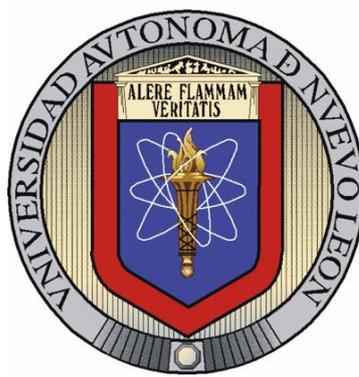


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE BIOINSECTICIDAS MICROENCAPSULADOS A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis* Y NEEM PARA EL CONTROL DEL GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* (Hübner).

Por

ERICK DE JESÚS DE LUNA SANTILLANA

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Biotecnología.

Septiembre, 2014.

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE BIOINSECTICIDAS MICROENCAPSULADOS
A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis* Y NEEM PARA EL CONTROL
DEL GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* Hübner.

Comité de Tesis



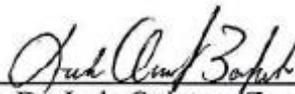
Dra. Katiushka Arevalo Niño
Director de Tesis



Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Secretario



Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado
Vocal



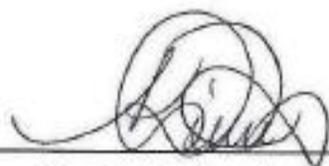
Dr. Isela Quintero Zapata
Vocal



Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco
Vocal

DESARROLLO Y EVALUACION DE BIOINSECTICIDAS MICROENCAPSULADOS
A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis* Y NEEM PARA EL CONTROL
DEL GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* Hübner.

Dirección de Tesis



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Director



Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis por todos los conocimientos, experiencias transmitidas y por su motivación a seguir en el camino de la investigación. A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por haberme brindado la oportunidad de incorporarme a su laboratorio, por su asesoría, y por la confianza brindada. Al Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez por haberme abierto las puertas de su laboratorio y otorgarme las facilidades y el apoyo en cada etapa de la elaboración de este trabajo que hoy en día concluye.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme la oportunidad de incorporarme dentro de su alumnado, ser mi casa de estudios y además por poder acceder a sus instalaciones, al personal académico y a su magnífica filosofía institucional que me ha permitido desarrollarme profesionalmente.

Al Instituto Politécnico Nacional por abrirme sus puertas y brindarme sus instalaciones para realizar parte del proyecto Doctoral e incorporarme a su planta docente y de investigación.

Al comité revisor de tesis conformado por la Dra. Lilia H. Morales Ramos, el Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado, Dr. Hugo Alberto Luna Olvera y la Dra. María Guadalupe Maldonado-Blanco/Dra. Isela Quintero Zapata por sus críticas constructivas, apoyo y aportaciones de ideas, que hicieron posible la culminación de este estudio.

A todos los miembros del Laboratorio de Biomedicina Molecular, especialmente al Dr. Xianwu Guo y la M.E. Isabel Cristina Rodríguez Luna por sus consejos y todo el apoyo brindado. No terminaría de citar a todas las personas que me brindaron su apoyo en cada una de las diferentes etapas de la realización de mi proyecto de tesis, sin embargo, tengo que reconocer el gran apoyo brindado por María Dolores Rivera Elizondo, José Delfino López Sánchez, Miguel Ángel Pérez Rodríguez, Ali Mohamed Ali Mahmoud, Hemavathi Gopal y Yajuan Fu, mil gracias.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su programa de Becas para la formación de recursos humanos capaces de desarrollar y aplicar la tecnología para el desarrollo y bienestar de México. Gracias a este programa me fue posible recibir un apoyo económico a través de la beca No. 129116, con lo cual me fue posible desarrollar mis estudios de Doctorado.

DEDICATORIA

A mi familia, que han instado y brindado todo lo necesario para llegar hasta donde estoy, siendo el soporte necesario para mi desarrollo. Todo su amor, abrazos, retos, castigos y miradas, dieron sus frutos y me ayudaron a llegar a este momento. Han sido un verdadero apoyo en cada aventura que he decidido emprender, y espero lo sigan siendo.

A mis sobrinos Jocelyn Dominique, Edgar Emiliano y Saul, por ser el motor de superación y su ejemplo a seguir, lo cual me motiva a ser cada día mejor.

A mis amigos y amigas, quienes siempre han estado en los momentos en que los he necesitado, y en los que no también.

5. CONTENIDO

Sección		Página
1.	PORTADA	i
2.	APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS	ii
3.	APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR DIRECTORES	iii
4	AGRADECIMIENTOS	iv
5.	DEDICATORIA	v
6.	CONTENIDO	vi
7.	ÍNDICE DE TABLAS	ix
7.	ÍNDICE DE GRÁFICAS	xi
8.	ÍNDICE DE FIGURAS	xii
9.	NOMENCLATURA	xiii
10.	RESUMEN	xv
11.	ABSTRACT	xvii
12.	INTRODUCCIÓN	1
13	HIPÓTESIS	5
14	OBJETIVOS	6
	14.1. Objetivo General	6
	14.2. Objetivos Específicos	6
15.	ANTECEDENTES	7
	15.1. El Control Biológico.	7
	15.1.1. Ventajas y Desventajas del Control Biológico.	8
	15.1.2. El Control Biológico en México	10
	15.1.3. Perspectivas y Desafíos del Control Biológico en México	12
	15.2. Entomopatógenos	13
	15.3. Historia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
	15.4. Morfología	19

15.5. Evolución de <i>Bacillus thuringiensis</i> como Agente de Control Biológico	21
15.6. Mecanismo de Acción de las Toxinas	23
15.7 Formulación de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
15.8 Plantas como Fuente Natural de Semioquímicos	30
15.8.1 Insecticidas Naturales de Extractos Vegetales	31
15.8.1.1. Rotenona	31
15.8.1.2. Piretrinas	32
15.8.1.3 Nicotina	33
15.8.1.4. Rianodina	34
15.8.1.5. Azaridactina	35
15.8.1.6. Meliartenina	37
15.8.1.7. Cebadilla	39
15.8.1.8. Poliglodial	39
15.8.1.9. Aceite de Ajenjo	39
15.8.1.10. Artemisina	40
15.8.2. <i>Azadirachta indica</i> como Fuente Bioinsecticida	41
15.8.2.1. Área de Distribución	41
15.8.2.2. Clima	43
15.8.2.3. Ciclo Vital	43
15.8.2.3.1. Flores y Fruto	43
15.8.2.3.2. Semillas	44
15.8.2.4. Daños en Neem	44
15.8.2.5. Usos	45
15.8.3. Generalidades de <i>Spodoptera exigua</i> .	46
16 MATERIAL Y MÉTODOS	49
16.1. Evaluación Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos Espora-Cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> y de Neem.	49
16.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de <i>B. thuringiensis</i> y Neem en contra de <i>Spodoptera exigua</i>	51
16.3. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL ₅₀) de <i>B. thuringiensis</i> y Neem en contra de <i>Spodoptera exigua</i>	52
16.4. Propagación Masiva <i>B. thuringiensis</i>	53

	16.5. Bioensayo de Preferencia Alimenticia	54
	16.6 Formulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> y/o Neem	56
	16.7. Evaluación de los Formulados a Nivel de Laboratorio	58
	16.8 Evaluación de los Formulados a Nivel de Invernadero	59
17.	RESULTADOS	61
	17.1. Evaluación Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos Espora- Cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> y Neem (<i>Azadirachta indica</i>).	61
	17.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de <i>Bacillus thuringiensis</i> y Neem contra <i>Spodoptera exigua</i> .	65
	17.3. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL ₅₀).	66
	17.4. Propagación Masiva <i>B. thuringiensis</i> .	67
	17.5. Bioensayo de Preferencia Alimenticia	68
	17.6 Formulación de Bioactivos	74
	17.7. Evaluación de los Formulados a Nivel de Laboratorio.	77
	17.8. Evaluación de los Formulados a Nivel de Invernadero	81
18	DISCUSIÓN	89
	18.1. Evaluación Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos Espora- cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> y Neem (<i>Azadirachta indica</i>).	90
	18.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) y del Tiempo Letal Medio (TL ₅₀). e <i>Bacillus thuringiensis</i> y Neem contra <i>Spodoptera exigua</i> .	91
	18.3. Propagación Masiva <i>B. thuringiensis</i> .	93
	18.4. Bioensayo de Preferencia Alimenticia	94
	18.5 Formulación de Bioactivos	97
	18.6. Evaluación de los Formulados a Nivel de Laboratorio.	99
	18.7. Evaluación de los Formulados a Nivel de Invernadero	102
19	CONCLUSIONES	105
20	LITERATURA CONSULTADA	109
21	RESÚMEN BIOGRÁFICO	127

6. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Compuestos Bioactivos del Neem.	50
2. Componentes empleados en el Diseño de los Soportes de Formulación.	59
3. Serotipos de las Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	65
4. Ensayo Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos de los Agentes Entomopatógenos contra <i>Spodoptera exigua</i> .	67
5. Efecto Preliminar de la Dosis de los Entomopatógenos Evaluados contra <i>Spodoptera exigua</i> .	67
6. Evaluación del Efecto Antifagoestimulante del Extracto de Neem contra <i>Spodoptera exigua</i>	70
7. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL ₅₀) de los Agentes Entomopatógenos contra <i>Spodoptera exigua</i> .	71
8. Rendimiento Obtenido Durante la Propagación Masiva de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD551	72
9. Determinación de Soportes de Formulación de Agentes Entomopatógenos con Carácter Fagoestimulante hacia <i>Spodoptera exigua</i> .	73
10. Efecto de la Ausencia o Presencia de Aditivos Fagoestimulantes en Relación a la Preferencia de los Soportes de Formulación en <i>S. exigua</i> .	75
11. Efecto de los Polímeros Microencapsulantes en Relación a la Preferencia Alimenticia en <i>S. exigua</i> .	76
12. Efecto de las Polímeros Microencapsulantes Combinadas con los Aditivos en Relación a la Preferencia hacia <i>S. exigua</i>	77
13. Efecto de los Aditivos Fagoestimulantes en Relación a la Preferencia de los Soportes de Formulación contra <i>S. exigua</i>	78
14. Composición de los Formulados Desarrollados.	79
15. Rendimientos del Proceso de Secado por Aspersión de las Formulaciones Desarrollados	80
16. Evaluación de la Actividad Toxica de Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra <i>Spodoptera exigua</i> a nivel de laboratorio	83
17. Evaluación de la actividad toxica de tipo de Bioactivos empleados en las Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra <i>Spodoptera exigua</i> a nivel de laboratorio	84
18. Estimación de parámetros de la protección generada por las diversas formulaciones bioinsecticidas dirigidas al control de <i>Spodoptera exigua</i> . a nivel Invernadero	87
19. Evaluación de la actividad tóxica de Formulaciones	89

	Bioinsecticidas Asperjables contra <i>Spodoptera exigua</i> a nivel invernadero	
20.	Evaluación del nivel de protección de los diferentes ingredientes activos empleados en las Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra <i>Spodoptera exigua</i> a nivel de Invernadero.	90
21.	Evaluación del nivel de protección de las Formulaciones Asperjables que contienen <i>Bacillus thuringiensis</i> como ingrediente activo en contra de <i>Spodoptera exigua</i> a nivel de Invernadero.	91
22.	Evaluación del nivel de protección de las Formulaciones Asperjables que contienen Neem como ingrediente activo en contra de <i>Spodoptera exigua</i> a nivel de Invernadero.	92

7. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Selección de agentes entomopatógenos con actividad tóxica hacia <i>Spodoptera exigua</i> .	68
2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de los Ingredientes Activos con actividad toxica contra <i>S. exigua</i> .	69
3. Niveles de Preferencia Alimenticia de <i>Spodoptera exigua</i> hacia los Soportes de Formulación.	74

8. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura Molecular de Rotenona	36
2. Estructura Molecular de la Piretrina	37
3. Estructura Molecular de la Nicotina	38
4. Estructura Molecular de la Rianodina	39
5. Estructura de los Compuestos Bioactivos del Neem	40
6. Estructura Molecular de la Meliartenina	42
7. Estructura Molecular de la Artemisina	45
8. Distribución Mundial del Cultivo del Árbol de Neem	46

9. NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
H ₂ O	Agua
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CTP	Caldo triptosa fosfato
Cm	Centímetro
comb.	Combinación
CL ₅₀	Concentración Letal media
TL ₅₀	Corregida
δ	Delta
σ	Desviación estándar de la muestra
Ed.	Editorial
Fam.	Familia
°C	Grados centígrados
g.l.	Grados de libertad
g.	Gramo
HD	Howard Dulmage
i.a.	Ingrediente activo
K ⁺¹	Ion potasio
kD	Kilodaltons
Km	Kilómetro
kPa	Kilopascal
L.	Litro
MIP	Manejo integrado de plagas
®	Marca registrada
>	Mayor que

μ	Media estadística de la muestra
<	Menor que
mg/cm ²	Microgramo por centímetro cuadrado
μ L	Microlitro
μ m	Micrómetro
μ g/cm ²	Miligramo por centímetro cuadrado
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro cuadrado
Nm	Nanómetro
No.	Numero
n.	Número de ejemplares de la muestra
N.	Número de ejemplares de la población
OILB	Organización Internacional de la Lucha Biológica
pp	Página
%	Por ciento
pH	Potencial de hidrogeno
F.	Prueba estadística F
Rpm	Revoluciones por minuto
TL ₅₀	Tiempo Letal medio
vvm	Volumen de aire por volumen de medio

10. RESUMEN.

La creciente demanda de garantías de inocuidad y de seguridad alimentaria para la comercialización y exportación de productos agrícolas, así como la necesidad de una conciencia mundial para revertir el deterioro ambiental y la salud de los consumidores por el uso indiscriminado de insecticidas químicos ha favorecido y dado importancia al hecho de modificar y mejorar las formas de control fitosanitario a través de la aplicación de productos biológicos seguros con actividad insecticida.

En el presente trabajo se desarrollaron diversas formulaciones biorracionales dirigidos contra el gusano soldado *Spodoptera exigua* Hübner, los cuales están constituidos por una mezcla de ingredientes activos de origen biológico, como lo es el extracto de la bacteria *Bacillus thuringiensis* y un extracto vegetal de *Azadirachta indica* (neem). Durante el proceso de desarrollo de las formulaciones se evaluó la toxicidad de las cepas HD1, HD2, HD9, HD29, HD73, HD125, HD133, HD227, HD551 y Bt1154 de *Bacillus thuringiensis*, así como de un extracto de neem. Las cepas que provocaron arriba del 60% de mortalidad a la dosis baja fueron las cepas HD133 y la HD551 ocasionando una mortalidad de 66.06% y 63.89% contra las larvas neonatas de *S. exigua*. El extracto de neem ocasionó una mortalidad de 22% a las dosis baja de 50 µg de extracto por mililitro de dieta. Aunque la mortalidad fue inferior al 60% se apreció un efecto biológico positivo a considerarse como un ingrediente activo potencial, debido a que a dosis superiores a los 40 µg/ml de extracto de neem, este induce una pérdida del peso larval. Una vez seleccionados estos tres ingredientes activos, éstos fueron caracterizados toxicológicamente mediante la determinación de la CL₅₀ y el TL₅₀.

La CL₅₀ para la cepa HD133 fue de 77,68 µg/ml y para la cepa HD551 fue de 68.55 µg/ml, mientras que para el neem fue de 509.20 µg/ml. Considerando estos datos la cepa HD551 de *B. thuringiensis* fue empleada para la formulación de los bioinsecticidas. Con relación al TL₅₀ de los bioactivos en contra de *Spodoptera exigua*, las cepas HD133 y HD551 presentan un TL₅₀ muy cercano, siendo éste de 5.92 y 6.46 días respectivamente, mientras el extracto de neem produjo un TL₅₀ de

9.72 días. Durante la propagación masiva de la cepa HD551 a nivel reactor de 14 litros el rendimiento promedio de extracto obtenido fue de 12.01 gramos de extracto. Posteriormente, fueron diseñados dieciocho soportes de formulación con acción fagoestimulante a partir de 3 polímeros microencapsulantes y cinco aditivos fagoestimulantes.

Los soportes constituidos de la mezcla grenetina- repollo y grenetina- panoja presentaron elevados niveles fagoestimulantes presentando una media de atracción de 5.47 ± 2.43 y 5.40 ± 1.84 larvas atraídas. Las matiz encapsulante que mostró el mejor efecto fagoestimulante fue la grenetina presentando una medias de atracción de 2.58 ± 1.91 larvas atraídas, mientras que los aditivos más aceptados fueron la panoja y el repollo presentando como medias de atracción 4.26 ± 2.13 y 3.71 ± 2.24 larvas atraídas, respectivamente.

