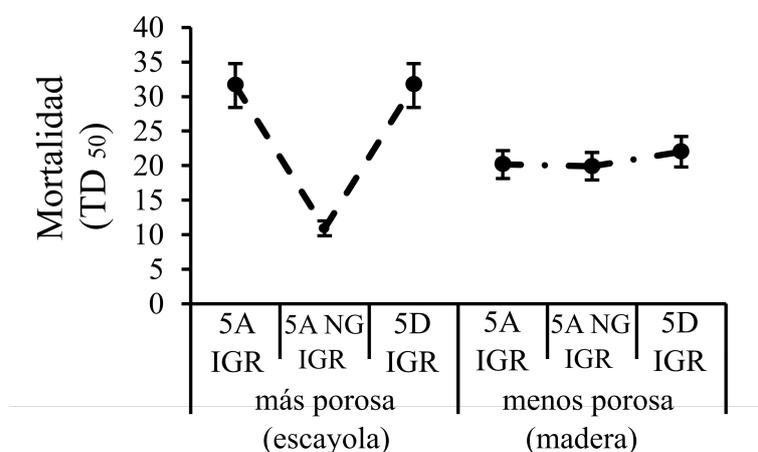


Figura 4.5: TD₅₀ según el tipo de superficie, más porosa (yeso) o menos porosa (madera de pino), y formulados aplicados. 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-aletrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifos 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %

Interacción del efecto de los formulados y el tiempo (meses)— Por último, el efecto del modelo muestra las marcadas diferencias en la eficacia residual de los formulados 5A IGR y 5D IGR vs 5A NG IGR a lo largo del tiempo.

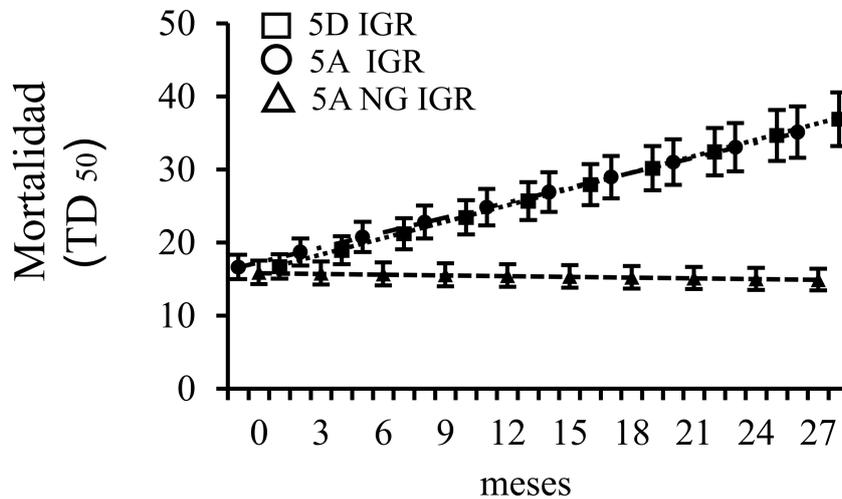


Figura 4.6: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD₅₀ en función de los formulados aplicados y del tiempo (meses) 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-aletrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifós 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %

Tal y como se observa en la figura 4.6, los formulados 5A IGR y 5D IGR evidencian notables incrementos idénticos en las pendientes del modelo, es decir, que el número de horas para el TD₅₀ se incrementó en ambas a lo largo del tiempo. No obstante, aunque el TD₅₀ al inicio de la prueba es similar en los tres formulados 5A NG IGR no se vio afectado por la degradación de los i.a. y mantuvo su efectividad residual a lo largo de toda la prueba.

4.2. Prueba II

Debido a la complejidad y extensión de la prueba, la presentación de los resultados se ha subdividido según los materiales o sustratos tratados (contenedores de plástico y tablillas de masonite). En primer lugar se presentan los datos descriptivos observados (no corregidos con la prueba Abbott) en función de la eficacia de cada una de las concentraciones de PPF a lo largo del tiempo, para posteriormente presentar los diferentes análisis estadísticos aplicados.

4.2.1. Contenedores de plástico (macetas)

La Tabla 4.9 muestra el porcentaje de mortalidad para cada estadio estimada a partir de la media de tres repeticiones y tres controles para cada concentración de PPF. Para los primeros estadios larvarios ($L_1 - L_2$) la mayor mortalidad se observó en la concentración al 0,0063 % (E1) (47 %). Sin embargo, una mayor residualidad se observó en una concentración moderada de PPF 0,063 % hasta nueve meses después del tratamiento. Por otro lado, la concentración 0,2 % registró el porcentaje más discreto en los primeros estadios, variando la mortalidad desde un 30 % al inicio de la prueba hasta un 3 % hasta de los 13 meses (B6). En los estadios larvarios finales ($L_3 - L_4$) al inicio de la prueba (B1 - B2) las tres concentraciones mostraron porcentajes similares de mortalidad entre sí (71 - 73 %).

Aunque la pérdida de eficacia a lo largo del tiempo fue paralela para las tres concentraciones, la mortalidad se redujo con la concentración al 0,2 % desde los 10 (B5) hasta los 27 meses (B11), mientras que la concentración al 0,063 %, especialmente al 0,0063 %, se redujo claramente. Evidentemente aún mostraron efectividad, aunque en un porcentaje muy bajo (2 %). Finalmente, en la fase de pupa, la mortalidad fue mayor (100 %) hasta los 7 meses (B4) después del tratamiento inicial, independientemente de la concentración de PPF. Posteriormente, la mortalidad se redujo en un 50 % hasta los 21 meses (B9). En el último bioensayo se encontraron tasas de mortalidad más bajas, sobre todo para la concentración al 0,0063 %.

B	tiempo (meses)	concentración % PPF	larvas iniciales L ₁ - L ₂	C	larvas finales L ₃ - L ₄	C	Pupas	C
B1	0	E1 (0,0063)	13	3	51	0	100	3
		E2 (0,063)	27	3	71	7	100	0
		E3 (0,2)	27	3	64	0	100	3
B2	2	E1 (0,0063)	7	0	51	0	100	0
		E2 (0,063)	10	0	32	3	100	0
		E3 (0,2)	30	0	73	0	100	0
B3	4	E1 (0,0063)	37	0	71	0	100	7
		E2 (0,06)	47	0	48	0	100	14
		E3 (0,2)	0	0	69	20	100	8
B4	7	E1 (0,0063)	0	0	2	0	100	10
		E2 (0,063)	0	0	2	0	100	10
		E3 (0,2)	2	0	16	0	100	10
B5	10	E1 (0,0063)	0	0	9	10	94	0
		E2 (0,063)	0	0	2	10	100	0
		E3 (0,2)	0	0	2	7	100	0
B6	13	E1 (0,0063)	0	0	0	7	52	0
		E2 (0,063)	0	0	2	0	97	0
		E3 (0,2)	3	0	0	0	100	0
B7	15	E1 (0,0063)	0	0	0	0	54	0
		E2 (0,063)	0	0	0	0	98	0
		E3 (0,2)	0	0	0	0	98	7
B8	18	E1 (0,0063)	0	0	5	0	71	18
		E2 (0,063)	0	0	2	0	99	0
		E3 (0,2)	0	0	6	0	100	0
B9	21	E1 (0,0063)	0	0	10	0	92	0
		E2 (0,063)	0	0	14	0	95	0
		E3 (0,2)	0	0	18	0	99	0
B10	24	E1 (0,0063)	0	0	12	0	18	3
		E2 (0,063)	0	0	0	0	52	7
		E3 (0,2)	0	0	6	17	75	8
B11	27	E1 (0,0063)	0	0	2	0	13	0
		E2 (0,063)	0	0	1	0	16	0
		E3 (0,2)	0	0	0	0	94	0

Tabla 4.9: Porcentaje de mortalidad estimado de tres réplicas y el control en dos grupos de estadios larvales, observada en contenedores de plástico. B= bioensayos; PPF= piriproxifeno

Efecto mortalidad estadio inicial ($L_1 - L_2$)— El modelo ajustado con ambas variables independientes (concentración y meses) más su interacción mostró una elevada capacidad explicativa de la variación de los datos $R^2 = 81,37\%$ y ($gl = 32$; $F = 9,01$; $p < (0,001)$). En la tabla 4.10 se encuentran los efectos generales estimados por el modelo, el cual evidenció un importante efecto del tiempo y de su interacción con el tipo de concentración, pero no detectó diferencias significativas entre éstas. Los resultados (Fig. 4.7 y 4.8) muestran que la menor tasa de mortalidad corresponde a la concentración de PPF al 0,2 % (E3) vs al 0,0063 % (E1).

Efecto	SS	gl	MS	F	<i>p</i>
Intercepto	0,5	1	0,5	87,89	<0,001
Concentración	0,01	2	0	1,04	0,358
Mes	1,19	10	0,11	20,75	<0,001
Concentración x Mes	0,45	20	0,02	3,93	<0,001

Tabla 4.10: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario inicial ($L_1 - L_2$). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

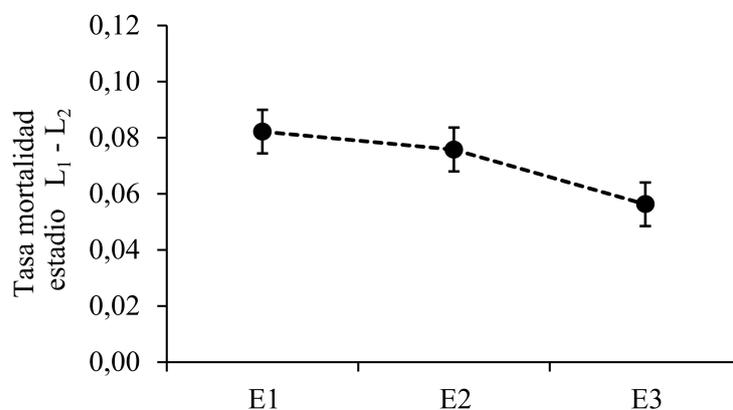


Figura 4.7: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio inicial ($L_1 - L_2$). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres réplicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

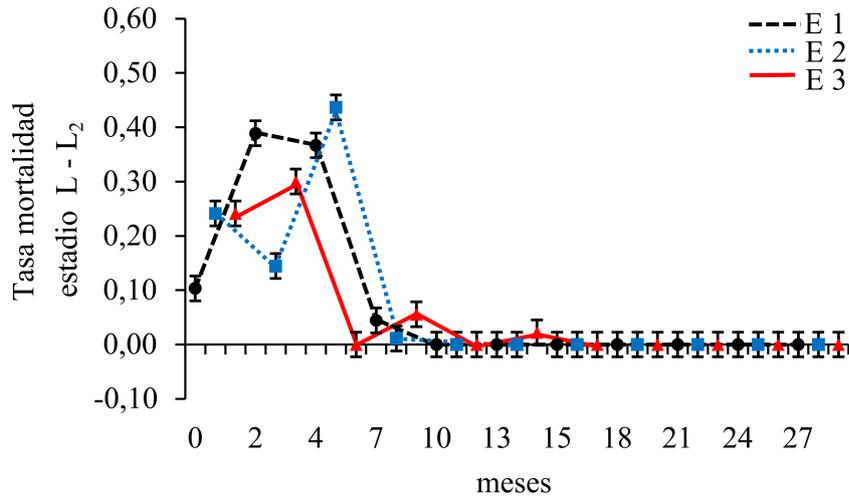


Figura 4.8: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio inicial ($L_1 - L_2$) a lo largo del tiempo. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

Efecto mortalidad estadio final ($L_3 - L_4$)— Asimismo, el modelo ajustado para las variables independientes (concentración y mes) y su interacción, también mostraron una elevada capacidad explicativa $R^2 = 94,06\%$ y ($gl = 32$; $F = 32,68$; $p < 0,001$). La Tabla 4.11 muestra que los efectos generales estimados por el modelo tienen un efecto importante entre el tipo de concentración y el tiempo (meses), sin estimar diferencia significativa entre las tres concentraciones de PPF (Fig. 4.9).

Efecto	SS	gl	MS	F	<i>p</i>
Intercepto	3,788	1	3,788	439,214	<0,001
Concentración	0,008	2	0,004	0,485	0,617
Mes	8,568	10	0,856	99,341	<0,001
Concentración x Mes	0,443	20	0,022	2,571	0,002

Tabla 4.11: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario final ($L_3 - L_4$). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

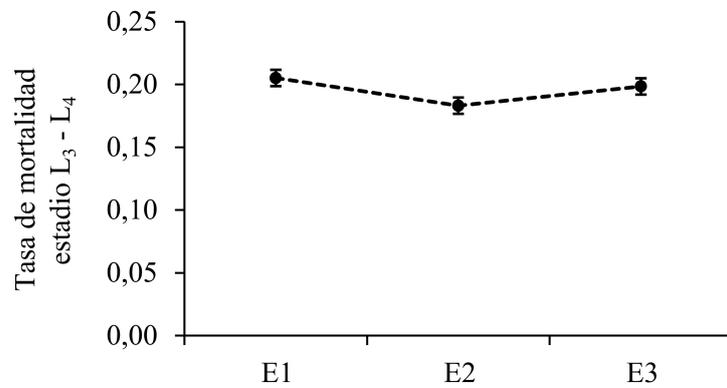


Figura 4.9: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final ($L_3 - L_4$). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

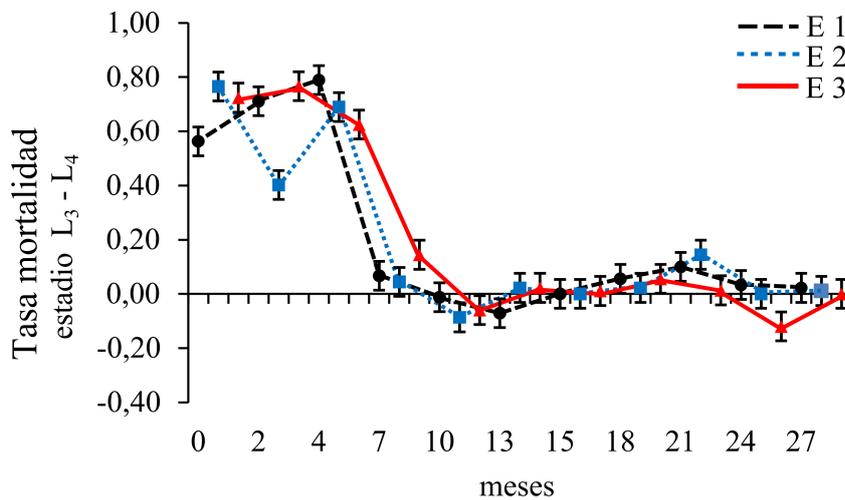


Figura 4.10: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final ($L_3 - L_4$) a lo largo del tiempo. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres réplicas; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

Efecto mortalidad pupas— El modelo ajustado para las variables concentración, tiempo (meses) y su interacción, mostró una elevada capacidad explicativa $R^2= 88,78 \%$ y ($gl= 32$; $F= 16,32$; $p <0,001$). En la tabla 4.12, se observan que los efectos generales estimados obtenidos. Evidenciando un importante efecto del tiempo (meses) y de su interacción con el tipo de concentración. Sin embargo, se registró un importante efecto entre las tres concentraciones. La figura 4.11 y 4.12 evidencian la diferencia en la tasa de mortalidad entre las tres concentraciones, registrándose la mayor mortalidad al 0,063 % y 0,2 %. Siendo para esta última del 97 – 100 % hasta el final de la prueba (27 meses).

Efecto	SS	gl	MS	F	<i>p</i>
Intercepto	75,634	1	75,634	6900,415	<0,001
Concentración	0,94	2	0,47	42,918	<0,001
Mes	3,066	10	0,306	27,975	<0,001
Concentración x Mes	1,719	20	0,085	7,845	<0,001

Tabla 4.12: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio pupa. Tasa de mortalidad ajustada IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

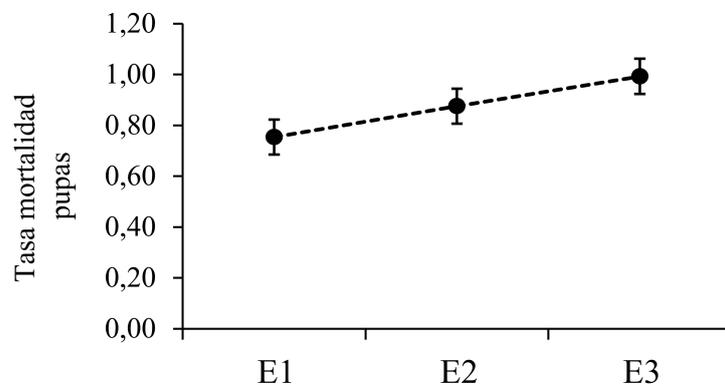


Figura 4.11: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio pupa. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres réplicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

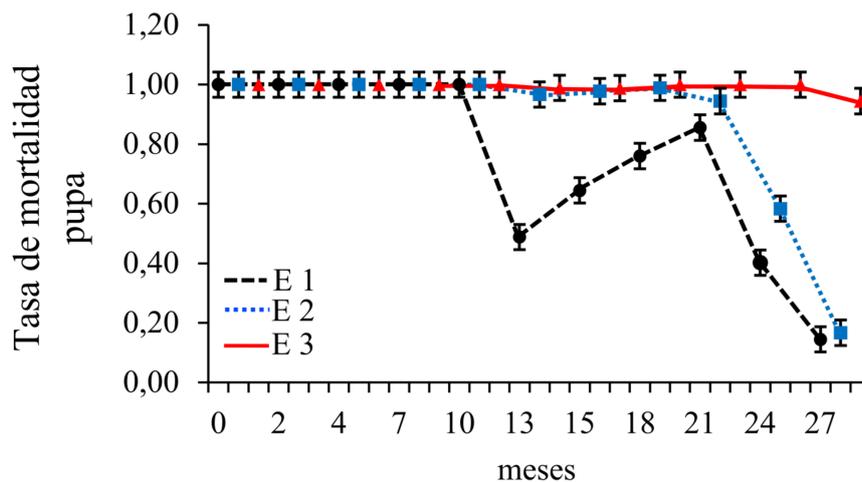


Figura 4.12: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio pupa a lo largo del tiempo. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

Inhibición de la emergencia (% IE)— Según los datos obtenidos, se calculó los siguientes parámetros: 1) porcentaje de pupas iniciales $[p(i)]$ que se refiere a las larvas de estadio final ($L_3 - L_4$), las cuales llegaron a la fase de pupa; 2) pupas viables $[p(vb)]$ = aquellas pupas que en un lapso de 72 h todavía presentaban viabilidad para la emergencia del adulto; 3) adultos = que es el porcentaje de la emergencia de los individuos expuestos. El (% IE) puede tomar valores entre 0 y 100, correspondiendo el valor de 100 % a una inhibición total (Tabla 4.13).

Como se ha mencionado en el capítulo III, en este análisis se observó muchos datos negativos en los primeros bioensayos, por lo que se procedió a ordenarlos por grupos, y se han subdividido tres, es decir, los valores presentados son los primeros 4 bioensayos = (0 - 10 meses), seguidos de los 4 bioensayos posteriores = (13 - 18 meses) y finalmente los 3 bioensayos restantes = (21 - 27 meses). El procedimiento se realizó tanto en los contenedores de plástico (macetas) como en masonite y se muestran los análisis estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control. Posteriormente, se procedió a realizar todas las comparaciones posibles dos a dos, comparando el control con cada una de las concentraciones y después todas las emulsiones entre sí (6 pares de comparaciones). Se puede observar (tabla 4.15) que la viabilidad de las pupas para PPF al 0,0063 % y 0,063 % aumentó progresivamente, especialmente a partir de los 21 meses (B9 - B11). Sin embargo, no alcanzaron tasas similares a los controles.

B	T	concentración	p (i)	C	p (vb)	C	adultos	C	% (IE)	C
B1	0	E1 (0,0063)	13 ($\pm 5,03$)	29	0	29	0	29	100	0
		E2 (0,063)	6 ($\pm 1,15$)	27	0	27	0	27	100	0
		E3 (0,2)	8 ($\pm 2,64$)	29	0	29	0	29	100	0
B2	2	E1 (0,0063)	9 ($\pm 5,13$)	30	0	30	0	30	100	0
		E2 (0,063)	17 ($\pm 3,21$)	29	0	29	0	29	100	0
		E3 (0,2)	7 ($\pm 4,35$)	30	0	30	0	30	100	0
B3	4	E1 (0,0063)	6 ($\pm 1,15$)	30	0	28	0	28	100	7
		E2 (0,06)	9 ($\pm 6,55$)	29	0	25	0	25	100	14
		E3 (0,2)	9 ($\pm 5,50$)	24	0	22	0	22	100	8
B4	7	E1 (0,0063)	28 ($\pm 1,52$)	30	0	27	0	27	100	10
		E2 (0,063)	29 (± 1)	30	0	27	0	27	100	10
		E3 (0,2)	25 ($\pm 4,93$)	30	0	27	0	27	100	10
B5	10	E1 (0,0063)	27 ($\pm 2,08$)	27	2 ($\pm 2,8$)	27	2 ($\pm 2,8$)	27	93	0
		E2 (0,063)	29 ($\pm 0,57$)	27	0	27	0	27	100	0
		E3 (0,2)	29 ($\pm 0,57$)	28	3 (± 0)	28	3 (± 0)	28	90	0
B6	13	E1 (0,0063)	30 (± 0)	28	14 ($\pm 9,60$)	28	14 ($\pm 9,60$)	28	53	0
		E2 (0,063)	29 ($\pm 1,15$)	30	1 ($\pm 1,73$)	30	1 ($\pm 1,73$)	30	97	0
		E3 (0,2)	30 (± 0)	30	1 ($\pm 0,57$)	30	1 ($\pm 0,57$)	30	97	0
B7	15	E1 (0,0063)	30 (± 0)	30	14 ($\pm 8,8$)	30	14 ($\pm 8,8$)	30	53	0
		E2 (0,063)	30 (± 0)	30	1 ($\pm 1,15$)	30	1 ($\pm 1,15$)	30	97	0
		E3 (0,2)	30 (± 0)	30	1 ($\pm 0,57$)	28	1 ($\pm 0,57$)	28	97	7
B8	18	E1 (0,0063)	28 ($\pm 2,08$)	28	6 (± 1)	23	6 (± 1)	23	79	18
		E2 (0,063)	29 ($\pm 0,57$)	30	1 ($\pm 0,57$)	30	1 ($\pm 0,57$)	30	97	0
		E3 (0,2)	28 ($\pm 0,57$)	30	0	30	0	30	100	0
B9	21	E1 (0,0063)	27 (± 2)	30	4 ($\pm 1,15$)	30	4 ($\pm 1,15$)	30	85	0
		E2 (0,063)	26 ($\pm 4,16$)	30	2 (± 1)	30	2 (± 1)	30	92	0
		E3 (0,2)	25 ($\pm 3,51$)	30	1 ($\pm 0,57$)	30	1 ($\pm 0,57$)	30	96	0
B10	24	E1 (0,0063)	26 ($\pm 4,04$)	30	22 ($\pm 3,51$)	29	22 ($\pm 3,51$)	29	15	3
		E2 (0,063)	30 (± 0)	30	13 (± 7)	28	13 (± 7)	28	57	7
		E3 (0,2)	28 ($\pm 1,15$)	25	7 ($\pm 0,57$)	23	7 ($\pm 0,57$)	23	75	8
B11	27	E1 (0,0063)	29 ($\pm 1,15$)	30	27 ($\pm 2,08$)	30	27 ($\pm 2,08$)	30	7	0
		E2 (0,063)	29 ($\pm 1,15$)	30	25 ($\pm 2,08$)	30	25 ($\pm 2,08$)	30	14	0
		E3 (0,2)	30 (± 0)	30	2 ($\pm 0,57$)	30	2 ($\pm 0,57$)	30	93	0

Tabla 4.13: Los valores presentados representan la media de las tres réplicas (\pm SD). p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; % (IE)= inhibición de la emergencia; B= bioensayos; E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; T= tiempo (meses); C= control

B	T	concentración	Control	E1 (0,0063 %)	E2 (0,063 %)
B1 – B5	0 – 10	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	< 0,0001 < 0,0001 0,0013	ND 1,0000	0,4857
B6 – B8	13 – 18	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	0,0933 < 0,0000 0,0046	0,0048 0,4285	0,0600
B9– B11	21 – 27	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	0,3193 0,1011 < 0,0001	0,6501 < 0,0001	0,0073

Tabla 4.14: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de pupas viables vs pupas iniciales. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

B	T	concentración	p(i)	p(vb)	Tasa (%) p(vb)	[IC 95%]
B1 – B5	0 – 10	E1 (0,0063 %)	17	0	2	[0 – 21]
		E2 (0,063 %)	18	0	0	[0 – 19]
		E3 (0,2 %)	16	1	4	[0,15 – 30]
		C	28	27	49	[35,35 – 63]
B6 – B8	13 – 18	E1 (0,0063 %)	29	12	29	[16,12 – 46]
		E2 (0,063 %)	30	1	3	[0,08 – 17]
		E3 (0,2 %)	29	7	19,23	[8,19 – 36]
		C	30	29	49,4	[36 – 62,50]
B9– B11	21 – 27	E1 (0,0063 %)	27	17	38,23	[24,35 – 54,50]
		E2 (0,063 %)	28	13	32,13	[18 – 48]
		E3 (0,2 %)	28	3	10	[2,1 – 26,52]
		C	28	28	49,46	[36,33 – 64]

Tabla 4.15: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de pupas viables vs pupas iniciales. p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

Adultos eclosionados y sus parámetros del ciclo gonotrófico— Al inicio de la prueba, en los bioensayos (B0 a B4) no existió la eclosión de adultos, lo que indicó que PPF afectó la actividad del vuelo normal a partir de los primeros adultos eclosionados. Esta tendencia fue significativamente diferente en el grupo control. En las siguientes tablas se observan los datos con relación a las pupas viables, las cuales posteriormente a la ecdisis, mostraron alteración en su capacidad de vuelo .

B	T	PPF	adultos	C	adultos (vl)				adultos (s-vl)			
					hembras	C	machos	C	hembras	C	machos	C
B5	10	E1	2 ($\pm 2,8$)	27	0	9	0	18	0	0	2 ($\pm 2,8$)	0
		E2	0	27	0	10	0	17	0	0	0	0
		E3	0	28	0	12	0	16	0	0	0	0
B6	13	E1	14 ($\pm 9,6$)	28	2 (± 1)	12	4 ($\pm 3,5$)	16	4 ($\pm 5,8$)	0	4 ($\pm 3,4$)	0
		E2	1 ($\pm 1,7$)	30	1 ($\pm 1,7$)	9	0	21	0	0	0	0
		E3	1 ($\pm 2,3$)	30	1 ($\pm 0,5$)	11	0	19	0	0	0	0
B7	15	E1	14 ($\pm 8,8$)	30	3 ($\pm 2,5$)	12	7 ($\pm 6,0$)	18	1 (± 1)	0	3 ($\pm 2,6$)	0
		E2	1 ($\pm 1,1$)	30	0	11	0	19	0	0	1 ($\pm 1,1$)	0
		E3	1 ($\pm 0,5$)	28	0	10	0	18	0	0	1 ($\pm 0,5$)	0
B8	18	E1	6 (± 1)	23	2 ($\pm 0,5$)	9	4 ($\pm 1,1$)	14	0	0	0	0
		E2	1 ($\pm 0,5$)	30	0	9	0	21	0	0	1 ($\pm 0,5$)	0
		E3	0	30	0	10	0	20	0	0	0	0
B9	21	E1	4 ($\pm 1,1$)	30	1 ($\pm 0,5$)	13	3 ($\pm 1,1$)	17	0	0	0	0
		E2	2 (± 1)	30	0 (± 0)	11	2 ($\pm 0,5$)	19	0	0	0	0
		E3	0	30	0	11	0	19	0	0	0	0
B10	24	E1	22 ($\pm 3,5$)	29	7 ($\pm 0,5$)	12	11 (± 2)	17	1 ($\pm 0,5$)	0	3 ($\pm 2,6$)	0
		E2	13 (± 7)	28	2 ($\pm 1,7$)	10	4 (± 3)	18	1 ($\pm 1,1$)	0	6 ($\pm 2,0$)	0
		E3	0	23	0	7	0	16	0	0	0	0
B11	27	E1	27 (± 3)	30	3 ($\pm 1,1$)	6	24 ($\pm 0,5$)	24	0	0	0	0
		E2	24 (± 3)	30	2 ($\pm 0,5$)	8	20 (± 2)	22	0	0	2 ($\pm 0,54$)	0
		E3	2 ($\pm 0,5$)	30	0	6	1 ($\pm 0,5$)	24	0	0	1 ($\pm 0,57$)	0

Tabla 4.16: Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (vl)= adultos con capacidad de vuelo; adultos (s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; B= bioensayos; F= concentraciones; C= control; T= tiempo (meses)

En el análisis estadístico se puede observar (tabla 4.17 y 4.18), que en la concentración al 0,0063% (E1) fue significativamente diferente a las anteriores a partir de los bioensayos B6 a B8.

B	T	concentración	Control	E1 (0,0063 %)	E2 (0,063 %)
B1 – B5	0 – 10	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	0,0667 ND ND		ND ND ND
B6 – B8	13 – 18	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	0,0122 0,0625 0,0645		0,5147 0,5147 1,0000
B9 – B11	21 – 27	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	0,3878 0,0395 0,0667		0,3120 1,0000 1,0000

Tabla 4.17: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de adultos vs la capacidad de vuelo. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

B	T	concentración	adultos (e)	adultos (s-vl)	Tasa (%) adultos (s-vl)	[IC 95 %]
B1– B5	0 – 10	E1 (0,0063 %)	1	1	50	[1,25 – 99]
		E2 (0,063 %)	0	0	ND	
		E3 (0,2 %)	0	0	ND	
		C	27	0	0	[0 – 13]
B6 – B8	13 – 18	E1 (0,0063 %)	11	4	26,09	[8 – 55]
		E2 (0,063 %)	1	1	50	[15,16 – 72,33]
		E3 (0,2 %)	1	1	50	[1,25 – 99]
		C	29	0	0	[0 – 12]
B9–B11	21 – 27	E1 (0,0063 %)	18	1	7	[0,13 – 26]
		E2 (0,063 %)	13	3	18,75	[4,04 – 46]
		E3 (0,2 %)	1	1	50	[1,25 – 99]
		C	28	0	0	[0 – 12,34]

Tabla 4.18: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de adultos vs capacidad de vuelo. Adultos(e)= adultos eclosionados; adultos(s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; B= Bioensayos (grupos); ND= no determinable; T= tiempo (meses)

Hembras con ingestión de sangre y ovoposición— La probabilidad de que las hembras alimentadas realicen la ovoposición fue más pronunciada para las concentraciones al 0,0063 % y 0,063 % en los últimos bioensayos. Sin embargo, aunque se observaron hembras con vuelo normal a partir del bioensayo B6 (13 meses), la ingestión de sangre por hembras con capacidad de vuelo normal se demostró posteriormente en el bioensayo B7 (15 meses).