De la combinación de los dos soportes de formulación y dos ingredientes activos se elaboraron 8 formulaciones asperjables (2 formulaciones blanco, 2 formulaciones con *B. thuringiensis*, 2 formulaciones con neem y 2 formulaciones con la mezcla 1:1 de *B. thuringiensis*: neem, los cuales fueron evaluados a nivel laboratorio e invernadero empleando como controles de comparación dos formulaciones comerciales- *B.t.* de nombre Thuricide HPC® y Dipel Dust ® y una formulación comercial de neem de nombre Triple Action PLUS®.

A nivel laboratorio las formulaciones que produjeron la más alta mortalidad fueron las constituidas por Gpa- *Bt*, Gre- *Bt*, Gpa- *BtNm* y Thuricide HPC® ocasionando una mortalidad de 12.00 ± 1.41 , 11.80 ± 1.30 , 11.20 ± 2.68 y 10.60 ± 0.55 larvas respectivamente, mientras que a nivel laboratorio las formulaciones que produjeron el menor daño sobre plantas de algodón de la variedad fibermax fueron los constituidos por Gpa-*Bt*, Gre-*Bt*, Thuricide HPC ® y Gpa-*BtNm*, en los cuales se generó el menor daño al afectarse solamente 1.53 ± 1.06 , 1.73 ± 0.88 , 2.47 ± 0.84 y 2.80 ± 1.47 hojas afectadas, lo que represento un menor daño sobre las plantas (6, 7, 10 y 11% de daño, respectivamente).

11. ABSTRACT.

Bacillus thuringiensis (*Bti*) has been extensively used for five decades in biopesticidal formulations due to its records as a safe agent for environmental and human health. The widespread use of *Bti* is often challenged by production as well as formulation cost. Formulation of *Bti* is a crucial factor between efficacy of active ingredients and applications as it regulates cost, increases shelf life, facilitates application and enhances field efficiency. Recently, interest in the use of natural compounds or vegetal bioinsecticides gained interest in crop protection. The neem tree *Azadiractha indica* produces the biodegradable and insecticidal limonoid recognized as azadiracthin or neem, compound that can be efficiently extracted from neem seeds and leaves. The insecticidal activity of neem has been demonstrated against numerous insect pests.

The objective of the present thesis is to develop combined formulations of *Bti* and neem extracts to improve the control of armyworm beetle, *Spodoptera exigua*. In order to develop those formulations, we evaluated the toxicity of ten *B. thuringiensis* strains and one neem extract. The HD133 and HD551 *B.t* strains showed the highest toxicity against the insect, and the neem extract had a biological positive effect to consider it as bioactive. The mortality caused at low concentration for those ingredients were 66.1%, 63.9%, and 22% respectively. After those bioactives were selected, a completed toxicological characterization was done through LC_{50} and LT_{50} 's determination. The LC_{50} for the HD133, HD551 and neem extract were 77.7, 68.6, and 509.2 $\mu\text{g/ml}$, respectively for each component, while the LT_{50} were 5.9, 6.5, and 9.7 days. According to previous results here given, the strain HD551 *B. thuringiensis* and the neem extract was selected for further experiments.

In order to produce massively the HD551 strain, three fermentation procedures were run with an average yield of 12.1 grams of *Bt*'s extract per each liter. When a microencapsulated matrix was developed, we observed that grenetin, a biopolymer, cabbage, and corn spike dust showed the highest phagostimulation against *S. exigua*. The blend of grenetin-cabbage and grenetin-cornspike was effective in the

microencapsulate matrix which attracted 5.47 ± 2.43 y 5.40 ± 1.84 larvae, which represented a higher attraction compared with cabbage only as used as control. However, the difference was not significant.

To produce microencapsulated formulations, we used the spray dry technique which performed well with high recovery of the products and maintaining good biological activity of the bioinsecticides. Eight formulations were produced combining one of both microencapsulate matrix and *B. thuringiensis* HD551 and neem extract. The formulations were evaluated at two levels. At laboratory level, the best treatments were those conformed by grenetin-cabbage-Bt and grenetin-cornspike-Bt, Thuricide HPC® and Grenetin-cornspike-BtNeem causing high protection to the cotton plants disc treated. We recorded only 12.00 ± 1.41 , 11.80 ± 1.30 , 11.20 ± 2.68 y 10.60 ± 0.55 dead larvae, respectively. At greenhouse level, the formulation more effective was the same as that seen at laboratory level, therefore, the best formulations were elaborated using grenetin-cabbage-Bt and grenetin-cornspike-Bt, Thuricide HPC® and grenetin-cornspike-BtNeem.

The toxicological result of the formulation developed was improved in contrast with other studies done elsewhere. Hence, it is possible to improve the effect of a bioinsecticide by formulating it using different bioactives. The combination of *Bti* and neem alone does not have an increased effect, but when the neem is formulated it does.

12. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos ha ocasionado no sólo la aparición de poblaciones de insectos cada vez más resistentes a estos productos, sino también un impacto ambiental negativo, afectando a los enemigos naturales, contaminando las mantos freáticos y el aire (Dietz *et al.*, 1991). Existe una tendencia mundial por utilizar alternativas de manejo sano de la agricultura, que garanticen sustentabilidad, seguridad ambiental y calidad en los productos alimenticios. Dentro de estas alternativas se encuentra el control biológico, el cual puede cubrir los requisitos de seguridad ambiental e inocuidad.

Los biopesticidas, incluyendo pesticidas microbianos, nemátodos entomopatógenos, baculovirus, pesticidas derivados de plantas y feromonas de insectos representan una alternativa a los pesticidas químicos y son componentes claves en un sistema de manejo integrado de plagas (Cisneros *et al.*, 2002; Hofte y Whiteley, 1989; Lasa *et al.*, 2007; Szewczyk *et al.*, 2006).

Se espera que en esta década el crecimiento del mercado de los biopesticidas sea de entre 10 y 15% anual, en contraste con 2% para los pesticidas químicos (Hall y Menn, 1999). En los Estados Unidos la meta para el año 2000 era remplazar el 75% de los pesticidas químicos por bioinsecticidas, sin embargo, esta meta no se alcanzó, lo que ha afectado directamente las exportaciones de los productos agrícolas ya que no cumplen las normas en cuanto a la residualidad de pesticidas. Todo esto ha dado lugar a la necesidad de implementar estrategias en el manejo integrado de plagas en los cultivos de exportación y de empezar a establecer las bases para la producción de productos orgánicos. Sin embargo, la introducción de biológicos en la agricultura es

incipiente. El manejo integrado de plagas considera que los insecticidas biológicos son productos importantes para el combate de insectos en cultivos de maíz, algodón, caña de azúcar, café, hortalizas, frutales y árboles forestales, los cuales se usan apoyados por la legislación en materia de protección ambiental. Dentro de estos productos destacan la bacteria *Bacillus thuringiensis* y los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* (De-Faria y Wraight, 2007).

Los bioinsecticidas han demostrado su efectividad tóxica para el control de plagas causando un daño ambiental mínimo, no dejan residuos tóxicos en los alimentos y no presentan actividad carcinogénica ni alteraciones neurológicas en los humanos, como se ha señalado que causan los insecticidas químicos. Además, excepto para *Bacillus thuringiensis* con *Plutella xylostela*, no se conocen casos de resistencia de insectos a estos productos (Hofte y Whiteley, 1989; Tabashnik, 1994). Estos atributos, aunado a que los bioinsecticidas se pueden emplear dentro de los programas del manejo integrado de plagas y en las estrategias de conservación agroecológica, impulsan a que estos mejoren su posición en el mercado en los próximos años respecto a los insecticidas químicos. Desde el punto de vista económico las perspectivas de éxito del control biológico son alentadoras, de manera que gran cantidad de investigaciones se están realizando enfocadas en llevar a cabo la producción comercial a gran escala de bioinsecticidas para la protección de los campos agrícolas.

La humanidad ha utilizado productos de las plantas para el control de insectos por varios siglos. Los insecticidas botánicos son productos derivados de vegetales, es decir, que no son sintetizados químicamente, sino que mediante ciertos procedimientos son extraídos de las plantas. Dentro de este grupo se tienen las piretrinas, alcaloides, entre otros. Estos compuestos al usarse en campo no

representan un problema ambiental, como lo presentan los insecticidas químicos. Unas de las plantas bien conocidas por sus propiedades pesticidas está representado por el neem (*Azadirachta indica*). Por cientos de años, los granjeros hindús han usado el árbol de neem por sus propiedades pesticidas, antifúngico y por su propiedad antifagoestimulante. El efecto de la azaridactina sobre diferentes organismos como nemátodos (Akhtar, 2000) y su modo de acción como componente pesticida ha sido investigada (Immaraju, 1998; Javed, *et al.*, 2007, 2008; Mordue y Blackwell, 1993). Los extractos productos botánicos son una herramienta alternativa útil y deseable en la mayoría de los programas de manejo de plagas porque pueden ser eficaces y completar a menudo las acciones de los enemigos naturales (Schmutterer, 1990). Los extractos de neem son ampliamente explotados para su uso contra una amplia variedad de insectos y nemátodos fitopatógenos como es el caso de *Meloidogyne javanica* (Javed *et al.*, 2007, 2008). En particular el triterpeno azaridactina y sus derivados, presentan efecto antialimentario (Liang *et al.*, 2003), repelente, insecticida, regulador del crecimiento y, son causantes de esterilidad en hembras adultas (Coventry y Allan, 2001; Schmutterer, 1990; Seljasen y Meadow, 2006; Tewari, 1993).

Dentro de los factores más importantes que afectan la producción de hortalizas destacan los insectos plaga. Cada día la situación de éstos insectos se torna más difícil, las plagas secundarias se tornan primarias; además, surgen nuevas plagas que anteriormente no se encontraban. Los insectos que mayor daño causan a estos cultivos son el minador de la hoja *Liriomyza sativae*, la mosquita blanca *Bemisia tabaci* y *B. argentifoli*, el gusano soldado *Spodoptera exigua*, gusano alfiler *Keiferia lycopersicella*, entre otros (Avilés, 1997).

En los últimos años el gusano soldado está considerado como una de las plagas más importantes de las hortalizas, esto se debe a que es difícil de controlar y se presenta en las altas poblaciones, causa daño en follaje y frutos. Para el control de este insecto plaga se destinan grandes cantidades de productos para su control y aun así, se detectan daños causados por este insecto.

13. HIPÓTESIS

Se puede desarrollar un formulado efectivo a partir de una cepa de colección de *Bacillus thuringiensis* combinada con un extracto de *Azadirachta indica* para proteger los cultivos afectados por *Spodoptera exigua*.

14. OBJETIVOS

14.1. Objetivo General:

Desarrollar formulaciones a partir de *Bacillus thuringiensis* y/o extractos de *Azadirachta indica* a partir de compuestos biodegradables con la finalidad de proteger los cultivos afectados por *Spodoptera exigua*.

14.2. Objetivos Específicos:

1. Realizar ensayos en el laboratorio para medir la actividad tóxica de las diferentes extractos de *B. thuringiensis* de cepas de colección y de un extracto de neem contra larvas de *Spodoptera exigua*.
2. Determinar la concentración letal media (CL₅₀) y el tiempo letal medio (TL₅₀) de extractos de *Bacillus thuringiensis* y de neem contra *Spodoptera exigua*.
3. Producir, de manera masiva, los agentes entomopatógenos a nivel laboratorio y planta semi-piloto.
4. Realizar bioensayos de preferencia para *Spodoptera exigua* utilizando diferentes matrices encapsulantes y aditivos fagoestimulantes solos o en combinación.
5. Elaborar formulados asperjables de los extractos de los agentes entomopatógenos con actividad tóxica hacia *Spodoptera exigua* con la incorporación en el mejor soporte de formulación.
6. Evaluar a nivel de laboratorio e invernadero los formulados desarrollados.

15. ANTECEDENTES

15.1. El Control Biológico.

El control biológico fue originalmente definido como “la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir en su ausencia” (De Bach, 1964). Como tal el control biológico se distingue de otras formas de control de plagas por actuar de una manera denso-dependiente, esto es, los enemigos naturales se incrementan en intensidad y destruyen una gran porción de la población cuando la densidad de esta población se incrementa y vice-versa (De Bach y Rosen, 1991).

Este fenómeno natural de regulación de plagas manejado por el hombre a través del realce de la intervención de agentes de control biológico, plantas y herbívoros provisto de bases ecológicas se dio a conocer en la década de los 70 del siglo pasado como Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Van des Bosch *et al.*, 1982).

La Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) define el control biológico como “la utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos”. Desde este punto de vista se incluyen en este concepto no solo los parasitoides, depredadores y patógenos de insectos y ácaros, sino también el de fitófagos y patógenos de malezas así como feromonas, hormonas juveniles, técnicas autocidas y manipulaciones genéticas.

Van Driesche and Bellows (1996) hacen referencia a una definición más reciente de control biológico que expresa que “el control biológico es el uso de parasitoides,

depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población de plagas, haciendo esta menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de éstos”, considerando esta definición bastante amplia y que incluye todos los grupos de organismos con capacidad para mantener y regular densidades poblacionales de organismos plaga a un nivel bajo, por lo tanto todos pueden considerarse agentes de control biológico y estar incluidos en la categoría de enemigo natural.

De acuerdo con Huffaker (1985), la premisa del control biológico descansa en que bajo ciertas circunstancias muchas poblaciones son llevadas a bajas densidades por sus enemigos naturales. Este efecto se origina de la interacción de ambas poblaciones (plaga y enemigo natural), lo cual implica una supresión del tipo denso-dependiente que se traduce como el mantenimiento de ambas poblaciones en equilibrio. Bajo este concepto la población del enemigo natural depende a su vez de la población de la plaga, es decir, la interacción de poblaciones significa una regulación y no un control (Rodríguez del Bosque, 1991)

15.1.1. Ventajas, desventajas, riesgos y beneficios del control biológico.

El control biológico cuando funciona posee muchas ventajas (Charleston *et al.*, 2005, 2006; Summy y French, 1988) entre las que se pueden destacar:

- Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluido el hombre.
- La resistencia de las plagas al control biológico es muy rara.
- El control biológico con frecuencia es a largo término pero permanente.

- El tratamiento con insecticidas es eliminado de forma sustancial.
- La relación coste/beneficio es muy favorable.
- Evita plagas secundarias.
- No existen problemas con intoxicaciones.

Entre las limitaciones que tiene el control biológico se pueden citar:

- Ignorancia sobre los principios del método.
- Falta de apoyo económico.
- Falta de personal especializado.
- No está disponible en la gran mayoría de los casos.
- Problemas con umbrales económicos bajos
- Enemigos naturales más susceptibles a los plaguicidas que las plagas.
- Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata.

El beneficio del control biológico se puede valorar en términos de éxitos o fracasos (De Bach, 1968). Un éxito completo se obtiene cuando se utiliza el control biológico contra una plaga importante y sobre un área extensa a tal grado que las aplicaciones de insecticidas se vuelven raras.

El éxito sustancial incluye casos donde las ganancias son menos considerables ya que la plaga y el cultivo son menos importantes, cuando el área cultivada es pequeña o porque ocasionalmente se requiere el uso de insecticidas. El éxito parcial es donde el control químico permanece como necesario pero se reduce el número de aplicaciones y el área tratada es pequeña.

En términos económicos, los beneficios cuando los hay son tan espectaculares como los ecológicos; se ha calculado un retorno aproximado por cada dólar invertido en control biológico clásico de una plaga de 30:1, mientras que para el control químico la relación es 5:1 (Hokkanen, 1985).

15.1.2. El Control Biológico en México

Desde hace poco más de un siglo y en varios países del mundo, el control biológico ha sido una de las áreas más interesantes dentro del manejo integrado de plagas. En el caso de México, este interés se ha dado de manera especial en los últimos 70 años. Las introducciones a México de parasitoides y depredadores para el control de los barrenadores de la caña de azúcar, de la mosca prieta de los cítricos y de otras plagas, la creación de centros de reproducción y liberación de organismos benéficos en toda la República, las investigaciones para conocer, proteger e incrementar la acción de organismos benéficos nativos o introducidos y, más recientemente, el estudio y utilización de microorganismos entomopatógenos, son testimonios de dicho interés. Las expectativas de estudio y aplicación del control biológico son muy amplias. Basta recordar la carencia de información del control biológico de plagas en diferentes sistemas de producción agrícola, en sistemas de labranza, cultivos asociados, cultivos protegidos, productos agrícolas almacenados, en sistemas de riego, o en la agricultura sustentable y orgánica. Otras necesidades están creciendo en importancia como son las de estudiar, en relación con el control biológico, los problemas relacionados con los cambios climáticos, el aumento del CO₂, la aparición en el mercado de cultivares con características de resistencia a plagas y su efecto en los enemigos naturales de éstas, o las plantas transgénicas y sus

repercusiones en los enemigos naturales de las plagas (Adams *et al.*, 1994; Gressel, 2010).