B	T	concentración	hembras (vl)	C	hembras (alim.)	C	hembras (ov)	C
B6	13	E1 (0,0063 %)	2 (± 1)	12	0	12	0	12
		E2 (0,063 %)	1 ($\pm 1,73$)	9	0	9	0	9
		E3 (0,2 %)	1 ($\pm 0,57$)	11	0	11	0	11
B7	15	E1 (0,0063 %)	3 ($\pm 2,51$)	12	3 ($\pm 2,64$)	12	0	12
		E2 (0,063 %)	0	11	0	11	0	11
		E3 (0,2 %)	0	10	0	10	0	10
B8	18	E1 (0,0063 %)	2 ($\pm 0,57$)	9	2 ($\pm 0,57$)	9	2 ($\pm 0,57$)	9
		E2 (0,063 %)	0	9	0	9	0	9
		E3 (0,2 %)	0	10	0	10	0	10
B9	21	E1 (0,0063 %)	1 ($\pm 0,57$)	13	1 ($\pm 0,57$)	13	1 ($\pm 0,57$)	13
		E2 (0,063 %)	0	11	0	11	0	11
		E3 (0,2 %)	0	11	0	11	0	11
B10	24	E1 (0,0063 %)	7 ($\pm 0,57$)	12	7 ($\pm 0,57$)	12	7 ($\pm 0,57$)	12
		E2 (0,063 %)	2 ($\pm 1,73$)	10	2 ($\pm 1,73$)	10	2 ($\pm 1,73$)	10
		E3 (0,2 %)	0	7	0	7	0	7
B11	27	E1 (0,0063 %)	3 ($\pm 1,15$)	6	3 ($\pm 1,15$)	6	3 ($\pm 1,15$)	6
		E2 (0,063 %)	2 ($\pm 0,57$)	8	2 ($\pm 0,57$)	8	2 ($\pm 0,57$)	8
		E3 (0,2 %)	0	6	0	6	0	6

Tabla 4.19: Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (vl)= hembras con capacidad de vuelo; (alim)= hembras alimentadas; (ov)= hembras con ovo posición; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)

B	T	concentración	Control	E1 (0,0063 %)	E2 (0,063 %)
B1 – B5	0 – 10	E1 (0,0063 %)	ND		
		E2 (0,063 %)	ND	ND	
		E3 (0,2 %)	ND	ND	ND
B6 – B8	13 – 18	E1 (0,0063 %)	1,0000		
		E2 (0,063 %)	ND	ND	
		E3 (0,2 %)	ND	ND	ND
B9– B11	21 – 27	E1 (0,0063 %)	1,0000		
		E2 (0,063 %)	1,0000	1,0000	
		E3 (0,2 %)	ND	ND	ND

Tabla 4.20: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de la ovo posición vs hembras alimentadas con sangre. En negrita, los valores estadísticamente significativos postcorrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

B	T	PPF	hembras (alim.)	hembras (ov)	Tasa (%) hembras (ov)	[IC 95 %]
B1- B5	0 - 10	E1 (0,0063 %)	0	0	ND	
		E2 (0,063 %)	0	0	ND	
		E3 (0,2 %)	0	0	ND	
		C	9	9	50	[29 - 76]
B6 - B8	13 - 18	E1 (0,0063 %)	2	1	27,27	[1,25 - 99]
		E2 (0,063 %)	0	0	ND	
		E3 (0,2 %)	0	0	ND	
		C	10	10	49,26	[27,19 - 73]
B9-B11	21 - 27	E1 (0,0063 %)	4	4	50	[18,40 - 90]
		E2 (0,063 %)	1	1	50	[9,42 - 99]
		E3 (0,2 %)	0	0	ND	
		C	8	8	50	[24,65 - 75]

Tabla 4.21: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la ovoposición vs hembras alimentadas con sangre. (alim.)= hembras alimentadas con sangre; (ov)= ovoposición; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

Viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2)— A partir de la ovoposición de las hembras alimentadas, se evaluó la viabilidad de los huevos y se comparó la tasa de viabilidad y eclosión hasta los siguientes estadios larvarios, pupas y adultos (F2). Como se muestra en la Tabla 4.22, la viabilidad de los huevos no se confirma hasta los 18 meses (B6 – B8), es decir, existen diferencias relacionadas con la viabilidad de huevos y el desarrollo hasta la fase pupa. Sin embargo, aunque éstos eran aparentemente viables, las tasas de eclosión de los adultos en la siguiente generación, en las concentraciones al 0,0063 % y 0,062 % fueron mucho más evidentes en comparación a la concentración al 0,2 % de PPF en los últimos bioensayos.

B	T	PPF	F1		F2					
			hembras (ov)	C	huevos (vb)	C	adultos (e)	C	% (IE)	C
B8	18	E1	2 ($\pm 0,57$)	9	55 (± 0)	179	0 (± 0)	164	100	8
		E2	0	9	0	171	0	168	0	2
		E3	0	10	0	97	0	84	0	13
B9	21	E1	1 (± 0)	13	20 (± 0)	221	0 (± 0)	209	100	5
		E2	0	11	0	155	0	149	0	4
		E3	0	11	0	110	0	96	0	13
B10	24	E1	7 ($\pm 0,57$)	12	233 (± 0)	111	0 (± 0)	97	100	13
		E2	2 ($\pm 1,73$)	10	98 (± 0)	169	0 (± 0)	164	100	3
		E3	0	7	0	265	0	251	0	5
B11	27	E1	3 ($\pm 1,15$)	6	145 (± 0)	210	100 (± 0)	200	31	5
		E2	2 ($\pm 0,57$)	8	156 (± 0)	190	29 (± 0)	180	81	5
		E3	0	6	0	174	0	160	0	8

Tabla 4.22: Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (ov)= hembras con ovoposición; (vb)= viables; (e)= eclosionados; B= bioensayos; T= tiempo (meses)

B	T	PPF	Control	E1 (0,0063 %)	E2 (0,063 %)
B1 - B	0 - 10	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND ND ND	ND	ND
B6 - B8	13 - 18	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	< 0,0001 ND ND	ND	ND
B9 - B11	21 - 27	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND < 0,0001 ND	0,0577 ND	ND

Tabla 4.23: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de la viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2) vs adultos (F1). En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)

B	T	concentración	huevos (vb)	adultos (e)	Tasa (%) (IC 95 %) adultos (e)
B1 - B5	0 - 10	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %) C	0 0 0 117	0 0 0 108	ND ND ND 48 [41,31 - 55]
B6 - B8	13 - 18	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %) C	18 0 0 152	0 0 0 140	0 [0 - 19] ND ND 48 [42,09 - 54]
B9 - B11	21 - 27	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %) C	133 85 0 183	33 10 0 169	20 [14,09 - 27] 10,27 [5,22 - 19] ND 48 [43 - 53]

Tabla 4.24: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2) vs adultos (F1). (vb)= viables; (e) eclosionados; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable

Efecto de piripoxifeno en las pupas (malformaciones)— Paralelamente se analizó los efectos de las tres concentraciones de PPF de las larvas y pupas tratadas y sus malformaciones morfogénicas observadas. La acción de la hormona juvenoide (HJ) de piripoxifeno alteró de forma negativa la fisiología de la morfogénesis, tanto para los estadios iniciales y finales como para las pupas, y se observó que los individuos tratados fueron afectados durante el proceso de desarrollo larva-pupa y pupa adulto, presentándose la mayor tasa de mortalidad en el estadio de pupa.

Los resultados obtenidos mostraron que la tasa de mortalidad de los grupos de pupas melanizadas y pupas blancas fue significativamente mayor. Se puede observar (Tabla 4.25 y 4.26) que las pupas melanizadas tienen una mayor tasa de mortalidad a las tres concentraciones, y en menor proporción las pupas con adulto visible y con adultos parcialmente emergidos. Estos datos representan los resultados, pero no cuantifican la mortalidad de las larvas en la etapa inicial ($L_1 - L_2$), porque se contabilizaron a partir de larvas mal formadas en la etapa final ($L_3 - L_4$), es decir, cuando ya se pudo visualizar un efecto negativo en las mismas, ya sea como larva final ($L_4 - \text{pre pupa}$) o a partir de la ecdisis incompleta parcial o total en pupa-adulto.

B	T	pre-pupas			pupas blancas			pupas melanizadas			con adulto visible			adulto parcialmente emergido			
		PPF	Control	E1	E2	PPF	Control	E1	E2	PPF	Control	E1	E2	PPF	Control	E1	E2
B1 – B5	0 – 10	E1	0,2885			E1	0,0619			E1	<0,0002			E1	0,3830		
		E2	0,2966	1,0000		E2	0,0143	0,7041		E2	<0,0007	1,0000		E2	ND	1,0000	
		E3	1,0000	0,6088	0,6131	E3	0,0598	1,0000	0,7092	E3	<0,0001	1,0000	0,7848	E3	0,3778	1,0000	0,4857
B6 – B8	13 – 18	E1	1,0000			E1	0,2393			E1	<0,0009			E1	1,0000		
		E2	1,0000	1,0000		E2	0,1147	1,0000		E2	<0,0000	0,3747		E2	0,2385	0,6132	
		E3	1,0000	1,0000	1,0000	E3	0,0552	0,7096	1,0000	E3	<0,0000	0,2775	1,0000	E3	0,4918	1,0000	1,0000
B9 – B11	21 – 27	E1	ND			E1	0,2373			E1	<0,0036			E1	ND		
		E2	0,4915	1,0000		E2	0,0540	0,7104		E2	<0,0032	1,0000		E2	ND	ND	
		E3	1,0000	1,0000	1,0000	E3	0,4918	0,6766	0,4295	E3	<0,0000	0,072	0,0717	E3	1,0000	1,0000	1,0000

Tabla 4.25: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas, y adultos. En negrita, los valores estadísticamente significativos postcorrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$). E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

B	T	PPF	larvas iniciales	P-P	Tasa (%)	[IC 95 %]	P-B	Tasa (%)	[IC 95 %]	P-M	Tasa (%)	[IC 95 %]	CAV	Tasa (%)	[IC 95 %]	APE	Tasa (%)	[IC 95 %]
B1 - B5	0 - 10	E1	17	3	14,43	[3,38 - 40]	3	15,3	[3,20 - 38]	10	37	[20,22 - 59]	1	4,59	[0,14 - 29]	0	0	[0 - 20]
		C	29	1	4	[1 - 17]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		E2	18	3	13,46	[3 - 36]	5	22,41	[7,46 - 44]	10	36,17	[19 - 56]	0	0	[0 - 19]	0	0	[0 - 19]
		C	28	1	5	[1 - 22]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		E3	16	1	8,23	[0,14 - 29]	3	15,21	[4 - 41]	11	40,45	[20 - 59]	1	3,7	[0,15 - 30]	0	0	[0 - 21]
		C	28	1	4,08	[1 - 18]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
B6 - B8	13 - 18	E1	29	2	5,37	[33 - 70]	3	9,27	[2 - 25]	12	28,45	[14,22 - 43]	1	3,29	[1 - 17]	0	0	[0 - 12]
		C	29	1	2,27	[1 - 18]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		E2	29	2	7,36	[1 - 21]	4	12	[3,40 - 28]	19	40	[27 - 56]	3	9,27	[2 - 25]	0	0	[0 - 12]
		C	30	1	3,22	[1 - 17]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		E3	29	2	6,38	[1 - 21]	5	14,56	[5 - 31]	20	41	[28,18 - 57]	2	6,38	[1 - 21]	0	0	[0 - 12]
		C	30	1	2,17	[1 - 17]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
B9 - B11	21 - 27	E1	27	0	0	[0 - 13]	3	9	[2,11 - 27]	9	24,07	[12 - 42]	0	0	[0 - 13]	0	0	[0 - 13]
		C	30	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		E2	28	1	2,29	[1 - 18]	5	16	[5 - 31]	9	24,1	[12 - 41]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		C	30	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		E3	28	1	2,35	[1 - 18]	2	8	[1 - 22]	23	45,03	[32 - 61]	1	2,35	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]
		C	28	1	2,29	[1 - 18]	0	1,16	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]	0	0	[0 - 12]

Tabla 4.26: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas, y adultos. P-P= pre-pupa; P-B= pupa blanca; P-M= pupa melanizada; CAV= pupa con adulto visible; APE= pupa con adulto parcialmente emergido; E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; C= control; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable

4.2.2. Tablillas de Masonite[®] (tablex[®])

Al igual que con los contenedores de plástico (maceta), aquí primero se presenta una descripción observada (no corregida por la prueba de Abbott) de la efectividad en el tiempo de la superficie tratada según cada concentración, para posteriormente describir el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Ovoposición y tasa de probabilidad de eclosión de huevos— Se mantuvo con variaciones entre bioensayos, pero discretamente similar al control hasta el final de la prueba (tabla 4.27). La acción ovicida y el proceso de embriogénesis se vio afectada por la acción dosisdependiente de PPF.

B	T	concentración	total	valor medio	huevos/hembra	viabiles	no viabiles	eclosión	no eclosión	% eclosion
B1	0	E1 (0,0063 %)	345	115	3,45	88	27	79	9	90
		E2 (0,063 %)	158	53	1,58	35	18	28	7	89
		E3 (0,2 %)	885	295	8,85	242	53	204	38	85
		C	1734	578	17,34	578	0	480	98	73
B2	3	E1 (0,0063 %)	1304	435	13,04	293	142	55	238	18
		E2 (0,063 %)	1989	663	19,89	604	59	53	551	9
		E3 (0,2 %)	2478	826	24,78	778	48	20	758	2
		C	1034	345	10,34	323	22	284	39	100
B3	6	E1 (0,0063 %)	1724	575	17,24	343	232	75	268	23
		E2 (0,063 %)	920	307	9,2	216	91	62	154	30
		E3 (0,2 %)	239	80	2,39	29	51	5	24	51
		C	1049	350	10,49	321	29	258	63	82
B4	10	E1 (0,0063 %)	1370	457	13,7	223	234	140	83	63
		E2 (0,063 %)	1891	630	18,91	199	431	106	93	58
		E3 (0,2 %)	1587	529	15,87	160	369	57	103	46
		C	1506	502	15,06	163	339	148	15	90
B5	14	E1 (0,0063 %)	720	240	7,2	83	157	80	3	94
		E2 (0,063 %)	1093	364	10,93	100	264	88	12	88
		E3 (0,2 %)	859	286	8,59	209	77	205	4	98
		C	732	244	7,32	150	94	146	4	98
B6	17	E1 (0,0063 %)	742	247	7,42	174	73	171	3	96
		E2 (0,063 %)	842	281	8,42	174	106	170	4	98
		E3 (0,2 %)	1030	343	10,3	168	175	162	6	96
		C	641	214	6,41	128	86	128	0	100
B7	20	E1 (0,0063 %)	1372	457	13,72	384	74	381	3	99
		E2 (0,063 %)	995	332	9,95	226	106	222	4	98
		E3 (0,2 %)	1620	540	16,2	365	175	359	6	98
		C	1392	464	13,92	378	86	378	0	100

Tabla 4.27: Tasa de huevos ovopuestos, su viabilidad y eclosión. Datos de tres réplicas y el control, observada en las tablillas de masonite. PPF= piriproxifen; T= tiempo (meses)

Mortalidad de los estadios larvales— A partir de los datos descriptivos (Tabla 4.28), se puede observar que la tasa de mortalidad no se mantuvo constante a lo largo del tiempo y fue más evidente en la concentración al 0,2 %. Incluso se registró mortalidad en las tres concentraciones después de 10 meses (B4). Para la estadios finales $L_3 - L_4$, el efecto es similar al de la etapa anterior, mostrando nuevamente una menor proporción de mortalidad al final de la prueba.

B	tiempo (meses)	concentración % PPF	larvas iniciales L_1-L_2	C	larvas finales L_3-L_4	C	Pupas	C
B1	0	E1 (0,0063 %)	90	19	100	9	0	17
		E2 (0,063 %)	64	5	100	3	0	4
		E3 (0,2 %)	22	15	100	86	0	0
B2	3	E1 (0,0063 %)	0	0	0	0	100	1
		E2 (0,063 %)	0	0	0	0	100	1
		E3 (0,2 %)	0	0	0	0	100	3
B3	6	E1 (0,0063 %)	0	0	0	2	100	11
		E2 (0,063 %)	0	0	0	0	100	0
		E3 (0,2 %)	12	0	0	0	100	0
B4	10	E1 (0,0063 %)	14	0	18	1	99	1
		E2 (0,063 %)	12	0	21	0	92	1
		E3 (0,2 %)	20	1	50	1	100	0
B5	14	E1 (0,0063 %)	0	0	16	0	85	0
		E2 (0,063 %)	0	0	0	0	95	0
		E3 (0,2 %)	17	0	38	0	98	0
B6	17	E1 (0,0063 %)	0	1	1	3	2	4
		E2 (0,063 %)	0	0	1	0	6	1
		E3 (0,2 %)	0	0	1	0	82	0
B7	20	E1 (0,0063 %)	0	0	35	0	0	1
		E2 (0,063 %)	0	0	8	0	10	0
		E3 (0,2 %)	0	0	6	0	96	0

Tabla 4.28: % de mortalidad estimada de tres réplicas y el control, en dos grupos de estadios larvales, observada en masonite. B= bioensayos; PPF= piriproxifeno

Efecto mortalidad estadio inicial ($L_1 - L_2$)— La Tabla 4.29 explica los efectos generales estimados a partir del modelo, que no difieren significativamente entre los efectos del tiempo y las interacciones con los tipos de concentración. Según el modelo ajustado y la interacción muestra una capacidad explicativa de coeficiente $R^2 = 83\%$ y ($gl = 20$; $F = 10,10$; $p < 0,001$).

Efecto	SS	gl	MS	F	<i>p</i>
Intercepto	1,238	1	1,238	79,897	<0,001
Mes	2,809	6	0,468	30,212	<0,001
Concentración	0,051	2	0,025	1,653	0,203
Concentración * Mes	0,271	12	0,022	1,461	0,177

Tabla 4.29: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario inicial ($L_1 - L_2$). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

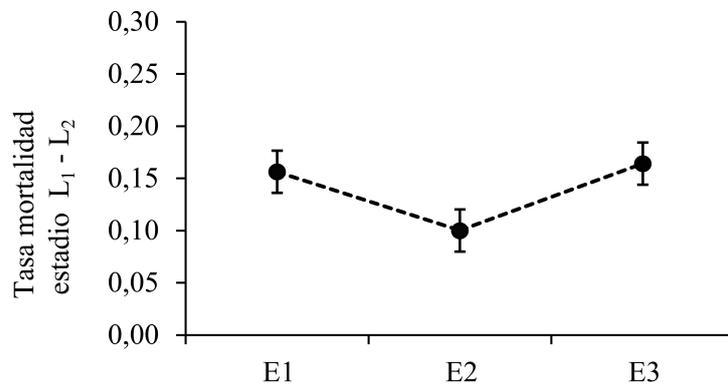


Figura 4.13: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario final ($(L_1 - L_2)$). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

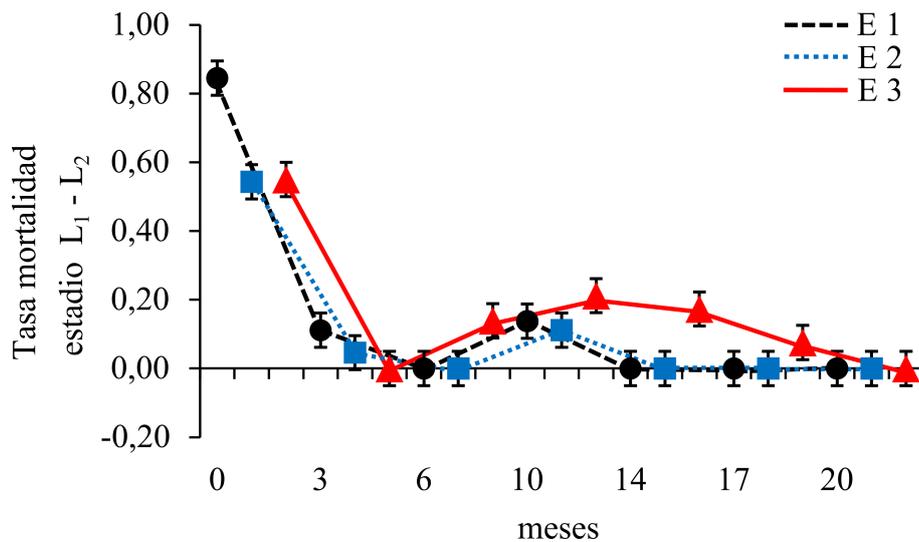


Figura 4.14: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final ($(L_1 - L_2)$). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

Efecto mortalidad estadio final ($L_3 - L_4$)— La siguiente tabla explica que el modelo ajustado muestra un gran efecto de las interacciones de las variables tiempo y concentración, demostrando una diferencia significativa entre ellos $R^2 = 95.33\%$ y ($gl = 20$; $F = 42.91$; $p < 0,001$).

Efecto	SS	gl	MS	F	<i>p</i>
Intercepto	4,649	1	4,649	573,19	<0,001
Mes	6,451	6	1,075	132,55	<0,001
Concentración	0,181	2	0,09	11,15	<0,001
Concentración * Mes	0,329	12	0,027	3,38	<0,001

Tabla 4.30: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario inicial (L_3-L_4). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

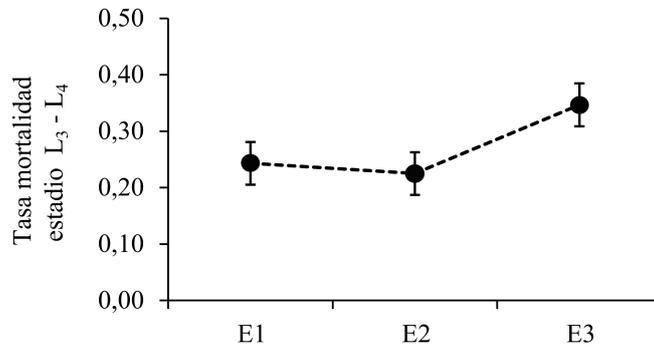


Figura 4.15: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario final (L_3-L_4). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

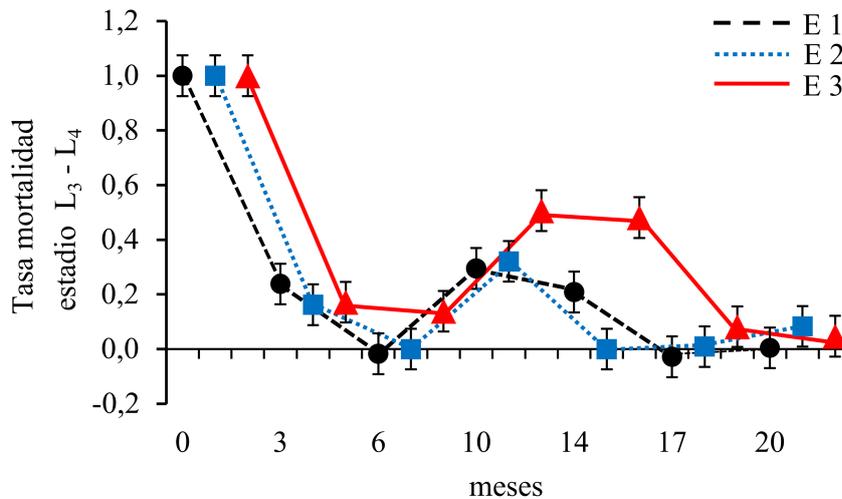


Figura 4.16: Valores de mínimos cuadrados (IC 95%) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final (L_3-L_4). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF

Efecto mortalidad pupas— El modelo ajustado mostró un alto poder explicativo $R^2 = 99,47\%$ ($gl = 20$; $F = 398,91$; $p < 0,001$). Las observaciones mostraron que al igual que con los contenedores de plástico (macetas), la mortalidad en la etapa de pupa fue mayor para la concentración al 0,2% de PPPF (E3), donde se observó tasas de mortalidad de entre el 95 y 100% durante toda la prueba.

Efecto	SS	gl	MS	F	<i>p</i>
Intercepto	40,049	1	40,049	37239,35	<0,001
Mes	5,485	6	0,914	850,03	<0,001
Concentración	0,988	2	0,494	459,41	<0,001
Concentración * Mes	2,09	12	0,174	161,96	<0,001

Tabla 4.31: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio pupas. Tasa de mortalidad ajustada; IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

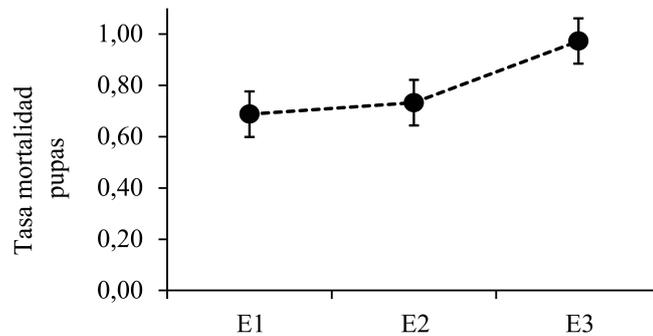


Figura 4.17: Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio pupas. Tasa de mortalidad ajustada; IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey

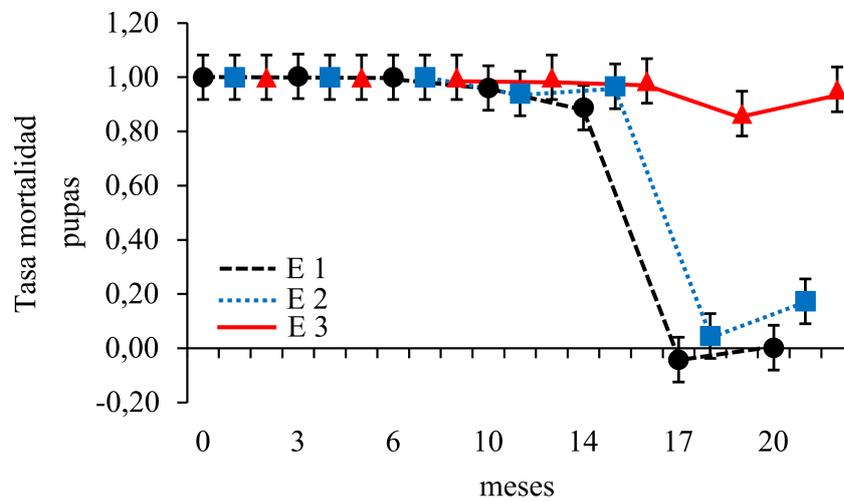


Figura 4.18: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio pupas. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF

Inhibición de la emergencia (% IE)— Como era de esperar, la HJ de PPF alteró negativamente el desarrollo larvario y la ecdisis en las tres concentraciones, confirmando la mayor eficacia de la concentración al 0,2% en relación con las demás. Sin embargo, solo se observó una inhibición de la emergencia alta (90 - 100%) durante un máximo de seis a 14 meses.

B	T	concentración	p (i)	C	p (vb)	C	adultos	C	% (IE)	C
B1	0	E1	0	47	0	39	0	39	ND	17
		E2	0	914	0	879	0	879	ND	4
		E3	0	45	0	45	0	45	ND	0
B2	3	E1	55 ($\pm 43,48$)	428	0	425	0	425	100	1
		E2	53 (± 26)	178	0	176	0	176	100	1
		E3	20 (± 5)	363	0	352	0	352	100	3
B3	6	E1	75 ($\pm 8,14$)	295	0	262	0	262	100	11
		E2	62 (± 8)	260	0	260	0	260	100	0
		E3	5 ($\pm 5,29$)	299	0	299	0	299	100	0
B4	10	E1	98 (± 41)	156	1 ($\pm 0,57$)	154	1 ($\pm 0,57$)	154	99	1
		E2	74 (± 32)	143	5 ($\pm 5,40$)	142	5 ($\pm 5,40$)	142	93	1
		E3	23 ($\pm 3,46$)	140	0	140	0	140	100	0
B5	14	E1	67 (± 42)	156	10 ($\pm 0,5$)	156	10 ($\pm 0,5$)	156	85	0
		E2	89 (± 19)	201	4 ($\pm 1,5$)	201	4 ($\pm 1,5$)	201	96	0
		E3	106 (± 44)	81	1 ($\pm 0,57$)	81	1 ($\pm 0,57$)	81	99	0
B6	17	E1	168 (± 151)	85	164 (± 14)	82	164 (± 14)	82	2	2
		E2	168 (± 34)	148	159 (± 22)	146	159 (± 22)	146	5	1
		E3	161 (± 42)	147	29 (± 13)	147	29 (± 13)	147	82	0
B7	20	E1	378 (± 139)	400	378 (± 22)	397	378 (± 22)	397	0	0
		E2	203 ($\pm 26,1$)	319	184 (± 5)	319	184 (± 5)	319	9	0
		E3	337 (± 180)	412	12 (± 2)	412	12 (± 2)	412	96	0

Tabla 4.32: Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; % (IE)= inhibición de la emergencia; B= bioensayos; E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; T= tiempo (meses); C= control; ND= no determinable

B	T	concentración	Control	E1 (0,0063%)	E2 (0,063%)
B1 - B3	0 - 6	E1 (0,0063%)	ND		
		E2 (0,063%)	ND	ND	
		E3 (0,2%)	0,0075	ND	ND
B4 - B5	10 - 14	E1 (0,0063%)	<0,0000		
		E2 (0,063%)	<0,0000	1,0000	
		E3 (0,2%)	<0,0000	0,2397	0,2363
B6 - B7	17 - 20	E1 (0,0063%)	ND		
		E2 (0,063%)	ND	ND	
		E3 (0,2%)	ND	ND	ND

Tabla 4.33: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de pupas viables vs pupas iniciales. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)

B	T	concentración	p(i)	p(vb)	Tasa (%) p(vb)	[IC 95 %]
B1 – B3	0 – 6	E1 (0,0063 %)	43	0	0	[0 – 8]
		E2 (0,063 %)	38	0	0	[0 – 9]
		E3 (0,2 %)	8	0	0	[0 – 37]
		C	236	232	50	[45,06 – 54]
B4 – B5	10 – 14	E1 (0,0063 %)	83	6	6,25	[2,54 – 14]
		E2 (0,063 %)	82	5	5,23	[1,28 – 11]
		E3 (0,2 %)	65	1	1	[0,03 – 8]
		C	156	155	50	[44,14 – 56]
B6 – B7	17 – 20	E1 (0,0063 %)	273	271	50	[45,53 – 54]
		E2 (0,063 %)	186	172	48,03	[43 – 53]
		E3 (0,2 %)	249	21	8	[5 – 12]
		C	243	240	50	[45,23 – 54]

Tabla 4.34: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de pupas viables *vs* pupas iniciales. p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

Adultos eclosionados y sus parámetros del ciclo gonotrófico— Como en el estudio anterior (contenedores de plástico) aquí se explica los parámetros productivos de los adultos emergidos. En la tabla 4.35 se muestran los datos descriptivos de la emergencia de adultos de las pupas iniciales y viables. Se realizó un análisis de la capacidad de vuelo y los adultos de pupas visiblemente viables emergieron normalmente 10 meses después del tratamiento (B4). sin embargo, el vuelo normal se vio afectado. Los individuos, especialmente adultos machos con capacidad de vuelo normal, no se observaron hasta 14 meses después del tratamiento. Sin embargo, a partir de los 17 meses (B5), se observaron hembras y machos adultos con capacidad de vuelo normal.

De igual manera que en el caso del estudio anterior (macetas) las tasas de capacidad de vuelo fueron más evidentes en el grupo control vs 0,2%. En el análisis de probabilidad del vuelo, se observó que las concentraciones de 0,0063% y 0,063% son significativamente diferentes de E3 (0,2%), mientras que las concentraciones al 0,063% vs 0,2% son significativamente diferentes en los últimos tres bioensayos.

B	T	PPF	adultos (vl)				adultos (s-vl)					
			adultos	C	hembras	C	machos	C	hembras	C	machos	C
B1	0	E1	0	39	0	10	0	26	0	3	0	0
		E2	0	879	0	348	0	521	0	8	0	2
		E3	0	45	0	18	0	27	0	0	0	0
B2	3	E1	0	425	0	115	0	300	0	7	0	3
		E2	0	176	0	62	0	114	0	0	0	0
		E3	0	352	0	100	0	245	0	6	0	1
B3	6	E1	0	262	0	91	0	155	0	10	0	6
		E2	0	260	0	108	0	142	0	6	0	4
		E3	0	299	0	127	0	168	0	3	0	1
B4	10	E1	1 (± 1)	154	0	40	0	111	0	1	1 (± 0)	2
		E2	5 ($\pm 5,40$)	142	0	40	0	98	0	1	5 ($\pm 5,4$)	3
		E3	0	140	0	50	0	86	0	2	0	2
B5	14	E1	10 ($\pm 0,5$)	156	0	59	2 (± 2)	97	2 (± 1)	0	6 (± 2)	0
		E2	4 ($\pm 1,5$)	201	0	52	0	149	0	0	4 ($\pm 1,5$)	0
		E3	1 (± 1)	81	0	21	0	60	0	0	1 (± 1)	0
B6	17	E1	164 (± 14)	82	62 (± 11)	21	92 (± 12)	61	3 (± 1)	0	7 (± 2)	0
		E2	159 (± 22)	146	60 (± 19)	41	94 (± 11)	95	1 (± 0)	2	4 (± 1)	8
		E3	29 (± 13)	147	4 (± 2)	28	11 (± 2)	99	5 (± 3)	4	9 (± 2)	16
B7	20	E1	378 (± 22)	397	128 (± 28)	150	214 (± 16)	240	10 (± 4)	1	26 (± 12)	6
		E2	184 (± 5)	319	58 (± 9)	120	107 (± 8)	195	5 (± 1)	2	14 (± 2)	2
		E3	12 (± 2)	412	2 (± 0)	180	6 (± 2)	230	1 (± 1)	1	3 (± 1)	1

Tabla 4.35: Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD) adultos (vl)= adultos con capacidad de vuelo; adultos (s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; B= bioensayos; C= control; T= tiempo (meses)

B	T	concentración	Control	E1 (0,0063 %)	E2 (0,063 %)
B1 – B3	0 – 6	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND ND ND	ND ND ND	ND
B4 – B5	10 – 14	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	<0,0000 <0,0000 0,0517	1,0000 1,0000	1,0000
B6 – B7	17 – 20	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND 0,0971 <0,0000	0,7189 <0,0001	<0,0006

Tabla 4.36: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de adultos vs la capacidad de vuelo. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)

B	T	concentración	adultos (e)	adultos (s-vl)	Tasa (%) adultos (s-vl)	[IC 95 %]
B1 – B3	0 – 6	E1 E2 E3 C	0 0 0 438	0 0 0 7	ND ND ND 1,49	[1 – 3]
B4 – B5	10 – 14	E1 E2 E3 C	6 5 1 172	5 5 1 2	45 50 50 1,15	[19 – 81] [21,20 – 86,30] [1,25 – 99] [0,13 – 4,09]
B6 – B7	17 – 20	E1 E2 E3 C	271 172 21 280	23 12 9 11	8 6,53 30,5 4	[5,02 – 11,50] [3,41 – 11,11] [19,18 – 44] [2 – 7]

Tabla 4.37: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de adultos vs capacidad de vuelo. Adultos(e)= adultos eclosionados; adultos(s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; B= Bioensayos (grupos); ND= no determinable; T= tiempo (meses)

Hembras con ingestión de sangre y su ovoposición— A diferencia de los contenedores de plástico, en las tablillas de masonite, la comparación de las concentraciones al 0,0063% y 0,063% y sus tasas para la probabilidad de que las hembras realicen la ovoposición después de alimentarse de sangre, fue más pronunciada en los últimos bioensayos (B6 a B7) es decir, 17 meses después del tratamiento inicial. Sin embargo, aunque la proporción de hembras que se alimentaron de sangre con éxito fue muy discreta, éstas, en su mayoría realizaron la ovoposición.

B	T	concentración	hembras (vl)	C	hembras (alim.)	C	hembras (ov)	C
B1	0	E1 (0,0063%)	0	10	0	10	0	10
		E2 (0,063%)	0	348	0	348	0	348
		E3 (0,2%)	0	18	0	18	0	18
B2	3	E1 (0,0063%)	0	115	0	115	0	115
		E2 (0,063%)	0	62	0	62	0	62
		E3 (0,2%)	0	100	0	100	0	100
B3	6	E1 (0,0063%)	0	91	0	91	0	91
		E2 (0,063%)	0	108	0	108	0	108
		E3 (0,2%)	0	127	0	127	0	127
B4	10	E1 (0,0063%)	0	40	0	40	0	40
		E2 (0,063%)	0	40	0	40	0	40
		E3 (0,2%)	0	50	0	50	0	50
B5	14	E1 (0,0063%)	0	59	0	59	0	59
		E2 (0,063%)	0	52	0	52	0	52
		E3 (0,2%)	0	21	0	21	0	21
B6	17	E1 (0,0063%)	62 (± 11)	21	22 (± 12)	21	22 (± 4)	21
		E2 (0,063%)	60 (± 19)	41	33 (± 2)	41	33 (± 2)	41
		E3 (0,2%)	4 (± 2)	28	3 (± 1)	28	1 (± 0)	28
B7	20	E1 (0,0063%)	128 (± 28)	150	120 (± 20)	150	120 (± 18)	150
		E2 (0,063%)	58 (± 9)	120	55 (± 8)	120	54 (± 7)	120
		E3 (0,2%)	2 (± 0)	180	2 (± 1)	180	2 (± 0)	180

Tabla 4.38: Los datos presentados representan el valor medio de tres réplicas (\pm SD). (vl)= hembras con capacidad de vuelo; (alim)= hembras alimentadas; (ov)= hembras con ovoposición; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)

B	T	PPF	Control	E1 (0,0063 %)	E2 (0,063 %)
B1 - B3	0 - 6	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND ND ND	ND ND	ND
B4 - B5	10 - 14	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND ND ND	ND ND	ND
B6 - B7	17 - 20	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %)	ND 1,0000 1,0000	1,0000 1,0000	1,0000

Tabla 4.39: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la ovo posición vs la ingestión de sangre. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)

B	T	PPF	hembras(as)	hembras(ov)	Tasa (%)	[IC 95 %]
B1 - B3	0 - 6	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %) C	0 0 0 173	0 0 0 173	ND ND ND 50	[44,45 - 55,25]
B4 - B5	10 - 14	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %) C	0 0 0 50	0 0 0 50	ND ND ND 50	[39,29 - 60]
B6 - B7	17 - 20	E1 (0,0063 %) E2 (0,063 %) E3 (0,2 %) C	71 44 3 104	71 44 2 104	50 49,71 37,5 50	[41,50 - 58,49] [39,14 - 61] [7 - 93,24] [43 - 57]

Tabla 4.40: Los datos presentados representan el valor medio de tres réplicas (\pm SD). h(as)= hembras alimentadas; h(ov)= hembras con ovoposición; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)

Viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2)— Los resultados obtenidos demuestran la eficacia y actividad residual prolongada de PPF a tres concentraciones posttratamiento. Sin embargo, para las concentraciones de 0,0063% y 0,063% se obtuvieron valores de %IE del 100% hasta 10 meses (Tabla 4.41). La actividad residual a la concentración del 0,2% fue muy satisfactoria durante la mayoría de los bioensayos (15 meses). No obstante, en el bioensayo final se observó un %IE con una reducción de la residualidad de hasta un 50

B	T	PPF	F1		F2					
			hembras (ov)	C	huevos (vb)	C	adultos (e)	C	% (IE)	C
B1	0	E1 (0,0063%)	0	10	0	300	0	291	0	3
		E2 (0,063%)	0	348	0	3210	0	3195	0	0
		E3 (0,2%)	0	18	0	281	0	277	0	1
B2	3	E1 (0,0063%)	0	115	0	655	0	647	0	1
		E2 (0,063%)	0	62	0	410	0	401	0	2
		E3 (0,2%)	0	100	0	647	0	633	0	2
B3	6	E1 (0,0063%)	0	91	0	610	0	597	0	2
		E2 (0,063%)	0	108	0	589	0	578	0	2
		E3 (0,2%)	0	127	0	722	0	715	0	1
B4	10	E1 (0,0063%)	0	40	0	355	0	345	0	3
		E2 (0,063%)	0	40	0	600	0	590	0	2
		E3 (0,2%)	0	50	0	644	0	633	0	2
B5	14	E1 (0,0063%)	0	59	0	419	0	400	0	5
		E2 (0,063%)	0	52	0	447	0	435	0	3
		E3 (0,2%)	0	21	0	339	0	328	0	3
B6	17	E1 (0,0063%)	22 (± 4)	21	600 (± 59)	542	589 (± 48)	534	2	1
		E2 (0,063%)	33 (± 2)	41	689 (± 110)	655	654 (± 75)	647	5	1
		E3 (0,2%)	1 (± 0)	28	30 (± 5)	431	8 (± 3)	427	73	1
B7	20	E1 (0,0063%)	120 (± 18)	104	931 (± 36)	826	910 (± 35)	816	2	1
		E2 (0,063%)	54 (± 7)	107	310 (± 135)	786	300 (± 326)	774	3	2
		E3 (0,2%)	2 (± 0)	137	8 (± 3)	892	4 (± 0)	881	50	1

Tabla 4.41: Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (ov)= hembras con ovo posición; (vb)= viables; (e)= eclosionados; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre las concentraciones al 0,0063% y 0,063%, es decir, no hubo diferencias entre las hembras (ov) ovoposición, su viabilidad y la eclosión de los adultos.

B	T	concentración	huevos (vb)	adultos (e)	Tasa (%) adultos (e)	(IC 95 %)
B1 – B3	0 – 6	E1 (0,0063 %)	0	0	ND	
		E2 (0,063 %)	0	0	ND	
		E3 (0,2 %)	0	0	ND	
		C	1403	1391	50	[47,91 – 52]
B4 – B5	10 – 14	E1 (0,0063 %)	0	0	ND	
		E2 (0,063 %)	0	0	ND	
		E3 (0,2 %)	0	0	ND	
		C	524	513	49,46	[46,38 – 53]
B6 – B7	17 – 20	E1 (0,0063 %)	776	750	49,14	[47 – 52]
		E2 (0,063 %)	500	477	49	[46 – 52]
		E3 (0,2 %)	19	6	24	[9,35 – 45]
		C	721	711	50	[47 – 52,34]

Tabla 4.42: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2) vs adultos (F1). (vb)= viables; (e) eclosionados; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable

Efecto de PPF en pupas (malformaciones)— La HJ de PPF también afectó negativamente los estadios inicial y final, así como el desarrollo pupal y la metamorfosis, los cuales se observaron directamente afectados durante la transformación larva - pupa y pupa - adulto, con la mayor mortalidad en pupas. Se encontró que la tasa de mortalidad de pre - pupas, pupas blancas y pupas melanizadas fue relativamente alta en comparación con los contenedores de plástico.

Como se puede observar, se evidenció que la pupa melanizada registro mayor tasa de mortalidad en las tres concentraciones y en menor proporción las pupas con adulto visible y con adultos parcialmente emergidos. Estos datos están expresados sin contar la mortalidad de las larvas en estadio inicial ($L_1 - L_2$) ya que se contabilizaron a partir de las larvas con malformaciones en el estadio final ($L_3 - L_4$), es decir, cuando ya se podía visualizar un efecto negativo, ya sea como larva final ($L_4 -$ prepupa) o en la observación de la eclosión incompleta o parcial y/o total de las pupas.

B	T	pre-pupas			pupas blancas			pupas melanizadas			con adulto visible			adulto parcialmente emergido									
		PPF	Control	E1	E2	PPF	Control	E1	E2	PPF	Control	E1	E2	PPF	Control	E1	E2	F	E1	E2			
T1- T3	0 - 6	E1	1,0000			E1	0,0001			E1	<0,0000			E1	ND			E1	1,0000				
		E2	ND	1,0000		E2	<0,0000	0,7674		E2	ND	0,7937			E2	ND	ND		E2	ND	ND	ND	
		E3	<0,0000	0,0014	0,0008		E3	0,0015	0,6368	0,6045	E3	ND	0,0001	0,0001	E3	ND	ND	ND	E3	1,0000	ND	ND	ND
T4 - T5	10 - 14	E1	1,0000			E1	<0,0000			E1	<0,0000			E1	<0,0000			E1	ND				
		E2	0,2498	1,0000		E2	<0,0000	0,6883		E2	<0,0000	0,7517			E2	0,0002	0,1889		E2	ND	ND	ND	ND
		E3	<0,0000	<0,0000	0,0001		E3	<0,0000	0,0077	0,0264	E3	<0,0000	0,0059	0,0019	E3	ND	0,0002	0,0211		E3	ND	ND	ND
T6 - T7	17 - 20	E1	ND			E1	ND			E1	ND			E1	ND			E1	ND				
		E2	1,0000	ND		E2	0,5873	0,1651		E2	0,0001	0,0013			E2	0,0396	0,1639		E2	0,0178	0,2807		
		E3	ND	ND	0,0018		E3	ND	ND	ND	E3	ND	ND	ND	E3	ND	ND	0,0345		E3	ND	ND	0,0150

Tabla 4.43: Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas y adultos. En negrita: los valores estadísticamente significativos postcorrección del test Bonferroni; valor de p ($<0,05$). E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)

B	T	PPF	larvas iniciales	P-P	Tasa (%)	[IC 95 %]	P-B	Tasa (%)	[IC 95 %]	P-M	Tasa (%)	[IC 95 %]	CAV	Tasa (%)	[IC 95 %]	APE	Tasa (%)	[IC 95 %]
B1 - B3	0 - 6	E1	43,33	2	5	[0,53 - 15]	7	13,33	[6 - 27]	103	70,38	[62,44 - 78]	0	0	[0 - 8,22]	0	0	[0 - 8,22]
		C	257	12	4,34	[2,33 - 8]	2	0,77	[1 - 3]	0	0	[0 - 1,42]	0	0	[0 - 1,42]	3	1,15	[0,23 - 3,33]
		E2	38,33	1	3	[0,06 - 13,47]	5	12	[4 - 25]	98	72	[64 - 79,40]	0	0	[0 - 9,25]	0	0	[0 - 9,25]
		C	451	12	3	[1,34 - 4,48]	0	0	[0 - 0,81]	0	0	[0 - 0,81]	0	0	[0 - 0,81]	0	0	[0 - 0,81]
		E3	8,33	6	42	[18 - 71]	2,33	22	[2,28 - 52]	0	0	[0 - 37]	0	0	[0 - 37]	0	0	[0 - 37]
		C	236	3	1,25	[0,25 - 4]	0	0	[0 - 1,55]	0	0	[0 - 1,55]	0	0	[0 - 1,55]	2	0,84	[0,10 - 3]
B4 - B5	10 - 14	E1	82,5	1	1	[0,03 - 7]	13	14	[7,41 - 22]	95	53,52	[46 - 61]	15,5	16	[9 - 24]	0	0	[0 - 4,34]
		C	156	1	0,42	[0,01 - 3,49]	0	0	[0 - 2,33]	0	0	[0 - 2,33]	0	0	[0 - 2,33]	0	0	[0 - 2,33]
		E2	81,5	2	2,39	[0,28 - 8,33]	15,5	16	[10 - 25,40]	102	56	[48 - 63]	8	9	[4 - 17]	0	0	[0 - 4,39]
		C	172	1	0,28	[0,01 - 3,17]	0	0	[0 - 2,12]	0	0	[0 - 2,12]	0	0	[0 - 2,12]	0	0	[0 - 2,12]
		E3	64,5	18	22	[13,38 - 32]	27,5	30	[21,27 - 41]	36	36	[26,36 - 46]	0	0	[0 - 5,51]	0	0	[0 - 5,51]
		C	110,5	0	0	[0 - 3,26]	0	0	[0 - 3,26]	0	0	[0 - 3,26]	0	0	[0 - 3,26]	0	0	[0 - 3,26]
B6 - B7	17 - 20	E1	273,5	0	0	[0 - 1,33]	0	0	[0 - 1,33]	2	0,72	[4,19 - 11]	0,5	0,18	[0 - 2]	3	1,08	[0,22 - 3,13]
		C	242,5	2	1	[0,09 - 3]	0	0	[0 - 1,50]	0	0	[0 - 1,50]	0	0	[0 - 1,50]	0	0	[0 - 1,50]
		E2	185,5	0	0	[0 - 2]	1,5	0,8	[0 - 3]	12	6,07	[3,17 - 10,34]	4	2,11	[0,6 - 5,30]	5	2,62	[0,85 - 6]
		C	233,5	1	0,21	[0 - 2]	0,5	0,21	[0 - 2]	0	0	[0 - 2]	0	0	[0 - 1,56]	0	0	[0 - 1,56]
		E3	249	12	5	[2,39 - 8]	95,5	28	[23,16 - 33]	242	49,28	[45 - 54]	0	0	[0 - 1,47]	0	0	[0 - 1,47]
		C	279,5	0	0	[0 - 1,30]	0	0	[0 - 1,30]	0	0	[0 - 1,30]	0	0	[0 - 1,30]	0	0	[0 - 1,30]

Tabla 4.44: Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas, y adultos. P-P= pre-pupa; P-B= pupa blanca; P-M= pupa melanizada; CAV= pupa con adulto visible; APE= pupa con adulto parcialmente emergido; E1= 0,0063%; E2= 0,063%; E3= 0,2% de PPF; C= control B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable

Capítulo 5

Discusión

Según recomendaciones de un informe de la OMS en 2017 (A. M. WHO, 2017), cuando se utilizan nuevos procedimientos para controlar insectos vectores con componentes químicos, físicos o ambos, las metodologías que los incorporan deberían necesariamente tener una efectividad real a largo plazo, debiéndose considerar la necesidad de que los i.a. tengan una degradación más controlada con el paso del tiempo. Pero además, la exposición de estos componentes a las personas en determinadas concentraciones o combinaciones de formulados insecticidas, aunque podría ser permanente, no debería significar un riesgo, y si la relación riesgo/costo y beneficio podría resultar favorable, se podría proponer su uso como apto para el control de un vector de importancia sanitaria para la Salud Pública.

Es así, que las acciones recomendadas dirigidas al insecto vector siempre deberían incluir saneamiento del medio, análisis de la educación sociocultural, motivación a la movilización social, y medidas de control biológico y/o químico favorables al medio ambiente y los insectos no objetivo (Marí, Masiá, Elbal, y Escudero, 2022). Por lo tanto, la incorporación del uso de nuevas tecnologías dentro de un control integrado podría contribuir a tener resultados más alentadores a largo plazo.

5.1. Prueba I (pinturas insecticidas)

Como mencionamos al inicio, una de las estrategias ampliamente utilizada de control de insectos vectores es el IRS, que es la fumigación residual de interiores (por sus siglas en inglés: *Indoor Residual Spraying*). Sin embargo, su eficacia podría resultar parcial, presumiblemente debido a que los mosquitos tienden a descansar dentro de las viviendas después de una toma de sangre y el IRS se realiza mayormente fuera de las viviendas (lo que lleva a un aumento de las interacciones sinantrópicas) (Fullman y cols., 2013). En este sentido, se ha estado reportado que la metodología de la microencapsulación que incluye el uso de PI muestra resultados alentadores, ya que se demostró su efectividad dentro de las viviendas, en zonas donde el IRS no alcanza a cubrir y en diferentes superficies, dosis y combinación de biocidas (Mashauri y cols., 2017); (Acharya y cols.,

2021); (Ngwej y cols., 2021), además de que las microcápsulas contenidas con los i.a. se liberan gradualmente según el área tratada, el tipo de superficie y la concentración aplicada.

Varios han sido los estudios realizados con la misma tecnología de microencapsulación de PI (Inesfly[®]) en condiciones de campo y laboratorio, y han demostrado su eficacia. Aunque estos estudios no utilizaron todos los mismos i.a. que en nuestro estudio, citamos algunos más relevantes: *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* (Mosqueira y cols., 2010a, 2010b); (Mosqueira y cols., 2015), *Rhodnius prolixus* (Oliveira Filho, 1997), *Triatoma infestans* (Alarico, Romero, Hernández, Catalá, y Gorla, 2010); (Gorla, Vargas Ortiz, y Catalá, 2015); (J. C. P. Dias y Jemmio, 2008); (Maloney y cols., 2013); (Amelotti, Catalá, y Gorla, 2009); (Banjara y cols., 2019), y *Estegomyia albopicta*= *Aedes albopictus* (Yao y cols., 2014); (Junnila y cols., 2015), *Aedes aegypti* (Acharya y cols., 2021); (DeRaedt Banks y cols., 2015), *Aedes vigilax* (Webb, Miller, y Peters, 2012); (Vythilingam, Zainal, y Hamidah, 1999); (Delacour y cols., s.f.).

En esta parte de el estudio, se ha analizado la eficacia de polímeros (pinturas) enriquecidos con insecticidas microencapsulados contra *Aedes albopictus* y se evaluó en condiciones controladas de laboratorio, utilizando la técnica de contacto forzado (OMS) y analizándose tres formulados con diferentes i.a. insecticidas combinados con piriproxifeno (PPF): una contenían piretroides (PY) y dos contenían organofosforados (OP). Las PI se aplicaron sobre dos tipos de superficies, que por sus características son más o en su caso menos porosas y a dos concentraciones.

El tratamiento aplicado en dos concentraciones, consistió en una imprimación simple de una sola capa 1 kg / 6 m² (dosis recomendada), y una doble concentración de 1 kg / 3 m² imprimación doble, que comprendía dos capas aplicadas con 24 h de diferencia. Por lo tanto, según recomendaciones del fabricante el motivo de utilizar una dosis doble, es simplemente, que al pintar superficies muy porosas (sin sellado previo) se aplicaría inicialmente una primera capa de pintura diluida con un 50 % de agua hasta la cobertura total de la superficie, y dado que se trata de biocidas que actúan en los insectos por contacto tarsal y por inhalación, para conseguir los mejores resultados es conveniente aplicar una capa adicional a la superficie (doble capa) en la mayor área de superficie posible y evitando así zonas refugio para los insectos vectores. Por lo tanto, se ha optado por analizar dos concentraciones, tanto para superficies más porosas o menos porosas, y así evidenciar, si la degradación de los i.a. en las mismas, podrían tener una influencia significativa si se aplica una dosis o una sola capa (concentración recomendada) o dos (doble capa) en la misma área a tratar (13 cm²) y no así en una superficie más amplia (1 kg / 12 m²).

Mosqueira y cols., (2010a) compararon la eficacia de un formulado de PI (5A IGR^{MT}) en condiciones de laboratorio contra mosquitos del género *Culex*. Éste, fue compuesto por dos OP y un IGR: clorpirifós (1,5 %) + diazinón (3 %) y piriproxifeno (0,063 %) aplicados a dos tipos de superficies, demostrando una mortalidad aceptable (87 - 100 %) hasta seis meses en las superficies menos porosas. Además, un año después del tratamiento se registraron altas tasas de mortalidad (93 - 100 %) en las superficies menos porosas (madera) para ambas concentraciones. Sin embargo, la alta eficacia de

los i.a. en superficies porosas desapareció seis meses después del tratamiento contra los mosquitos resistentes y susceptibles.

En nuestro estudio, en comparación con Mosqueira y cols., (2010a) para el análisis de las PI con tecnología de microencapsulación Inesfly[®] en relación con la elección del tipo de superficies, se ha tomado en cuenta varios aspectos relacionados con el comportamiento sinantrópico de la especie. Éstos podrían ser los más comunes elegidos por las hembras para realizar la ovoposición, y como hemos mencionado el hecho de que las hembras tienden a posarse en las paredes dentro de las viviendas donde pueden descansar durante el día después de una toma de sangre y luego conducirse a sitios óptimos de ovoposición, se basa, en que al tener una fuente potencial de sangre, tanto de humanos u otros vertebrados, indica que en general los materiales de las viviendas donde los mosquitos adultos eligen para reposar están construidas en su mayoría de elementos de madera (más prolijas) y de materiales porosos como el hormigón, adobe, escayola. . . , entre otros. Por lo cual, según la naturaleza física del material elegido y su conformación, la elección dependió de factores en los cuales los microencapsulados y la residualidad de los i.a. o el tipo de superficie en sí o ambos, podrían ofrecer una influencia sobre los resultados esperados.

Es así, que se tomó en cuenta la porosidad y/o la rugosidad de las mismas superficies según la naturaleza física del material elegido y su conformación. La elección dependió de factores en los cuales los microencapsulados (el insecticida, el formulado, la duración de la eficacia) o la superficie en sí deberían tener una influencia sobre los resultados esperados. Por lo que se tomó en cuenta la porosidad o la rugosidad de la superficie. Estos parámetros condicionaron la degradación de los i.a. en cada formulado, ya que con el tiempo es común y es un factor importante pero no determinante en la evaluación de la eficacia residual.

La cuestión más importante para poder evidenciar la alta residualidad de los formulados, fue la degradación de los insecticidas aplicados sobre tales superficies, la cual aumenta con el tiempo y podría deberse a los procesos de volatilización o de degradación. Sin embargo, la tasa de disminución de la eficacia también estaría condicionada y varía dependiendo del insecticida, formulación, sustrato, y la temperatura (Watters, White, y Cote, 1983); (Arthur, Liu, Zhao, y Philips, 2009). Otros factores como: la resistencia a la alcalinidad, provocarían una gran reducción de la eficacia real del formulado y que generalmente es directamente proporcional a la alcalinidad del agua o del medio con el que el formulado entre en contacto. Por lo que los formulados analizados en su microcápsula, mantienen a los i.a. a un pH ácido y poseen una resistencia a la alcalinidad mayor a la que ofrecen otras pinturas convencionales, que suelen incorporar coalescentes de naturaleza orgánica para la formación de la película, perdiéndose su efecto insecticida con mayor rapidez.

Otro factor es la adherencia, que normalmente las pinturas de exteriores tienen sobre soportes como el hormigón, cemento y el resto de componentes minerales que suelen encontrarse en una fachada o pared de obra, por lo que su porosidad podrían o no condicionar la degradación de los insecticidas utilizados en cada formulado. Por lo cual, uno de nuestros limitantes en la elección de los materiales surgió cuando se observó que la adherencia de este tipo de pintura no era satisfactoria, como se observó el caso de

superficies sin desgaste ambiental (neumáticos nuevos) (Arthur y cols., 2009); (Watters y cols., 1983). Estos parámetros en las superficies son particularmente importantes en biocidas con i.a. no microencapsulados, ya que estos se degradan muy rápidamente a temperaturas más elevadas, por lo que las PI que contienen tecnología de microcápsulas poseen una pared lo suficientemente dura en el momento de su aplicación para evitar la rotura de la misma y a la vez puedan ser capaces de adherirse al insecto por contacto tarsal, y luego romperse para liberar los i.a. insecticidas.

Amelotti y cols., (2009) (Amelotti y cols., 2009) sugiere que la porosidad podría parecer ser un problema: las superficies de cemento se desempeñan peor que las superficies de madera e incluso de adobe, por lo que a la hora de elegir el tipo de superficie para este tipo de formulados, es necesario tener en cuenta el tipo de porosidad en cuestión, y que además, puedan incluir antes de ser aplicados materiales selladores para superficies más porosas o algún tipo de fijador para las superficies más lisas o mucho más “deslizantes” o impermeables (neumáticos), y la razón a esta afirmación podría suponerse al tratamiento utilizado en la fabricación de los mismos, que confirman su mayor dificultad, porque este tipo de superficie (neumáticos) no permite que el producto se adhiera a toda el área aplicada, ya que debido a la naturaleza de los compuestos utilizados para fabricar estos materiales, que generalmente están constituidos de elastómeros sometidos a diversos tratamientos, supone una elevada impermeabilidad de la cámara de aire (interior del neumático), que permite mantener durante mucho tiempo la presión correcta, y además de aplicar materiales sellantes en su fabricación para evitar fugas de aire. Es por tal razón, que los resultados aceptables en algunos estudios realizados por (Suleman, Arshad, y Khan, 1996); (Beehler, Quick, y DeFoliart, 1991); (Marina y cols., 2012); (Walker, 2016) puede deberse a que fueron realizados en condiciones de campo y además en neumáticos usados, los cuales podrían haber perdido sus propiedades impermeables o de rebote de los líquidos afectados por los efectos ambientales.