El Control Biológico ha rebasado en México la frontera que existe entre la tecnología marginal y la tecnología de uso común para los productores agrícolas. Lo anterior es especialmente cierto para aquellos productores que participan en los mercados internacionales, lo que les obliga a buscar las herramientas y estrategias que les permitan competir adecuadamente. Por otra parte, los técnicos y productores, intuitivamente, se han percatado de que el uso del control biológico les permite combatir plagas contra las cuales se dispone de especies entomófagas o entomopatógenas, a un costo menor que las erogaciones generadas por el empleo de plaguicidas.

Aunque las estadísticas de producción nacional no reflejan esto, la observación de las cantidades de agentes de control biológico importados muestra el aumento de su uso en México. Se vislumbra que en el futuro, el uso del control biológico se incrementará como consecuencia de la globalización de la economía, según se describe a continuación.

Conforme se diversifican las fuentes de suministro de productos hortícolas y frutícolas para los principales países importadores, aumenta la preocupación de los consumidores por proteger su salud, por lo que demandan que sus gobiernos impongan requerimientos cada vez más estrictos en lo que concierne a las normas de calidad y sanitarias del procesamiento de los productos alimenticios que se sirven e ingieren frescos. Por ejemplo, Estados Unidos está modificando su estructura de vigilancia sanitaria, para asegurar que los productos que se importan hayan sido cultivados, cosechados, empacados y/o procesados, mediante sistemas que reduzcan los riesgos de contaminación de cualquier tipo. Más aún, han variado los parámetros

toxicológicos que se aplican para el registro de plaguicidas agrícolas; de modo que se espera que durante los próximos diez años, el número de los ingredientes activos actualmente en uso se reduzca significativamente, así como las tolerancias (expresadas en partes por millón, que permanecen sobre los productos cosechados) de los que continúen en el mercado. Esta respuesta del gobierno de los Estados Unidos a la exigencia de los consumidores, se percibe como una tendencia que se expresará de manera generalizada a través de todos los países que participan en la Organización Mundial de Comercio, pues la Comisión del *Codex Alimentarius* ya inició la elaboración de normas en ese sentido.

La menor disponibilidad de plaguicidas químicos, así como la mayor vigilancia para que los productos que participan en el comercio mundial cumplan con las normas sanitarias, se reflejará en el incremento de prácticas agronómicas que aseguren la inocuidad de los alimentos y en la demanda de estrategias alternativas para el combate de plagas como el control biológico (Duso *et al.*, 2008).

14.1.3. Perspectivas y Desafíos para el Control Biológico en México.

En años recientes se ha reconocido con mayor frecuencia que el control biológico constituye (por sus virtudes económicas, ambientales, y ecológicas) la estrategia más deseable para el manejo de poblaciones de plagas agrícolas. Al contrario de lo que podría pensarse, el control biológico no es una estrategia relativamente nueva para la protección de cultivos en México. Su historial abarca más de 60 años, durante los cuales se han obtenido algunos éxitos importantes. Sin embargo, el desarrollo del control biológico como disciplina científica y como tecnología para la protección de cultivos ha sido obstaculizado por diversos factores. No obstante, en años recientes

se han intensificado las actividades relacionadas con el control biológico y se han obtenido avances tangibles. Puede afirmarse que el control biológico ocupa ya un lugar preferencial en el arsenal de tecnologías disponibles para la protección vegetal y esto crea oportunidades que contribuyen a su desarrollo. Por otra parte, se anticipa que una serie de cambios recientes en la política agraria y económica de México podrían alterar el marco ecológico y social dentro del cual se desarrolla el control biológico (Adamczyk *et al.*, 2008).

15.2. Entomopatógenos

Los insectos plaga al igual que las plantas, el ser humano y otros animales, pueden ser infectados por organismos que les ocasionan enfermedades, tales como bacterias, virus y hongos (De-Faria y Wraight, 2007; Szewczyk *et al.*, 2006). Bajo ciertas condiciones, como la humedad elevada o abundancia de la plaga, estos organismos de ocurrencia natural pueden multiplicarse y ocasionar brotes de enfermedades o epizootias que pueden acabar con una población. Las enfermedades pueden ser un control natural muy importante de algunos artrópodos plaga.

Algunos patógenos han sido producidos en masa y se encuentran disponibles en formulaciones comerciales. Estos productos, son llamados insecticidas microbiológicos, bioremediadores o bioinsecticidas. Algunos de estos todavía se encuentran en fases experimentales, otros ya están disponibles por muchos años. Formulaciones de la bacteria *Bacillus thuringiensis* o *Bt*, por ejemplo, se ampliamente usadas por los productores.

La mayoría de patógenos son específicos a cierto grupo y a ciertas etapas de vida de los insectos. Los productos microbiológicos no afectan directamente a los insectos

benéficos y, por lo general, no son tóxicos para los seres humanos y para las otras especies. La especificidad que posee estos agentes puede ser considerada una desventaja para la comercialización de este tipo de producto ya que un mercado pequeño limitaría las ganancias.

Al contrario de los insecticidas químicos o sintéticos, Los insecticidas microbiológicos no actúan rápidamente, es decir, puede tomar más tiempo en eliminar o debilitar a la plaga objetivo. Esto puede limitar su uso en los cultivos que pueden tolerar un cierto grado de daño. Para ser efectivos, la mayoría de los bioinsecticidas deben ser aplicados cuando la plaga objetivo se encuentra en una etapa de su ciclo específica, por lo que es necesario conocer sobre el ciclo de vida de la plaga. Otros bioinsecticidas deben ser ingeridos por la plaga para causar efecto.

Las principales características de los entomopatógenos:

- Matan, reducen la reproducción, reducen el crecimiento o acortan la vida del insecto plaga.
- Usualmente, son específicos a ciertos tipos de insectos, incluso a las diferentes etapas de su ciclo de vida.
- Su eficacia depende de las condiciones ambientales y de la abundancia del hospedero.
- El grado de control de una plaga, por parte de estos organismos es impredecible, generalmente actúan muy lentamente; puede tomar más de varios días para proporcionar un control adecuado.
- Pueden causar epizootias.

Los insecticidas microbiológicos son compatibles con el uso de predadores y algunos los cuales ayudan a la dispersión de los patógenos. Los insectos benéficos no

son afectados directamente debido a la especificidad del producto, pero algunos parasitoides pueden ser afectados indirectamente si sus hospederos son eliminados (Charleston *et al.*, 2005, 2006).

Al aplicar bioinsecticidas se deben tomar las mismas precauciones que al aplicar agroquímicos. A pesar de que los bioinsecticidas no son tóxicos para los seres humanos es recomendable minimizar la exposición (Caballero y Ferré, 2001; Couch, 1978).

Algunas especies de insectos son particularmente susceptibles al ataque de hongos entomopatógenos. Estos hongos son muy específicos, al grado de género y/o especie, por lo que no infectan a plantas y animales. El desarrollo de estos patógenos es favorecido por condiciones de humedad.

15.3. Historia de *Bacillus thuringiensis*

El conocimiento de organismos capaces de generar enfermedades en los insectos se remonta a la antigüedad cuando fueron descritos por vez primera en China los efectos del hongo *Cordyceps* sobre el gusano de seda *Bombyx mori*. Desde entonces, el número de enfermedades citadas ha ido en aumento, viéndose incrementado especialmente a partir del siglo XIX, coincidiendo con el desarrollo de la microbiología. Muchos de los organismos entomopatógenos que las causan son susceptibles de ser utilizados por el hombre en el control de densidades de poblaciones de insectos y, pertenecen a diferentes grupos taxonómicos, principalmente hongos, bacterias, nematodos y virus. Sin embargo, hasta el momento, sólo unos pocos han sido desarrollados como materias activas de productos insecticidas. De todos ellos, los más utilizados y extendidos

comercialmente en todo el mundo son, sin duda, los basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Caballero y Ferré, 2001).

La historia acerca de *Bacillus thuringiensis* da comienzo a inicios de este siglo cuando un bacteriólogo japonés, Ishawata (1901), aisló una bacteria esporogénica de forma bacilar a partir de la hemolinfa del gusano de seda *Bombyx mori*, a la cual llamó *Bacillus sotto*. Diez años más tarde, fue redescubierto un organismo similar por Berliner de la linfa de larvas de *Anagasta kuehniella*, en Alemania. El investigador Alemán lo llamó *Bacillus thuringiensis* debido a que tal microorganismo fue aislado en Turingia, Alemania, y con el cual en la actualidad se le reconoce. Berliner, aunque el mismo investigador reportó la presencia de un cuerpo paraesporal, dicho cuerpo de inclusión no fue relacionado con la actividad tóxica del microorganismo (Lambert y Peteroen, 1992; Salama y Morris, 1993).

No fue sino hasta 1915 en que un grupo de investigadores japoneses encontró que solo los cultivos esporulados eran tóxicos para larvas del gusano de seda. Ellos sugerían que la toxicidad observada se debía a la acción de toxinas (Lambert y Peteroen, 1992).

Los primeros ensayos en los que se usó a *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos, tomó lugar a finales de 1920 y principios de 1930, contra el gusano europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*, en el sureste de Europa como parte de un proyecto internacional de los Estados Unidos. Durante las siguientes dos décadas, pruebas de campo se realizaron contra plagas de lepidópteros en Europa y Estados Unidos. El primer producto comercial llamado Sporeine estuvo disponible en el año de 1938 en Francia, sin embargo, su desarrollo como bioinsecticida no alcanzó los niveles deseables de comercialización por dos razones principalmente. La primera de ellas porque tres años más tarde se descubrirían las propiedades insecticidas de las

moléculas químicas orgánicas de síntesis, lo cual marcó el inicio de la era del control químico que, rápidamente, acaparó todo el interés del mercado de los plaguicidas.

La segunda, porque el espectro de huéspedes de *B. thuringiensis* se restringía al orden Lepidóptera, en ese momento, en contraposición con el amplio espectro de huéspedes que caracterizaba a los insecticidas químicos que acababan de aparecer en el mercado (Caballero y Ferré, 2001). No fue sino hasta la década de los 50's en que varios países iniciaron la producción comercial extensiva de otros productos como Bakthane L-69, Biotrol BTB, Parasporin y Thuricide, los cuales utilizaron como ingrediente activo a *B. thuringiensis* variedad thuringiensis (Frankenhuyzen, 1993).

Hannay (1953) sugirió que el cristal paraesporal era el agente responsable de producir la toxicidad. Este acontecimiento queda más tarde comprobado por Angus (1954) quien en ese entonces reportó que *B. cereus* hoy reconocido como *B. thuringiensis* es una cepa microbiana muy tóxica hacia larvas de *Bombyx mori* mantenidas bajo condiciones de laboratorio. Más tarde, Hannay y Fitz-James (1955) demuestran la naturaleza proteica del cristal.

Un avance mayor ocurre cuando la Dra. H. de Barjac y A. Bonnefoni (1962) de Francia proponen por primera vez una clasificación serológica en base a los antígenos flagelares propios de *Bacillus thuringiensis*. Este acontecimiento sirvió para que más tarde Dulmage (1970) del USDA-ARS formara y clasificara la primera colección Internacional de esta bacteria.

Tiempo después en el año de 1969 ocurrió un evento mayor, el cual aumentó el número de las investigaciones relacionadas sobre *B. thuringiensis*, este acontecimiento fue cuando Dr. Howard T. Dulmage logró aislar en los Estados Unidos una cepa de *B. thuringiensis*, la cual resultó ser de 20 a 200 veces más potente que todas las especies ya conocidas en esas fechas; dicha cepa fue llamada *B.*

thuringiensis variedad *kurstaki* (HD1), y eventualmente fue adoptada por todas las compañías como ingrediente activo para sus respectivos productos comerciales (Couch, 1978; Frankenhuyzen, 1993).

Además, es importante mencionar el descubrimiento hecho en 1977 por Goldberg y Margalit, los cuales fueron los primeros en aislar una cepa de *Bacillus thuringiensis* con patogenicidad hacia otro orden de insectos, como es el caso de los para dípteros. Esta cepa hoy en día se conoce como *B. thuringiensis* variedad *israelensis* (Crickmore *et al.*, 1995) y lo cual abrió nuevos mercados, siendo el primer producto comercial de *B. thuringiensis* para el control de larvas de mosquitos y la mosca negra, incrementándose así las ventas globales en un 0.5% del mercado de los bioinsecticidas (Cerón, 2001; Frankenhuyzen, 1993). En 1983, Krieg aisló otra variedad de *Bacillus thuringiensis* a partir de pupas muertas del gusano de la harina, la cual llamó como *Bacillus thuringiensis* variedad *tenebrionis*. Esta subespecie fue altamente tóxica contra larvas de coleópteros como *Agelastica alni* y *Leptinotarsa decemlineata*. Estos últimos acontecimientos aunado a la concientización social de los problemas derivados del control químico, así como el incremento del espectro de huéspedes susceptibles a *B. thuringiensis* mediante el redescubrimiento de nuevas cepas con actividad insecticida más diversificada, renovó el interés por desarrollar comercialmente bioinsecticidas basados en esta bacteria. A partir de entonces se incrementó de modo significativo el ajuste de las reglamentaciones gubernamentales con la finalidad de potencializar su uso y, además, se incrementaron los esfuerzos realizados por las universidades y el sector industrial, poniendo en marcha programas de investigación que dieron como resultado el descubrimiento de muchas cepas de *B. thuringiensis* (Caballero y Ferré, 2001). Actualmente, se estima en 40,000 especies

de *B. thuringiensis* las cuales están registradas dentro de la colección mundial (Lambert y Peteroen, 1992).

15.4. Morfología

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, esporulado, entomopatógeno facultativo, con un tamaño promedio de 2 a 5 μm por 1 a 1.2 μm , perteneciente a la familia Bacillacea, presenta flagelos peritricos, a excepción de una cepa y se reproducen por fisión binaria durante su ciclo celular vegetativo. Esta bacteria es capaz de formar endosporas dentro de un esporangio cuando los nutrientes se agotan o cuando el medio ambiente llega a ser adverso, lo que origina un re-arreglo de la morfología y la formación de la spora. *Bacillus thuringiensis* está situado en el grupo 1 del género *Bacillus*, los cuales se caracterizan por ser especies con spora elipsoidal, las cuales no provocan hinchamiento del perfil bacilar (Gordon *et al.*, 1973) Esta bacteria en un principio era comúnmente encontrada en el medio ambiente como flora del suelo, sin embargo, conforme el interés hacia esta bacteria fue creciendo, su hábitat se fue incrementando, por lo que hoy en día su distribución es cosmopolita, ya que puede aislada de ambientes muy diversos (Lambert y Peteroen, 1992).

Existen especies de *Bacillus* muy relacionados o parecidos a *Bacillus thuringiensis*, sin embargo, la principal diferencia entre *Bacillus thuringiensis* y los otros bacillos estrechamente relacionados es la formación de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la spora, los cuales son sintetizados durante el proceso de esporulación (De-Maagd *et al.*, 2003). La mayoría de estos cristales paraesporales son tóxicos para ciertas especies de insectos, propiedad que le

ha conferido a este organismo un enorme interés, generándose formulaciones fitosanitarias de alta eficiencia y especificidad con un bajo impacto medioambiental (Bulla *et al.*, 1985).

Durante la esporulación sobreproducen un número limitado de proteínas de aproximadamente 130 kD, y estas subunidades proteicas conformarán una estructura mayor originando un el cristal proteico intracelular, el cual también es conocido como inclusión paraesporal. Estos cristales son liberados al medio cuando las paredes celulares son degradadas al término de la esporulación bacteriana. Según estimaciones promedio el cristal puede representar más del 30 % del peso seco del esporangio maduro. Estas estructuras cristalinas poseen morfología muy variada la cual inicialmente fue relacionada con la toxicidad dirigida hacia los diferentes órdenes de insectos.

B. thuringiensis produce cerca de 25 tipos de cristales insecticidas cuya morfología es variable considerando la cepa de *B. thuringiensis* de la que se trate. Esta diversidad de formas es dependiente del tipo de proteínas que lo conforman. Considerando esto podemos encontrar cristales bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares, cuyo tamaño oscila desde los 350nm de diámetro en algunos cristales irregulares, a 2 μ m de longitud en muchos cristales bipiramidales (Gordon *et al.*, 1973; Meadows, 1993). Los genes que codifican para este cristal generalmente se encuentran dentro de plásmidos, aunque se han encontrado algunos en localización cromosomal (Aronson *et al.*, 1986; Lambert y Peteroen, 1992). El cristal de la mayoría de las cepas de *Bacillus thuringiensis* contiene entre tres y cinco δ - endotoxinas, cada una de las cuales tiene su propia especificidad insecticida. La toxicidad y efectividad insecticida de una cepa bacteriana viene determinada por la combinación de δ - endotoxinas y la proporción

relativa de las mismas. En *B. thuringiensis*, hasta la fecha, se han identificado más de 200 proteínas tóxicas diferentes que ofrecen un recurso natural para su utilización en el control de plagas.