Otra de las limitaciones de nuestros resultados, se basa, en el hecho de que no se analizaron superficies como el estuco y el plástico. Comparando el estudio de Mosqueira y cols. (2010a) los autores realizaron una comparación de la interacción con la sinergia entre PY y OP de formulados insecticidas (Fase I), y se hace referencia a un formulado basado en OP (5A IGR^{MT}) y con distinto grado de similitud a las superficies aplicadas en nuestro estudio. Pero que además, fueron descritos en base a la comparación del efecto tóxico entre el tipo de superficies (más porosa vs menos porosa). Por lo que, los resultados de Mosqueira y cols. (2010a) se han podido contrastar con el uso de piretroides obtenidos durante los estudios de la Fase II y III, basadas en el uso de mosquiteros insecticidas de larga duración (LLIN) y la eficacia de Inesfly 5A IGR^{MT} en combinación con los tratados con piretroides en bioensayos piloto de campo. Esta prueba, realizada tanto en el laboratorio como en el campo, obtuvo una elevada mortalidad a largo plazo (96 - 100 %) durante 12 meses en el campo contra *An. gambiae* y *Cx. quinquefasciatus* susceptibles a los piretroides. Mientras que contra mosquitos resistentes a los piretroides los resultados fueron de 90 a 100 % en cabañas experimentales en el campo. Sin embargo, se encontró que la eficacia después de 12 meses en las cabañas tratadas había disminuido al 60 - 80 %. Los resultados a un año después del tratamiento la mortalidad retardada seguía siendo del 93 - 100 %, incluso en el caso de las hembras resistentes a los OP e incluso en superficies no porosas como el

plástico duro o la madera blanda. En superficies porosas como el cemento, las tasas de mortalidad seguían siendo bajas 12 meses después del tratamiento, independientemente de la concentración (dosis) o del estado de resistencia.

Por otro lado, los resultados de Amelotti (2009) (Amelotti y cols., 2009) han demostrado que el formulado de PI proporcionó una eficacia residual al producir un 94 % de efecto KD y un 90 % de mortalidad contra un vector del Chagas. Además, en el estudio realizado por Acharya y cols. (2021) (Acharya y cols., 2021) donde se ha analizado el piretroide sintético deltametrina (DM) microencapsulado en el aglutinante de pintura de emulsión, y se ha evaluado su eficacia a largo plazo contra el vector del dengue *Aedes aegypti* demostraron ser eficaces hasta 18 meses después de su aplicación. Los valores de tiempo del efecto KD (KDT) KDT₁₀ y KDT₅₀ fueron de 7,4 min (IC 95 %: 5,6 - 9,1) y 22,1 min (IC 95 %: 19,7 - 24,3) respectivamente, mientras que la mortalidad corregida a las 24 h fue del 90 % (IC 95 %: 82,5 - 97,5).

De acuerdo con nuestros resultados, en relación con la superficie y sus interacciones, la representación de los valores de mínimos cuadrados (Fig. 5.1 A) mostró claramente un mayor efecto medio del efecto KD cuando la superficie tratada es más porosa (escayola), con una probabilidad de efecto KD estimada del 0,79 [IC 95 % (0,75 - 0,83)] respecto a la estimada para la superficie menos porosa (madera) 0,63 [IC 95 % (0,60 - 0,67)]. Afirmando, que la probabilidad del efecto KD (Fig. 5.1) en la superficie más porosa (escayola) resultó un 25,4 % superior o 1,2 veces más a la observada en la menos porosa (madera).

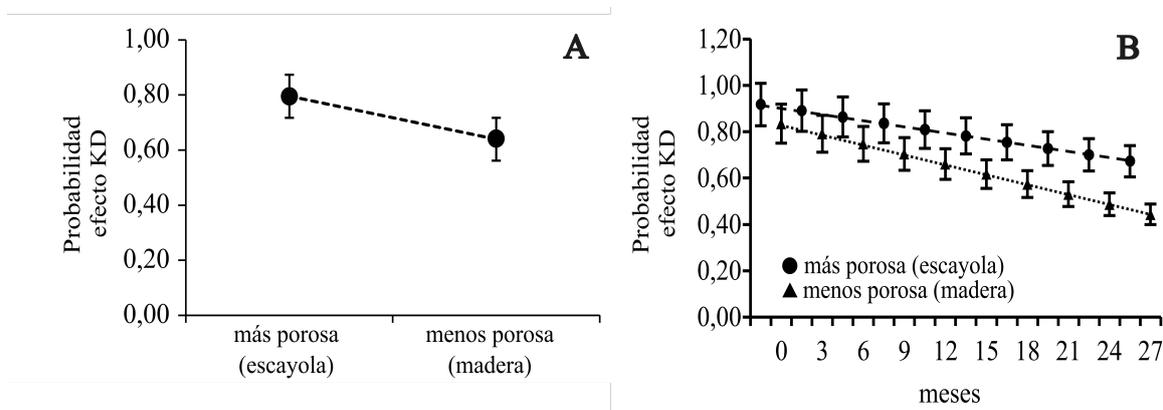


Figura 5.1: A= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD según el tipo de superficie; B= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD en función de la superficie y del tiempo (meses)

Es así, que en primer lugar, a diferencia de la disminución del efecto KD a lo largo del tiempo (independiente de la concentración), la interacción entre la superficie y el tiempo (meses) (Fig. 5.1 B) muestra cómo la pendiente de la disminución de la probabilidad de KD a lo largo del estudio varió según el tipo de superficie, siendo ésta más acusada para la superficie menos porosa (madera). Lo que significa, que a lo largo de los 27 meses que duró el estudio, la probabilidad del KD disminuyó un 26,3 % sobre

la superficie más porosa (escayola), pero un 46,9 % sobre la menos porosa (madera). En segundo lugar, en comparación con los resultados de Mosqueira y cols., (2010a, 2010b), aunque el TD_{50} al inicio de los bioensayos fue similar para el formulado contenido con PY (5A NG IGR), no se vio afectado por la degradación de los i.a. y mantuvo su eficacia residual durante toda la prueba. Sin embargo, la degradación de los i.a. en los OP (5A IGR y 5D IGR) disminuyó en su eficacia alrededor de un 52 % para ambos a los 27 meses (Fig. 5.2). Por lo que se podría suponer, que el tipo de superficie afecta a la eficacia, especialmente para los tipos de superficie más porosas, ya que en nuestro estudio se utilizó superficies con una porosidad menos densa (escayola) en comparación con las utilizadas por Mosqueira y cols. (2010a). Por lo tanto, la naturaleza de la superficie podría ser uno de los factores más importantes en la eficacia de cualquier PI (Corrêa y cols., 2019).

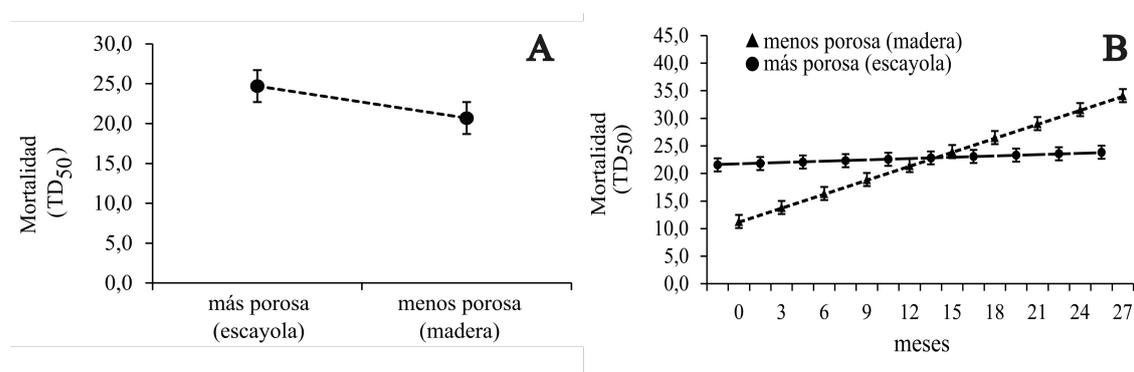


Figura 5.2: A= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el mejor modelo de regresión final obtenido según criterio de Akaike (AIC) para el TD_{50} según las superficies; B= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD_{50} en función de la superficie

En otras investigaciones anteriores (Jenson, Arthur, y Nechols, 2009), se observó que la superficie sobre la que se aplican las PI, especialmente las superficies más porosas, suelen tener una menor eficacia en comparación con una menos porosa, aunque las condiciones ambientales a las que se expone pueden influir en su eficacia residual (Bennett, Owens, y Corrigan, 1996). Otro factor podría ser la concentración aplicada a cada superficie, ya que el tratamiento a dos capas da como resultado una mayor duración de la eficacia. Gunasekaran (2005) (Gunasekaran, Sahu, Jambulingam, y Das, 2005) describieron la dificultad de lograr una buena cobertura superficial para estimar la reducción esperada en la densidad de reposo interior *indoor resting density* (IRD). Por lo tanto, el aumento de la cobertura del tratamiento puede conducir a un aumento en la duración de la supresión de la IRD. Otros autores, como Ratti y cols. (2018) (Ratti, Rheingold, y Wallace, s.f.) sugirieron que la pulverización adicional o el uso de dos capas (doble concentración) en el 50 % de las superficies a tratar fue efectiva para reducir la IRD y resultó tan efectiva como el uso de una sola capa en el 70 % de la superficie.

Posteriormente al KD, en el análisis de los datos de mortalidad, fue necesario cuantificar la supervivencia de los individuos expuestos, ya que el tipo de superficie, formulados y la concentración determinó el TD_{50} , pudiendo mantenerse o incrementarse en cada bioensayo a medida del paso del tiempo. Aunque ambas superficies produjeron

tasas de mortalidad similares, el TD_{50} en la superficie menos porosa aumentó significativamente cuando se duplicó la concentración, es decir, el TD_{50} en la superficie menos porosa fue 1,7 veces más rápido que para la superficie más porosa a una doble concentración con una diferencia aproximada de 9,2 horas. Para producir el TD_{50} en un tiempo más corto, las condiciones de la superficie fueron un 37,5 % más efectivas si la concentración se duplicaba. Por lo cual, la cuestión más importante que podría demostrar la alta residualidad del PI es la degradación o volatilización de los insecticidas aplicados en estas superficies (Arthur y cols., 2009), además de factores que podrían condicionar su eficacia y residualidad, como la concentración, los formulados de los i.a. y especialmente el tipo de superficie.

Pero además, las variables analizadas no permitieron dilucidar si la mortalidad después del KD se produjo por su interacción con los i.a. o por mecanismos subyacentes, ya que no necesariamente la acción letal podría asociarse con el tipo de i.a. (OPS, 1987). Esto contrastó con la mortalidad, que podría haber ocurrido después de la supervivencia al KD (Briggs y cols., 1976) y puede haber dependido de factores como la interacción insecticida de cada formulado, la penetración más rápida de los i.a. al individuo, la concentración o disponibilidad de liberación de microcápsulas con respecto al tipo de superficie y la degradación metabólica.

Con respecto a la concentración de pintura aplicada, tal y como se puede observar en la figura 5.3 A, y confirmando lo sugerido por el análisis descriptivo de los datos, una concentración doble aumentó el efecto KD, si bien, aunque el aumento fue consistente, su magnitud no fue proporcional al incremento de la concentración de los i.a. respecto a la concentración recomendada. Según las estimaciones del modelo, la probabilidad del KD de la concentración doble 0,76 [IC 95 % (0,72 – 0,79)] resultó en un incremento del 13,4 % o tan sólo 1,1 vez superior a la concentración recomendada 0,67 [IC 95 % (0,63 – 0,71)] a pesar de contener el doble de i.a. Además, el incremento de la concentración tampoco implicó una mayor residualidad de los tratamientos para el KD, tal y como ha quedado manifiesto al no quedar retenida la interacción entre la concentración y la variable tiempo. Gráficamente esta independencia se puede visualizar en la figura 5.3 B, en la que se observa que las pendientes de la probabilidad del KD a lo largo del tiempo son paralelas para ambas concentraciones, lo que nos indicó que la residualidad del efecto disminuyó a la misma velocidad independientemente de la concentración inicial de los i.a.

Además, el incremento de la concentración implicó una mayor residualidad para el TD_{50} , y quedó manifiesto al no quedar retenida la interacción entre la concentración y la variable tiempo. Esta independencia se observa en la figura 5.4, donde las pendientes del modelo de la probabilidad del TD_{50} a lo largo del tiempo son paralelas para ambas concentraciones, y nos indicó que la residualidad del efecto no disminuyó a la misma velocidad, independientemente de la concentración inicial de los i.a., es decir, la efectividad residual fue más evidente progresivamente cuando el tiempo transcurría si la concentración era el doble. En las pendientes del TD_{50} de las dos concentraciones, no existió variabilidad al inicio de los bioensayos, tanto para la concentración recomendada, con un tiempo de 16,6 h [IC 95 % (8,7 – 24,4)] y para la doble 16,2 h [IC 95 % (8,3 – 24,1)].

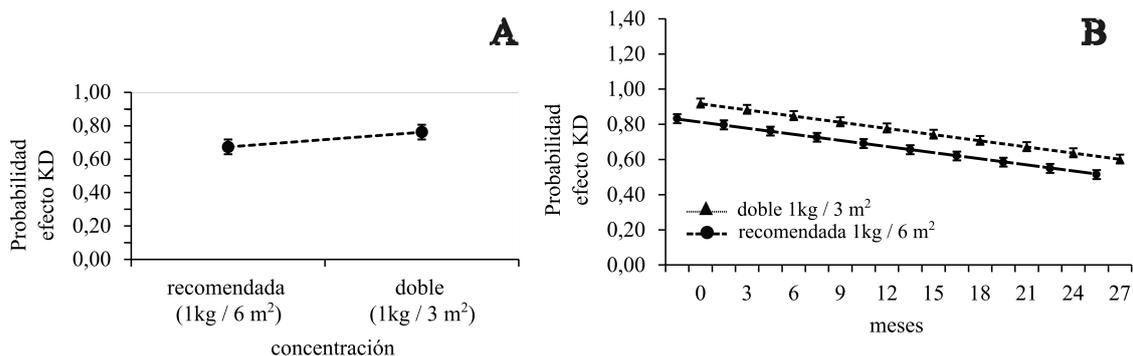


Figura 5.3: A= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD. Según la concentración; B= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD a lo largo del tiempo. Se representa la eficacia residual a lo largo del tiempo de dos concentraciones

Realizando una comparación del primer al último bioensayo, para la concentración recomendada, el TD₅₀ ocurrió con un tiempo de 34,3 h [IC 95 % (26,4 – 42,2)], si la comparamos cuando la concentración fue el doble y ocurrió en un tiempo de 23,5 h [IC 95 % (16 – 31,4) y conforme a la degradación de los i.a. el TD₅₀ aumentó en un 52 % o 2 veces menos rápida en la concentración recomendada o un 31 % o 1,4 veces menos rápida cuando era doble. Los cálculos de los mínimos cuadrados mostró una diferencia en el TD₅₀ en ambas concentraciones del 31,4 % al final de la prueba, es decir, que la concentración cuando se duplicó mantuvo una eficacia residual mucho mayor.

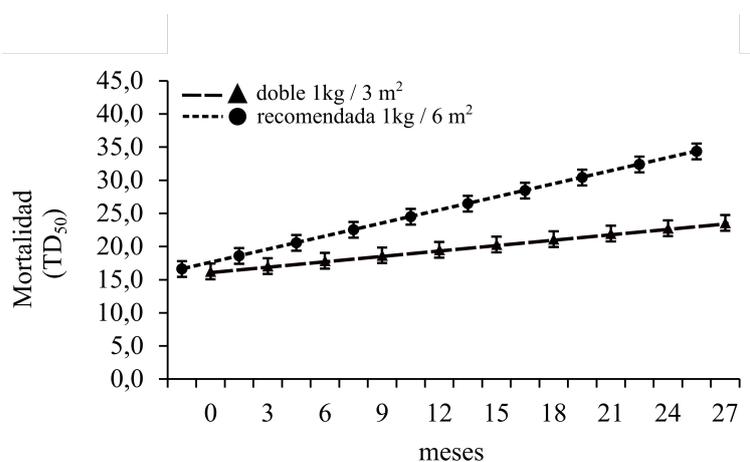


Figura 5.4: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD₅₀ en función de dos concentraciones.

Sin embargo, la persistencia de los efectos antes mencionados relacionados con el TD₅₀ posterior al efecto KD fue constante y efectiva al inicio de los bioensayos, especialmente en los PY (5A NG IGR) y OP diazinón + clorpirifós (5A IGR). Por el contrario, el formulado con un único i.a. OP diazinón 3 % (5D IGR) presentó una menor letalidad, que fue disminuyendo gradualmente, y evidenció que la superficie en relación con los i.a. influyeron en su efectividad. Por lo cual, la intensidad del KD difirió notablemente entre los tres formulados. El efecto principal estimado por el modelo logístico mediante el cálculo de los mínimos cuadrados (Fig. 5.5) mostró que las probabilidades del KD para los formulados 5A NG IGR: 0,97 [IC 95 % (0,93 – 1)] y

5A IGR 0,72 [IC 95 % (0,67 – 0,76)] se incrementaron en un 37,5 – 53,6 % o 1,6 – 2,1 veces superiores respectivamente a la estimada para 5D IGR, y fue el que evidenció el efecto KD más débil 0,45 [IC 95 % (0,40 – 0,50)]. Así mismo, la probabilidad estimada para 5A NG IGR se incrementó en un 34,7 % o 1,3 veces superior a la presentada por el formulado 5A IGR.

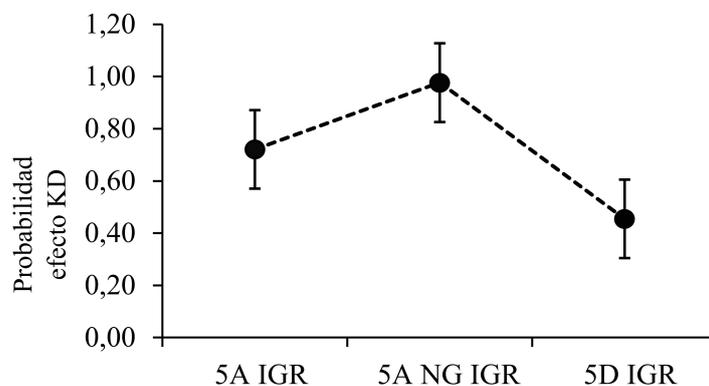


Figura 5.5: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD según el formulado. 5A IGR= diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. 5D IGR= diazinón 3%; PPF 0,063 %. 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %; d-aletrina 1 %; PPF 0,063 %

Debemos aclarar que, la determinación de la probabilidad del KD se redujo a medida que los i.a. de los tres formulados se degradaron con el tiempo, especialmente para los OP. Esto nos sugiere que, al determinar la correlación entre la tasa del KD y el TD_{50} para cada tratamiento, siendo presumiblemente posible que todos los individuos con el efecto KD pudieron haber presentado un diagnóstico falso de muerte en un determinado parámetro de tiempo, independientemente del efecto letal de cada i.a.

Estudios similares realizados por Ajayi y cols. (2020) (Ajayi, Idowu, Sam-Wobo, Eromosele, y Eniola, 2020) observaron una tasa de KD del 100 % para los mosquitos dentro de los 10 minutos posteriores a la exposición en los primeros dos meses, y un alargamiento del tiempo de la KD que es debido a la degradación de los i.a. A diferencia de nuestros resultados, los OP combinados diazinón y clorpirifós (5A IGR) registraron altos efectos de KD (90 %) incluso hasta los 24 meses (Fig. 5.7) aunque las variaciones en su eficacia fueron evidentes, especialmente para la superficie menos porosa. Nuestros resultados sugieren que un tiempo comprendido entre 30 minutos de observación, el efecto KD resultó válido, en comparación con el tiempo señalado por la OMS (1981) (Abramides y cols., 2011) de una hora, y reafirman la efectividad y residualidad alta de los PY (5A NG IRG).

Por lo tanto, existió la necesidad de una observación detallada durante un período de tiempo necesario en el momento del contacto forzado de los individuos con las superficies tratadas, ya que cuando se requirió evaluar la mortalidad, particularmente con insecticidas PY, se nos hizo frecuente confundir el efecto KD con la mortalidad. Por lo que, es menos concluyente que en el efecto KD o sus diferentes manifestaciones y la posterior mortalidad tienen el mismo mecanismo subyacente (Alzogaray, Fontan, y Zerba, 1997). Como hemos mencionado anteriormente, esta afirmación fue puesta

en contraste con la mortalidad, la cual puede ocurrir dos días o más después de la sobrevivencia al KD. En nuestro estudio, el KD ocurrió en menos de 30 segundos en todos los bioensayos, independientemente del tipo de formulado y la residualidad de los i.a. asociada a la posterior mortalidad de los individuos fue constantemente efectiva al inicio de los bioensayos, especialmente como era de esperar con la presencia de PY.

Como era de esperar el efecto residual de cada formulado en función de la porosidad de las superficies, fue degradándose con el tiempo, siendo la más notoria en la superficie menos porosa (madera) y a una concentración recomendada. Sin embargo, esto no ocurrió con el formulado que contenía PY, independientemente de la porosidad de la superficie o la concentración aplicada. El efecto del modelo corroboró las marcadas diferencias en la eficacia residual de los formulados 5A IGR y 5D IGR *vs* 5A NG IGR a lo largo del tiempo, tal y como se observa en la figura 5.6, los formulados 5A IGR y 5D IGR evidencian notables incrementos idénticos en las pendientes del modelo, es decir, que el número de horas para el TD₅₀ se incrementó en ambas a lo largo del tiempo, No obstante aunque el TD₅₀ al inicio de la prueba es similar en los tres formulados, 5A NG IGR no se vio afectado por la degradación de los i.a. y mantuvieron su efectividad residual a lo largo de toda la prueba.

En cuanto a la disminución de la efectividad de los formulados, se observó que para las dos menos eficaces (5A IGR y 5D IGR) el TD₅₀ al inicio de la prueba fue similar para ambas y a medida que transcurría el tiempo la degradación de los i.a disminuyó su efectividad en un 52 %.

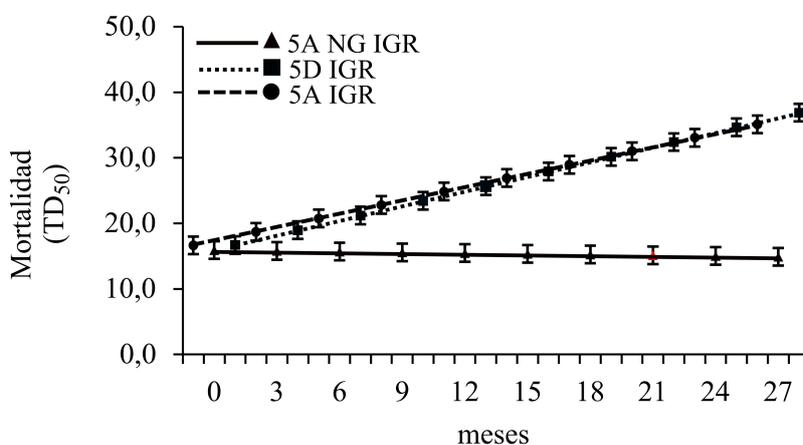


Figura 5.6: Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD₅₀ en función de la superficie

Estas diferencias se mantuvieron incluso a doble concentración, por lo tanto, cuando la superficie es más porosa, aumenta la probabilidad del efecto KD, lo que puede implicar que las propiedades y la porosidad de la superficie son favorables para la salida de las microcápsulas (Williams, Semple, y Amos, 1982). Sin embargo, el hecho de que nuestros resultados muestren una mayor susceptibilidad a los PY en comparación con los OP (clorpirifós) se basa, como se ha mencionado, en que la cepa de *Ae. albopictus* utilizada en nuestro laboratorio no estuvo expuesta previamente a insecticidas y

puede considerarse como no resistente, por lo cual, no existía la presión selectiva de insecticidas, ya que el hecho de que algunos vectores (Malaria) estén desarrollando resistencia a los PY en condiciones naturales, afirma que la prevalencia de la resistencia ha aumentado considerablemente con el tiempo (Dabiré y cols., 2012).

Se podría afirmar que en el efecto KD en superficies más porosas y concentraciones de una sola capa son muy eficaces. Cuando solamente se utilizó un insecticida OP diazinón (5D IGR) la eficacia fue marcadamente menor. Lo que demuestra que la efectividad de los formulados a base de PY posría no estar condicionada por el tipo de superficie o concentración y mantiene su residualidad hasta los 27 meses después de un único tratamiento. Por el contrario, para el TD₅₀ el coeficiente del modelo indicó que el número de horas transcurrido desde los primeros 30 minutos hasta la muerte del 50 % de los ejemplares fue mayor en una superficie más porosa. Pudiendo afirmar que el TD₅₀ está condicionada por el tipo de superficie y la concentración, pero no por el tipo de i.a.

Sin embargo, si la superficie es menos porosa, su potencia podría ser mayor inicialmente, incluso si la mayor mortalidad en el menor número de horas se registró con el PY (5A NG IGR) y en una superficie más porosa. Por lo tanto, si una superficie es más porosa, el TD₅₀ ocurrió con más efectividad en un periodo de tiempo menor, ya sea en presencia de PY o con OP. Dado que la composición química de los insecticidas en las microcápsulas pueden contribuir a una variación en la biodisponibilidad en las superficies menos porosas, no se observaron diferencias en las estimaciones y el TD₅₀ fue similar en los tres formulados, aunque en una superficie más porosa y a una concentración recomendada los valores de mortalidad fue sensiblemente menor que en una doble.

5.2. Prueba II (emulsiones microencapsuladas)

Los IGR son relativamente más seguros contra organismos que no son el objetivo (Mulla, 1995) y se han recomendado para el control de mosquitos (WHO y cols., 2006). Éstos, incluyen sustancias químicas con modos de acción únicos, como los análogos de hormonas juveniles, inhibidores de la síntesis de quitina y agonistas de ecdisona (Mulla, 1995); (Soin y cols., 2010). En nuestro estudio, se ha analizado un análogo de hormona juvenil (piriproxifeno) en la prueba del análisis de emulsiones sobre dos tipos de materiales y se han comparado tres concentraciones emulsionables (lacas) de PPF al 0,0063 %, 0,063 % y 0,2 %, cada una por triplicado y con un control. De esta forma, se ha analizado la eficacia sobre la mortalidad acumulada de larvas y pupas, el % IE, el efecto de la hormona juvenil (HJ) contenida en las tres concentraciones y su relación con las consecuentes alteraciones morfológicas posteriores que se producen en los distintos estadios de larvas y pupas.

5.2.1. Contenedores de plástico (macetas)

El control de *Aedes albopictus* en cualquier tipo de sustratos que son aptos para contener agua (imprescindible para su desarrollo gonotrofico) es difícil y más aún, usando métodos tradicionales, porque este vector tiende a elegir hábitats crípticos ocultos (Chandel y cols., 2016) donde prefiere ovopositar y para tal fin, pueden usar casi cualquier recipiente pequeño que evidentemente pueda contener agua en un momento dado para el desarrollo de sus larvas.

Los avances en el estilo de vida actual requieren el uso de plásticos de un solo uso. Esto incluye artículos domésticos cotidianos, como vasos y/o contenedores de plástico. Si bien se debe insistir en la concientización de los programas de reciclaje, el mayor problema de gestión de desechos es causado por la gran cantidad de basura generada por la sociedad, sobre todo en países en vías de desarrollo. Este panorama crea hábitats para las larvas de mosquitos como *Ae. albopictus* que tiene la capacidad de completar su ciclo de vida con una pequeña cantidad de agua dentro de pequeños contenedores.

Al analizar el efecto residual del regulador de crecimiento PPF sobre individuos de *Ae. albopictus*, se observó un rango del % IE de entre el 13 – 100 % durante todo el período de experimentación, encontrándose un menor efecto residual en las concentraciones al 0,0063 % (E1) y 0,063 % (E2). Contrariamente, a una concentración del 0,2 % (E3) el % IE se mantuvo entre 100 % y 95 %. La mortalidad de larvas y pupas en el grupo de control fue inferior al 10 % en la mayoría de los bioensayos. La emergencia de adultos en los controles fue bastante significativa en relación con las concentraciones de PPF, con casi todas las pupas emergiendo a adulto.

Se debe tener en cuenta, que la mortalidad está medida en base a los individuos contabilizados y catalogados en las cuatro fases larvarias y pupas, de manera que el porcentaje de mortalidad se contabiliza en cada una de las fases tanto larvas como pupas, que quedan vivas de las iniciales. Por lo tanto, no se observó un porcentaje significativo de las 30 larvas iniciales en las tres réplicas de cada concentración que llegaron a la fase adulta, salvo en la concentración al 0,0063 % (E1), que fueron entre cinco adultos vivos y con dificultades para volar, lo que demuestra, que aunque llegaron a la fase adulta, éstos no fueron capaces de concluir con el siguiente ciclo gonotrófico normal.

Al analizar los porcentajes de IE se encontró menor efecto en las concentraciones al 0,0063 % (E1) y 0,063 % (E2). En cambio, al 0,2 % de PPF (E3) se mantuvo entre 95 % y 100 % durante toda la prueba. Este resultado es bastante satisfactorio y sugiere que la persistencia de los i.a. podría ser incluso de hasta un promedio de seis meses adicionales en condiciones de laboratorio. La mortalidad, tanto de larvas como de pupas fue menor del 10 %, en los grupos control en todos los bioensayos. La emergencia de adultos en el grupo control es bastante significativa con respecto a las tres concentraciones, emergiendo casi la totalidad de las pupas a la fase de adulta. Para 0,0063 % el % IE varió entre el 98 % - 100 % a los 10 meses del tratamiento con tendencia a la baja, mientras que para 0,063 % se mantuvo en 100 % a los 13 meses. Debemos recordar que sin embargo, existen diferencias significativas en la actividad inhibidora de PPF entre

estadios y se observó que las larvas de estadio $L_3 - L_4$ son más resistentes y la duración del tiempo de muda a pupa fue mucho más larga que el grupo control.

Por otro lado, al analizar los efectos observados de la mortalidad en los estadios larvales y pupas, se observó un mayor efecto tóxico en los estadios larvales iniciales ($L_1 - L_2$) [0,0063 % (E1) > 0,2 % (E3)]. En tanto, en el último estadio ($L_3 - L_4$) no se encontraron diferencias significativas entre concentraciones a lo largo del estudio. Después en los 7 meses la mortalidad tuvo un descenso hasta menos del 10 %. Sin embargo, siguió observándose mortalidad de las larvas hasta los 27 meses en las tres concentraciones.

En la fase de pupa, no se encontró diferencia significativa entre [0,0063 % (E1) <> 0,2 % (E3), así como en [0,063 % (E2) <> 0,2 % (E3)]. Esto dio como resultado la muerte de las pupas que podrían llegar a eclosionar, lo que sugiere que los porcentajes de mortalidad están sujetos de una manera muy variable en los estadios iniciales vs finales. Es así, que a pesar de que el efecto resulta eficaz al inicio del tratamiento, éste, pierde eficacia por degradación, es decir, la actividad residual para $L_1 - L_2$ fue notoria durante 4 meses con un 50 % de mortalidad para concentración más alta de PPF 0,2 % (E3) que fue del 3,3 %, en tanto, al 0,063 % (E2) se obtuvo una mayor mortalidad con un 47 %.