Las cepas que han alcanzado un mayor desarrollo comercial pertenecen principalmente a cuatro serovariedades, sin embargo las serovariedades *kurstaki* y *aizawai* son las que han sido más utilizadas comercialmente ya que poseen una alta actividad insecticida para mayoría de las larvas de los lepidópteros (Bohorova *et al.*, 1997). Las otras dos serovariedades corresponden a la *israelensis* (Crickmore *et al.*, 1995) la cual presenta toxicidad hacia larvas de dípteros y a la serovar. *morrisoni* hoy conocida como *tenebrionis*, cuyo efecto insecticida va dirigido principalmente hacia algunas especies de coleópteros. Estas cepas constituyen la materia activa de las distintas formulaciones comerciales, las cuales en su conjunto representan más del 90% de los bioinsecticidas actualmente comercializados (Caballero y Ferré, 2001).

15.5. Evolución de *Bacillus thuringiensis* como Agente de Control Biológico.

Aunque *Bacillus thuringiensis* fue comercializado hace más de 40 años, su uso se ha incrementado, de manera significativa, en los últimos 10 años. Esto se debe, principalmente, a la demanda pública del uso de plaguicidas menos tóxicos para los consumidores, trabajadores, el medio ambiente y la creciente demanda de productos que sean efectivos en el control de insectos resistentes a insecticidas químicos. Simultáneamente, con el aumento de la aceptación de los insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, se han hecho esfuerzos para el mejoramiento de los rendimientos en los métodos de producción, las técnicas de formulaciones y la obtención de nuevas cepas capaces de atacar diversas plagas (Gelernter y Schawab, 1993).

Han pasado más de tres décadas desde que se empezaron a utilizar las primeras preparaciones comerciales de *B. thuringiensis* y a la fecha la bioseguridad es una de las ventajas principales que ofrece este insecticida microbiano. Diversas razones entre las que destacan especificidad, virulencia y potencia contra los insectos blanco, han convertido a esta bacteria en uno de los candidatos más atractivos para el desarrollo comercial.

Setenta años después de su descubrimiento a principio de este siglo, *Bacillus thuringiensis* capturó la atención de pocos microbiólogos y entomólogos. Ahora, cien años después, los científicos estudian una amplia variedad de disciplinas, para probar sus secretos en el ámbito molecular, fisiológico y ecológico. Hoy *Bacillus thuringiensis* no es solamente el más exitoso insecticida microbiano comercial con aplicación mundial para la protección de cultivos, bosques y la salud humana, sino está también ha comenzado a remplazar a los insecticidas químicos convencionales en varias áreas de aplicación.

Durante los años ochenta, la convergencia de nuevas técnicas, especialmente aquellas proporcionadas por la tecnología del DNA recombinante, y el cambio de actitudes públicas y políticas hacia el uso de estos plaguicidas, precipitó un incremento drástico en la investigación de *Bacillus thuringiensis* por la industria, gobierno e instituciones académicas de investigación. El bajo costo de desarrollo, con la alta diversidad de cepas y toxinas, así como también el buen prospecto para llevar a cabo la manipulación genética, ha provisto las bases para el desarrollo de nuevas generaciones de productos más efectivos y experimentalmente aceptables para el control de insectos (Frankenhuyzen, 1993; Gaertner *et al.*, 1993).

15.6. Mecanismo de Acción de las Toxinas

El insecto blanco ingiere la formulación la cual contiene como ingredientes activos, esporas viables de *Bacillus thuringiensis* y una protoxina de 130 kD, que al pasar al intestino es solubilizada debido al pH alcalino del medio. Ésta es hidrolizada en fragmentos tóxicos de aproximadamente 650 aminoácidos (60- 70 kD) por acción de una proteasa, presente en el intestino medio. La subunidad proteica tóxica se une posteriormente a receptores específicos de las células columnares en la membrana epitelial del intestino medio de los insectos, causando un incremento de la permeabilidad de las membranas al ion K^+ , seguido por la lisis celular del epitelio (Hofte y Whiteley, 1989). Tras la lisis de las células epiteliales, cuyo efectos pueden bastar para matar al insecto, las esporas contenidas en el intestino pueden acceder a la cavidad hemocélica del insecto aprovechando las lesiones como puerta de entrada, provocando en ocasiones septicemia al germinar y multiplicarse activamente en la hemolinfa, lo que supone un efecto sinérgico con el de la toxina. Como consecuencia de esto, las larvas dejan de alimentarse y se provoca la muerte de la larva a las 24 ó 48 horas, después de la exposición a la bacteria (Frankenhuyzen, 1993; Gill, *et al.*, 1992).

15.7. Formulaciones de *Bacillus thuringiensis*.

Una formulación de un pesticida agrícola se define como una mezcla o combinación correcta, de tal manera que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto estable, efectivo, seguro, fácil de aplicar y aceptable para su uso. El objetivo principal de una formulación es asegurar la viabilidad óptima del entomopatógeno en el ambiente, extender la vida de anaquel del producto y ser aceptado por el insecto blanco. Dentro de los plaguicidas, los entomopatógenos son

usados en las formulaciones como un ingrediente activo, el cual llevará a cabo el control biológico. Estos entomopatógenos pueden ser bacterias, hongos o virus, los cuales infectan a insectos (Aronson *et al.*, 1986; Sawicka y Couch, 1983).

La microencapsulación es una tecnología relativamente nueva que es usada para la protección, estabilización y la lenta liberación de los ingredientes activo (Cerón, 2001; Dunkle y Shasha, 1988; Sawicka y Couch, 1983). Durante la microencapsulación, se forman gotas pequeñas del ingrediente o material activo que están cubiertas por un agente encapsulante, lo que resulta en la producción de cápsulas minúsculas con diversas propiedades favorables. Estas partículas esféricas, llamadas microcápsulas, presentan radios desde fracciones de micra hasta algunos milímetros. Sin embargo, su forma no es siempre idealmente esférica, ya que está influenciada fuertemente por la estructura del material original (Okos y Narsimham, 1990). Los procesos de encapsulación son capaces de reducir la cantidad de ingrediente activo, de tal forma que se obtenga una eficiencia mayor permitiendo llevar a cabo la liberación sostenida del ingrediente activo por un periodo de tiempo (Shahidi y Qing-Han, 1993).

El desarrollo de formulaciones mejoradas puede incrementar la mortalidad larvaria, asegurando la ingestión de una dosis letal de *B. thuringiensis* en un periodo de tiempo corto antes de que la larva deje de alimentarse (Gillespie *et al.*, 1994). Para ello, la adición de coadyuvantes para estimular la alimentación de la larva sobre los productos de *B. thuringiensis* ha sido una de las estrategias más utilizadas en agricultura. El uso de *B. thuringiensis* en forma concentrada en conjunto con algunos fagoestimulantes ayuda a asegurar que la larva ingiera una cantidad letal antes de dejar de alimentarse (Cisneros *et al.*, 2002).

Bacillus thuringiensis es solamente uno de los bioinsecticidas producidos a escala industrial y disponibles en el mercado a precios accesibles para los agricultores, sin embargo, en la actualidad se sigue trabajando para obtener tecnologías de producción más accesibles que ayuden a reducir los costos de manufactura, esto con la finalidad de generar productos más competitivos comparado con los insecticidas químicos.

Las investigaciones de los últimos 35 años han demostrado la efectividad de las cepas de *B. thuringiensis* contra un gran número de cultivos agrícolas y ornamentales, árboles forestales y animales.

Varias formulaciones de *B. thuringiensis* están ahora registradas en los estados Unidos y Canadá. Formulaciones comerciales de la cepa HD1 de la variedad kurstaki, incluyendo a Thuricide®, Depilé®, Novaba®, Futura®, Envirobact®, y Bactospeine® son designadas específicamente para su uso contra ciertas plagas de lepidópteros de bosques, cultivos agrícolas, granos almacenados, ornamentales o jardines caseros. Otro producto como el Javelin® es una formulación de la cepa NRD-12, la cual también es específica para el control de lepidópteros.

Existen otras formulaciones comerciales las cuales utilizan a cepas del serotipo israelensis, como lo son la formulación Vectobac®, Bactimos® y Teknar®, u cuya aplicación principal es el control de moscos transmisores de enfermedades. Otras formulaciones comerciales menos frecuentes que utilizan cepas de la serovariedad san diego y tenebrionis son el M-One® y Trident® respectivamente, las cuales son utilizadas para llevar a cabo control contra ciertos coleópteros Chrysomélidos (Roberts *et al.*, 1991).

Algunas formulaciones contienen contener dos o más combinaciones de toxinas en un mismo producto para obtener un espectro de acción más amplio. Posteriormente la empresa Mycogen introdujo una combinación de proteínas cryIAC

y crylC, y Ecogen saca un producto llamado Crymax®, el cual posee como ingrediente activo la combinación de tres toxinas cry1Ac, cry2A y crylC aplicables para llevar a cabo la protección de hortalizas y del cultivo de algodón. Algunos otros productos como el Dipel® de Abbott y Javelin® de Sandoz contienen una mezcla de cuatro o más diferentes tipos de cristales. El número y el tipo de cristales en un producto es un factor determinante que está relacionado con la efectividad sin embargo, la concentración es también un factor importante.

Después de la comercialización de los productos mencionados anteriormente Sandoz en 1996 introdujo un producto de *B. thuringiensis* de alta potencia el cual contenía una mezcla de 5 diferentes cristales, el CoStar®. Este producto fue utilizado para combatir plagas de algodón y vino. La alta potencia ofrece un control efectivo de plagas a dosis bajas con gran actividad residual (Caballero y Ferré, 2001).

Existen algunos factores como es el lavado por lluvia y la inactivación de las esporas y cristales por acción de la luz solar que limitan o el uso de estos tipos de productos, como consecuencia de que originan una toxicidad limitada o disminuida. Otro de los factores adversos de los productos a base de *Bacillus thuringiensis* es que la transmisión horizontal de la infección hacia otros insectos es muy baja o no se produce por ello es necesario realizar aplicaciones repetidas, especialmente cuando se trata de combatir un insecto plaga multivoltina o insectos que presentan períodos de oviposición largos. Sin embargo, con el creciente reconocimiento del potencial de *Bacillus thuringiensis* como agente de control de insectos, durante 1980 y 1990 los principales objetivos se enfocaron a mejorar las deficiencias de este tipo de productos (Frankenhuyzen, 1993; Gillespie *et al.*, 1994). Para incrementar el tiempo de persistencia del ingrediente activo en el campo, es necesario proteger los bioactivos de factores adversos del medio ambiente y, además, hacerlo más atractivo

hacia el insecto blanco. Una forma que ha contribuido a proteger el ingrediente activo, ha sido el empleo de formulaciones encapsuladas de lenta liberación, entre las cuales destacan las matrices de almidón en forma de microcápsulas o gránulos, dependiendo si el método de aplicación va a realizarse por aspersión (como es el caso de la mayoría de los cultivos agrícolas) o granular (aplicable para gramíneas y pastos) (Dunkle y Shasha, 1988; McGuire y Shasha, 1990b; McGuire *et al.*, 1994).

Los tipos de aplicación de *Bacillus thuringiensis* a cultivos se ha modificado notablemente en los últimos años en un intento para aumentar la toxicidad y la residualidad del mismo (Gillespie *et al.*, 1994; McGuire *et al.*, 1994). Inicialmente y hasta fechas recientes, una de las mejores técnicas más eficientes para proteger un cultivo, se lleva a cabo mediante la aplicación del ingrediente activo por aspersión (Lambert y Peteroen, 1992).

Durante los años de 1960, Angus y Jaques- Fox, experimentan el uso de aditivos aspersores y adherentes para incrementar la eficiencia de aspersión de *Bacillus thuringiensis* en sistemas de cultivo, donde la eficiencia sé incremento (Couch, 1978).

Una vez más, estos resultados favorecieron que durante la década de 1970, fueran realizadas aspersiones aéreas en grandes extensiones en Norteamérica con el fin de llevar a cabo el control del gusano de la yema del abeto, *Christoneura rumiferana* y la polilla gitana *Lymantria dispar*. Para ello aplicaciones de campo fueron realizadas para determinar las frecuencias de los tratamientos, las dosis y los volúmenes de aplicación. Con estas pruebas la eficiencia de *Bacillus thuringiensis* fue mejorando y disminuyendo los costos de aplicación. La tecnología para llevar a cabo la aplicación de *B. thuringiensis* es básicamente la misma que es utilizada para los insecticidas sintéticos y, están basadas en la aplicación controlada de las gotas. Esta tecnología

fue desarrollada en Inglaterra a finales de 1970 y fue aplicado por el Instituto de Tecnología y la Comisión Forestal del Reino Unido en Escocia para llevar a cabo la protección forestal de los bosques para el control de la mariposa bella del pino *Panolis flammea* con Fenitrothion y, posteriormente, fue utilizado en Canadá por el Grupo de Investigación de New Brunswick con la finalidad de controlar el gusano de la yema del Abeto; para ello el diámetro medio de la gota asperjada fue de 100 μm . En Canadá el porcentaje de áreas tratadas con *Bacillus thuringiensis* se incrementó de un 5% a un 60% durante los años de 1980 a 1990, protegiendo aproximadamente 5 millones de hectáreas (Frankenhuyzen, 1993).

En los últimos 20 años diversos estudios se han dirigido hacia la protección de las esporas y cristales de la luz solar, en preparar formulaciones que se dispersen rápidamente y generar productos que posean una vida de anaquel mayor. Durante la década de 1990 al 2000, diversas formulaciones asperjables a base de almidón de maíz las cuales contenían un 6% de sólidos totales fueron desarrolladas con el fin de evaluar diversos parámetros como la viscosidad, solubilidad y la retención sobre la superficie de la planta. Otros estudios fueron realizados con la finalidad de evaluar la persistencia de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis*, observando que cuando el agente encapsulante estaba presente, la actividad insecticida persistía hasta por dos semanas bajo condiciones de invernadero (McGuire y Shasha, 1990b).

En estudios de campo, las aplicaciones microbianas se realizan mediante aspersiones foliares por lo que se pierde gran parte del agente en el suelo o aire, es por este motivo que se empezó a emplear el uso de estabilizadores y adherentes (Couch, 1978) entre los cuales se emplearon algunos carbohidratos como la sacarosa (McGuire y Shasha, 1992a). Otro de los problemas que más afectan a este tipo de productos es la inactivación de los bioactivos originado por la radiación ultravioleta

proveniente de los rayos solares. Con la finalidad de evitar y minimizar este efecto, diversos colorantes aromáticos fueron evaluados con la finalidad de incrementar el grado de protección (Bartlett *et al.*, 1990). Durante este época también se estuvieron estudiando otros parámetros con la finalidad de incrementar la eficiencia el consumo de las formulaciones por parte del insecto, para ello fueron evaluados algunos atrayentes y fagoestimulantes, donde el p- metoxicianoaldehído y el Coax® resultaron ser los mejores aditivos (McGuire y Shasha, 1992a).

Morales-Ramos (1998) menciona que los polímeros gelatina y pectina pueden ser utilizados exitosamente para elaborar formulados granulares de *Bacillus thuringiensis*, los cuales mantienen una buena actividad biológica al someter los formulados a un proceso de almacenamiento durante 12 meses, no encontrando una pérdida considerable en la actividad tóxica. Otras cualidades que presentaron estas formulaciones fueron una elevada propiedad adherente y además el insecto en estudio aceptó alimentarse con los gránulos elaborados con estas matrices. Considerando estas propiedades, ellos sugieren que los biopolímeros podrían utilizarse en otro tipo de formulaciones biológicas, ya que para su elaboración no requiere el uso de solventes.

Para el obtenerse el éxito comercial de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida, se requirió de varios procesos y disciplinas, tales como el aislamiento de cepas, mejorar las tecnologías de producción, estudiar las mejores técnicas aplicación en campo, el desarrollar formulaciones más eficientes y finalmente aplicar el uso de la biología molecular, todo ello con el fin de controlar número importante de plagas del orden lepidóptera (Cannon, 1996).

La mayoría de los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* son producidos con cepas nativas y utilizan una pequeña fracción de proteínas cry conocidas (Hofte y Whiteley, 1989).

15.8. Plantas como fuente Natural de Semioquímicos.

Otra clase de agentes entomopatógenos que ha tenido una buena aceptación en el control de insectos plaga son los insecticidas de origen vegetal o semioquímicos.

El principal mercado y uso de los insecticidas vegetales hoy en día es el de los parques y jardines, esto se debe a que poseen una baja persistencia en el medio, las personas están mucho menos expuestas a su toxicidad. Se espera que en 10 a 15 años, estos compuestos aumenten en un 25% su participación en el mercado de insecticidas y que no solamente se limiten al área de jardinería sino que se expandan masivamente en ámbitos como el agrícola y el urbano (Silva *et al.*, 2002).

Las plantas en conjunto producen más de 100,000 sustancias de bajo peso molecular conocidas también como metabolitos secundarios, los cuales en la mayoría de los casos no son esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Diversos son los tipos de metabolitos producidos, como lo son los terpenos, los lignanos, los alcaloides, así como diversos azúcares, esteroides y ácidos grasos. Toda esta diversidad bioquímica es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies y que ha favorecido que las plantas tengan mejores mecanismos de defensa contra el ataque microbiano, así como a la depredación que sufren como consecuencia de la presencia de algunos insectos y animales (Dixon, 2001). Hoy en día se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo de defensa de las plantas (Jacobson, 1989).

En los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de pesticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana.

Sin lugar a dudas los insecticidas naturales obtenidos a partir de extractos vegetales constituyen una fuente muy interesante como alternativa en el control de insectos, y son una fuente potencial ya que a la fecha se han evaluado muy pocas plantas en relación a la fuente natural de metabolitos que ofrecen al planeta, por lo que las perspectivas futuras en cuanto a investigación, día con día se han incrementado (Carpinella *et al.*, 2002).

15.8.1. Insecticidas Naturales obtenidos de Extractos Vegetales

A partir de la necesidad por encontrar una nueva alternativa natural para el control de insectos plagas y remplazar así los pesticidas sintéticos aparecen una serie de insecticidas de origen botánico, los cuales ofrecen seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica. Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas de importancia contra los insectos plagas (Céspedes *et al.*, 2000). La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios potenciales capaces de ser utilizados como insecticidas naturales, además de esa propiedad debe ser fácilmente cultivable y poseer principios activos potentes y de alta estabilidad química. Los principales compuestos aislados de plantas los cuales han sido aplicados con fines insecticidas son:

15.8.1.1. Rotenona.

La rotenona (Figura 1), extraída de una planta de la Familia Fabaceae llamada derris (*Derris elliptica* y *Lonchocarpus utilis*). Esta planta produce un flavonoide que se extrae de las raíces, la cual logra producir alrededor de un 5 a 13% de

rotenona en proporción al peso seco del tejido deshidratado. Los ejemplares de las plantas del género *Derri sp* son nativos de los trópicos orientales, mientras que los del género *Lonchocarpus sp* son del hemisferio occidental. Este compuesto es un insecticida que actúa tanto por contacto como por ingestión, y además en algunos insectos funciona como repelente. Su modo de acción implica una inhibición del transporte de electrones a nivel de las mitocondrias, bloqueando la fosforilación del ADP a ATP, es por esto que se dice que actúa inhibiendo el metabolismo del insecto. Los síntomas que presentan los insectos intoxicados con rotenona son muy diversos, y se caracterizan por originar una disminución del consumo de oxígeno, así como una depresión de la respiración y finalmente genera ataxia, lo que en su conjunto provoca finalmente la parálisis y muerte del insecto por asfixia (Silva *et al.*, 2002).

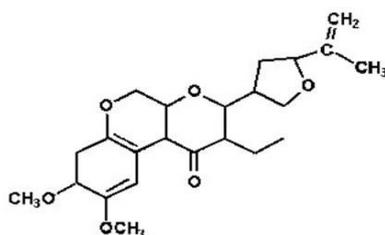


Figura No.1. Estructura molecular de Rotenona

16.8.1.2. Piretrinas.

Por otro lado, las *piretrinas* (Figura 2) son una mezcla de compuestos estéricos con propiedades insecticidas. Estos compuestos son encontrados de modo natural en las flores de las plantas del género *Chrysanthemum ssp* como *Chrysanthemum cinaerifolium* (Fam. Asteraceae). Dentro de las piretrinas se conocen seis sustancias biológicamente activas con propiedades insecticidas y, cuyos constituyentes se clasifican principalmente en dos grupos: las piretrinas I ($C_nH_{28}O_3$) y las piretrinas II:

Las piretrinas pueden obtenerse en proporciones que van desde un 20 al 25% del peso seco de la flor. Este tipo de químicos afectan tanto el sistema nervioso central como el periférico del insecto, lo que ocasiona fuertes estímulos repetidos, seguido de convulsiones. Diversos estudios han demostrado que estos bioactivos bloquean la entrada de iones sodio a los canales, generando un descontrol de la conductividad de los estímulos como consecuencia del transporte de este ion. Sin lugar a dudas la característica más importante de estos compuestos es su alto efecto irritante lo que hace que el insecto tan pronto entra en contacto con la superficie tratada deje de alimentarse y caiga de la planta o superficie tratada. Las piretrinas capturaron la atención de diversos grupos de investigación, y como consecuencia de ello posteriormente se dieron origen a una familia de compuestos artificiales conocidos como *piretroides* (Pascual-Villalobos, 1996; Silva *et al.*, 2002).

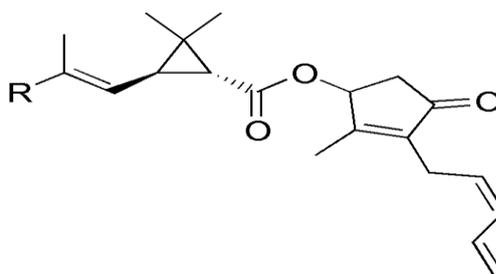


Figura 2: Estructura molecular de Piretrina

15.8.1.3. Nicotina.

Un tercer compuesto de importancia lo es la *nicotina* (Figura 3), un alcaloide obtenido especialmente de la planta del tabaco *Nicotiana tabacum* (Fam. Solanaceae), la cual constituye produce cerca del 5% de nicotina en proporción al peso seco de la planta. Sus propiedades insecticidas fueron reconocidas en la primera

mitad del siglo 16, como un insecticida de contacto no persistente. Es un potente veneno e incluso se usa en múltiples insecticidas (fumigantes para invernaderos), y en bajas concentraciones causa un efecto estimulante. Su modo de acción consiste en mimetizar la función de la acetilcolina, ya que logra combinarse con su receptor en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. El receptor acetilcolínico al interaccionar naturalmente con la acetilcolina y altera la permeabilidad de la membrana, sin embargo, la actividad de la nicotina ocasiona además la generación de nuevos impulsos que provocan contracciones espasmódicas, convulsiones y finalmente la muerte. Hoy en día se encuentran en el mercado un grupo de insecticidas conocidos como neonicotinoides, los cuales son copias sintéticas o derivadas de la estructura de la nicotina, ejemplo de ellos son la imidacloprida, el tiacloprid, el nitempiram, el acetamiprid y el tiametoxam, entre otros

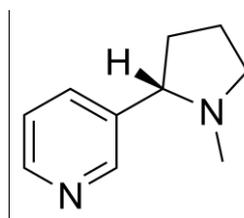


Figura 3: Estructura molecular de la Nicotina

Otra planta utilizada como insecticida es la *Anabasis aphylla* L. (Fam. Chenopodiaceae). Su principio activo denominado *anabasina* o *neonicotina* es similar a la nicotina y actúa de la misma forma. Esta planta crece en Asia central (Casanova *et al.*, 2002; Duke, 1990).

15.8.1.4. Rianodina.

La *rianodina* es un agente bioactivo obtenido de los tallos y raíces de una planta originaria de América del Sur conocida como riana o *Ryania speciosa* (Fam. Flacourtiaceae). De esta planta se logra obtener una serie de alcaloides, siendo el más

importante la rianodina. Este alcaloide actúa por contacto y vía oral afectando directamente los músculos e impidiendo su contracción, motivo por el cual genera parálisis. La planta es utilizada para combatir larvas de insectos plaga del orden Lepidóptera que atacan frutos y particularmente la plaga del maíz europeo (Jefferies y Casida, 1993; Silva *et al.*, 2002).

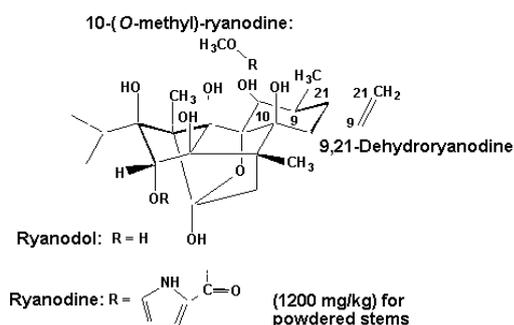


Figura 4: Estructura molecular de la Rianodina

15.8.1.5. Azadiractina.

Uno de los bioactivos más ampliamente utilizado para el control de los insectos plaga es la azadiractina, un tetraterpenoide característico de la familia Meliaceae obtenido especialmente del árbol neem (*Azadirachta indica*) originario de la india (Nathan *et al.*, 2007; Javed *et al.*, 2007, 2008). Este compuesto puede obtener de la corteza, las hojas y el fruto de este árbol, aunque la mayor concentración se obtiene de la semilla. Aunque un gran número de compuestos han sido aislados del árbol de neem, solamente unos pocos han sido caracterizados y estudiados con relación a su actividad biológica (Kausik *et al.*, 2002). En el extracto se han identificado alrededor de 18 compuestos entre los que destacan la salanina, el melianrol y la azadiractina, los cuales se encuentran en mayor proporción (Figura No. 5). Los mecanismos de

acción que ejercen hacia los insectos son muy variados, actuando como antifagoestimulantes, reguladores del crecimiento, inhibidores de la oviposición y como esterilizantes (Nathan *et al.*, 2005). Hoy en día ya se pueden encontrar formulaciones comerciales de neem con nombres comerciales, como el Neem Gold®, el Neemazal®, el Econeem®, el Neemark®, el Neemcure®, el Azatin®, entre otros, en países como Estados Unidos, India, Alemania y varios países de América Latina (Silva *et al.*, 2002).

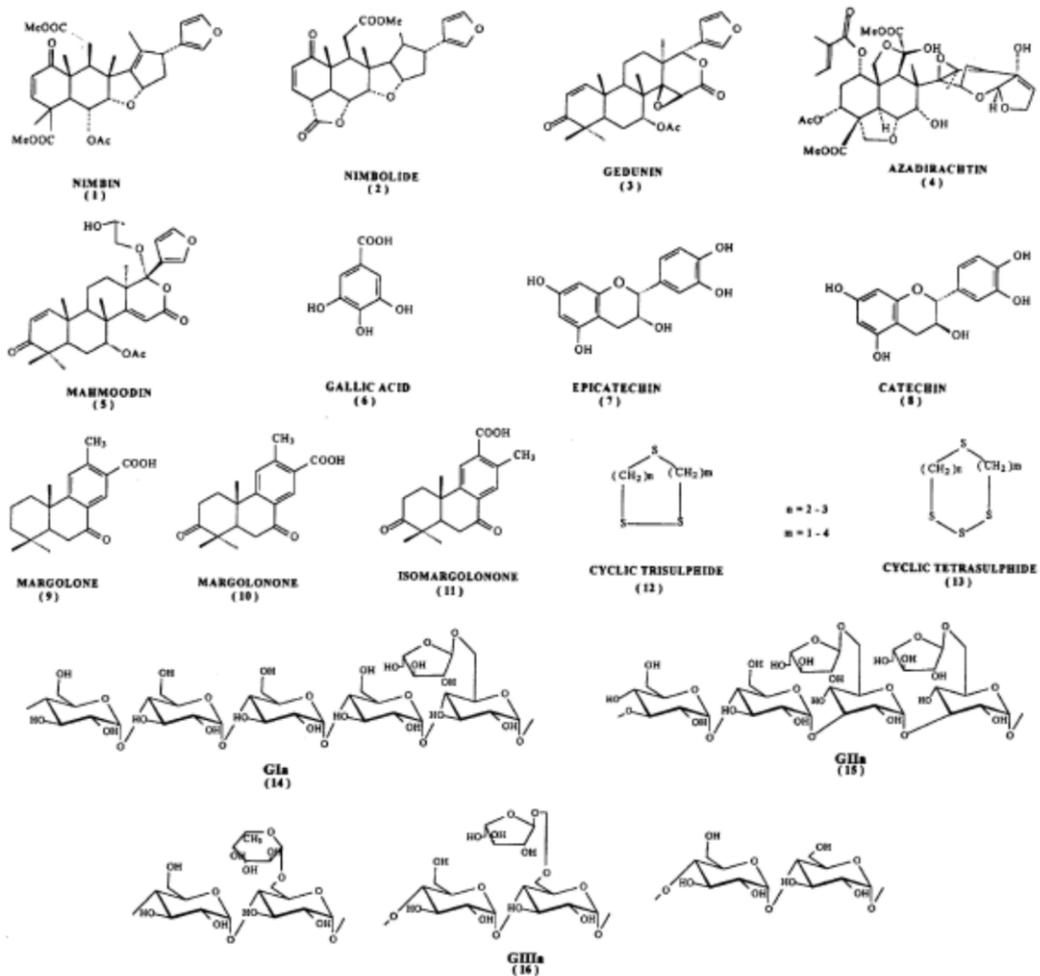


Figura 5: Estructura de los compuestos Bioactivos del Neem. (Kausik *et al.*, 2002)

La azaridactina ocasiona un efecto secundario mínimo sobre los enemigos naturales de los insectos plaga por su especial modo de acción, por ello, los insecticidas basados en el neem no producen en la mayoría de los casos un daño sobre los enemigos naturales de las plagas (Nathan *et al.*, 2007). No obstante, cuando la aplicación de azadiractina se incrementa aparecen algunos efectos sobre los enemigos naturales, esto como consecuencia de la acumulación de la azadiractina en los insectos presa de estos enemigos naturales.

Algunos autores consideran que la azadiractina en determinadas condiciones puede incrementar la efectividad de los antagonistas. Este efecto positivo se origina como consecuencia, ya que los extractos llevan a las larvas a la muerte de forma lenta y gradual, permitiendo que los hospederos perduren en un estado débil en el cuál son más susceptibles a los enemigos naturales (Nathan, *et al.*, 2005, 2006; Ruii *et al.*, 2008).

15.8.1.6. Meliartenina.

Otra fuente de insecticidas de origen vegetal es árbol *Melia azedarach* (Fam. Meliaceae), también llamada “paraíso”. Este árbol crece abundantemente en Argentina y los frutos maduros así como las hojas amarillas son usados como insecticida y como inhibidor de la alimentación sobre diferentes tipos de insectos plaga. El potente efecto insecticida del extracto del árbol paraíso podría ser equivalente al del extracto de neem. Estudios realizados a partir de distintas concentraciones de extracto demostró que este inhibe la alimentación y afecta negativamente el desarrollo y supervivencia de distintas especies de insectos plaga que atacan diversos cultivos (Valladares *et al.*, 1997). Por ejemplo distintas

concentraciones de extracto paraíso (2, 5 y 10 %) provocaron un efecto antialimentario del 87% en larvas de *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera) y en los adultos genera un 75 % a bajas concentraciones y un 100 % de inhibición a la concentración más alta (Valladares *et al.*, 1997).

El compuesto activo obtenido de este extracto es un limonoide llamado meliartenina. Bioensayos a nivel de laboratorio muestran que la actividad antialimentaria originada por este compuesto a una dosis de 5.5 a 27.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ provoca una inhibición del 50 a un 75% para la mayoría de las especies tratadas. Estos resultados son comparables al limonoide comercial azadiractina (Carpinella *et al.*, 2002, 2003). El modo de acción de estos compuestos extraídos de distintas especies de Meliáceas puede originarse a partir de la combinación del efecto antialimentario y una toxicidad post-digestiva (Céspedes *et al.*, 2000). Existen diversos resultados que reportan el efecto anti-alimentario tanto para *A. indica* como para *M. azedarach* en diversos artrópodos e insectos plaga defoliadoras, cortadoras y barrenadoras de interés económico. De igual forma se ha reportado el efecto repelente que origina contra los mosquitos. Ambas plantas han sido reconocidas por sus propiedades insecticidas y anti-alimentaria (Lee *et al.*, 1991).

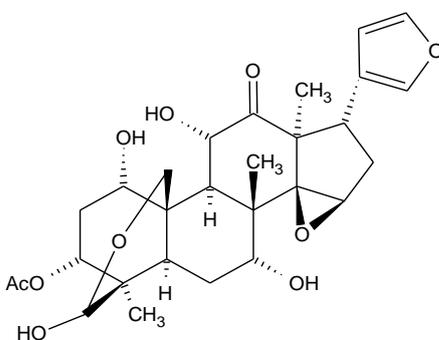


Figura 6: Estructura molecular de Meliartenina

15.8.1.7. Cebadilla.

La *cebadilla* es un compuesto derivado de las semillas de una planta de origen sudamericano conocido como *Schoenocaulon officinale* (Fam. Liliaceae). Las semillas de esta planta han demostrado tener cantidades importantes de alcaloides que le confieren las propiedades tóxicas. El polvo de estas semillas es uno de los insecticidas vegetales de menor toxicidad para mamíferos, sin embargo, si se aíslan sus alcaloides, estos pueden llegar a ser altamente tóxicos además de irritantes para la piel (Silva *et al.*, 2002).

15.8.1.8 Poliglodial.

El poliglodial es un sesquiterpeno producido por *Polygonum hydropiper* (Fam. Polygonaceae) es usado como un potente inhibidor de la alimentación en áfidos (Duke, 1990).