Al mismo tiempo, se observó que la longevidad también se vio afectada por el efecto de PPF en los estadios larvales para ambos materiales de estudio (contenedores de plástico y masonite). El desarrollo temporal normal de las larvas en comparación con las del grupo control estuvo determinado por la acción de la HJ incrementándolo. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que en algunos bioensayos, tanto en los tratamientos como en el grupo control, el porcentaje de mortalidad también pudo estar relacionado con deficiencias nutricionales, resultantes de una mala asimilación de nutrientes que alargan el tiempo de desarrollo inmaduro y aumento de la mortalidad (Arrivillaga y Barrera, 2004).

La longevidad de los estadios larvales y pupas resultó asincrónica o de forma no simultánea y se realizó un seguimiento de la duración de cada estadio larval y el día en el cual las larvas del estadio inicial pasaban a los estadios finales, es decir, que si de un número de larvas iniciales introducidas para cada réplica, una parte del total de éstas pasaban al siguiente estadio final en un periodo de días mucho más corto, el resto de las larvas rezagadas todavía seguían en el estadio inicial. De tal manera que la ecdisis ocurría en los días posteriores, o en su caso morían por el efecto del tratamiento. Por lo tanto, se valoró la longevidad de cada grupo, es decir, la duración en días de cada estadio (larvas iniciales, larvas finales y pupas), observando el promedio de la longevidad en cada uno de los bioensayos como base para el análisis estadístico de los resultados.

A modo de ejemplo, los resultados obtenidos sobre el tiempo de vida (longevidad) de los estadios larval y pupa en los contenedores de plástico (maceta), el modelo final ajustado a los datos de mortalidad se retuvo los efectos de la variable dependiente (tiempo) y las interacciones de las variables independientes, la cual registró una capacidad explicativa de la variación de los datos para cada estadio. Por lo tanto,

para los estadios iniciales no se registró diferencia significativa ($L_1 - L_2$) $R^2 = 24,93\%$ ($gl = 32$; $F = 1,79$; $p = 0,147$) y para los estadios finales ($L_3 - L_4$) la capacidad explicativa de la variación de los datos según el modelo ajustado arrojó un $R^2 = 02,92\%$ ($gl = 32$; $F = 0,16$; $p = 0,974$), en tanto para las pupas la capacidad explicativa según el modelo resultó bastante baja $R^2 = 18,98\%$ ($gl = 32$; $F = 1,26$; $p = 0,307$). Esto significó, que no existieron diferencias significativas entre concentraciones y el control, por lo cual, el promedio en días en los estadios iniciales fue más corto (cinco días), mientras que en el estadio final $L_3 - L_4$ mostró un retraso en la ecdisis de larvas a pupas (15 días). Por otro lado, el comportamiento en los 11 bioensayos (contenedores de plástico) resultó asíncrono, y se encontró picos de retraso. Este retraso del desarrollo normal larvario influyó en importantes procesos biológicos, y según estudios de (Beserra, Fernandes, y Ribeiro, 2009); (Gama, Alves, Martins, Eiras, y Resende, 2005); (Walsh, Facchinelli, Ramsey, Bond, y Gould, 2011) este aumento de la longevidad afecta factores como la capacidad de vuelo, la fecundidad de las hembras (ovoposición), el tamaño de los adultos eclosionados, la capacidad reproductiva de los machos más pequeños, la eclosión de huevos y la densidad larvaria.

5.2.2. Tablillas de Masonite[®] (tablex[®])

El sustrato de ovoposición (tablillas de masonite) es el componente de la ovitrampa que se recolecta sistemáticamente y se verifica la presencia de huevos. Por lo que, son trampas especiales para huevos que se utilizan para detectar la presencia o un nuevo asentamiento de mosquitos vectores. De esta manera, una ovitrampa de monitoreo estándar de bajo costo se puede convertir en un dispositivo de control de residualidad controlada.

El nombre de marca Masonite se le dio a un tipo de tablero duro hecho de desechos de aserradero de pino amarillo de hoja larga. El desarrollo del proceso Masonite fue motivado por el deseo de utilizar desechos de aserraderos en el sur de los EE. UU. (Suchsland, 1987). Estos paneles están hechos de madera reconstituida u otras fibras lignocelulósicas como paja, pulpa de remolacha bagazo, megasse, caña y líber, que se reducidas a fibras o haces de fibras y luego reconstituidas mediante formas especiales de fabricación (calor, vapor, presión, humedad) en tableros duros.

La masonita no es tan sensible a los cambios climáticos como la madera, además de sus distintos usos, como mencionamos se utilizan con las ovitrampas para observar la presencia de vectores y están muy difundidas como herramienta de monitoreo, pero no se utilizan como señuelos o herramientas para matar mosquitos. Las ovitrampas se utilizan comúnmente para vigilar los mosquitos Aedes que se crían en contenedores (Service, 1992). El tamaño del sustrato de oviposición no está estandarizado, aunque se ha demostrado que las superficies más amplias proporcionadas como sustratos de oviposición no dan como resultado una mayor cantidad de huevos de mosquito (Falsone, Brianti, Severini, Giannetto, y Romi, 2015).

Los resultados obtenidos en este tipo de sustrato demostraron que en larvas iniciales ($L_1 - L_2$) en la concentración $0,0063\%$ (E1) y $0,063\%$ (E2) se mantuvo una actividad

residual durante 10 meses con un 11%, en tanto en la concentración al 0,2%, la mortalidad duró hasta los 14 meses, con un porcentaje del 23,5%. En los estadios larvales finales ($L_1 - L_2$) en la concentración más baja, se obtuvo una mortalidad del 10 por ciento al inicio de los bioensayos y del 0,34% hasta el final de la prueba. En la concentración baja al 0,063%, la mortalidad empezó con un poco más del 50% llegando hasta el final de los 20 meses con menos del 10% y significó una mortalidad mucho más alta y significativa respecto a las otras dos. La concentración mas alta 0,2% (E3) obtuvo un 80% de mortalidad, disminuyendo su eficacia hasta el 6% al final de la prueba. Este comportamiento de mortalidad se intensificó a medida que las larvas abandonaban el estadio anterior, es decir, que la mortalidad en los estadios iniciales se mantuvo hasta los 10 meses, mientras que al final del estadio larval se mantuvo el porcentaje de mortalidad hasta el final del ensayo (20 meses) a las tres concentraciones.

Con respecto a las pupas, no se registraron larvas en estado de pupa en ninguna de las tres concentraciones en el primer bioensayo (B1). Posteriormente, a partir de los tres meses, se mantuvo la tasa de mortalidad del 95% al 100%, hasta los 6 meses, y a los 14 meses, la tasa de mortalidad fue más significativa en 0,0063% (E1), cuya eficacia disminuyó al final de la prueba hasta niveles muy similares al control, lo que no ocurrió en la concentración más alta, manteniendo su eficacia (90%). La tasa de mortalidad más alta observada entre los adultos emergentes fue con la concentración al 0,2%. En el grupo de control, la tasa de mortalidad no superó el 10%. Por lo cual, la acción del HJ de PPF inhibió la síntesis de quitina de las larvas durante la ecdisis, lo significa que se afectó el desarrollo larval en todas los estadios larvales, aunque de manera muy significativa en las pupas.

Por otro lado, la acción de PPF al inicio de prueba en la ovoposición y el desarrollo embrionario de los mismos al contacto con los i.a. en las tabillas de masonite sugieren que la relación ovicida entre las concentraciones aplicadas fueron efectivamente dosis-dependiente, ya que se observó menor emergencia en los formulados con porcentajes de PPF más altos. Por lo tanto, este tipo de control se enfoca en la liberación lenta de i.a. y podría ser más efectivo en la etapa de pupa - adulto afectando el tiempo de muda (longevidad) entre las diferentes etapas de las larvas. Pero por otro lado, debemos aclarar que las larvas se criaron en densidades no homogéneas en cada réplica en función del número de huevos eclosionados según la eficacia residual de las concentraciones de PPF, por lo que se ajustó la cantidad de alimento disponible en relación a la densidad larvaria. Sin embargo, se observó mayor densidad de larvas en algunos bioensayos, y el número de larvas era proporcional al número de huevos viables eclosionados.

En nuestros resultados, no se encontraron diferencias en el número de huevos puestos por hembra entre cada concentración. Esto indica que la dosis de PPF utilizados en los bioensayos no afecta el desarrollo de los huevos, ni actúan como un elemento disuasorio de la ovoposición, que está de acuerdo con los resultados de Sihuincha (2005) (Sihuincha y cols., 2005), que encontró que incluso a concentraciones muy altas de PPF (>30000 ppb) los susutratos tratados se utilizan igualmente como sitios de ovoposición con el de los controles. Contrariamente, la viabilidad de los huevos en nuestros resultados no se vio afectada al inicio de los bieonsayos o solo en el primer, 5to, 6to y 7mo bioensayo, en los restantes, no solo se vio afectado el número de huevos, sino que también afectó a

la viabilidad de los mismos, la cual como mencionamos, se fue normalizando conforme los i.a. se degradaban.

Harburguer (2014) (Harburguer, Zerba, y Licastro, 2014) sostiene que tanto la permeabilidad de los huevos a los solutos como al agua se ven afectadas a medida que pasa el tiempo desde la oviposición. La absorción de agua es rápida durante las primeras dos horas y continúa a un ritmo significativo hasta pasadas las 10 horas. Esta disminución de la permeabilidad del corion del huevo está asociada con la secreción de una capa de cera (Clements y cols., 1992); (Lazzaro, Flores, Lorigan, y Yourth, 2008), y sugiere que tal vez el corion bloquee la entrada de moléculas grandes como los insecticidas e inhiba la eclosión, dado que una aplicación externa de JH o JAI sobre los huevos de moscas y polillas no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento y la morfogénesis embrionaria (Riddiford y Williams, 1967); (Truman y Riddiford, 1999). Aunque, sólo Naqvi y cols. (1976) (Naqvi, Rashid, y Ashrafi, 1976) encontró una inhibición de la eclosión de huevos tratados en *Ae. aegypti*, con un formulado comercial de metopreno, esta inhibición se produjo después de la exposición continua durante siete días y osciló entre el 13 % y el 79 %.

Las poblaciones de *Ae. albopictus* que se desarrollan en condiciones naturales se ven influidos por la disponibilidad de recursos que disponen las larvas, así como la competencia intra e interespecífica y las condiciones ambientales que pueden afectar a la fecundidad, por el contrario en condiciones óptimas de laboratorio *Ae. albopictus* tiene una media de 40 a 85 huevos por toma de sangre para el primer ciclo gonotrófico y tiene una fecundidad promedio de por vida de 300 – 345 huevos (Hawley, 1988). Los estudios de laboratorio han encontrado que la limitación de alimento larval reducirá el tamaño adulto (Mori y cols., 1979), un rasgo que sí se relaciona con la producción de huevos (Blackmore y Lord, 2000).

En nuestro estudio la dichas variables que pudieron influenciar en el desarrollo normal de las larvas es afectado solamente por el efecto del i.a. (IGR) de las concentraciones, ya que el alimento y las condiciones de competencia intra e interespecíficas fueron casi nulas, al tratarse de un número de 30 larvas en el caso de la prueba de contenedores de plástico (macetas), éstos no encontraron competencia por la disponibilidad de recursos. Al contrario, en los bienosayos de la prueba masonite, sí existió una competencia limitante de la disponibilidad del alimento, o como mayor variable limitante en el desarrollo larval puede suponerse que, la cantidad y oxigenación del agua contenida en las placas de Petri utilizadas para el desarrollo de las larvas, ya que se procedía a cerrarlas con el objetivo de evitar la salida imperceptible de de adultos cuando las pupas podrían ser viables, es decir, se debía evitar que algún individuo que ya estando en la fase pupa y pueda emerger y que además tenga una capacidad de vuelo normal pueda establecerse en el entorno natural fuera de la colonia, por el mismo hecho de la limitante en las condiciones del insectario donde fue establecida la colonia de mosquitos, ya que no cuenta con las normas establecidas de bioseguridad Nivel 3.

En nuestro estudio, la reducción de la fecundidad y la fertilidad de *Ae. albopictus* en la siguiente generación, pudo ser debido a la presencia de PPF, imitando la acción de JH en un momento en que no debería estar presente, afectando a la vitelogénesis o algún otro paso en la ovogénesis (Harburguer y cols., 2014) Algunos otros trabajos han

demostrado que el tratamiento de las larvas con dosis subletales de diferentes IGR tiene efectos sobre la fecundidad (aumento o disminución en el número de huevos puestos) y la fertilidad (reducción de la eclosión o la viabilidad de los huevos) en *Ae. aegypti* y otros culícidos (Miura, Schaefer, Takahashi, y Mulligan 3rd, 1976); (Fournet, Sannier, y Monteny, 1993). Braga (2005) (Braga, Mello, Peixoto, y Valle, 2005) no encontró diferencias entre el número de huevos puestos por las hembras de *Ae. aegypti* que sobrevivieron a un tratamiento con Metopreno (en dosis de EI₅₀ y EI₉₀) y las hembras de control; tampoco se observó una reducción en la viabilidad de los huevos.

En los análisis de la aparición de la segunda generación de adultos y su capacidad para volar dependió de cada concentración y de su eficacia a lo largo del tiempo y se observó que hasta los cinco a seis meses ningún adulto eclosionó en ambas pruebas, además, la mayoría de adultos eclosionados fueron machos. Posteriormente, a partir de los 24 meses (contenedores de plástico) 17 meses (masonite) postratamiento la eclosión de adultos fue evidente en las concentraciones al 0,0063 % (E1) y 0,063 % (E2) y la proporción de la capacidad de vuelo fue más notoria en E1, con porcentajes más altos en los machos. En cambio para PPF al 0,2 % (E3) la eclosión de adultos y su capacidad de vuelo se vio afectada casi al 100 % en todos los bioensayos.

Para los mosquitos, volar es fundamental para su supervivencia, la dispersión de su población con la consecuente transmisión de enfermedades. Por lo tanto, la cobertura de los criaderos se puede aumentar mediante el uso de mosquitos adultos como portadores de microcápsulas insecticidas que se propagan por sí mismas y matan a las larvas. En este método, los mosquitos que contienen partículas de larvicida se adhieren al cuerpo del insecto y luego realizan la transferencia horizontal a criaderos limpios antes de viajar a estos sitios para realizar la ovoposición. Es así, que partir de los resultados de las investigaciones de laboratorio de Itoh (1994) ((Itoh, 1994)) se descubrió que las hembras de *Ae. aegypti* alimentadas con sangre que habían sido forzadas a entrar en contacto con superficies tratadas con el IGR PPF, transportaban cantidades suficientes del IGR para interrumpir el desarrollo de las larvas en los lugares de ovoposición no tratados.

Por lo tanto, la capacidad de vuelo o potencial de vuelo en individuos de *Ae. albopictus* expuestos a bajas dosis de PPF puede ser un indicador del éxito de la autodiseminación de biocidas, ya que el vuelo juega un papel importante en la biología de apareamiento de esta especie. En la literatura, se ha informado que los mosquitos vuelan entre 50 m y 50 km, según diversas condiciones y especies. Los especímenes del género *Aedes* generalmente se clasifican como voladores débiles (<50 m) o voladores fuertes (>4000 m) ((Verdonschot y Besse-Lototskaya, 2013)). En *Ae. albopictus*, otra especie invasora, se informó que volaba 75 m en un estudio utilizando diversas metodologías, siendo la más utilizada la marcación, liberación y recaptura (MRR), aunque generalmente se considera un volador débil, mientras que en otras especies, los adultos volaban regularmente más de 250 m ((Marini y cols., 2010)); ((Vavassori, Saddler, Müller, y cols., 2019)).

Otra variable de estudio se refirió a la capacidad de ingestión de sangre de aquellos adultos eclosionados tratados. Diversos estudios han llegado a la conclusión de que la proteína es la principal, si no exclusiva, fuente de nutrientes en la sangre, que es

necesaria para la ovogénesis. Las hembras requieren sangre ingerida para completar el desarrollo del folículo ovárico, que permanece en un estado de suspensión ((Clements y cols., 1992)). Como se mencionó en los resultados obtenidos, las hembras emergidas de los tratamientos de ambas pruebas, en la concentración 0,2 % (E3) eran incapaces de realizar toma de sangre, o bien se realizaba en varios intentos de tomas en distintos días, inclusive se les proporcionaba sangre humana (introducción de la mano o el brazo a las cajas de cría).

Después de la observación de la ingesta de sangre, la cual se comprobaba a simple vista por la hinchazón del abdomen, las hembras no tenían la capacidad de realizar la ovoposición pasado el tiempo necesario para la ovogénesis y consecuentemente llegaban a morir. A estas hembras, se les introdujo machos no tratados, a una razón de 10 por hembra tratada. Para observar si este factor influía o podría tener algún efecto que pueda suponer que una hembra tratada en condiciones de campo podría ser fecundada por un macho no tratado y pueda producirse la ovoposición normal. En esta observación se encontró que las hembras tratadas y machos tratados eclosionados de la concentración más baja (E1), en ambas pruebas, no fu necesario introducir machos adicionales para cada hembra, ya que como se mencionó en los últimos bioensayos, sobre todo en E1 los machos sobrevivientes a los tratamientos eran suficientes para cada hembra emergida. En cambio para la concentración mas alta (E3) se debió introducir machos adicionales para la copula, ya que solo emergieron un numero de uno o dos adultos hembras por replica. En la concentración mas baja 0,0063 % (E1) las hembras supervivientes de los tratamientos, tanto en los contenedores de plastico (macetas), como en masonite, la ingesta de sangre y la posterior oviposición fueron normales en el último bioensayo, de modo que fueron similares a los controles.

Por lo tanto, la eclosión de hembras en condiciones de ser alimentadas, es decir las que tuvieron una capacidad de vuelo normal [h(vl)] no superó el 3% de hembras en todos los bioensayos, de las cuales el 100 % de las mismas realizó la ingestión de sangre. En las hembras alimentadas el porcentaje de huevos / hembra fue dosisdependiente. El total de hembras eclosionadas, a diferencia de la concentración más alta 0,2 %, tuvieron una capacidad de vuelo normal, se alimentan de sangre y ponen huevos.

Posteriormente a la ingestión de sangre, se analizó la ovoposicion. La exposición de las larvas a las tres concentraciones de PPF podría suponer que afectó al desarrollo del óvulo y por ende a la producción de huevos de las hembras, reduciendo su eclosión. Diversos estudios han llegado a la conclusión de que la proteína es la principal (si no exclusiva) fuente de nutrientes en la sangre que es necesaria para la ovogénesis. Como hemos mencionado, las hembras requieren sangre ingerida para completar el desarrollo del folículo ovárico, que permanece en un estado de suspensión (Clements y cols., 1992). Nuestros resultados mostraron que la tasa de eclosión observada en los últimos bioensayos de hembras en condiciones de ser alimentadas h(vl) no fue significativamente alta en ambos materiales, el 100 % de las cuales realizó la ingestión de sangre, y ovopositaron un promedio aproximado de 40 huevos / hembra (contenedores de plástico) y 135 huevos/hembra (masonite), es decir, el número de huevos depositados se triplicaba a medida que los i.a. se degradaban y se observó inhibición de la eclosión, sobre todo en la concentración al 0,2 % (E3). Por lo que, a diferencia de los insecticidas piretroides neurotóxicos convencionales, PPF no es un adulticida eficaz, pero afecta a

la hormona juvenil y ecdisteroides que son hormonas de muda y sexuales, que parecen inhibir la fecundidad de los mosquitos adultos y la posterior fertilidad de los huevos depositados (Sihuincha y cols., 2005), inclusive Ohashi (2012) (Ohashi y cols., 2014) mostró que la exposición a red de polietileno tratado con 0,1 % (35 mg/ai/m²) y 0,01 % de PPF dio lugar a la esterilización completa de *An. gambiae* durante al menos un ciclo gonotrófico. A diferencia de los insecticidas piretroides neurotóxicos convencionales, PPF no es un adulticida eficaz, pero afecta a la hormona juvenil y ecdisteroides que son hormonas de muda y sexuales, que parecen inhibir la fecundidad de los mosquitos adultos y la posterior fertilidad de los huevos depositados ((Sihuincha y cols., 2005)).

La reducción de la fecundidad y la fertilidad de *Ae. albopitctus* observada en este estudio, podría ser debido a la presencia de PPF, imitando la acción de JH en un momento en que no debería estar presente, que afecta a la vitelogénesis o algún otro paso en la formación de los huevos ((Harburguer y cols., 2014)). Algunos otros trabajos han demostrado que el tratamiento de las larvas con dosis subletales de diferentes IGR tiene efectos sobre la fecundidad (aumento o disminución en el número de huevos puestos) y la fertilidad (reducción de la eclosión o la viabilidad de los huevos) en *Ae. aegypti* y otros culícidos ((Miura y cols., 1976); ((Fournet y cols., 1993). Braga (2005) no encontró diferencias entre el número de huevos puestos por las hembras de *Ae. aegypti* que sobrevivieron a un tratamiento con Metopreno (en dosis de EI₅₀ y EI₅₀) y las hembras de control y tampoco se observó una reducción en la viabilidad de los huevos.

Un estudio similar al nuestro Harburguer (2014) (Harburguer y cols., 2014)) que se realizó con larvas tardías con dosis subletales de PPF liberado de una formulación fumigante sobre la fecundidad, la fertilidad, y la acción ovicida en *Ae. aegypti*, mostrando que no hubo diferencias en el número de ovarioles por hembra entre el control y el grupo tratado. Esto indica que el uso de PPF a las concentraciones subletales, no interfieren con el desarrollo de los discos imaginales que se originan en las gónadas femeninas de *Ae. aegypti*, o al menos no afectan a su número. Según el autor, estos tratamientos podrían inducir un estímulo antes o en el momento de determinar el número de ovariolas. Los ovarios rudimentarios aparecen en larvas de tercer estadio, la organización de las gónadas es evidente al principio del último instar y las ovarioles sólo se diferencian en la fase de pupa. Posiblemente la aplicación de un IGR podría inducir la maduración e inhibir algunos otros ovariolas rudimentarias. En este estudio, se encontraron diferencias en el número de huevos puestos por hembra entre los grupos tratados. Esto indica que la dosis de PPF utilizados en los bioensayos no afecta el desarrollo de los huevos, ni actúan como un elemento disuasorio de la ovoposición, que está de acuerdo con los resultados de Sihuincha (2005), que encontró que incluso a concentraciones muy altas de PPF (>30000 ppb), los contenedores tratados se utilizan igualmente como sitios de ovoposición que los controles.

A diferencia de estos estudios, la viabilidad de los huevos en nuestros resultados no se vio afectada o solo en el primer, 5to, 6to y 7mo bioensayo, en masonite y en los restantes bioensayos no solo se vio afectado el número de huevos puestos en cada bioensayo, sino que también afectó a la viabilidad de los mismos, la cual se fue normalizando conforme el principio activo se degradaba, por lo cual podrían estar de acuerdo a los resultados obtenidos a los estudios mencionados como ejemplo anteriormente.

5.3. Efecto de Piriproxifeno en las malformaciones morfogénéticas de *Aedes albopictus*

El efecto de PPF sobre la morfología de *Aedes albopictus* sobre los estadios inmaduros y las pupas tubo un efecto inhibitor de la ecdicis de larvas iniciales a larvas finales a pupa, con % IE aceptables. De acuerdo con nuestros resultados se observó casos de incompleta pupación (pre – pupa), pupas blancas, pupas melanizadas y pupas con adulto interno. Estas las aberraciones morfogénéticas ocurridas en los diferentes estadios muertos presentaron algunos grupos de anomalías similares a los inducidos por la HJ, sus análogos y miméticos (Arias y Mulla, 1975). De acuerdo a la clasificación de Yodbustra et al., (1985) (Yodbustra y cols., 1985) se encontró, que las tasas de mortalidad porcentual eran significativamente distinta en el grupo de pupa melanizada (en ambas pruebas), las cuales fueron en mayor proporción en las tres concentraciones. Las menores tasas de mortalidad se observó en pre – pupas y se observó mudadas parciales con el exoesqueleto larvario todavía unido a la parte caudal. Otro porcentaje menor se observó en los adultos parcialmente emergidos (pupas elefantoides) y en un porcentaje muy reducido casi nulo se observó en pupas con adulto visible, es decir, como adulto farado (denominación utilizada cuando las estructuras del adulto son visibles a través del tegumento de la pupa) que se dice del adulto que ya ha sufrido apólisis (su cutícula no está más unida a la cutícula de la pupa) pero aún se encuentra cubierto por la cutícula pupal, los cuales, como se mencionó anteriormente, eran incapaces de experimentar un vuelo normal o completar los parámetros de alimentación, cópula y ovoposición para la siguiente generación.

En larvas, la mayor tasa de las malformaciones se observó en los estadios larvales finales ($L_3 - L_4$) en ambas pruebas, en cambio los estadios iniciales ($L_1 - L_2$) no presentaron ninguna formación de proyecciones bulbosas como ocurrió en larvas finales, donde se encontró una formación bulbosa transparente. Las larvas de una forma intermedia entre larva y pupa denominada pre-pupa, presentaron la forma de la cabeza sin desarrollar, sin los sifones respiratorios y el tórax seguía teniendo setas con la ecdicis incompleta o con la exuvia restante del estadio anterior (L_4). Estas deformidades morfológicas en L_4 , como cutículas negras y pigmentadas en el cefalotórax y el abdomen de las pupas podría deberse a una melanización cuticular anormal, debido a la inhibición del mecanismo de síntesis de quitina. La mayoría de larvas resultaron con características de color transparente con interrupciones y cortes de la región posterior del abdomen y la región anterior del cefalotórax, algunas con reducción del tamaño del mismo, pudiendo sufrir una falla ecdisial entre el estadio L_3 y L_4 -final. Con lo cual, se podría atribuir la mayor mortalidad en las larvas finales y no así en las larvas iniciales. Por lo tanto, las aberraciones comúnmente observadas de las larvas tratadas fueron el oscurecimiento y la cutícula contraída de las papilas anales (Fig. 5.7).

Algunas de las larvas de (L_4) que mudaban a a al siguiente estadio de pupa se agruparon en intermedios larva – pupa (pupas larviformes o pre – pupas). La mayoría de las malformaciones exhibieron piel y características pupales de color albino y exuvias

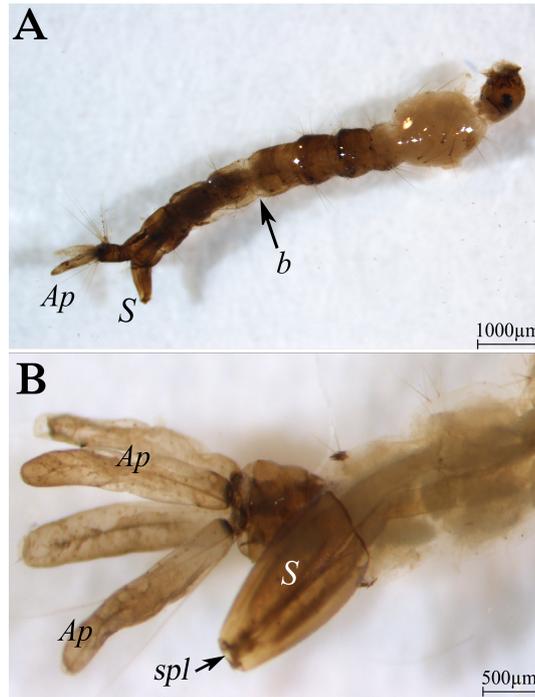


Figura 5.7: Efectos de PPF en la morfología del cuarto estadio (L_4). (A)= estadio larvario $L_3 - L_4$. Las deformidades morfológicas incluyen: a= cepillo y cabeza de alimentación deformados; b= tracto digestivo interrumpido, lumen intestinal interrumpido; d= cutículas negras y sin pigmento en el tórax; Ap= papilas anales pigmentadas y negras (B)= segmento terminal de larva L_4 , muestra: Ap= papilas anales deformadas; S= sifón; spl= lóbulo perispiracular deformado

larvarias en la región posterior del abdomen y la región anterior del cefalotórax, se observó completamente sin melanitis, excepto por los pigmentos oculares. No están completamente fuera del exoesqueleto larvario y todas las características externas son larvales, pero la forma pupal está ligeramente formada y contenida dentro del anterior exoesqueleto larvario, muriendo antes del endurecimiento y el oscurecimiento de la cutícula. En casi todos los casos, el abdomen se mantenía en una posición anormalmente de “coma”. En la Figura 5.8, se observa una pre – pupa con el cefalotórax deformado en la que se ha escapado incompletamente de la cutícula larvaria y que permanece en la región abdominal posterior dentro y con restos del esqueleto de la cabeza de la larva. Wright (1976) (Wright y Jones, 1976) sostuvo que aberraciones como (larva – intermedio pupal) es un verdadero efecto de la hormona juvenil (JH).

Syafruddin (1990) (Syafruddin, s.f.) sugiere que en general las alteraciones morfológicas en el estadio pre - pupa relacionado con concentraciones bajas y la duración del tratamiento con PPF producen una posible pirólisis de las células, como consecuencia no se produce una cutícula larval bien estructurada propia de cuarto estadio ya que las células epidérmicas podrían estar vacuoladas, manteniendo la cutícula del anterior estadio larval, evitando así la formación de la nueva cutícula y vacuolación epidérmica, también relaciona a PPF a efectos hitopatológicos en el intestino medio, los túbulos de Malpighi e interrupción de la mitocondria, observándose vacuolas y organelas de laminoplasma pobremente estructuradas. En nuestras observaciones se podría esperar que podrían diferir por el tiempo de duración del tratamiento y mas

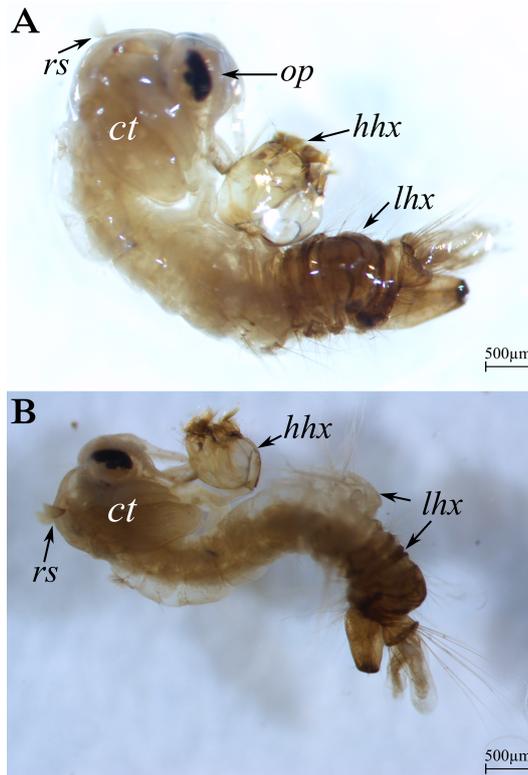


Figura 5.8: (A)= pre - pupa no completamente fuera del exoesqueleto larvario (lhx) y con restos del exoesqueleto de la cabeza pupal (hhx), la pupa se escapa incompletamente del exoesqueleto larvario, pero permanece sin melanizar a excepción de los pigmentos oculares (op). (B)= el cefalotórax deformado en la que se ha escapado incompletamente de la cutícula larvaria y que permanece en la región abdominal posterior dentro y con restos del esqueleto de la cabeza de la larva. ct= cefalotórax; rs= sifones respiratorios

aún del porcentaje del i.a., sin embargo en nuestros resultados ocurrían aberraciones similares (Fig. 5.9) ya sea en la concertación de PPF mas baja como en la más alta.