De las Rutales, se han aislado numerosos limonoides (naturales y modificados) de plantas pertenecientes a este orden para estudiar los efectos antialimentarios que provocan sobre especies de insectos plagas pertenecientes a los Lepidópteros (Suresh *et al.*, 2002).

14.8.1.9. Aceite de Ajenjo.

El *ajenjo dulce* es el nombre común de *Artemisia annua* (Fam. Asteraceae). El aceite esencial producido en las partes aéreas de esta planta es usado contra el ataque de insectos plagas de productos almacenados (Rao *et al.*, 1999; Tripathi *et al.*, 2000,

2001). Se conoce el efecto provocado por el aceite sobre el desarrollo y reproducción en chinches (Rao *et al.*, 1999). Recientemente, se está investigando la actividad insecticida y anti-alimentaria de distintas concentraciones del extracto orgánico de las partes aéreas de *A. annua* sobre dos plagas agronómicas importantes, con resultados muy favorables.

15.8.1.10. Artemisina.

Por otra parte se estudió también el efecto causado sobre las mismas plagas por parte de uno de los principales compuestos activos de esta planta, llamado Artemisina, conocido y usado mayormente como antimalárico (Klayman *et al.*, 1984). Se ha observado mediante pruebas en laboratorio que este compuesto produce efecto anti-alimentario sobre insectos plaga como *Epilachna paenulata* (Coleoptera) y *Spodoptera eridania* (Lepidoptera) causando también un porcentaje importante de mortalidad y cambios en el desarrollo larval. Con concentraciones de extracto que van desde 0.15 a 1.5 mg/cm², fue posible aplicar de este extracto en el control de plagas debido a que provocan entre un 80 a 100% de actividad anti-alimentaria para ambas especies. Los efectos del compuesto activo afectan el desarrollo y la supervivencia de estas plagas a una concentración de 0.03 mg/cm² siendo esta dosis equivalente a la concentración más alta del extracto, dando resultados de actividad anti-alimentaria de entre un 80 a un 90% para ambas especies tratadas. Se observó también que este principio activo provoca un efecto neurotóxico ya que el comportamiento de los insectos tratados con el mismo comienza a realizar movimientos descoordinados, temblores y colapso.

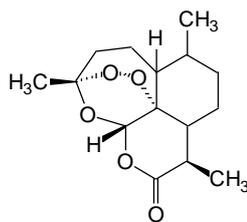


Figura 7: Estructura molecular de Artemisina.

15.8.2. *Azadirachta indica* A. Juss. Como Fuente Bioinsecticida.

Azadirachta indica A. Juss., conocido comúnmente como neem y paraíso de la India, es un árbol de tamaño de mediano a grande, caracterizado por su tallo corto y recto, una corteza arrugada de color de marrón oscuro a gris y una copa densa y redondeada con hojas pinnadas. Este árbol es nativo al sur de Asia (Nathan *et al.*, 2007), y se ha adaptado extensamente en las áreas semiáridas a través de Asia y África. Ha sido introducida a varias de las islas del Caribe, en donde se le cultiva más que nada para sombra, combustible y numerosos productos no maderables que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza. Entre estos se encuentran agentes medicinales e insecticidas. El neem es siempre verde, excepto en las áreas susceptibles a las heladas y las sequías.

15.8.2.1. Área de Distribución.

A pesar de que su distribución natural no se conoce con precisión el origen, se cree que el neem es nativa al sur de Asia en donde crece en los bosques naturales de las regiones más secas del sur de la India (Gamble, 1922). Por muchos siglos, tal vez miles de años, el neem se ha cultivado en la India, Paquistán, Sri Lanka,

Bangladesh, Myanmar, Tailandia, el sur de Malasia y en las islas más secas de Indonesia, hacia el este de Java. Se ha naturalizado en varias localidades a través de esa región (Ahmed y Grainge, 1986; Benthall, 1933). Durante el siglo XIX, el neem fue introducido a Fiji y Mauricio, en donde se ha naturalizado. El neem también se ha esparcido a otras islas en el Pacífico del Sur (Ahmed y Grainge, 1986).

El neem se introdujo al oeste de África al principio del presente siglo y, más recientemente, a otras regiones tropicales y subtropicales en el Medio Oriente, la América Central y del Sur, la región del Caribe y el sur de la Florida (Ahmed *et al.* 1989; National Research Council, 1992). En la región del Caribe el neem se ha naturalizado posterior a su introducción como un árbol de sombra y ornamento en Haití, las Islas Vírgenes Británicas, Antigua, Trinidad y Surinam (Ahmed y Grainge, 1986; Lewis y Elvin-Lewis, 1983; Little, *et al.*, 1974). Se han establecido plantaciones a pequeña escala en la República Dominicana, Cuba (Betancourt, 1972), el sur de la Florida, Arizona y en la península de Baja California (National Research



Council, 1992).

Figura No. 8.- Distribución Mundial del cultivo del Árbol de Neem (Orwa *et al.*, 2009)

15.8.2.2. Clima

A través de la distribución natural e introducida del neem, la temperatura anual promedio varía entre 21 y 32 °C (Anónimo, 1988). En la India crece en las regiones con unas temperaturas a la sombra mínimas y máximas absolutas de 0 y 49 °C, respectivamente. La precipitación normal dentro de esta área de distribución varía entre 450 y 1150 mm por año (Troup, 1981), aunque el neem crece a veces en sitios que reciben solamente 250 mm de precipitación anual. En la India, el neem se usa en programas de reforestación en las regiones áridas y semiáridas de Andhra Pradesh, Bihar, Gujarat, Maharashtra, Rajasthan y Uttar Pradesh. En la región del Sahel en África es una de las mejores especies para plantar en los sitios que reciben menos de 600 mm de precipitación anual, con una estación seca de 5 a 7 meses de duración (Anónimo, 1988).

15.8.2.3. Ciclo Vital.

15.8.2.3.1. Flores y Fruto.

Las flores del neem aparecen en panículas estrechas y ramificadas de 5 a 15 cm de largo. Las flores individuales están compuestas de 5 lóbulos del cáliz, redondeados y de un color verde pálido; 5 pétalos blancos, oblongos y redondeados de 0.5 cm de largo; 10 estambres unidos en un tubo y un pistilo con un ovario redondeado y un estilo delgado. En su área de distribución natural y en el Caribe, el neem florece entre marzo y mayo (Ciesla, 1993; Little *et al.*, 1974). En la zona Sudán-Sahélica en África, la florescencia ocurre por lo general entre abril y julio (Betancourt, 1972).

Las frutas en forma de aceitunas (drupas) tienen de 1.0 a 2.0 cm de largo, son lisas y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando maduras. Las frutas del neem maduran de junio a agosto en la India y entre septiembre y diciembre en la zona Sudán-Sahélica de África (Betancourt, 1972; Ciesla, 1993; Troup, 1981). Las frutas por lo usual contienen una sola semilla elíptica, ocasionalmente dos, rodeadas de una pulpa dulce, la cual tiene un fuerte olor que recuerda al del ajo. La producción de la fruta comienza por lo usual cuando los árboles tienen de 3 a 5 años de edad y es profusa cuando los árboles alcanzan su productividad máxima a los 10 años de edad aproximadamente (Ahmed y Grainge, 1986).

15.8.2.3.2. Semillas.

Por lo normal se pueden encontrar entre 4,000 y 5,000 semillas por kilogramo en las frutas del neem, a pesar de que la información inédita sobre el peso de las semillas varía entre 900 y 6,300 semillas por kilogramo (Chaturvedi, 1985). Las semillas se ven dispersadas por las aves. Las frutas deberán ser recolectadas de las ramas cuando totalmente maduras o del suelo, dentro de un período de 1 a 2 días después de la caída de la fruta. Las frutas se esparcen luego sobre esteras bajo una sombra leve y se secan al aire por 4 ó 5 días (Orwa *et al.*, 2009). Después de secas se pueden almacenar a temperatura ambiente en sacos de tela previo a la siembra.

15.8.2.4. Daños en Neem.

El neem parece ser relativamente resistente al daño por plagas de insectos y patógenos. En el noroeste de la India durante los años de 1926, 1927 y 1963 se

presentó una fuerte infestación de langostas migratorias y el neem fue una de las pocas especies de árboles que se vieron en su mayoría libres de los efectos de este insecto plaga (Ahmed y Grainge, 1986; Jotwani y Srivastava, 1981). Se tienen pocos antecedentes del ataque severo de insectos plaga sobre el árbol del neem sin embargo, en la región central y el sur de la India, los insectos *Palvinaria máxima* (Hemíptera), *Aspidiotus orientalis* (Homóptera) y *Helopeltis theivora* (Lepidóptera) causan un daño severo a los árboles jóvenes del neem. Se ha reportado también la presencia de una defoliación fuerte en las plantaciones del neem en la India ocasionada por *Acostis selenaria* (Lepidóptera: Geometridae) (Beeson, 1953).

Otros insectos defoliadores que causan un daños menores sobre cultivos masivos del neem es originado por las hormigas *Solenopsis* spp. (Raghunath *et al.*, 1982), por el escarabajo *Cryptocephalus ovulum* (Coleoptera: Chrysomelidae), y los lepidópteros *Laspeyresia aurantiana* (Eucosmidae), *Cleora cornaria* (Geometridae) (Uthamasamy *et al.*, 1973), *Latoia lepida* (Lamacodidae) (Raghunath, 1979; Radwanski y Wickens, 1981).

15.8.2.5. Usos

Se reporta que varias partes del árbol poseen efectos analgésicos, antihelmínticos, antipiréticos, antisépticos, antisifilíticos, astringentes, demulcentes, diuréticos, emenagógicos, emolientes y purgantes (Tabla No.1). Se ha demostrado que los extractos del neem poseen propiedades antibacterianas, antidiabéticas, antifúngicas y antivirales (Kausik *et al.*, 2002; National Research Council, 1992).

Tabla No. 1.- Compuestos Bioactivos del Neem.

Neem compound	Source	Biological activity	Reference
Nimbidin		Anti-inflammatory	21
		Antiarthritic	22
		Antipyretic	23
		Hypoglycaemic	24
		Antigastric ulcer	25, 26
		Spermicidal	29
		Antifungal	30
		Antibacterial	30
		Diuretic	31
Sodium nimbidate		Anti-inflammatory	21, 22
Nimbin (1)	Seed oil	Spermicidal	28
Nimbolide (2)	Seed oil	Antibacterial	32, 33
		Antimalarial	34
Gedunin (3)	Seed oil	Antifungal	35
		Antimalarial	33
Azadirachtin (4)	Seed	Antimalarial	37
Mahmoodin (5)	Seed oil	Antibacterial	18
Gallic acid (6), (-) epicatechin (7) and catechin (8)	Bark	Anti-inflammatory and immunomodulatory	38
Margolone (9), margolonone (10) and isomargolonone (11)	Bark	Antibacterial	39
Cyclic trisulphide (12) and cyclic tetrasulphide (13)	Leaf	Antifungal	40
Polysaccharides		Anti-inflammatory	41
Polysaccharides GIa (14), GIb	Bark	Antitumour	42
Polysaccharides GIIa (15), GIIIa (16)	Bark	Anti-inflammatory	43
NB-II peptidoglycan	Bark	Immunomodulatory	44, 45

Números en paréntesis corresponden a las estructuras mostradas en la Figura No. 5 (Kausik *et al.*, 2002).

15.8.3. Generalidades de *Spodoptera exigua*.

La familia Noctuidae, ubicada dentro del orden Lepidóptera, abarca un total de 20.000 especies y se caracterizan porque sus adultos vuelan de noche y son de colores grisáceos u oscuros. Las especies de esta familia tienen unas características que influyen en su importancia económica en los cultivos:

- Son especies plagas muy polífagas, atacan a cualquier tipo de cultivo herbáceo.
- Presentan una tendencia al comportamiento gregario, los estados inmaduros tienen tendencia a vivir en gran número sobre la misma planta.

- Existen bastantes especies migratorias, emigran en determinadas épocas del año y aparecen de forma masiva en el cultivo, causando daños mayores que si fuera apareciendo de forma escalonada.

Existen diversas especies de lepidópteros noctuidos que atacan a los distintos cultivos hortícolas. Entre otras especies destacan *Spodoptera exigua*, que es la más importante.

S. exigua es considerada una de las plagas con mayor importancia en el cultivo del maíz debido a su impacto económico y es una plaga polífaga que ataca más de 60 especies de plantas pertenecientes a 23 familias botánicas diferentes (Brown y Dewhurst, 1975). Es considerada una especie migratoria en la que sus adultos pueden recorrer largas distancias de hasta 3,500 Km en un lapso de 9 a 11 días (French, 1969). En determinadas zonas geográficas de clima cálido, esta especie puede estar presente todo el año, produciéndose un reagrupamiento de las poblaciones de adultos en la primavera o principios del verano (Belda *et al.*, 1994).

S. exigua es un insecto proveniente del sudeste de Asia y es considerado un insecto importante en muchas zonas agrícolas del mundo. Su primera aparición en América fue en los Estados Unidos en el estado de Oregón en 1876, desde donde se desplazó hacia México y el Caribe (Adamczyk *et al.*, 2003). La producción de hortalizas en invernaderos representa una parte importante de la economía del sector agrícola (Lasa *et al.*, 2007). Dentro de los factores más importantes que afectan la producción de hortalizas destacan los insectos plaga. Cada día la situación de éstos insectos se torna más difícil, las plagas secundarias se tornan primarias; además, surgen nuevas plagas que anteriormente no se encontraban en la región. Los insectos que mayor daño causan a estos cultivos son el minador de la hoja *Liriomyza sativae* Blanchard, la mosca blanca *Bemisia tabaci* Genadius y *B. argentifolli.*, el gusano

soldado *Spodoptera exigua* Hübner, y el gusano alfiler *Keiferia lycopersicella* Walter, entre otros (Avilés, 1997). Entre los principales cultivos destacan, tanto por superficie como por producción y valor de la misma, pimiento, tomate, sandía, melón, calabacín, pepino y berenjena. (Avisar *et al.*, 2009) La problemática fitosanitaria asociada a estos cultivos es bastante amplia concurriendo en ellos plagas y enfermedades muy favorecidas por las especiales condiciones que se dan dentro de los invernaderos (Cabello *et al.*, 1990; Lasa *et al.*, 2007).

16. MATERIAL Y MÉTODOS

16.1 Evaluación Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos Espora- Cristal de *Bacillus thuringiensis* y Neem (*Azadirachta indica*).

Para seleccionar los ingredientes activos (i.a.) con la más alta toxicidad hacia *Spodoptera exigua* fueron evaluados diez cepas de colección de *B. thuringiensis* y un extracto acuoso obtenido a partir de follaje de *Azadirachta indica* (neem). Los bioactivos fueron evaluados mediante bioensayos de incorporación a la dieta bajo una dosis de 50 y 500 µg o µl de ingrediente activo/ ml de dieta.

Los extractos espora cristal fueron obtenidos mediante la técnica de coprecipitación con lactosa- acetona descrita por Dulmage (1970). Las cepas fueron activadas en tubos con agar nutritivo inclinado, e incubadas por 18 horas a 30°C. Posteriormente, las cepas activadas fueron utilizadas para inocular 50 ml de caldo triptosa fosfato (CTP). Los matraces fueron incubados en agitación a 200 r.p.m. durante 18 horas a 30°C. Una vez obtenido el cultivo anterior, este fue utilizado como semilla para inocular al 1% 10 matraces de 500 ml de capacidad, los cuales contenían 100 ml de medio de cultivo a base de melaza y harina de soya. Los matraces a continuación fueron incubados en una atmosfera de 30°C con una agitación de 200 r.p.m. Una vez iniciado el proceso de inoculación de estos matraces, se llevó a cabo un monitoreo a diferentes intervalos de tiempo hasta obtener cultivos con un 80% de las células en la fase final de la esporulación. Una vez obtenidos los

cultivos, el pH del medio fue ajustado en el rango de 7.0- 7.2. El complejo espora- cristal se obtuvo por el método de co-precipitación lactosa- acetona de Dulmage (1970). Para ello el medio de cultivo se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 30 minutos a 5°C. La biomasa húmeda fue pesada para después preparar una solución de lactosa al 5% en una proporción de 1.71 veces el volumen del peso del precipitado. Este volumen fue añadido al pellet y posteriormente colocado en una base magnética para mantenerlo en agitación a velocidad media durante 30 minutos. A continuación se añadieron lentamente 3.34 volúmenes de acetona en relación al peso del precipitado y el volumen de lactosa añadido, continuando la agitación por 30 minutos más. Transcurrido este proceso, el complejo espora- cristal de cada cepa de *Bacillus thuringiensis* fue obtenido mediante filtración al vacío. El extracto obtenido es lavado con 2 volúmenes de acetona y pulverizado, para finalmente ser almacenado.