Las aberraciones encontradas en los adultos fueron las (CAV)= pupas con adulto visible, que eclosionaban solo con la parte anterior del cuerpo, pero todo el abdomen todavía permanecía dentro de la exuvia pupal, las partes de la boca y las piernas estaban pegadas al cuerpo; (APE)= adultos parcialmente emergidos, con las alas arrugadas o alguno o todos los tarsos pegadas a la exuvia. Otra ocurrencia frecuente y común fue el fracaso de los adultos para eclosionar por completo. Estos adultos parcialmente eclosionados fueron incapaces de volar por el anormal desarrollo de las alas las cuales estaban todavía arrugadas (ya sea un ala o ambas), las partes de la boca encrespadas y aprisionadas al cuerpo así como las patas aparentemente pegadas. En el proceso de eclosión, estos adultos no podían eclosionar con éxito de la piel de pupa. En general, los adultos eclosionaban parcialmente o casi por completo, esta característica también fue un fenómeno bastante común. Los adultos con este tipo de alas deformes eran incapaces de volar, y murieron en la superficie del agua.

Por otra parte, en la concentración 0,0063% (E1) a medida del paso del tiempo y la consiguiente perdida de eficacia de PPF las malformaciones en pupas y adultos



Figura 5.9: C= pupa elefantoide, Este grupo están las pupas que pudieron salir completamente del exoesqueleto larvario pero permanecieron sin melanizar, excepto por los pigmentos oculares. D= pupa con adulto visible



Figura 5.10: Pupa con adulto parcialmente emergido

parcialmente emergidos fueron en menor porcentaje, sobretodo en los dos últimos bioensayos en las tablillas de masonite (tablex) contrastándose a tasas de eclosión normal muy semejantes al grupo control y los adultos sobrevivientes eclosionados no tenían ninguna dificultad en su ciclo normal gonotrófico para la generación F2. En cambio, en la concentración de PFF más altas 0,2% (E3) las malformaciones continuaban teniendo un efecto en el ciclo gonotrófico y los adultos sobrevivientes no tenían capacidad de vuelo normal y las pocas hembras eclosionadas eran incapaces de alimentarse de sangre y por consiguiente realizar la copula y/o ovoposición.

Capítulo 6

Conclusiones

6.1. Prueba I

Se ha analizado la eficacia de pinturas insecticidas suplementadas con piriproxifeno contra el mosquito *Aedes albopictus* bajo condiciones controladas de laboratorio con contacto forzado. Tres formulados que contienen diferentes ingredientes activos se combinaron con PY, OP y PPF. Éstos formulados insecticidas acordes a la tecnología de microencapsulación Inesfly[®] se evaluaron frente a la eficacia de controles sin productos químicos añadidos. Después de aplicar las pinturas en dos concentraciones, se ensayaron en dos superficies. Se realizaron 11 bioensayos durante 27 meses después de una sola aplicación inicial. Se utilizaron hembras adultas nulíparas sin ingestión de sangre para determinar el efecto knock-down (KD) en los primeros 30 minutos, y la tasa de mortalidad del 50 % de los individuos (la media), es decir, el tiempo para alcanzar el 50 % de mortalidad (TD₅₀) hasta las 72 horas. Por lo tanto, incluso después de 27 meses de una sola aplicación inicial, los resultados mostraron una alta mortalidad. Reafirmar la efectividad y residualidad de PY (5A NG IRG) vs OP (5A IGR y 5D IGR), nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

- El tipo de superficie condicionó la probabilidad del efecto KD según la concentración. Sin embargo, la eficacia de los formulados basados en piretroides no estuvo condicionada por el tipo de superficie o concentración, y mantuvieron su residualidad hasta 27 meses después de un solo tratamiento.
- El efecto KD fue significativamente mayor con piretroides (5A NG IGR) vs organofosforados (5A IGR y 5D IGR), independientemente del tipo de superficie o concentración aplicada. La interacción entre el tipo de superficie y los formulados, supuso una notable variación de la eficacia en el efecto KD. Incluso si el formulado se basa únicamente en un organofosforado (diazinón), la probabilidad de KD aumentó cuando la superficie fue más porosa.
- El TD₅₀ resultó ser mucho más rápido si se duplica la concentración y es aplicada en una superficie más porosa, condicionada con la presencia de piretroides.

- Para la residualidad, el coeficiente del modelo indicó que el TD₅₀ fue mayor para una superficie más porosa. Este condicionamiento fue afirmado por el tipo de superficie y la contracción, pero no por el tipo de ingredientes activos.
- El efecto de la superficie sobre el TD₅₀ varió en función a la concentración y el tipo de formulado (5A NG IGR > 5A IGR y 5D IGR)
- La degradación de los ingredientes activos estuvo relacionada con el tipo de formulado, por lo que la combinación de dos insecticidas en base a organofosforados no garantiza las propiedades residuales en comparación con el contenido en base a piretroides, independientemente de la superficie o concentración aplicada. Los piretroides presentaron mayor residualidad (2%) de disminución estimada vs 44,5 -73,2% que en los organofosforados).

6.2. Prueba II

Para el análisis de el IGR piriproxifeno en dos tipos de sustratos, se probó la eficacia de distintas concentraciones emulsionables (0,0063%, 0,063% y 0,2%) y se compararon entre si y con un control con resultados por triplicado. Los parámetros de estudio, fueron la eficacia de la mortalidad acumulada contra larvas y pupas, el porcentaje de la inhibición de emergencia (%IE), el efecto de la hormona juvenoide (HJ) contenida en las tres concentraciones y su relación con las consecuentes alteraciones morfológicas ocurridas en los estadios larvarios, pupas y adultos emergidos y la consiguiente alteración del ciclo gonotrófico normal de la siguiente generación. Las conclusiones son las siguientes.

- En los contenedores de plástico, la mortalidad ocurrió con mayor acusación en las larvas en estadios iniciales (L₁ - L₂) en concentraciones de piriproxifeno más moderada-baja (0,0063% y 0,063%). En sustratos para ovitrampas masonite, la mortalidad de larvas iniciales no fue significativamente diferente entre concentraciones bajas o más altas.
- La eficacia residual resultó significativamente distinta en relación a la variable tiempo (meses). La degradación de los ingredientes activos se degradaron paralelamente en las tres concentraciones.
- El efecto de la HJ de PPF en las tres concentraciones afectó a los adultos emergidos a lo largo de toda la prueba (0,2% > 0,0063% y 0,063%), y confirmó la letalidad de la concentración al 0,2%.
- La ovogénesis se vio más afectada cuando la concentración de piriproxifeno fue la más alta.
- Se ha confirmado que la mortalidad ocurre principalmente en la etapa de pupa. En ambos sustratos independientemente de la concentración, las alteraciones morfológicas se atribuyeron a las pupas melanizadas y en menor proporción las pupas con adulto visible y con adultos parcialmente emergidos.

6.3. Recomendaciones

De acuerdo a estas consideraciones, la base de las estrategias de control integral debe ser decisiva, especialmente en los países en desarrollo, ya que la comunicación y las evaluaciones de los cambios en el comportamiento social sobre las enfermedades transmitidas por vectores están aumentando constantemente, y las nuevas metodologías para el control y la gestión de los programas del IRS están ganando aceptación (Kebede, Abebe, Alemayehu, Sudhakar, y Birhanu, 2020). Se podría investigar el uso de metodologías para la microencapsulación de insecticidas que sean más sostenibles para el medio ambiente o el uso de nanopartículas que contengan insecticidas (Norris y cols., 2020), ya sea de base química o biológica.

Finalmente, para diferentes formulados que contengan i.a. insecticidas, IGR o su combinación, podríamos sugerir que se deben realizar evaluaciones a largo plazo de las poblaciones de mosquitos *Aedes* en condiciones de semi-campo y campo, y así complementar los programas de control en áreas de alto riesgo epidemiológico como América Latina o África, e incluir otras especies de vectores (leishmaniasis). Las PI podrían convertirse en una herramienta adicional eficaz para el control de *Ae. albopictus*, ya que los formulados con mezclas de ingredientes insecticidas con mayor disposición controlada residual de los i.a. proporcionan una mayor eficacia en los estadios inmaduros y los adultos. También se deberían aplicar i.a. microencapsulados, tanto los polímeros como las emulsiones en otro tipo de superficies (concreto, adobe, metal...), realizando bioensayos en base a nuevos formulados con tecnología Inesfly[®] en condiciones de semi-campo y campo, y en áreas donde ésta especie de mosquito ya se haya establecido.

Otros factores no menos importantes, podrían aportar mejor comprensión en cuanto a la ovoposición o desarrollo larval realizando estudios relacionados con mosquitos adultos (hembras núlparas, hembras grávidas, hembras alimentadas con sangre, hembras con o sin ingestión de sangre y machos adultos), esto con el objetivo analizar la autodiseminación de los i.a. de las a los diferentes sitios de cría, ya sea urbano o periurbano, y realizar estudios de los formulados Inesfly[®] con otras especies de mosquitos no transmisores de enfermedades endémicas en España, que son perjudiciales tanto para la población humana como para la ganadería. Estas sugerencias en la aportación del análisis de diferentes biocidas con degradación lenta, podrían contribuir a mejorar la comprensión de la resistencia de los insecticidas microencapsulados en esta especie de mosquito o en otras, y los bioensayos tanto de laboratorio como de campo (ovitrampas) que en su composición contengan insecticidas microencapsulados, podrían ser comparados con biocidas de origen no químico, como los extractos vegetales, IGR no químicos y otros que tengan un impacto nulo a otras especies no objetivo y sean amigables con el medio ambiente.

RECONOCIMIENTO Este estudio ha sido financiado por el Proyecto SGI Número 218304 del Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad de la Diputación General de Aragón y la Obra Social y Cultural de Ibercaja. Fue parcialmente apoyado por el Grupo de Investigación Fondos del Gobierno de Aragón

(A05-17R).

Referencias

- Abbot, W. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925. *J Am Mosq Control Assoc*, 3(2), 302–3.
- Abbott, W. S., y cols. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265–267.
- Abramides, G. C., Roiz, D., Guitart, R., Quintana, S., Guerrero, I., y Giménez, N. (2011). Effectiveness of a multiple intervention strategy for the control of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(5), 281–288.
- Acharya, B., Ahirwar, R., Dhiman, S., Yadav, K., Pandey, P., y Sukumaran, D. (2021). Deltamethrin microencapsulation in emulsion paint binder and its long-term efficacy against dengue vector *Aedes aegypti*. *Frontiers in Public Health*, 9, 686122–686122.
- Achudume, A. (2012). Insecticide. En *Insecticides-pest engineering*. IntechOpen.
- Adams, H. R., y cols. (2001). *Veterinary pharmacology and therapeutics*. (n.º Ed. 8). Iowa state university press.
- Aguirre-Obando, O. A., Martins, A. J., y Navarro-Silva, M. A. (2017). First report of the phe1534cys kdr mutation in natural populations of *Aedes albopictus* from Brazil. *Parasites & Vectors*, 10(1), 1–10.
- Ajayi, O. O., Idowu, O. A., Sam-Wobo, S. O., Eromosele, I. C., y Eniola, K. I. (2020). Assessment of an insecticidal paint for malaria control. *International Journal of Infection*, 7(2).
- Akaike, H. (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. En *Proc. 2nd international symposium on information theory, 1973* (pp. 267–281).
- Alarcón-Elbal, P. M., Delacour-Estrella, S., Collantes, F., Delgado, J. A., Ruiz-Arrondo, I., Pinal-Prieto, R., ... others (2013). Primeros hallazgos de *Aedes (stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) en la provincia de Valencia, España/first findings of *Aedes (stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) in the province of Valencia, Spain. En *Anales de biología* (p. 95).
- Alarcón-Elbal, P. M., Estrella, S. D., Arrondo, I. R., Collantes, F., Iniesta, J. A. D., Morales-Bueno, J., ... others (2014). Updated distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Spain: new findings in the mainland Spanish Levante, 2013. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109, 782–786.
- Alarico, A. G., Romero, N., Hernández, L., Catalá, S., y Gorla, D. (2010). Residual effect of a micro-encapsulated formulation of organophosphates and piriproxifen on the mortality of deltamethrin resistant *Triatoma infestans* populations in rural houses of the Bolivian Chaco region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105,

752–756.

- Alzogaray, R., Fontan, A., y Zerba, E. (1997). Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (hemiptera: Reduviidae). *Archives of insect biochemistry and physiology*, 35(3), 323–333.
- Amelotti, I., Catalá, S. S., y Gorla, D. E. (2009). Experimental evaluation of insecticidal paints against triatoma infestans (hemiptera: Reduviidae), under natural climatic conditions. *Parasites & vectors*, 2(1), 1–7.
- Aranda, C., Eritja, R., y Roiz, D. (2006). First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and veterinary entomology*, 20(1), 150–152.
- Arias, J., y Mulla, M. (1975). Morphogenetic aberrations induced by a juvenile hormone analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 12(3), 309–316.
- Arrivillaga, J., y Barrera, R. (2004). Food as a limiting factor for *Aedes aegypti* in water-storage containers. *Journal of vector ecology*, 29(1), 11–20.
- Arthur, F. H., Liu, S., Zhao, B., y Philips, T. W. (2009). Residual efficacy of pyriproxyfen and hydroprone applied to wood, metal and concrete for control of stored-product insects. *Pest management science*, 65(7), 791–797.
- Avignone-Rossa, C., y Mignone, C. (1995). *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity—basic applied considerations molecular biotechnology 4: 55–71 [https://doi.org/10.1007. BF02907471](https://doi.org/10.1007/BF02907471).
- Axtell, R., Rutz, D., y Edwards, T. (1980). Field tests of insecticides and insect growth regulators for the control of *Culex quinquefasciatus* in anaerobic animal waste lagoons. *Mosquito News*, 40(1), 36–42.
- Baldacchino, F., Caputo, B., Chandre, F., Drago, A., della Torre, A., Montarsi, F., y Rizzoli, A. (2015). Control methods against invasive aedes mosquitoes in Europe: a review. *Pest management science*, 71(11), 1471–1485.
- Banjara, M. R., Das, M. L., Gurung, C. K., Singh, V. K., Joshi, A. B., Matlashewski, G., ... Olliaro, P. (2019). Integrating case detection of visceral leishmaniasis and other febrile illness with vector control in the post-elimination phase in Nepal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(1), 108.
- Bank, U., WHO, y cols. (1994). Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatomíneos. *Acta Toxicol. Argent*, 29–33.
- Barceló, C., Bengoa, M., Moneris, M., Molina, R., Delacour-Estrella, S., Lucientes, J., ... others (2015). First record of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera; Culicidae) from Ibiza (Balearic Islands; Spain). *JEMCA*, 33, 1–4.
- Barratt, B. I., Colmenarez, Y. C., Day, M. D., Ivey, P., Klapwijk, J. N., Loomans, A. J., ... Zhang, F. (2021). Regulatory challenges for biological control. *Biological control: global impacts, challenges and future directions of pest management*, 166–196.
- Bates, M., y cols. (1949). The natural history of mosquitoes. *The Natural History of Mosquitoes*.
- Beehler, J., Quick, T., y DeFoliart, G. (1991). Residual toxicity of four insecticides to *Aedes triseriatus* in scrap tires. *Journal of the American Mosquito Control Association (USA)*.
- Belkin, J. N., Heinemann, S. J., y Page, W. A. (1970). The culicidae of Jamaica. En *The culicidae of Jamaica* (pp. 458–458).
- Bengoa, M., Delacour-Estrella, S., Barceló Seguí, C., Paredes Esquivel, C. C.,

- Leza Salord, M., Lucientes, J., . . . Miranda Chueca, M. Á. (2018). First record of *Aedes albopictus* (skuse, 1894)(diptera; culicidae) from minorca (balearic islands, spain). *Journal of the European mosquito control association*, 2016, vol. 34, p. 5-9.
- Bengoa, M., Eritja, R., y Lucientes, J. (2014). Ground ultra-low volume adulticiding field trials using pyrethroids against *Aedes albopictus* in the baix llobregat region, spain. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 30(1), 42–50.
- Bennett, G. W., Owens, J. M., y Corrigan, R. M. (1996). *Guía científica de truman para operaciones de control de plagas*. Advanstar Communications.
- Beserra, E. B., Fernandes, C. R., y Ribeiro, P. S. (2009). Relação entre densidade larval e ciclo de vida, tamanho e fecundidade de *Aedes (stegomyia) aegypti* (l.)(diptera: Culicidae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, 38(6), 847–852.
- Bharati, M., Saha, D., y cols. (2021). Insecticide resistance status and biochemical mechanisms involved in aedes mosquitoes: A scoping review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 14(2), 52.
- Blackmore, M. S., y Lord, C. C. (2000). The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 25(2), 212–217.
- Blagrove, M. S., Arias-Goeta, C., Failloux, A.-B., y Sinkins, S. P. (2012). Wolbachia strain w mel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 255–260.
- Bloomquist, J. R. (1996). Ion channels as targets for insecticides. *Annual review of entomology*, 41(1), 163–190.
- Bonds, J. A., Collins, C. M., y Gouagna, L.-C. (2022). Could species-focused suppression of *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito, and *Aedes albopictus*, the tiger mosquito, affect interacting predators? an evidence synthesis from the literature. *Pest Management Science*.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., y Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological reviews*, 24(2), 93–106.
- Braga, I. A., Mello, C. B., Peixoto, A. A., y Valle, D. (2005). Evaluation of methoprene effect on *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) development in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 100(4), 435–440.
- Bravo-Barriga, D., Gouveia Almeida, A. P., Parreira, R., Jiménez-Vidal, D., Pérez-Martín, J. E., Martín-Cuervo, M., y Frontera, E. (2019). Primeras detecciones de *Aedes albopictus* (mosquito tigre) en la región de extremadura, oeste de españa. *Gaceta Sanitaria*, 33, 299–300.
- Briggs, G., Elliott, M., Farnham, A., Janes, N., Needham, P., Pulman, D., y Young, S. (1976). Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. viii. relation of polarity with activity in pyrethroids. *Pesticide Science (UK)*.
- Brown, J., Williams, D., Gwinn, T., y Melson, R. (1998). Flit-gun sprayer characteristics. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 3, 322–325.
- Bueno-Marí, R., Bernués-Bañeres, A., Peris-Felipo, F. J., Moreno-Marí, J., y Jiménez-Peydró, R. (2013). American cockroach control assays in the municipal sewerage system of valencia (spain). *Polish Journal of Entomology*, 82(3), 143.
- Bueno-Marí, R., y García-Mújica, P. (2015). Establecimiento de una nueva especie invasora para la provincia de almería: el mosquito tigre, *Aedes albopictus* (skuse, 1894). *SOCIEDAD GADITANA*, 31.

- Bueno Marí, R., y Jiménez Peydró, R. (2010). Situación actual en España y eco-epidemiología de las arbovirosis transmitidas por mosquitos culícidos (diptera: Culicidae). *Revista Española de Salud Pública*, 84(3), 255–269.
- Bueno Marí, R., y Quero de Lera, F. (2021). Gestión vectorial de los casos de arbovirosis notificados en la ciudad de Valencia, España (2016-2018). *Revista Española de Salud Pública*, 95(1), e1–XX.
- Burgess, N., Cowan, G., y cols. (1993). A colour atlas of medical entomology. series 10. *A colour atlas of medical entomology. Series 10.*
- Calvitti, M., Moretti, R., Lampazzi, E., Bellini, R., y Dobson, S. L. (2014). Characterization of a new *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae)-*wolbachia pipientis* (rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the w pip strain from *Culex pipiens* (diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 47(2), 179–187.
- Campbell, C. L., Saavedra-Rodriguez, K., Kubik, T. D., Lenhart, A., Lozano-Fuentes, S., y Black IV, W. C. (2019). Vgsc-interacting proteins are genetically associated with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *PLoS One*, 14(1), e0211497.
- Cancrini, G., Di Regalbono, A. F., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., y Pietrobelli, M. (2003). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 118(3-4), 195–202.
- Cancrini, G., Romi, R., Gabrielli, S., Toma, L., Di Paolo, M., y Scaramozzino, P. (2003). First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology*, 17(4), 448–451.
- Caputo, B., Ienco, A., Cianci, D., Pombi, M., Petrarca, V., Baseggio, A., ... Della Torre, A. (2012). The “auto-dissemination” approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas.
- Caputo, B., Ienco, A., Manica, M., Petrarca, V., Rosà, R., y della Torre, A. (2015). New adhesive traps to monitor urban mosquitoes with a case study to assess the efficacy of insecticide control strategies in temperate areas. *Parasites & vectors*, 8(1), 1–12.
- Caro-Gamboa, L. J., Forero-Castro, M., y Dallos-Báez, A. E. (2020). Cholinesterase inhibition as a biomarker for the surveillance of the occupational population exposed to organophosphorus pesticides. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*.
- Carrilho, D. F. d. G. A. (2021). *Modelação da distribuição do mosquito Aedes albopictus nas principais áreas urbanas europeias* (Tesis Doctoral no publicada). Universidade de Lisboa (Portugal).
- Castro, M. J. M., y Castro, A. E. M. (2020). Microcefalia antes de la llegada del virus Zika: una revisión de tema. *Medicina UPB*, 39(1), 42–48.
- Cator, L. J., Arthur, B. J., Ponlawat, A., y Harrington, L. C. (2011). Behavioral observations and sound recordings of free-flight mating swarms of *Ae. aegypti* (diptera: Culicidae) in Thailand. *Journal of medical entomology*, 48(4), 941–946.
- Cavany, S. M., España, G., Lloyd, A. L., Waller, L. A., Kitron, U., Astete, H., ... others (2020). Optimizing the deployment of ultra-low volume and targeted indoor residual spraying for dengue outbreak response. *PLoS computational biology*, 16(4), e1007743.
- Chadee, D. D., y Beier, J. C. (1996). Natural variation in blood-feeding. *Vector Ecology*, 21(2), 150–155.
- Chandel, K., Suman, D. S., Wang, Y., Unlu, I., Williges, E., Williams, G. M., y Gaugler, R. (2016). Targeting a hidden enemy: pyriproxyfen autodissemination strategy

- for the control of the container mosquito *Aedes albopictus* in cryptic habitats. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(12), e0005235.
- Chaves, L. F., Harrington, L. C., Keogh, C. L., Nguyen, A. M., y Kitron, U. D. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured? *Frontiers in zoology*, 7(1), 1–11.
- Chen, A. C., y Mayer, R. T. (1985). Insecticides: effects on the cuticle. *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology/executive editors, GA Kerkut, LI Gilbert*.
- Chiappetta, D. (2006). *Microencapsulación de medicamentos, cátedra de farmacotecnia i, facultad de farmacia y bioquímica, universidad de buenos aires, argentina*.
- Clements, A. N. (2013). *The physiology of mosquitoes: International series of monographs on pure and applied biology: Zoology, vol. 17* (Vol. 17). Elsevier.
- Clements, A. N., y cols. (1992). *The biology of mosquitoes. volume 1: development, nutrition and reproduction*. Chapman & Hall.
- Clements, A. N., y cols. (1999). *The biology of mosquitoes. volume 2: sensory reception and behaviour*. CABI publishing.
- Collantes, F., Delacour, S., Alarcón-Elbal, P. M., Ruiz-Arrondo, I., Delgado, J. A., Torrell-Sorio, A., ... others (2015). Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004–2014: known distribution and public health concerns. *Parasites & vectors*, 8(1), 1–11.
- Collantes, F., Méndez, M. J., Soto-Castejón, C., y Muelas, E. M. (2020). Consolidation of *Aedes albopictus* surveillance program in the autonomous community of the region of Murcia, Spain. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 4173.
- Corrêa, A., Galardo, A., Lima, L., Câmara, D., Müller, J., Barroso, J., ... others (2019). Efficacy of insecticides used in indoor residual spraying for malaria control: an experimental trial on various surfaces in a "test house". *Malaria Journal*, 18(345).
- Cosgrove, J., Wood, R., Petric, D., Evans, D., y Abbott, R. (1994). A convenient mosquito membrane feeding system. *Journal of the American Mosquito Control Association (USA)*.
- Curcó, N., Giménez, N., Serra, M., Ripoll, A., García, M., y Vives, P. (2008). Picaduras de mosquito tigre. percepción de la población afectada tras el establecimiento de *Aedes albopictus* en España. *Actas Dermosifiliogr. 2008 Nov; 99 (9): 708-13.*, 99(9), 708–713.
- Dabiré, K., Diabaté, A., Namountougou, M., Djogbenou, L., Wondji, C., Chandre, F., ... others (2012). *Trends in insecticide resistance in natural populations of malaria vectors in Burkina Faso, West Africa: 10 years' surveys*. InTech.
- Davis, T. J., Kaufman, P. E., Tatem, A. J., Hogsette, J. A., y Kline, D. L. (2016). Development and evaluation of an attractive self-marking ovitrap to measure dispersal and determine skip oviposition in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) field populations. *Journal of medical entomology*, 53(1), 31–38.
- Deichmeister, J. M., y Telang, A. (2011). Abundance of West Nile virus mosquito vectors in relation to climate and landscape variables. *Journal of Vector Ecology*, 36(1), 75–85.
- Delacour, S., Oropeza, V., Estrada, R., Lucientes, J., Yako, A., Hassan, S., ... Mateo, P. (s.f.). New deployment of transfluthrin effects into a long-lasting insecticide paint formulation with dual action.