El extracto foliar de neem fue preparado tomando como referencia el reporte de Montes Molina *et al.* (2008). Para ello 300 gramos de follaje fueron lavados y triturados en tres litros de agua por espacio de 3 minutos mediante el uso de una licuadora Osterizer® modelo 4655. El material triturado fue depositado en frascos ámbar de 4 litros de capacidad y se dejaron reposar bajo condiciones de oscuridad por espacio de 5 días. Transcurrido el tiempo de reposo, el material fue filtrado utilizando tela Magitel® para llevar a cabo la remoción de partículas grandes, y posteriormente la solución obtenida fue filtrada al vacío en papel Whatman No. 1. El extracto obtenido se concentró en un orden de 10 veces su volumen, para ello el extracto se colocó en un recipiente rectangular en el interior de una estufa de tiro forzado de la marca Shell Lab® modelo FX5 a una temperatura de 27°C durante 24 horas. Una vez concentrado el extracto, éste fue congelado en un vaso de precipitado y, posteriormente, fue deshidratado colocando el recipiente en el interior de una Jarra

cilíndrica de un liofilizador Freezone 12 de la marca Labconco®. El extracto obtenido fue almacenado en un recipiente hermético envuelto bajo condiciones de refrigeración. Los extractos en polvo de cada una de las cepas de *B. thuringiensis* y del follaje de neem fueron incorporados a la dieta artificial del insecto a las dosis de 50 y 500 µg/ ml de dieta. Una vez preparados los tratamientos, la dieta fue dispersada en 25 copas plásticas de una onza de capacidad de la marca Solo®. La dieta tratada se dejó solidificar durante 2 horas y, posteriormente, fue infestada con una larva neonata de *S. exigua* por cada copa. Las copas fueron cubiertas con una tapa plástica y, finalmente, las 25 copas cubiertas fueron depositadas en una bolsa de papel y se incubaron en una atmosfera de 30°C y 80% de humedad relativa bajo un fotoperíodo de 12/12 horas luz/ oscuridad. Tres replicas fueron ensayadas por cada dosis y para ingrediente i.a. a evaluar. Como control se utilizaron 25 copas con la dieta merídica del insecto en ausencia de i.a. La mortalidad fue registrada a los 7 días. Los datos fueron reportados como porcentajes de mortalidad y la mortalidad fue analizada estadísticamente mediante análisis de varianza simple utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.

16.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) de los Bioactivos tóxicos contra *Spodoptera exigua*.

Los ingredientes activos (i.a.) que generaron una mortalidad mayor al 60% ó que generaron un efecto biológico negativo en contra de *Spodoptera exigua* se les determinó la concentración letal media (CL₅₀) mediante un bioensayo de incorporación de i.a. a la dieta. Los i.a. fueron incorporados a la dieta artificial a una concentración de 10, 20, 40, 50, 70, 90, 110, y 150 µg/ ml y se dispersaron en 25

copas para cada dosis. La dieta se dejó solidificar por espacio de 2 horas y se colocó una larva neonata de *S. exigua*. Posteriormente, las copas infestadas fueron cubiertas con una tapa plástica y se depositaron en una bolsa de papel. Los tratamientos fueron incubados en una atmosfera de 30°C y una humedad relativa del 80%. Un total de 75 larvas se utilizaron para cada concentración evaluada, y como controles se utilizaron veinticinco copas con la dieta merídica del insecto en ausencia de los i.a. La mortalidad se registró a los 7 días y los resultados fueron analizados mediante un análisis probit utilizando el software Polo Plus ® versión 1.0. Los bioactivos más tóxicos fueron seleccionados y estos fueron usados posteriormente para llevar a cabo el desarrollo de las formulaciones.

16.3. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL₅₀).

Una vez seleccionados los bioactivos con la mayor actividad toxica fue determinado un segundo parámetro toxicológico, para ello el tiempo letal medio fue obtenido mediante un bioensayo de incorporación a la dieta. Los ingredientes activos fueron incorporados utilizando la concentración letal media (CL₅₀). Los dieta merídica tratada fue dispersada en veinticinco copas plásticas de una onza de la marca Solo®. La dieta se dejó solidificar por espacio de 2 horas, y posteriormente una larva neonata de *S. exigua* fue trasferida a cada copa. Las copas fueron cubiertas con una tapa plástica y fueron depositados en una bolsa de papel. Los tratamientos se sometieron a un proceso de incubación bajo una atmosfera de 30°C, una humedad relativa del 80% y un fotoperíodo de 12/ 12 horas luz/ oscuridad. Como controles se utilizaron copas con la dieta merídica en ausencia de bioactivos. Finalmente la mortalidad fue registrada diariamente por espacio de 15 días consecutivos.

16.4. Propagación Masiva *B. thuringiensis*.

La cepa más efectiva de *B.t.* contra *S. exigua* se propagó en un bioreactor New Brunswick Sc. Co. de 20 litros de capacidad con 15 litros de medio a base de melaza, líquido de remojo de maíz, harina de soya y carbonato de calcio en una concentración de 20, 10, 20 y 2 gramos/ litro, respectivamente. El escalamiento del proceso se realizó activando la cepa de *B. thuringiensis* en un tubo con agar nutritivo inclinado por un espacio de 18 horas a 30°C. A continuación este cultivo se utilizó para inocular (al 1%) un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de caldo triptosa fosfato pH 7.0 y fue incubado bajo las mismas condiciones atmosféricas que las iniciales aplicando además una agitación de 200 r.p.m. Transcurrido el tiempo, el cultivo anterior fue utilizado como semilla para inocular cuatro matraces de 500 ml con 100 ml de medio a base de melaza, harina de soya, carbonato de calcio y líquido de remojo de maíz a pH 7.0. Los matraces fueron incubados por 18 horas a 30°C y una agitación de 200 r.p.m. Finalmente, el tanque del bioreactor de catorce litros de capacidad fue preparado depositando 10 litros del medio a base de melaza y calibrando los electrodos de oxígeno y pH. Para ello el tanque de fermentación fue conectado al controlador y se ajustaron algunos parámetros de fermentación estándar que se utilizaron durante la corrida. Las condiciones operacionales utilizadas fueron una temperatura de 30°C, un pH de 7.0 a 7.5, 1 v.v.m. de aireación y 500 r.p.m. de agitación (Galán Wong, 1993). El tanque fue inoculado al 1% volumen: volumen con el cultivo propagado a nivel matraz. Una vez iniciado el proceso de fermentación, el cultivo se monitoreo cada 4 horas extrayendo una alícuota del medio de cultivo, esto con la finalidad de checar la pureza del cultivo y monitorear proceso de esporulación.

Para ello una laminilla fue preparada y teñida mediante una tinción simple. Una vez iniciado el proceso de esporulación, el intervalo de monitoreo se acortó a 2 y 1 hora conforme la proporción de células esporuladas se incrementaba. Al observar un 80 % de células en un proceso de esporulación avanzado, en ese momento se termina el proceso de fermentación.

El extracto fue obtenido usando el método de co-precipitación lactosa- acetona reportado por Dulmage (1970), descrito anteriormente.

16.5. Bioensayo de Preferencia Alimenticia.

Diversos soportes de formulación fueron elaboradas las cuales fueron utilizadas para evaluar el efecto fagoestimulante que ejercen sobre *S. exigua*. Dicha evaluación fue llevada a cabo mediante un bioensayo de preferencia alimenticia de dos vías descrito por Bartlett *et al.* (1990). Los soportes se elaboraron utilizando un biopolímero como matriz microencapsulante, solo o en combinación con un aditivo vegetal fagoestimulante en una proporción del 4%. Los biopolímeros utilizados fueron la grenetina, la pectina y la fécula de maíz, mientras que los aditivos fueron un polvo de panoja de maíz, de repollo, de alfalfa, de follaje de sorgo, y olote fresco deshidratado (Rosas-García y De Luna-Santillana, 2006). Los gránulos se elaboraron en ausencia de extractos por el método descrito por De Luna-Santillana (2002). Los ingredientes sólidos fueron homogenizados a través del tamizado de los mismos, y se integraron formando una pasta mediante la adición de una mínima cantidad de agua. La pasta se dejó reposar por espacio de una hora a temperatura ambiente y, posteriormente, fue extruida al hacerla pasar a través de un tamiz molecular 20 mediante la aplicación de presión. El material obtenido se dejó reposar 30 minutos y

se hizo pasar a través de un tamiz molecular 6 mediante el rompimiento de los filamentos extruidos por acción rotatoria. Los gránulos obtenidos se recolectaron y se secaron en una estufa Shell Lab de tiro forzado modelo FX5 a 30°C por espacio de 24 horas. Los gránulos fueron almacenados en recipientes herméticos de plásticos.

Dieciocho tipos diferentes de gránulos fueron preparados cuya composición es mostrada en la Tabla 2.

Tabla 2.- Componentes Empleados en el Diseño de los Soportes de Formulación			
Biopolímero Aditivo	Pectina	Grenetina	Fécula de Maíz
s.f.	Pbco	Gbco	Fbco
Panoja	Ppa	Gpa	Fpa
Alfalfa	Pal	Gal	Fal
Sorgo	Pso	Gso	Fso
Repollo	Pre	Gre	Fol
Olote fresco	Pol	Gol	Fol

P= Pectina, G= grenetina, F= fécula, pa= panoja, al= alfalfa, so= follaje de sorgo, d= repollo, ol= olote fresco, bco= blanco o sin aditivo, s.f. = sin fagoestimulante.

Los soportes desarrollados que mostraron una elevada preferencia fagoestimulante fueron seleccionados. Para ello se realizó un bioensayo de preferencia alimenticia hacia *S. exigua* mediante el método de doble alternativa descrito por Bartlett *et al.*, 1990. Para ello se utilizaron cajas Petri de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una mezcla de pasta de parís y carbón activado granulado en una proporción 15:1. Las cajas fueron humedecidas y se depositaron en sitios opuestos 25

miligramos de gránulos a comparar. Los gránulos se dejaron hidratar por espacio de una hora. Un total de 171 pares de gránulos fueron comparados y se realizaron 5 repeticiones para cada comparación. Cada tipo de gránulo se enfrentó contra cada uno de los 17 gránulos restantes. A cada caja con el par de gránulos a comparar se le transfirieron 10 larvas neonatas de *S. exigua* en la parte central de la caja Petri. Las cajas Petri infestadas con las larvas fueron selladas con Parafilm® y se incubaron durante veinticuatro horas bajo oscuridad en una atmosfera de 30°C y 80% de humedad relativa. Transcurrido el tiempo de incubación las cajas fueron congeladas a -60°C y el número de larvas sobre cada tipo de soporte fue registrado. Los soportes desarrollados fueron comparados enfrentándose además contra pequeños cuadros de repollo de 49 mm². Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza simple utilizando el software SPSS ® versión 15.

16.6. Formulación de *Bacillus thuringiensis*.

Posteriormente, se desarrollaron formulados asperjables utilizando el biopolímero y los aditivos más aceptado por *S. exigua*. Estos componentes fueron utilizados para microencapsular los ingredientes activos más tóxicos.

Para elaborar los formulados asperjables se utilizó el método descrito por De Luna-Santillana (1998). Dos soportes de formulación fueron utilizados para desarrollar las diferentes formulaciones con los agentes bioactivos. Un total de ocho formulaciones experimentales diferentes fueron elaboradas. Se prepararon dos formulaciones blanco, dos formulaciones con *Bacillus thuringiensis* al 7%, dos formulaciones a partir de neem al 2% y dos formulaciones a partir de la combinación del extracto de *Bacillus thuringiensis* y neem en las proporciones utilizadas en las

dos formulaciones anteriores. Se prepararon soluciones en agua con el polímero microencapsulante utilizándolo al 2%, en la cual se dispersó el aditivo seleccionado en una proporción del 4%, el extracto de *B. thuringiensis* al 7% y el neem al 2%. Estos últimos tres componentes fueron combinados dependiendo del tipo de formulación preparada. La composición de las diversas formulaciones elaboradas es mostrada en la Tabla 13. Las formulaciones asperjables elaboradas fueron deshidratadas utilizando un secador por aspersión modelo SSE68 de la marca APEX®. El secador se armó y las mangueras provenientes de los compresores de aire se conectaron al panel de control. Posteriormente, el equipo se dejó funcionar por espacio de 15 minutos con la finalidad de calentar la cámara de secado. Enseguida, se inició la inyección de la formulación a un flujo de alimentación de 7 ml/ min una vez que las condiciones de secado se regularon a una temperatura de la cámara de 130- 140°C, una temperatura de salida de 75- 85°C, 6 resistencias de calentamiento y una presión de aire para la aspersión de 3,600- 4,200 kPa/ cm². El formulado deshidratado fue colectado en un frasco de cristal.

Una vez secada la solución, se inyectó agua destilada durante 5 minutos con la finalidad de limpiar el sistema de alimentación y el atomizador centrifuga. Terminado el secado, el aparato se dejó funcionando por 3 minutos más sin alimentación alguna para tratar de disminuir la humedad relativa en el frasco de recolecta. Finalmente, a la formulación deshidratada se le determinó el peso de polvo recolectado y el rendimiento de recuperación.

16.7. Evaluación de los Formulados a Nivel de Laboratorio.

Una vez obtenidos los formulados se realizaron bioensayos en laboratorio para determinar la actividad tóxica de los bioactivos microencapsulados en las formulaciones.

Para los formulados desarrollados deshidratados se calculó la cantidad del formulado seco que fue reconstituido en agua estéril. Ocho formulaciones experimentales fueron evaluadas, y como un parámetro de comparación fueron evaluadas dos formulaciones comerciales a partir de *Bacillus thuringiensis*, y una formulación comercial a partir de neem. Los formulados fueron asperjados sobre discos de hoja de repollo de 4 centímetros de diámetro. Los discos tratados se dejaron secar a temperatura ambiente por espacio de 1 hora. Posteriormente se prepararon cajas de Petri de 5 centímetros de diámetro con un fondo cubierto con un disco de papel filtro Whatman® No. 1 humedecido. Los discos tratados con los tratamientos a evaluar fueron colocados en el interior de las cajas Petri. Los tratamientos fueron infestados con 20 larvas neonatas de *S. exigua* y las cajas fueron cubiertas y selladas con una cinta de Parafilm®. Cinco réplicas de cada tratamiento fueron evaluadas, los cuales se incubaron bajo una atmosfera de 30°C, 80% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12/12 horas luz oscuridad. Un total de 50 larvas se probaron para cada tratamiento. La mortalidad se registró a las 24 horas de terminado el bioensayo. De las larvas sobrevivientes de cada tratamiento, un total de 25 larvas fueron transferidas individualmente a una copa plástica Solo® de una onza conteniendo la dieta artificial del insecto. Las veinticinco copas infestadas fueron depositadas en una bolsa de papel e incubadas en una atmosfera similar a la anteriormente descrita. La mortalidad de estas últimas unidades experimentales fue registrada a los 7 días posteriores al inicio del bioensayo. Los resultados fueron

analizados mediante un análisis de varianza simple mediante el software SPSS ® versión 15.

16.8. Evaluación de los Formulados a Nivel de Invernadero.

Para evaluar los formulados a nivel invernadero se usaron plantas de algodón *Gossypium hirsutum* var. Fibermax de 60 días de edad. Las semillas fueron plantadas en recipientes vasos térmicos de plástico de 32 onzas de capacidad con el soporte Peat Moss®, las cuales fueron sometidas a regímenes de riego cada tercer día y fertilizadas vía foliar Gor-Green® 20-30-10 cada 10 días mediante la aplicación de 2 ml por planta a una concentración del 0.1% siguiendo las instrucciones recomendadas por el productor. Una vez que las plantas presentaron un desarrollo aproximado de 20 centímetros de altura las unidades experimentales fueron utilizadas para realizar el bioensayo. Dieciocho horas previas al bioensayo se contó el número de hojas en todas las plantas. Para evaluar la eficacia de los ocho formulados asperjables desarrollados, éstos fueron aplicados por atomización cubriendo de manera homogénea todo el follaje. Como un parámetro de comparación fueron evaluadas dos formulaciones comerciales a partir de *Bacillus thuringiensis*, una formulación asperjable de nombre Thuricide HPC®, y una formulación tipo talco de nombre Dipel Dust®, los cuales fueron aplicados siguiendo las indicaciones sugeridas por el productor. Además, una formulación comercial a base de neem llamado Triple Action Plus® fue utilizada. Una vez aplicados los productos a evaluar, los tratamientos se infestaron de manera artificial mediante la colocación de 10 larvas neonatas de *Spodoptera exigua*. Los tratamientos evaluados los conformaron 12 lotes de 15 plantas cada uno. Los tratamientos evaluados fueron dos

formulaciones asperjables de *B. thuringiensis*, dos formulaciones a partir de neem, dos formulaciones a partir de la combinación *Bacillus thuringiensis*/ neem, dos formulaciones asperjables blanco o sin ingredientes activos, el Thuricide HPC®, el Dipel Dust®, el Triple Action PLUS® y un lote control sin tratar.