- Delacour Estrella, S., Barandika, J. F., García-Pérez, A. L., Collantes, F., Ruiz Arrondo, I., Alarcón Elbal, P. M., ... others (2015). Detección temprana de mosquito tigre, *Aedes albopictus* (skuse, 1894), en el país vasco (españa). *Anales de Biología*, 37, 2015.
- Delacour-Estrella, S., Collantes, F., Ruiz-Arrondo, I., Alarcon-Elbal, P. M., Delgado, J. A., Eritja, R., ... others (2014). Primera cita de mosquito tigre, *Aedes albopictus* (diptera, culicidae), para andalucía y primera corroboración de los datos de la aplicación tigatrapp. En *Anales de biología* (pp. 93–96).
- Delacour-Estrella, S., Ruiz-Arrondo, I., Alarcón-Elbal, P. M., Bengoa, M., Collantes, F., Eritja, R., y cols. (2016). Primera cita del mosquito invasor *Aedes albopictus* (diptera, culicidae) en aragón: confirmación de su presencia en huesca capital. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 58, 157–158.
- Delatte, H., Desvars, A., Bouétard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., y Fontenille, D. (2010). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of chikungunya on la réunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(3), 249–258.
- DeRaedt Banks, S., Orsborne, J., Gezan, S., Kaur, H., Wilder-Smith, A., Lindsey, S., y cols. (2015). Permethrin-treated clothing as protection against the dengue vector, *Aedes aegypti*: Extent and duration of protection. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10), e0004109.
- Devine, G. J., Perea, E. Z., Killeen, G. F., Stancil, J. D., Clark, S. J., y Morrison, A. C. (2009). Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11530–11534.
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., y Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysterioid and juvenile hormone activity. *Annual review of entomology*, 43(1), 545–569.
- Dias, Í. K. R., Martins, R. M. G., Sobreira, C. L. d. S., Rocha, R. M. G. S., y Lopes, M. d. S. V. (2022). Education-based *Aedes Aegypti* control actions: an integrative review. *Ciência & Saúde Coletiva*, 27, 231–242.
- Dias, J. C. P., y Jemmio, A. (2008). Sobre uma pintura inseticida para o controle de *Triatoma infestans*, na bolívia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41, 79–81.
- Dieng, H., Saifur, R., Hassan, A., Salmah, M., Boots, M., y cols. (2010). Indoor-breeding of *Aedes albopictus* in northern peninsular malaysia and its.
- Diniz, A. (s.f.). Documentário científico: reconhecimento internacional de filme brasileiro sobre o transmissor da dengue.
- ECDC, E. F. S., y cols. (2018). The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12).
- Elbal, P. M. A., Estrella, S. D., Prieto, R. P., Arrondo, I. R., Muñoz, A., Bengoa, M., ... Lucientes, J. (2010). Establecimiento y mantenimiento de una colonia autóctona española de *Aedes (stegomyia) albopictus* skuse, 1894,(diptera, culicidae) en laboratorio. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología*, 69(2), 140–148.
- El Okda, E.-S., Abdel-Hamid, M. A.-A., y Hamdy, A. M. (2017). Immunological and genotoxic effects of occupational exposure to α -cypermethrin pesticide. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 30(4), 603.
- Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marques, E., Roiz, D., y Ruiz, S. (2005). Worldwide invasion of vector mosquitoes: present european distribution and challenges for

- spain. *Biological invasions*, 7(1), 87–97.
- Erlanger, T., Keiser, J., y Utzinger, J. (2008). Effect of dengue vector control interventions on entomological parameters in developing countries: a systematic review and meta-analysis. *Medical and veterinary entomology*, 22(3), 203–221.
- Estrada, J. G., Mulla, M., y cols. (1986). Evaluation of two new insect growth regulators against mosquitoes in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc*, 2(1), 57–60.
- Esu, E., Lenhart, A., Smith, L., y Horstick, O. (2010). Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, 15(5), 619–631.
- Falsone, L., Brianti, E., Severini, F., Giannetto, S., y Romi, R. (2015). Oviposition substrate in asian tiger mosquito surveillance: Do the sizes matter? *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 256–261.
- Feinsod, F., y Spielman, A. (1980). Nutrient-mediated juvenile hormone secretion in mosquitoes. *Journal of Insect Physiology (UK)*.
- Fernández Rubio, F., Moreno Fernández-Caparros, L., y Soriano, Ó. (2014). *Artrópodos en medicina y veterinaria*. Ministerio de Defensa (España).
- Ferreira-de Lima, V. H., Câmara, D. C. P., Honorio, N. A., y Lima-Camara, T. N. (2020). The asian tiger mosquito in brazil: Observations on biology and ecological interactions since its first detection in 1986. *Acta tropica*, 205, 105386.
- Florence, A., y Attwood, D. (2016). *Physicochemical principles of pharmacy*. Macmillan International Higher Education.
- Forattini, O. P. (1986). Identificação de *Aedes*(*stegomyia*) *Albopictus* (skuse) no brasil. *Revista de Saúde Pública*, 20, 244–245.
- Foster, W. A., y Walker, E. D. (2019). mosquitoes (culicidae). En *Medical and veterinary entomology* (pp. 261–325). Elsevier.
- Fournet, F., Sannier, C., y Monteny, N. (1993). Effects of the insect growth regulators omms 2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*.
- Franco Morales, J. C. (2020). Incidencia de las condiciones hidroclimatológicas en la abundancia de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en el casco urbano de la ciudad de cali, valle del cauca.
- Fu, G., Lees, R. S., Nimmo, D., Aw, D., Jin, L., Gray, P., ... others (2010). Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4550–4554.
- Fullman, N., Burstein, R., Lim, S., Medlin, C., Gakidou, E., y cols. (2013). Nets, spray or both? the effectiveness of insecticide-treated nets and indoor residual spraying in reducing malaria morbidity and child mortality in sub-saharan africa. *Malaria Journal*, 12(62).
- Gallo, M., y Lawryk, N. (1991). *Organic phosphorous pesticides. handbook of pesticide toxicology. hayes wj jr. and laws er jr. eds*. Academic Press, New York, NY.
- Gama, R. A., Alves, K. d. C., Martins, R. F., Eiras, Á. E., y Resende, M. C. d. (2005). Effect of larvae density on adult size of *Aedes aegypti* reared under laboratory conditions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, 64–66.
- Gan, S. J., Leong, Y. Q., bin Barhanuddin, M. F. H., Wong, S. T., Wong, S. F., Mak, J. W., y Ahmad, R. B. (2021). Dengue fever and insecticide resistance in aedes mosquitoes in southeast asia: A review. *Parasites & vectors*, 14(1), 1–19.
- Gaugler, R., Suman, D., y Wang, Y. (2012). An autodissemination station for the transfer of an insect growth regulator to mosquito oviposition sites. *Medical and*

- veterinary entomology*, 26(1), 37–45.
- Goddard, J. (2016). *Physician's guide to arthropods of medical importance*. CRC press.
- Goiri, F., González, M. A., Goikolea, J., Oribe, M., de Castro, V., Delacour, S., ... García-Pérez, A. L. (2020). Progressive invasion of *Aedes albopictus* in northern Spain in the period 2013–2018 and a possible association with the increase in insect bites. *International journal of environmental research and public health*, 17(5), 1678.
- Goma, L. (1966). The mosquitoes. *Great Britain: Hutchinson & Co Ltd*.
- González, J. E. G. (1999). Formulaciones de plaguicidas: importancia, tipos y perspectivas futuras. *Tecnología en Marcha*, 13(2), 44–60.
- Gorla, D. E., Vargas Ortiz, R., y Catalá, S. S. (2015). Control of rural house infestation by *Triatoma infestans* in the Bolivian chaco using a microencapsulated insecticide formulation. *Parasites & vectors*, 8(1), 1–8.
- Gouagna, L. C., Damiens, D., Oliva, C. F., Boyer, S., Le Goff, G., Brengues, C., ... Fontenille, D. (2020). Strategic approach, advances, and challenges in the development and application of the SIT for area-wide control of *Aedes albopictus* mosquitoes in Reunion Island. *Insects*, 11(11), 770.
- Gratz, N. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.*, 18, 215–227.
- Grimstad, P. R., y Haramis, L. D. (1984). *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae) and la crosse virus III. Enhanced oral transmission by nutrition-deprived mosquitoes. *Journal of medical entomology*, 21(3), 249–256.
- Gubler, D., y cols. (1970). Comparison of reproductive potentials of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* Skuse and *Aedes* (Stegomyia) *polynesiensis* Marks. *Mosquito News*, 30(2).
- Gubler, D. J., y Clark, G. G. (1996). Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. *Acta Tropica*, 2(61), 169–179.
- Gunasekaran, K., Sahu, S., Jambulingam, P., y Das, P. (2005). DDT indoor residual spray, still an effective tool to control *Anopheles fluviatilis*-transmitted *Plasmodium falciparum* malaria in India. *TM & IH. Tropical medicine & international health*, 10(2), 160–168.
- Hales, S., De Wet, N., Maindonald, J., y Woodward, A. (2002). Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *The Lancet*, 360(9336), 830–834.
- Harburguer, L., Zerba, E., y Licastro, S. (2014). Sublethal effect of pyriproxyfen released from a fumigant formulation on fecundity, fertility, and ovicidal action in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 51(2), 436–443.
- Hartberg, W. (1971). Observations on the mating behaviour of *Aedes aegypti* in nature. *Bulletin of the World Health Organization*, 45(6), 847.
- Harwood, R. F., y James, M. T. (1987). *Entomología médica y veterinaria*. Limusa.
- Hawley, W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1, 1–39.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., y Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(7), 653–665.
- Hennessey, M., Fischer, M., y Staples, J. E. (2016). *Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016* (Vol. 16) (n.º 3). Wiley

Online Library.

- Hernández Chavarría, F., y García, J. D. (2000). Aedes, dengue y la posibilidad de un enfoque diferente de lucha. *Revista costarricense de salud pública*, 9(16), 32–38.
- Herrero, P. M. (2009). Formación y funcionamiento de las microcápsulas poliméricas inefly: estudio de microscopía óptica y electrónica. *Rev Tec Sater Ind Pint Tint*, 18, 1–13.
- HiangHao, C., Zairi, J., y cols. (2013). Permethrin resistance in *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) and associated fitness costs. *Journal of Medical Entomology*, 50(2), 362–370.
- Hirano, M. (1998). Pyriproxyfen and other juvenile hormone analogues. *Rev. Toxicol.*, 2, 357–394.
- Hougaard, J.-M., Corbel, V., N’guessan, R., Darriet, F., Chandre, F., Akogbeto, M., . . . Traore-Lamizana, M. (2003). Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (diptera: Culicidae) in cote d’ivoire. *Bulletin of entomological research*, 93(6), 491–498.
- Huang, Y.-M. (1968). *Neotype designation for Aedes (stegomyia) albopictus (skuse)(diptera: Culicidae)* (Inf. Téc.). SMITHSONIAN INSTITUTION WASHINGTON DC.
- IARC, W. G. o. t. E. o. C. R. t. H., y cols. (2017). Some organophosphate insecticides and herbicides.
- Iriarte, J. M. O., Calle, A. I., Lorán, F. F., Fierro, A. T., Bonet, A. J., y de la Cruz Pérez, M. (2021). Vigilancia entomologica de aedes (stegomyia) albopictus (skuse, 1894) en la comunidad de madrid: avance de resultados 2016–2020. *Revista de Salud Ambiental*, 21(2), 160–169.
- Itoh, T. (1994). Control of df/dhf vector, aedes mosquito, with insecticides. *Trop Med*, 35, 259–267.
- Itoh, T., Kawada, H., Abe, A., Eshita, Y., Rongsriyam, Y., y Igarashi, A. (1994). Utilization of bloodfed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval habitats. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, 10(3), 344–347.
- Jenson, E. A., Arthur, F. H., y Nechols, J. R. (2009). Efficacy of methoprene applied at different temperatures and rates on surface substrates to control eggs and fifth instars of *Plodia interpunctella*. *Journal of economic entomology*, 102(5), 1992–2002.
- Jentes, E. S., Pomerol, G., Gershman, M. D., Hill, D. R., Lemarchand, J., Lewis, R. F., . . . others (2011). The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the informal who working group on geographic risk for yellow fever. *The Lancet infectious diseases*, 11(8), 622–632.
- Johnson, A. C., Donnachie, R. L., Sumpter, J. P., Jürgens, M. D., Moeckel, C., y Pereira, M. G. (2017). An alternative approach to risk rank chemicals on the threat they pose to the aquatic environment. *Science of the Total environment*, 599, 1372–1381.
- Judson, C. L., y de Lumen, H. Z. (1976). Some effects of juvenile hormone and analogues on ovarian follicles of the mosquito *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 13(2), 197–201.
- Juliano, S. A., O’Meara, G. F., Morrill, J. R., y Cutwa, M. M. (2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*,

130(3), 458–469.

- Juliano, S. A., y Philip Lounibos, L. (2005). Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecology letters*, 8(5), 558–574.
- Junnila, A., Revay, E. E., Müller, G. C., Kravchenko, V., Qualls, W. A., Allen, S. A., ... others (2015). Efficacy of attractive toxic sugar baits (atsb) against *Aedes albopictus* with garlic oil encapsulated in beta-cyclodextrin as the active ingredient. *Acta tropica*, 152, 195–200.
- Kamt Quezada, M. L. (2020). Efecto del clorpirifos en la micro y macro fauna del suelo.
- Kapranas, A., Collatz, J., Michaelakis, A., y Milonas, P. (2022). Review of the role of sterile insect technique within biologically-based pest control—an appraisal of existing regulatory frameworks. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 170(5), 385–393.
- Kawada, H., Oo, S. Z. M., Thaung, S., Kawashima, E., Maung, Y. N. M., Thu, H. M., ... Minakawa, N. (2014). Co-occurrence of point mutations in the voltage-gated sodium channel of pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in myanmar. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e3032.
- Kay, B., Marten, G., y Reid, J. (1998). Eradication of *Aedes aegypti* from a village in vietnam, using copepods and community participation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 657–660.
- Kebede, Y., Abebe, L., Alemayehu, G., Sudhakar, M., y Birhanu, Z. (2020). School-based social and behavior change communication (sbcc) advances community exposure to malaria messages, acceptance, and preventive practices in ethiopia: A pre-posttest study. *PLoS ONE*, 15(6), e0235189.
- Knudsen, A. (1995). Global distribution and continuing spread of aedes albopictus. *Parassitologia*, 37, 91–97.
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., ... others (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *elife*, 4, e08347.
- Kumar, K., Chhabra, M., Katyal, R., Patnaik, P., Kukreti, H., Rai, A., ... Lal, S. (2008). Investigation of an outbreak of chikungunya in malegaon municipal areas of nasik district, maharashtra (india) and its control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(2), 157.
- Kumar Singh, A., Nath Tiwari, M., Prakash, O., y Pratap Singh, M. (2012). A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Current neuropharmacology*, 10(1), 64–71.
- Laird, M. (1959). Parasites of singapore mosquitoes, with particular reference to the significance of larval epibionts as an index of habitat pollution. *Ecology*, 40(2), 206–221.
- Lambrechts, L., Scott, T. W., y Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(5), e646.
- La Ruche, G., Souarés, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Després, P., ... others (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan france, september 2010. *Eurosurveillance*, 15(39), 19676.
- Laycock, T., Paniago, C. U., y Javier, J. (2022). The threat of mosquito-borne arboviral disease in spain: A bibliographic review. *Medicina Clínica (English Edition)*, 158(8), 378–386.

- Lazzaro, B. P., Flores, H. A., Lorigan, J. G., y Yourth, C. P. (2008). Genotype-by-environment interactions and adaptation to local temperature affect immunity and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens*, 4(3), e1000025.
- Lehmann, R., y Lösler, M. (2016). Multiple outlier detection: hypothesis tests versus model selection by information criteria.
- Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C., y De Lamballerie, X. (2014). Chikungunya in the Americas. *The Lancet*, 383(9916), 514.
- Linley, J. R. (1989). Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti*, and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 26(6), 510–521.
- Liu-Helmersson, J., Quam, M., Wilder-Smith, A., Stenlund, H., Ebi, K., Massad, E., y Rocklöv, J. (2016). Climate change and Aedes vectors: 21st century projections for dengue transmission in Europe. *EBioMedicine*, 7, 267–277.
- Llácer, E., Dembilio, O., y Jacas, J. (2010). Evaluation of the efficacy of an insecticidal paint based on chlorpyrifos and pyriproxyfen in a microencapsulated formulation against *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(2), 402–408.
- Lopretti, M., Barriero, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C., y Olivera, A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *INNOTEC* (2 ene-dic), 19–23.
- Lounibos, L. P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 47, 233.
- Lucientes Curdi, J., y Collantes Alcaraz, F. (s.f.). Estudio poblacional de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) en España: distribución, genética y alternativas de control biológico de la especie.
- Lwande, O. W., Obanda, V., Lindström, A., Ahlm, C., Evander, M., Näslund, J., y Bucht, G. (2020). Globe-trotting *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: risk factors for arbovirus pandemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(2), 71–81.
- Macías, M. A. (1968). *Dr. José H. Pazos y Caballero: gran entomólogo cubano, 1867-1928* (n.º 39). Consejo Científico, Ministerio de Salud Pública.
- Madon, M. B., Mulla, M. S., Shaw, M. W., Kluh, S., y Hazelrigg, J. E. (2002). Introduction of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern California and potential for its establishment. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 27(1), 149–154.
- Mahmood, F., y Maramorosch, K. (1999). *Laboratory maintenance of mosquitoes*, pp. 3–31. Sci. Publ., Inc. Enfield, NH.
- Maloney, K. M., Ancca-Juarez, J., Salazar, R., Borrini-Mayori, K., Niemierko, M., Yukich, J. O., ... Levy, M. Z. (2013). Comparison of insecticidal paint and deltamethrin against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) feeding and mortality in simulated natural conditions. *Journal of Vector Ecology*, 38(1), 6–11.
- Mangas, I., Vilanova, E., Estévez, J., França, T., y cols. (2016). Neurotoxic effects associated with current uses of organophosphorus compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(5), 809–825.
- Manjarres, A., y Olivero, J. (2013). Control químico de *Aedes aegypti*: una perspectiva histórica. *Rev. Costarric. Salud Pública*, 22, 68–75.
- Maoz, D., Ward, T., Samuel, M., Müller, P., Runge-Ranzinger, S., Toledo, J., ...

- Horstick, O. (2017). Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: A systematic review. *Plos Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005651.
- Marí, R. B., Masiá, I. G., Elbal, P. M. A., y Escudero, M. L. D. F. (2022). Aproximación integrada al control vectorial: formación, comunicación de riesgos e investigación. *Revista de Salud Ambiental*, *22*(1), 31–37.
- Marí, R. B., y Peydró, R. J. (2012). Health implications of the establishment and spread of *Aedes albopictus* in Spain. *Revista española de salud pública*, *86*(4), 319–330.
- Marina, C. F., Bond, J. G., Muñoz, J., Valle, J., Chirino, N., y Williams, T. (2012). Spinosad: a biorational mosquito larvicide for use in car tires in southern Mexico. *Parasites & Vectors*, *5*(1), 1–10.
- Marini, F., Caputo, B., Pombi, M., Tarsitani, G., Torre, A. d., y cols. (2010). Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. *Medical and Veterinary Entomology*, *24*(4), 361–368.
- Marques, C. C., Marques, G. R., y Degallier, N. (1998). Is *Aedes albopictus* only a pest mosquito or also a vector of arboviruses in Brazil? En *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries* (pp. 248–60).
- Mashauri, F., Manjurano, A., Kinung’hi, S., Martine, J., Lyimo, E., Kishamawe, C., ... others (2017). Indoor residual spraying with micro-encapsulated pirimiphos-methyl (actellic® 300cs) against malaria vectors in the Lake Victoria basin, Tanzania. *PLoS ONE*, *12*(5).
- Mason, P., Everatt, M., Loomans, A., y Collatz, J. (2017). Harmonizing the regulation of invertebrate biological control agents in the Eppo region: using the Nappo region as a model. *EPPO Bulletin*, *47*(1), 79–90.
- Mayr, E. (1961). Cause and effect in biology: Kinds of causes, predictability, and teleology are viewed by a practicing biologist. *Science*, *134*(3489), 1501–1506.
- McAllister, J. C., Godsey, M. S., y Scott, M. L. (2012). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Port-au-Prince, Haiti. *Journal of Vector Ecology*, *37*(2), 325–332.
- McMichael, A. J. (2013). Globalization, climate change, and human health. *New England Journal of Medicine*, *368*(14), 1335–1343.
- Meng, S., Delnat, V., y Stoks, R. (2020). Mosquito larvae that survive a heat spike are less sensitive to subsequent exposure to the pesticide chlorpyrifos. *Environmental Pollution*, *265*, 114824.
- Meng, S., Delnat, V., y Stoks, R. (2022). Multigenerational effects modify the tolerance of mosquito larvae to chlorpyrifos but not to a heat spike and do not change their synergism. *Environmental Pollution*, *292*, 118333.
- Meng, S., Tran, T. T., Delnat, V., y Stoks, R. (2021). Transgenerational exposure to warming reduces the sensitivity to a pesticide under warming. *Environmental Pollution*, *284*, 117217.
- Minard, G., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., y Valiente Moro, C. (2013). Prevalence, genomic and metabolic profiles of acinetobacter and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS microbiology ecology*, *83*(1), 63–73.
- Miquel, M., del Río, R., Borràs, D., Barceló, C., Paredes-Esquivel, C., Lucientes, J., y Miranda, M. (2019). First detection of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in

- the balearic islands (spain) and assessment of its establishment according to the ecdc guidelines. *Journal of the European mosquito control association*, 2013, vol. 31, p. 8-11.
- Mitchell, C., y Gubler, D. (1987). Vector competence of geographic strains of *Aedes albopictus* and *Aedes polynesiensis* and certain other aedes (stegomyia) mosquitoes for ross river virus. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 142–147.
- Mitchell, C., y cols. (1995). Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the mediterranean basin. *Journal of vector ecology*, 20(1), 44–58.
- Miura, T., Schaefer, C., Takahashi, R., y Mulligan 3rd, F. (1976). Effects of the insect growth inhibitor, dimilin, on hatching of mosquito eggs. *Journal of Economic Entomology*, 69(5), 655–658.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., ... others (2016). Zika virus associated with microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–958.
- Montalvo, T., Higueros, A., Valsecchi, A., Realp, E., Vila, C., Ortiz, A., ... Figuerola, J. (2022). Effectiveness of the modification of sewers to reduce the reproduction of culex pipiens and *Aedes albopictus* in barcelona, spain. *Pathogens*, 11(4), 423.
- Moore, C. G., y Mitchell, C. J. (1997). *Aedes albopictus* in the united states: ten-year presence and public health implications. *Emerging infectious diseases*, 3(3), 329.
- Moreno, I. P. (s.f.). Principales métodos biotécnicos empleados en el control de plagas.
- Mori, A., y cols. (1979). Effects of larval density and nutrition on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. *Tropical Medicine*, 21(2), 85–103.
- Mosqueira, B., Chabi, J., Chandre, F., Akogbeto, M., Hougard, J.-M., Carnevale, P., y Mas-Coma, S. (2010a, 2010b). Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in west africa-part 2: Field evaluation. *Malaria Journal*, 9(1), 1–7.
- Mosqueira, B., Soma, D. D., Namountougou, M., Poda, S., Diabaté, A., Ali, O., ... others (2015). Pilot study on the combination of an organophosphate-based insecticide paint and pyrethroid-treated long lasting nets against pyrethroid resistant malaria vectors in burkina faso. *Acta tropica*, 148, 162–169.
- Mouchet, J. (1972). Prospection sur les vecteurs potentiels de fièvre jaune en tanzanie. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(5), 675.
- Mulla, M. (1995). The future of insect growth regulators in vector control. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 11(2), 269–273.
- Mulla, M., Darwazeh, H., Kennedy, B., y Dawson, D. (1986). Evaluation of new insect growth regulators against mosquitoes with notes on nontarget organisms. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2(3), 314–320.
- Murray, N. E. A., Quam, M. B., y Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*, 5, 299.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., y Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential sexual transmission of zika virus. *Emerging infectious diseases*, 21(2), 359.
- Naqvi, S., Rashid, S., y Ashrafi, S. (1976). Effect of altosid (jha-zr 515) on *Aedes aegypti* (pcsir strain). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 80(1-4), 316–324.
- Navarro, J.-C., Zorrilla, A., y Moncada, N. (2009). Primer registro de *Aedes albopictus* (skuse) en venezuela: Importancia como vector de dengue y acciones a desarrollar.

- Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49(1), 161–166.
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti*: Biología y ecología, organización panamericana de la salud. REF: PNSP/86-93, Washington, DC.
- Ngwej, L. M., Mashat, E. M., Mukeng, C. K., Mundongo, H. T., Malonga, F. K., Kashala, J.-C. K., y Bangs, M. J. (2021). Variable residual activity of k-othrine® polyzone and actellic® 300 cs in semi-field and natural conditions in the democratic republic of the congo. *Malaria Journal*, 20, 1.
- Norris, E. J., Mullis, A. S., Phanse, Y., Narasimhan, B., Coats, J. R., y Bartholomay, L. C. (2020). Biodistribution of degradable polyanhydride particles in *Aedes aegypti* tissues. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(9), e0008365.
- Nyamah, M., Sulaiman, S., Omar, B., y cols. (2011). Field observation on the efficacy of *Toxorhynchites splendens* (wiedemann) as a biocontrol agent against *Aedes albopictus* (skuse) larvae in a cemetery. *Trop Biomed*, 28(2), 312–319.
- O’gower, A., y cols. (1957a; 1957b, 1963). The influence of the surface on opposition by *Aedes aegypti* (linn.)(diptera, culicidae). En *Proceedings of the linnean society of new south wales* (Vol. 82).
- OHASHI, K., NAKADA, K., ISHIWATARI, T., MIYAGUCHI, J., y SHONO, Y. (2012). Efficacy of pyriproxyfen-treated nets in sterilizing and shortening the longevity of *Anopheles gambiae* (diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 49(5), 1052–1058.
- Ohashi, K., Nakada, K., Ishiwatari, T., Miyaguchi, J. i., Shono, Y., Lucas, J. R., y Mito, N. (2014). Efficacy of pyriproxyfen-treated nets in sterilizing and shortening the longevity of *Anopheles gambiae* (diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 49(5), 1052–1058.
- Ohba, S.-y., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., y Takagi, M. (2013). The effect of pyriproxyfen as a “population growth regulator” against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PLoS One*, 8(7), e67045.
- Oliva, C. F., Benedict, M. Q., Collins, C. M., Baldet, T., Bellini, R., Bossin, H., . . . others (2021). Sterile insect technique (sit) against aedes species mosquitoes: A roadmap and good practice framework for designing, implementing and evaluating pilot field trials. *Insects*, 12(3), 191.
- Oliveira Filho, A. M. (1997). Uso de nuevas herramientas para el control de triatominos en diferentes situaciones entomológicas en el continente americano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30, 41–46.
- OPS. (1987). *Aedes albopictus* en las américas. 99a reunión del comité ejecutivo del consejo directivo de la ops. Washington, DC Organización Panamericana de la Salud.
- Pampiglione, S., Rivasi, F., Angeli, G., Boldorini, R., Incensati, R., Pastormerlo, M., . . . Ramponi, A. (2001). Dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology*, 38(4), 344–354.
- Pardey, Á. E. B. (s.f.). El desarrollo de los insecticidas.
- Parker, C., Ramirez, D., y Connelly, C. R. (2019). State-wide survey of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) in florida. *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 210–215.
- Pasquali, S., Mariani, L., Calvitti, M., Moretti, R., Ponti, L., Chiari, M., . . . Gilioli, G. (2020). Development and calibration of a model for the potential establishment and impact of *Aedes albopictus* in europe. *Acta tropica*, 202, 105228.
- Petersen, E., Wilson, M. E., Touch, S., McCloskey, B., Mwaba, P., Bates, M., . . . others

- (2016). Rapid spread of zika virus in the americas-implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 brazil olympic games. *International Journal of Infectious Diseases*, *44*, 11–15.
- Pilger, D., De Maesschalck, M., Horstick, O., y San Martin, J. L. (2010). Dengue outbreak response: documented effective interventions and evidence gaps. *TropIKA. net*, *1*(1), 0–0.
- Pombi, M., Costantini, C., y Torre, A. d. (2003). *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) a roma: analisi sperimentale di parametri rilevanti in strategie di controllo. *Parassitologia*, *45*, 97–102.
- Ponce, G., Flores, A. E., Badii, M. H., y cols. (2004). Bionomía de *Aedes albopictus* (skuse). *Revista Salud Pública y Nutrición*, *5*(2).
- Popplewell, L., Balck, J., Norris, L., Porzio, M., y Pszczola, D. (1995). Encapsulation system for flavors and colors. *Food technology*, *49*(5), 76–82.
- Rahman, H. U., Asghar, W., Nazir, W., Sandhu, M. A., Ahmed, A., y Khalid, N. (2021). A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. *Science of The Total Environment*, *755*, 142649.
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., y Black IV, W. C. (2010). Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA. net [online]*, *1*(1).
- Rao, P., Goswami, D., y Rawal, R. (2021). Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*: A glimpse into the pandora’s box for the strategic control of vector borne diseases. *Environmental Sustainability*, *4*(1), 23–37.
- Ratti, V., Rheingold, E., y Wallace, D. (s.f.). Reduction of mosquito abundance via indoor wall treatments: A mathematical model.
- Reinert, J. F., Harbach, R. E., y Kitching, I. J. (2004). Phylogeny and classification of aedini (diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society*, *142*(3), 289–368.
- Reinert, J. F., y cols. (2000). New classification for the composite genus aedes (diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus ochlerotatus to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, *16*(3), 175–188.
- Reiter, P., y Darsie Jr, R. (1984). *Aedes albopictus* in memphis, tennessee (usa): an achievement of modern transportation? *Mosquito News*, *44*(3), 396–399.
- Rey, J. R., y O’Connell, S. M. (2014). Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Influence of congeners and of oviposition site characteristics. *Journal of Vector Ecology*, *39*(1), 190–196.
- Rey, J. R., O’Meara, G. F., O’Connell, S. M., y Cutwa-Francis, M. M. (2006). Factors affecting mosquito production from stormwater drains and catch basins in two florida cities. *Journal of Vector Ecology*, *31*(2), 334–343.
- Reynolds, J. A., Poelchau, M. F., Rahman, Z., Armbruster, P. A., y Denlinger, D. L. (2012). Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *Journal of Insect Physiology*, *58*(7), 966–973.
- Richards, S. L., Ponnusamy, L., Unnasch, T. R., Hassan, H. K., y Apperson, C. S. (2006). Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central north carolina. *Journal of medical entomology*, *43*(3), 543–551.

- Riddiford, L., y Williams, C. (1967). The effects of juvenile hormone analogues on the embryonic development of silkworms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 57(3), 595–601.
- Rivas Esteban, I. P. (2016). Diseño, desarrollo y evaluación de una formulación de microcápsulas del piretroide cipermetrina.
- Robertson, R., Hu, S., y cols. (1935). The tiger mosquito in shanghai. *China Journal*, 23(5).
- Rodríguez-Morales, A. J. (2015). Zika: the new arbovirus threat for latin america. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(06), 684–685.
- Rodríguez Villa, K., y cols. (2020). Vigilancia entomológica.
- Roiz, D., Eritja, R., Escosa, R., Lucientes, J., Marquès, E., Melero-Alcíbar, R., ... Molina, R. (2007). A survey of mosquitoes breeding in used tires in Spain for the detection of imported potential vector species. *Journal of Vector Ecology*, 32(1), 10–15.
- Rossi, G. C., y Almirón, W. R. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. *Publicaciones Mundo Sano, Serie Enfermedades Transmisibles*, 5, 53.
- Rossi, G. C., Pascual, N., y Krsticevic, F. J. (1999). First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, 15(3), 422–422.
- Ruberson, J., Nemoto, H., y Hirose, Y. (1998). Pesticides and conservation of natural enemies in pest management. En *Conservation biological control* (pp. 207–220). Elsevier.
- Rubin, E. J., Greene, M. F., y Baden, L. R. (2016). *Zika virus and microcephaly* (Vol. 374) (n.º 10). Mass Medical Soc.
- Ruiz-Arrondo, I., Delacour-Estrella, S., Santibáñez, P., y Oteo, J. A. (2021). Primera detección del mosquito tigre, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), en la Rioja: implicaciones en salud. En *Anales de Biología* (Vol. 43, pp. 117–122).
- Rust, M. K., Reiersen, D. A., y Hansgen, K. H. (1991). Control of American cockroaches (Dictyoptera: Blattidae) in sewers. *Journal of Medical Entomology*, 28(2), 210–213.
- Santos, R. L. C. d. (2003). Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil (1997-2002). *Revista de Saúde Pública*, 37(5), 671–673.
- Schaper, S., Hernández, F., y Soto, L. (1998). La lucha contra el dengue: Control biológico de larvas de *Aedes aegypti* empleando *Mesocyclops thermocyclopoides* (Crustacea). *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 19(1-2), 119–125.
- Schiøler, K. L., Alifrangis, M., Kitron, U., y Konradsen, F. (2016). Insecticidal paints: a realistic approach to vector control? *PLoS neglected tropical diseases*, 10(4), e0004518.
- Schlaeger, D. A., y Fuchs, M. S. (1974). Dopa decarboxylase activity in *Aedes aegypti*: a preadult profile and its subsequent correlation with ovarian development. *Developmental Biology*, 38(2), 209–219.
- Scholte, E.-J., Dijkstra, E., Blok, H., De Vries, A., Takken, W., Hofhuis, A., ... Reusken, C. (2008). Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(4), 352–358.
- Şengül Demirak, M. Ş., y Canpolat, E. (2022). Plant-based bioinsecticides for mosquito

- control: Impact on insecticide resistance and disease transmission. *Insects*, 13(2), 162.
- Service, M. (1992). Importance of ecology in *Aedes aegypti* control. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 23(4), 681–690.
- Sihuincha, M., Zamora-Perea, E., Orellana-Rios, W., Stancil, J. D., López-Sifuentes, V., Vidal-Ore, C., y Devine, G. J. (2005). Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) in iquitos, peru. *Journal of medical entomology*, 42(4), 620–630.
- Simmons, C., Farrar, J., y van Vinh Chau, N. (2012). New england j. *Med*, 366, 1423–1432.
- Singh, R. K., Dhama, K., Khandia, R., Munjal, A., Karthik, K., Tiwari, R., ... Bueno-Marí, R. (2018). Prevention and control strategies to counter zika virus, a special focus on intervention approaches against vector mosquitoes—current updates. *Frontiers in microbiology*, 9, 87.
- Skuse, F. A. A. (1899). *The banded mosquito of bengal*.
- Smith, L. B., Kasai, S., y Scott, J. G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pesticide biochemistry and physiology*, 133, 1–12.
- Snetselaar, J., Andriessen, R., Suer, R. A., Osinga, A. J., Knols, B. G., y Farenhorst, M. (2014). Development and evaluation of a novel contamination device that targets multiple life-stages of *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, 7(1), 1–10.
- Soares, L. B., Silva-Júnior, E. F., Moreira, K. A., y Aquino, P. G. (2022). Natural products for controlling dengue and its vectors. *Studies in Natural Products Chemistry*, 72, 423–464.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of toxicology*, 86(2), 165–181.
- Soin, T., Swevers, L., Kotzia, G., Iatrou, K., Janssen, C., Rouge, P., ... Smaghe, G. (2010). Comparison of the activity of non-steroidal ecdysone agonists between dipteran and lepidopteran insects, using cell-based ecr reporter assays. *PEST MANAGEMENT SCIENCE*, 66(11), 1215–1229.
- Soto, L., Schaper, S., Angulo, L., y Hernández, F. (1999). *Mesocyclops thermocyclopoides* y el control biológico de aedes: ejemplo de un plan de acción comunitaria en chacarita, puntarenas. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 20(1-2), 45–50.
- Soumare, M., y Cilek, J. (2011). The effectiveness of *Mesocyclops longisetus* (copepoda) for the control of container-inhabiting mosquitoes in residential environments1. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 27(4), 376–383.
- Sparks, R. E., y Jacobs, I. C. (1999). *Selection of coating and microencapsulation processes*. Marcel Dekker, Inc: New York.
- Sprenger, y Wuithiranyagool, T. (1986). The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in harris county, texas. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2(2), 217–219.
- Sprenger, P. R. D. (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*, 3(494), 2904963.
- Stejskal, V., Aulicky, R., y Pekar, S. (2009). Brief exposure of *Blattella germanica* (blattodea) to insecticides formulated in various microcapsule sizes and applied on porous and non-porous surfaces. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65(1), 93–98.

- Suchsland, O. (1987). *Fiberboard manufacturing practices in the united states* (n.º 640). US Department of Agriculture, Forest Service.
- Sulaiman, S., Pawanchee, Z., Wahab, A., Jamal, J., y Sohadi, A. (1997). Field evaluation of vectobac g, vectobac 12as and bactimos wp against the dengue vector *Aedes albopictus* in tires. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 22(2), 122–124.
- Suleman, M., Arshad, M., y Khan, K. (1996). Yellowfever mosquito (diptera: Culicidae) introduced into landi kotal, pakistan, by tire importation. *Journal of medical entomology*, 33(4), 689–693.
- Suman, D. S., Wang, Y., Bilgrami, A. L., y Gaugler, R. (2013). Ovicidal activity of three insect growth regulators against aedes and culex mosquitoes. *Acta Tropica*, 128(1), 103–109.
- Syafruddin, A. (s.f.). R., kamimura, k. and kawamoto, f. 1990. histopathological effects of an insect growth regulator, 4-phenoxyphenyl (rs)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether (pyriproxyfen), on the larvae of *Aedes aegypti*. *Jpn. J. Sanit. Zool*, 41, 15–22.
- Tandon, N., y Ray, S. (2000). Host feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in kolkata india.
- Telang, A., Li, Y., Noriega, F. G., y Brown, M. R. (1980). Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 645–655.
- Thomas, S. M., Obermayr, U., Fischer, D., Kreyling, J., y Beierkuhnlein, C. (2012). Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause european aedine strain, *Aedes albopictus* (diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 5(1), 1–7.
- Truman, J., y Riddiford, L. (1999). The origins of insect metamorphosis. *Nature (London)*, 401(6752), 447–452.
- Urbanski, J. M., Benoit, J. B., Michaud, M. R., Denlinger, D. L., y Armbruster, P. (2010). The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1694), 2683–2692.
- Vavassori, L., Saddler, A., Müller, P., y cols. (2019). Active dispersal of aedes albopictus: a mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasites and Vectors*, 12(583).
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., ... others (2007). Two chikungunya isolates from the outbreak of la reunion (indian ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS one*, 2(11), e1168.
- Vázquez Orrego, F. R. (2021). Marcadores moleculares asociados con mutaciones en el sitio blanco en *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* para vigilancia de la resistencia a insecticidas: Scoping review.
- Vélez, I. D., Quiñones, M. L., Suarez, M., Olano, V., Murcia, L. M., Correa, E., ... Morales, A. (1998). Presencia de *Aedes albopictus* en leticia, amazonas, colombia. *Biomédica*, 18(3), 192–8.
- Ventura, C. V., Maia, M., Ventura, B. V., Linden, V. V. D., Araújo, E. B., Ramos, R. C., ... Ventura, L. O. (2016). Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus zika virus infection. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, 79, 1–3.
- Verdonschot, P., y Besse-Lototskaya, A. (2013). Flight distance of mosquitoes

- (culicidae): A metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologica*, 45, 69–79.
- Vicente, C. R., Silva, T. C. C. d., Pereira, L. D., y Miranda, A. E. (2021). Impact of concurrent epidemics of dengue, chikungunya, zika, and covid-19. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54.
- Viñuela, E., Budia, F., y Del Estal, P. (1991). Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula. *Bol. San. Veg. Plagas*, 17(3), 391–400.
- Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., Della Torre, A., y Ranson, H. (2012). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 126–131.
- Vythilingam, I., Zainal, A., y Hamidah, T. (1999). Laboratory evaluation of lambda-cyhalothrin a microencapsulated formulation on mosquito nets for control of vector mosquitos. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 30(1), 177–183.
- Wahid, I., Ishak, H., Hafid, A., Fajri, M., Sidjal, S., Nurdin, A., ... others (2019). Integrated vector management with additional pre-transmission season thermal fogging is associated with a reduction in dengue incidence in makassar, indonesia: Results of an 8-year observational study. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(8), e0007606.
- Walker, E. D. (2016). Toxicity of sulfide and ammonium to *Aedes triseriatus* larvae (diptera: Culicidae) in water-filled tree holes and tires. *Journal of Medical Entomology*, 53(3), 577–583.
- Walsh, R., Facchinelli, L., Ramsey, J., Bond, J., y Gould, F. (2011). Assessing the impact of density dependence in field populations of *Aedes aegypti*. *Journal of Vector Ecology*, 36(2), 300–307.
- Ware, G. (1983). *Pesticides, theory and applications*. Freeman, San Francisco.
- Watters, F., White, N., y Cote, D. (1983). Effect of temperature on toxicity and persistence of three pyrethroid insecticides applied to fir plywood for the control of the red flour beetle (coleoptera: tenebrionidae)[tribolium castaneum, cypermethrin, fenvalerate, permethrin]. *Journal of Economic Entomology*.
- Webb, G., Miller, P., y Peters, B. (2012). Pyriproxyfen for the control of australian salt-marsh mosquito, *Aedes vigilax*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(1), 50–52.
- WHO. (1981). *Instructions for the bioassays of insecticide deposits on wall surfaces*. WHO/VBC/81.812, Geneva.
- WHO, y cols. (1967). *Mosquito ecology: report of a who scientific group [meeting held in geneva from 31 october to 5 november 1966]*. World Health Organization.
- WHO, y cols. (1998). *Diazinon-environmental health criteria 198*.
- WHO, y cols. (2006). Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. En *Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets*.
- WHO, y cols. (2014). Report of the seventeenth whopes working group meeting: Who/hq, geneva, 15-19 september 2014: review of alpha-cypermethrin 250 wg-sb, icon maxx, netprotect ln, chlorfenapyr 240 sc.
- WHO, y cols. (2019). *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World health organization, 2009*.
- WHO, A. M. (2017). *Respuesta mundial para el control de vectores: informe de la secretaría* (Inf. Téc.). Organización Mundial de la Salud.

- Williams, P., Semple, R., y Amos, T. (1982). Relative toxicity and persistence of one carbamate and three organophosphate insecticides on concrete, wood and iron surfaces for control of grain insects. *General and Applied Entomology: The Journal of the Entomological Society of New South Wales*, 14, 35–40.
- Wright, J. E., y Jones, R. (1976). Insect growth regulators: methoprene and stauffer r-20458 in pupae of the stable fly from treated breeding medium. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 15(5), 525–529.
- Wyatt, G., y cols. (2013). Juvenile hormone in insect reproduction-a paradox? *EJE*, 94(3), 323–333.
- Xi, Z., Khoo, C. C., y Dobson, S. L. (2006). Interspecific transfer of wolbachia into the mosquito disease vector *Aedes albopictus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1592), 1317–1322.
- Yao, T., Wang, L., Cheng, J., Hu, Y., Zhao, J., y Zhu, G. (2014). Optimization of pyrethroid and repellent on fabrics against stegomyia albopicta (= *Aedes albopictus*) using a microencapsulation technique. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(1), 37–43.
- Yodbustra, S., Ketavan, C., Suchartupatham, E., y Areekul, S. (1985). Effects of juvenile hormone analogue of the morphology and biology of *Aedes surtellaris malayensis* Colless (diptera: culicidae). *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 16(1), 41–48.
- Zanluca, C., Melo, V. C. A. d., Mosimann, A. L. P., Santos, G. I. V. d., Santos, C. N. D. d., y Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of zika virus in brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 569–572.
- Zimmerman, R., y Voorham, J. (1997). Uso de mosquiteros y otros materiales impregnados con insecticida para el control de la malaria en las américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 2(5), 310–318.
- Zouache, K., Voronin, D., Tran-Van, V., Mousson, L., Failloux, A.-B., y Mavingui, P. (2009). Persistent wolbachia and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One*, 4(7), e6388.

Lista de abreviaturas

ATSB = Atrayentes cebos azucarados tóxicos

DDT = Dicloro difenil tricloroetano

IGR = Reguladores del crecimiento de los insectos

IP = Pinturas insecticidas

IRAC = Comité de Acción contra la Resistencia a los Insecticidas

IRS = Fumigación residual de interiores (por sus siglas en inglés: *Indoor Residual Spraying*)

KD = Efecto volteo (Knock-down)

MIV = Manejo Integrado de Vectores

MPI = Microcápsula polimérica insecticida

OP = Organofosforados

PPF = Piriporxifeno

SIT = Técnica del insecto estéril

ULV = Nebulización de ultra bajo volumen

Lista de Figuras

1.1.	Representación de la liberación gradual de los i.a. microencapsulados de la PI. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	5
1.2.	Biopolímeros de liberación lenta. Otorgan un elevado poder residual manteniendo la no interacción de los i.a. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	6
2.1.	Diferencia de la cabeza y Scutum <i>Aedes albopictus</i> y <i>Aedes aegypti</i> (A)= Dorsum de la cabeza y Scutum con conspicuos de <i>Ae. albopictus</i> , raya media blanca plateada; <i>The Connecticut Agricultural Experiment Station</i> (2005). (B)= Diferencia entre Dorsum de la cabeza y Scutum con Conspicuous de <i>Aedes aegypti</i> . Modificado a partir de Rueda LM, <i>Magnolia Press</i> . (2004)	10
2.2.	Larva de cuarto estadio de <i>Ae. albopictus</i> , dorsal-izquierda, ventral derecha. (A)= Cabeza; (B)= Tórax y abdomen; (C)= Segmentos abdominales terminales. A= antena, C= cabeza, CS= dientes del peine, M= mesotórax, MP= mentón, P= protórax, PT= espina del pecten, S= sifón, T= metatórax, I-X= segmentos abdominales. Modificado a partir de Huang (1971 y 1972)	12
2.3.	Morfología de una pupa de <i>Ae. albopictus</i> visión dorsal y lateral (modificado a partir de Hawley, 1988)	13
2.4.	Pupa y genitalia del macho de <i>Ae. albopictus</i> (A)= abdomen pupal, dorsal a la izquierda, ventral a la derecha, P= paleta; (B)= cefalotórax de la pupa, (C)= cefalotórax; C= genitalia macho, CL= claspete. Modificado a partir de Belkin et al. (1970) y Huang (1968)	14
2.5.	Distribución de <i>Ae. Albopictus</i> en Europa. Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades y Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Mapas de mosquitos [internet]. Estocolmo, ECDC; 2021	18
2.6.	Distribución de <i>Ae. Albopictus</i> en España, 2020. Centro europeo para la prevención y control de enfermedades / Mosquito alert / ABC	19

2.7. Vista a microscopio óptico de micro cápsulas en suspensión acuosa. (A)= líquido con componentes disueltos en el que se encuentran en suspensión las microcápsulas; (B)= microcápsulas: cubierta de resina que atrapa en su interior los insecticidas. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	30
2.8. Aspecto de las microcápsulas al evaporarse el solvente (agua) al microscopio óptico (A)= cubierta de resina; (B)= interior con los insecticidas. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	30
2.9. Detalle de las microcápsulas a 40 aumentos con la muestra húmeda. Se observan perfectamente microcápsulas redondeadas con las partículas de activos en su interior. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	30
2.10. Detalles de las microcápsulas a 40 aumentos con la muestra seca. Al evaporarse el solvente (agua) las microcápsulas se juntan compactándose, lo que dará a la formación de una película estable con liberación controlada de los activos. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	31
2.11. Detalles de las microcápsulas a 40 aumentos con la muestra húmeda. En este caso los pigmentos y cargas enmascaran la presencia de microcápsulas. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	31
2.12. Muestra a 25°C en estufa a 1000 aumentos. Detalle de los cristales del polímero sometidos a desgaste por temperatura (100 µm). Las cargas y pigmentos se mueven agrupándose y las microcápsulas se abren liberando los ingredientes activos. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	31
2.13. Detalle de los cristales del polímero (50µm), sometidos a desgaste por temperatura. Las cargas y pigmentos se mueven agrupándose y las microcápsulas se abren liberando los ingredientes activos. Detalle de la muestra a 1000 aumentos tras un proceso de liofilización que simula las condiciones ambientales reales al eliminar la totalidad del solvente (agua). (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	32
2.14. Detalle de los cristales (200 µm) del polímero a 200 aumentos, en una muestra 25 oC; (B)= detalle del cristal (50 µm) a 1000 aumentos a T ^o ambiente. (Modificado a partir de: http://www.inesfly.com)	32
2.15. Proceso químico de polimerización de Inesfly [®] (Modificado a partir de http://www.inesfly.com)	33
2.16. Dureza del polímero Inesfly durante el proceso de fabricación y aplicación. (Modificado a partir de http://www.inesfly.com)	34
2.17. Mecanismo de estabilización de los i.a. Inesfly. (Modificado a partir de http://www.inesfly.com)	35
2.18. Mecanismo de estabilización de los i.a. Inesfly SIN. (Modificado a partir de http://www.inesfly.com)	36

3.1.	Sistema de alimentación de membranas Hemotek PS5A/220: (A)= membrana (Parafilm TM); (B)= el depósito con sangre del dispositivo; (C)= placa calefactora del dispositivo; (D)= ensamblaje del dispositivo; (D)= unidad de potencia PS5 . . .	38
3.2.	Papel de filtro con huevos ovo puestos (A)= maceta de plástico; (B)= papel de filtro con huevos adheridos (Modificado a partir de Alarcón-Elbal et al., 2010)	39
3.3.	(A)= bandejas de plástico donde se efectuó la emergencia de larvas L ₁ . Fueron introducidos los papeles de filtro con los huevos adheridos, sumergidos a los cuatro días después de la ovoposición; (B)= tablillas de masonite [®] (tablex) cuyo objetivo fue la oxigenación del agua al inicio de la emergencia larval	39
3.4.	Esquema de los bioensayos mediante el CONE TEST (OMS) en dos tipos de superficies ya tratadas: una más porosa (escayola) y menos porosa (madera) a dos concentraciones (1 Kg / 6 m ² y 1 kg / 3 m ²). Estas fueron recortadas en cuadrados (13 x 13 cm)	43
3.5.	Procedimiento de la prueba en superficie menos porosa (madera de pino) y otra más porosa (escayola). (A y B)= tres replicas para cada superficie tratada y un control; (C y D)= efecto KD durante los 30 minutos de exposición forzada (en la superficie escayola no se procedió al corte en cuadrados como en el caso de la madera A y D); (E)= succión con aspirador de boca (individuos aparentemente vivos); (F)= traslado a eclosionadores (después de los 30 min) suministrándose papel filtro humedecido y algodón con una solución azucarada	44
3.6.	Esquema de la metodología emulsiones sobre contenedores de plástico (macetas); E1= (0,0063 %); E2= (0,063 %); E3= (0,2 %) de PPF. Cada recipiente contenía 2 mg de PPF, se añadió 200 ml de agua de clorada y 30 larvas L ₁ ; R= réplicas	47
3.7.	Esquema del procedimiento para el análisis de la eficacia residual de PPF en contenedores de plástico (macetas)	49
3.8.	Procedimiento de la prueba emulsiones sobre las tablillas de masonite tratados, en el cual las hembras realizaron la ovoposición. (A)= contenedores de plástico, donde 100 hembras realizaron la ovoposición en las tablillas de masonite; (B)= papel filtro, donde se dejó secar las tablillas de masonite con los huevos; (C)= placa de Petri, donde se introdujo el papel filtro incluido las tablillas masonite y ocurrió la eclosión de huevos, los estadios larvales L ₁ ; L ₂ ; L ₃ ; L ₄ y pupas. E1= emulsión 1 (PPF 0,0063 %); E2= emulsión 2 (PPF 0,063 %); E3= emulsión 3 (PPF 0,2 %). R= Réplicas	51
3.9.	Esquema del procedimiento para el análisis de la eficacia residual de PPF en las tablillas de masonite [®] (tablex [®])	52

3.10. Procedimiento de la prueba en las tablillas de masonite [®] (tablex [®]) (A)= alimentación con sangre (membrane-feeding) (100 hembras por cada replica de cada formulado) (B)= tablillas de masonite, donde procedió la ovoposición introducido en la maceta de plástico con agua de clorada y con 0,2 mg de alimento para peces (atrayera ovoposición) y con el mismo procedimiento para el control. (C)= placas de Petri y papel filtro donde ocurrió la eclosión de larvas. (D)= tablillas de masonite tratados y controles sumergidos en agua de clorada dentro de placas Petri (monitorización de la ecdisis de los estadios larvales y pupas)	53
4.1. Valores mínimos al cuadrado (IC del 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del efecto KD. Interacción del efecto del tipo de superficie y la dosis aplicada (recomendada vs doble). La probabilidad de KD depende del tipo de superficie y de la dosis aplicada: 1kg / 6 m ² (recomendada); 1kg / 3 m ² (doble)	64
4.2. Interacción entre el tipo de superficie y el formulado. La probabilidad de KD depende de la superficie de aplicación, más porosa (escayola) o menos porosa (madera), dependiendo del formulado aplicado. 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-alettrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifós 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %	65
4.3. Valores mínimos al cuadrado (IC del 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del efecto KD. Probabilidad del KD en función del formulado aplicado y del tiempo (meses). 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-alettrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifos 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %	66
4.4. Valores de mínimos cuadrados (IC del 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad media de mortalidad del 50 % (TD ₅₀) según el tipo de superficies y la dosis aplicada: 1kg / 6 m ² (recomendada); 1kg / 3 m ² (doble).	68
4.5. TD ₅₀ según el tipo de superficie, más porosa (yeso) o menos porosa (madera de pino), y formulados aplicados. 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-alettrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifos 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %	69
4.6. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD ₅₀ en función de los formulados aplicados y del tiempo (meses) 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %, d-alettrina 1 %, PPF 0,063 %; 5A IGR= diazinón 1,5 %, clorpirifós 1,5 %, PPF 0,063 %; 5D IGR= diazinón 3 %, PPF 0,063 %	70
4.7. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio inicial (L ₁ - L ₂). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres réplicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	73

4.8. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio inicial ($L_1 - L_2$) a lo largo del tiempo. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	74
4.9. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final ($L_3 - L_4$). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	75
4.10. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final ($L_3 - L_4$) a lo largo del tiempo. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres réplicas; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	75
4.11. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio pupa. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres réplicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	76
4.12. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio pupa a lo largo del tiempo. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	77
4.13. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario final ($(L_1 - L_2)$). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	90
4.14. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final ($(L_1 - L_2)$). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	90
4.15. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario final (L_3-L_4). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	91
4.16. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio final (L_3-L_4). Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	91
4.17. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio pupas. Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	92

4.18. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo GLM para la tasa de la mortalidad en el estadio pupas. Los símbolos y barras representan valor medio y el intervalo de confianza de tres replicas. E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF	93
5.1. A= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD según el tipo de superficie; B= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD en función de la superficie y del tiempo (meses)	109
5.2. A= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el mejor modelo de regresión final obtenido según criterio de Akaike (AIC) para el TD ₅₀ según las superficies; B= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD ₅₀ en función de la superficie	110
5.3. A= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD. Según la concentración; B= Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD a lo largo del tiempo. Se representa la eficacia residual a lo largo del tiempo de dos concentraciones	112
5.4. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD ₅₀ en función de dos concentraciones.	112
5.5. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del KD según el formulado. 5A IGR= diazinón 1,5 %; clorpyrifós 1,5 %; PPF 0,063 %. 5D IGR= diazinón 3 %; PPF 0,063 %. 5A NG IGR= alfa-cipermetrina 0,7 %; d-aletrina 1 %; PPF 0,063 %	113
5.6. Valores de mínimos cuadrados (IC 95 %) estimados por el modelo de regresión final para la probabilidad del TD ₅₀ en función de la superficie	114
5.7. Efectos de PPF en la morfología del cuarto estadio (L ₄). (A)= estadio larvario L ₃ – L ₄ . Las deformidades morfológicas incluyen: a= cepillo y cabeza de alimentación deformados; b= tracto digestivo interrumpido, lumen intestinal interrumpido; d= cutículas negras y sin pigmento en el tórax; Ap= papilas anales pigmentadas y negras (B)= segmento terminal de larva L ₄ , muestra: Ap= papilas anales deformadas; S= sifón; spl= lóbulo perispiracular deformado	125
5.8. (A)= pre – pupa no completamente fuera del exoesqueleto larvario (lhx) y con restos del exoesqueleto de la cabeza pupal (hbx), la pupa se escapa incompletamente del exoesqueleto larvario, pero permanece sin melanizar a excepción de los pigmentos oculares (op). (B)= el cefalotórax deformado en la que se ha escapado incompletamente de la cutícula larvaria y que permanece en la región abdominal posterior dentro y con restos del esqueleto de la cabeza de la larva. ct= cefalotórax; rs= sifones respiratorios	126

5.9. C= pupa elefantoide, Este grupo están las pupas que pudieron salir completamente del exoesqueleto larvario pero permanecieron sin melanizar, excepto por los pigmentos oculares. D= pupa con adulto visible	127
5.10. Pupa con adulto parcialmente emergido	127

Lista de Tablas

4.1. Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie más porosa (escayola) para 1 kg / 6m ² (concentración recomendada). 5A IGR = diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. 5D IGR = diazinón 3 %; PPF 0,063 %. 5A NG IGR = alfa-cipermetrina 0,7 %; d-alettrina 1 %; PPF 0,063 %; B1 – B10 = bioensayos; T = tiempo de exposición; F = formulados	59
4.2. Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie más porosa (escayola) para 1 kg / 3m ² (concentración doble). 5A IGR = diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. 5D IGR = diazinón 3 %; PPF 0,063 %. 5A NG IGR = alfa-cipermetrina 0,7 %; d-alettrina 1 %; PPF 0,063 %; B1 – B10 = bioensayos; T = tiempo de exposición; F = formulados	60
4.3. Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie menos porosa (madera) para 1 kg / 6m ² (concentración recomendada). 5A IGR = diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. 5D IGR = diazinón 3 %; PPF 0,063 %. 5A NG IGR = alfa-cipermetrina 0,7 %; d-alettrina 1 %; PPF 0,063 %; B1–B10 = bioensayos; T = tiempo de exposición; F = formulados	61
4.4. Porcentaje (tres réplicas) del efecto KD y mortalidad observada hasta las 72 h post exposición en superficie menos porosa (madera) para 1 kg / 3 m ² (concentración doble). 5A IGR = diazinón 1,5 %; clorpirifós 1,5 %; PPF 0,063 %. 5D IGR = diazinón 3 %; PPF 0,063 %. 5A NG IGR = alfa-cipermetrina 0,7 %; d-alettrina 1 %; PPF 0,063 %; B1–B10 = bioensayos; T = tiempo de exposición; F = formulados	62
4.5. Efectos generales estimados para el mejor modelo final de regresión logística obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue el efecto KD codificada como variable binaria	63
4.6. Coeficientes estimados para el mejor modelo de regresión logística final obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue el efecto KD codificado como variable binaria.	64
4.7. Coeficientes estimados para el mejor modelo de regresión logística final obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue el TD ₅₀ codificado como variable binaria.	66

4.8. Coeficientes estimados para el mejor modelo final de regresión lineal obtenido según el criterio de Akaike (AIC). La variable dependiente fue la mediana de tiempo hasta la muerte (TD ₅₀)	67
4.9. Porcentaje de mortalidad estimado de tres réplicas y el control en dos grupos de estadios larvales, observada en contenedores de plástico. B= bioensayos; PPF= piriproxifeno	72
4.10. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario inicial (L ₁ - L ₂). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	73
4.11. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario final (L ₃ - L ₄). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	74
4.12. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio pupa. Tasa de mortalidad ajustada IC 95%; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	76
4.13. Los valores presentados representan la media de las tres réplicas (\pm SD). p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; % (IE)= inhibición de la emergencia; B= bioensayos; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; T= tiempo (meses); C= control	78
4.14. Valores de la probabilidad (<i>p</i>) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de pupas viables vs pupas iniciales. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de <i>p</i> (<0,05); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	79
4.15. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de pupas viables vs pupas iniciales. p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	79
4.16. Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (vl)= adultos con capacidad de vuelo; adultos (s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; B= bioensayos; F= concentraciones; C= control; T= tiempo (meses)	80
4.17. Valores de la probabilidad (<i>p</i>) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de adultos vs la capacidad de vuelo. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de <i>p</i> (<0,05); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	81
4.18. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de adultos vs capacidad de vuelo. Adultos(e)= adultos eclosionados; adultos(s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; B= Bioensayos (grupos); ND= no determinable; T= tiempo (meses)	81

4.19. Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (vl)= hembras con capacidad de vuelo; (alim)= hembras alimentadas; (ov)= hembras con ovo posición; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)	82
4.20. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de la ovo posición vs hembras alimentadas con sangre. En negrita, los valores estadísticamente significativos postcorrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	82
4.21. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la ovoposición vs hembras alimentadas con sangre. (alim.)= hembras alimentadas con sangre; (ov)= ovoposición; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	83
4.22. Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (ov)= hembras con ovoposición; (vb)= viables; (e)= eclosionados; B= bioensayos; T= tiempo (meses) .	83
4.23. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de la viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2) vs adultos (F1). En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)	84
4.24. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2) vs adultos (F1). (vb)= viables; (e) eclosionados; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable	84
4.25. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas, y adultos. En negrita, los valores estadísticamente significativos postcorrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$). E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	86
4.26. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas, y adultos. P-P= pre-pupa; P-B= pupa blanca; P-M= pupa melanizada; CAV= pupa con adulto visible; APE= pupa con adulto parcialmente emergido; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; C= control; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable . . .	87
4.27. Tasa de huevos ovopuestos, su viabilidad y eclosión. Datos de tres réplicas y el control, observada en las tablillas de masonite. PPF= piriproxifen; T= tiempo (meses) . . .	88
4.28. % de mortalidad estimada de tres réplicas y el control, en dos grupos de estadios larvales, observada en masonite. B= bioensayos; PPF= piriproxifeno	89

4.29. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario inicial ($L_1 - L_2$). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	90
4.30. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio larvario inicial (L_3-L_4). Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	91
4.31. Efectos generales estimados para el modelo GLM ajustado a las tasas de mortalidad del estadio pupas. Tasa de mortalidad ajustada; IC 95 %; comparación post-hoc utilizando el test de Tukey	92
4.32. Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; % (IE)= inhibición de la emergencia; B= bioensayos; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; T= tiempo (meses); C= control; ND= no determinable	94
4.33. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de pupas viables vs pupas iniciales. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)	94
4.34. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de pupas viables vs pupas iniciales. p(i)= pupas iniciales; p(vb)= pupas viables; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	95
4.35. Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD) adultos (vl)= adultos con capacidad de vuelo; adultos (s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; B= bioensayos; C= control; T= tiempo (meses)	96
4.36. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de adultos vs la capacidad de vuelo. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)	97
4.37. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de adultos vs capacidad de vuelo. Adultos(e)= adultos eclosionados; adultos(s-vl)= adultos sin capacidad de vuelo; B= Bioensayos (grupos); ND= no determinable; T= tiempo (meses)	97
4.38. Los datos presentados representan el valor medio de tres réplicas (\pm SD). (vl)= hembras con capacidad de vuelo; (alim)= hembras alimentadas; (ov)= hembras con ovoposición; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)	98

4.39. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la ovo posición vs la ingestión de sangre. En negrita, los valores estadísticamente significativos post corrección de Bonferroni; valor de p ($<0,05$); ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo(meses)	99
4.40. Los datos presentados representan el valor medio de tres réplicas (\pm SD). h(as)= hembras alimentadas; h(ov)= hembras con ovoposición; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)	99
4.41. Los valores presentados son la media de las tres réplicas (\pm SD). (ov)= hembras con ovo posición; (vb)= viables; (e)= eclosionados; B= Bioensayos; T= tiempo (meses)	100
4.42. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la viabilidad de huevos y eclosión de adultos (F2) vs adultos (F1). (vb)= viables; (e) eclosionados; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable	101
4.43. Valores de la probabilidad (p) exacta de Fisher estimados para la comparación entre las diferentes concentraciones y el control de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas y adultos. En negrita: los valores estadísticamente significativos postcorrección del test Bonferroni; valor de p ($<0,05$). E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; ND= no determinable; B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses)	103
4.44. Tasas calculadas (IC 95 %) de la probabilidad de la frecuencia de las malformaciones de larvas iniciales, larvas finales, pupas, y adultos. P-P= pre-pupa; P-B= pupa blanca; P-M= pupa melanizada; CAV= pupa con adulto visible; APE= pupa con adulto parcialmente emergido; E1= 0,0063 %; E2= 0,063 %; E3= 0,2 % de PPF; C= control B= Bioensayos (grupos); T= tiempo (meses); ND= no determinable	104