El daño se evaluó en las unidades experimentales tomando registros a los quince días del número de hojas y plantas afectadas, así como del número de hojas y plantas totales. Una vez obtenidos los registros anteriores se determinaron los porcentajes de infestación y de intensidad, así como el índice de infestación, utilizando el criterio recomendado por el INICA. Para ello se calcularon parámetros biológicos como se muestra a continuación.

$$\% \text{ infestación} = A / B * 100$$

Dónde: A representa el número de plantas afectadas y B el número de plantas totales.

$$\% \text{ de intensidad} = D / E * 100$$

Dónde: D representa el número de hojas afectadas y E el número de hojas totales

Índice de Infestación (I. I.)

$$I. I. = \% \text{ Inf.} \times \% \text{ Int.} / 100$$

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza simple, utilizando el software estadístico SPSS® versión 15.

17. RESULTADOS

17.1. Evaluación Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos Espora- Cristal de *Bacillus thuringiensis* y Neem (*Azadirachta indica*).

Se probó el efecto toxico de 10 cepas de colección de *Bacillus thuringiensis*, nueve cepas de la colección Howard Dulmage y una cepa depositada en el Instituto Pasteur. Las cepas de *Bacillus thuringiensis* evaluadas fueron la HD1, HD2, HD9, HD29, HD73, HD125, HD133, HD227, HD551 y Bt1154. Los serotipos de las cepas evaluadas son mostrados en la Tabla No. 3.

Tabla No. 3. Serotipos de las Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	
Cepa	Serotipo
HD1	kurstaki
HD2	thuringiensis
HD9	entomocidus
HD29	galleriae
HD73	kurstaki
HD125	tolworthi
HD133	aizawai
HD227	aizawai
HD551	aizawai
Bt1154	kenyae

Las cepas bacterianas seleccionadas fueron utilizadas para evaluar la toxicidad hacia larvas neonatas de *S. exigua* mediante un bioensayos preliminar el que los

extractos bacterianos fueron incorporados a la dieta merídica del insecto a las dosis de 50 y 500 µg de extracto por mililitro de dieta. En la Tabla No 4 se muestran los porcentajes de mortalidad generados por los tratamientos a la dosis de 50 µg de extracto/ml de dieta para los diferentes ingredientes activos evaluados. Considerando las cepas que provocaron arriba de un 60% de mortalidad a la dosis baja, tenemos que la cepa HD133 y la HD551 fueron las que ocasionaron mayor toxicidad contra las larvas neonatas de *S. exigua* , provocando un 66.06% y 63.89% de mortalidad. Con relación a la toxicidad generada por el extracto de neem este ocasionó una mortalidad del 23.61% a las dosis de 50 µg de extracto por mililitro de dieta como se puede apreciar en la Tabla No.4. Aunque la mortalidad a la dosis a la dosis de 50 µg de extracto por mililitro de dieta fue inferior al 60% se logró apreciar un efecto biológico positivo para considerar este componente como un ingrediente activo potencial para formularse, debido a que las larvas presentaron un menor desarrollo tomando como referencia las larvas del tratamiento control (Tabla 6). Considerando la toxicidad ocasionada por la dosis de 500 µg por mililitro se pudo apreciar que el neem genera una mortalidad estadísticamente igual a la ocasionada por las cepas HD133 y HD551 de *Bacillus thuringiensis* (Tabla 4).

Con la finalidad de evaluar el efecto de la dosis los diferentes ingredientes activos, se realizó un análisis de varianza donde se compara el efecto de la dosis con relación a la mortalidad. En este análisis se puede apreciar la existencia de una alta diferencia significativa entre las dos variables ($F= 11.18$, g.l.= 2, $p= 0.00$), lo cual posteriormente se confirma mediante la comparación múltiple de media de Tukey, agrupándonos los tratamientos en 2 grupos significativamente diferentes (Tabla 5).

Tabla No. 4.- Ensayo del efecto tóxico de extractos de los agentes entomopatógenos contra <i>Spodoptera exigua</i> .			
CEPA	Promedio ± DE del número de larvas muertas 50 µg de extracto/ ml	Promedio ± DE del número de larvas muertas 500 µg de extracto/ ml	% de Mortalidad
HD1	14.67 ± 8.08 ^{ab}	12,67 ± 8.96 ^{abc}	56.35
HD2	8.00 ± 4.58 ^{abc}	15.67 ± 2.52 ^{abc}	33.33
HD9	5.33 ± 1.16 ^{bc}	8.00 ± 6.08 ^{cd}	22.22
HD29	7.33 ± 2.31 ^{abc}	12.67 ± 2.52 ^{abd}	30.56
HD73	10.67 ± 5.03 ^{abc}	11.00 ± 4.58 ^{bcd}	44.44
HD125	16.00 ± 1.00 ^a	23.67 ± 0.58 ^a	41.67
HD133	16.33 ± 0.58 ^a	23.00 ± 1.00 ^a	68.06
HD227	7.33 ± 1.53 ^{abc}	7.33 ± 2.89 ^{cd}	30.22
HD551	15.33 ± 1.15 ^{ab}	21.33 ± 1.53 ^{ab}	63.89
Bt1154	11.00 ± 2.64 ^{ab}	20.00 ± 1.00 ^{ab}	46.44
Neem	5.33 ± 4.73 ^{bc}	22.00 ± 2.00 ^{ab}	23.61
Control	0.33 ± 0.58 ^c	0.33 ± 0.58 ^d	1.39

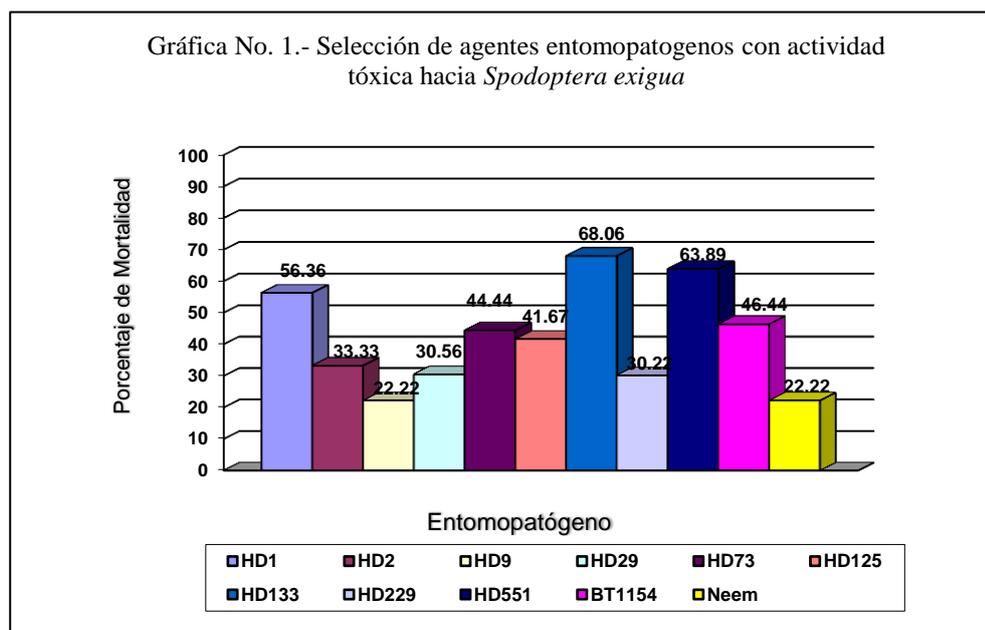
n= 75; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en **rojo** corresponden al análisis de las variables No. de larvas muertas bajo la dosis de bajo la dosis de 50 µg de *B. t.*/ ml y tipo de cepa; letras en **azul** corresponden al análisis de las variables No. de larvas muertas bajo la dosis de bajo la dosis de 500 µg de *B. t.*/ ml y tipo de cepa.

Posteriormente, se analizó el efecto del tipo de ingrediente activo con relación a la mortalidad bajo la dosis de 50 µg/ ml, donde se pudo apreciar la existencia de una alta diferencia significativa (F= 6.04, g.l.= 11, p= 0.00). Posteriormente mediante la comparación múltiple de medias de Tukey se corrobora este resultado, agrupándonos los doce tratamientos 3 grupos con niveles de significancia diferentes (Tabla 4).

Tabla No. 5.- Efecto Preliminar de la Dosis de los Entomopatógenos Evaluados contra <i>Spodoptera exigua</i> .		
Dosis (µg B. t. /ml)	Promedio ± DE del Número de larvas muertas	% de Mortalidad
0	0.33 ± 0.58 b	1.32
50	11.20 ± 4.99 a	44.8
500	15.53 ± 6.79 a	62.12

n= 75; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en **azul** corresponden al análisis de las variables número de larvas muertas y la dosis

Considerando los resultados del preliminar del efecto toxico de los extractos de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera exigua* fueron seleccionadas las cepas HD 133 y HD 55 debido a que mostraron tener un efecto toxico mayor del 60% de mortalidad a la dosis de 50 µg/ ml (Gráfica 1).

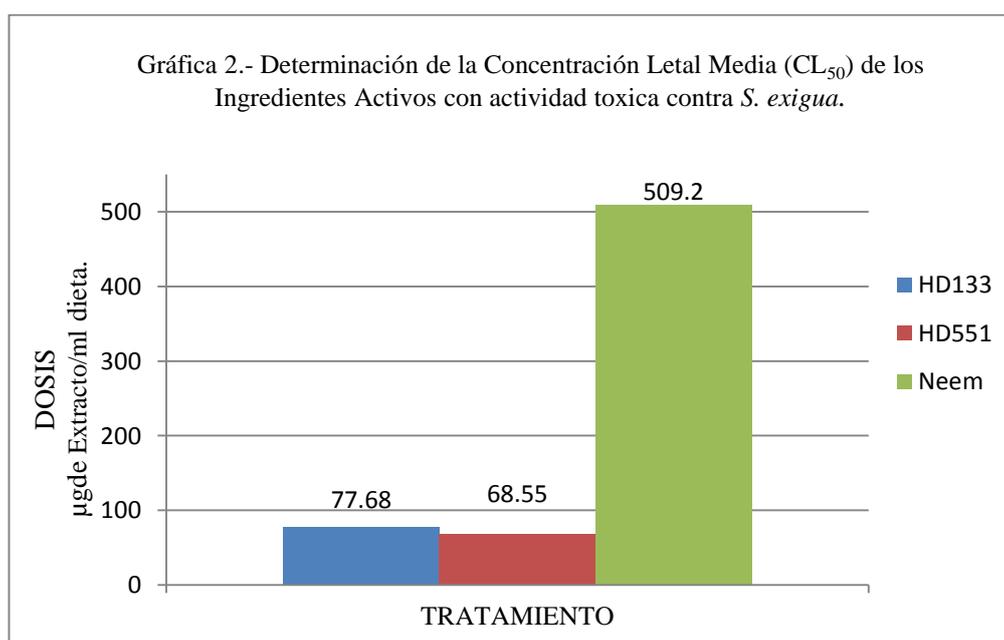


Cuando se evalúa el efecto preliminar de los extractos de neem se observa un efecto toxico fuerte contra larvas del primer instar de *Spodoptera exigua* a la dosis de 50 µg de extracto por mililitro reflejándose en una disminución del desarrollo larval comparado con el mostrado por las larvas control, lo cual fue debido a la inducción de un efecto antifagoestimulante (Tabla 6). Por otro lado, se aprecia una elevada toxicidad del neem a la dosis de 500 µg d extracto foliar por mililitro de dieta ocasionando un 91.67% de mortalidad (Tabla 4). Considerando el efecto biológico relacionado con la toxicidad, el extracto de neem fue seleccionado como ingrediente activo para la futura formulación.

17.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) de *Bacillus thuringiensis* y Neem contra *Spodoptera exigua*.

Posterior a la selección de las cepas de *Bacillus thuringiensis* HD133 y HD551 y del extracto de neem como potenciales agentes entomopatógenos para el control de *Spodoptera exigua*, se procedió a llevar a cabo la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) para las cepas HD133 y HD551, así como del extracto de neem. Para ello se realizó un bioensayo de incorporación a la dieta donde los extractos se incorporaron a las concentraciones de 10, 20, 40, 50, 70, 90, 110 y 150 µg/ ml.

Las concentraciones letales medias fueron obtenidas mediante análisis Probit. La CL₅₀ para la cepa HD133 es de 77,68 µg/ ml con un intervalo de confianza de 65.49 a 89.84 µg/ml, mientras que la de la cepa HD551 fue de 68.55 µg/ ml con un intervalo de confianza de 61.02 y 75.84 µg/ m. De igual manera la concentración letal media del extracto de neem fue determinada, obteniéndose una concentración letal de 509.20 µg/ ml (Gráfico 2).



Con relación al extracto de neem una vez terminado el bioensayo de toxicidad se llevaron a cabo los registros de los pesos de las larvas, con la finalidad de evaluar el efecto antifagoestimulante de este ingrediente activo. Los datos registrados se encuentran concentrados en la Tabla 6. En esta Tabla se puede apreciar que a dosis por arriba de los 40 µg de extracto por mililitro de dieta, el neem induce una pérdida en el peso de las larvas considerando el peso de los insectos control, lo que se ve reflejado en un menor desarrollo del insecto.

Tabla No. 6.- Evaluación del Efecto Antifagoestimulante del Extracto de Neem contra <i>Spodoptera exigua</i> .		
Dosis µg/ ml	Promedio ± DE del Peso de la larva (mg)	Rango de Peso
Control	215 ± 46 a	1°
20	204 ± 183 a	1°
10	184 ± 138 a	1°
50	176 ± 184 b	2°
40	157 ± 221 b	2°
70	142 ± 208 bc	2° 3°
90	126 ± 234 c	3°
110	107 ± 188 c	3°
150	86 ± 141 c	3°

N= 604; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables peso de las larvas y dosis del extracto de Neem.

17.3. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL₅₀).

Una caracterización toxicológica completa de los tres ingredientes activos fue completada mediante la determinación del tiempo letal medio. Para ello cada uno de los extractos obtenidos fue integrado a la dieta artificial del insecto bajo un estímulo de una concentración letal media. Para ello se realizaron 6 repeticiones de este

parámetro para cada agente bioactivo. Una vez evaluado este parámetro en contra de *Spodoptera exigua* obtuvimos que las cepas HD133 y HD551 presentan un tiempo letal medio muy cercano, siendo este de 5.92 y 6.46 días respectivamente, mientras que el extracto de neem produjo un tiempo letal medio de 9.72 (Tabla 7).

Tabla No. 7.- Determinación del Tiempo Letal Medio (TL ₅₀) de los agentes entomopatógenos contra <i>Spodoptera exigua</i> .			
Repetición	TL ₅₀ en Días		
	HD133	HD551	Neem
1ª	5.72	6.35	8.55
2ª	5.70	6.49	10.32
3ª	6.51	7.32	9.46
4ª	5.45	5.64	10.75
5ª	5.45	6.61	8.86
6ª	6.67	6.37	10.38
$\mu \pm \sigma$	5.92 ± 0.53	6.46 ± 0.54	9.72 ± 0.82

17.4. Propagación Masiva *B. thuringiensis*.

Una vez seleccionados los ingredientes activos potenciales para llevar cabo el control de *Spodoptera exigua* mediante el desarrollo de diversas formulaciones se llevó a cabo la propagación de la cepa HD551 a mayor escala mediante el uso de tanques de fermentación de 14 litros. Tres corridas de fermentación fueron llevadas a cabo. El rendimiento promedio de la biomasa húmeda y de la cantidad de extracto obtenido tanto por reactor, así como por litro de medio de cultivo se concentran en la Tabla 7. Los rendimientos promedios obtenidos por litro de medio de cultivo fueron de 27.75 gramos de biomasa húmeda y 12.01 gramos de extracto (Tabla 8).

Tabla 8.- Rendimiento obtenido durante la propagación Masiva de <i>Bacillus thuringiensis</i> HD551.				
Repetición	Peso Húmedo de la biomasa	Peso Húmedo/ Lt	Peso Seco del Extracto	Peso Seco/ Lt
Reactor 1	278.54	27.85	128.2	12.82
Reactor 2	231.35	23.14	109.5	10.95
Reactor 3	262.74	26.27	122.6	12.26
Promedio	257.54	25.75	120.1	12.01

17.5. Bioensayo de Preferencia Alimenticia.

Una vez seleccionados, caracterizados toxicológicamente y propagados masivamente los agentes entomopatógenos con potencial para ser utilizados en el control de *Spodoptera exigua*, la siguiente etapa consistió en diseñar y seleccionar una soporte de formulación microencapsulante con actividad fagoestimulante hacia el insecto de estudio.

Se elaboraron 18 gránulos diferentes compuestos de la combinación de una matriz polimérica sola o en combinación de un aditivo fagoestimulante. Los componentes utilizados en el diseño de los soportes de formulación fueron la pectina, la gretina y la fécula de maíz, como matrices microencapsulantes, mientras que un polvo fino de panoja de maíz, de alfalfa, de follaje de sorgo, de repollo y de olote fresco deshidratado fueron utilizados como aditivos fagoestimulantes (Tabla 2).

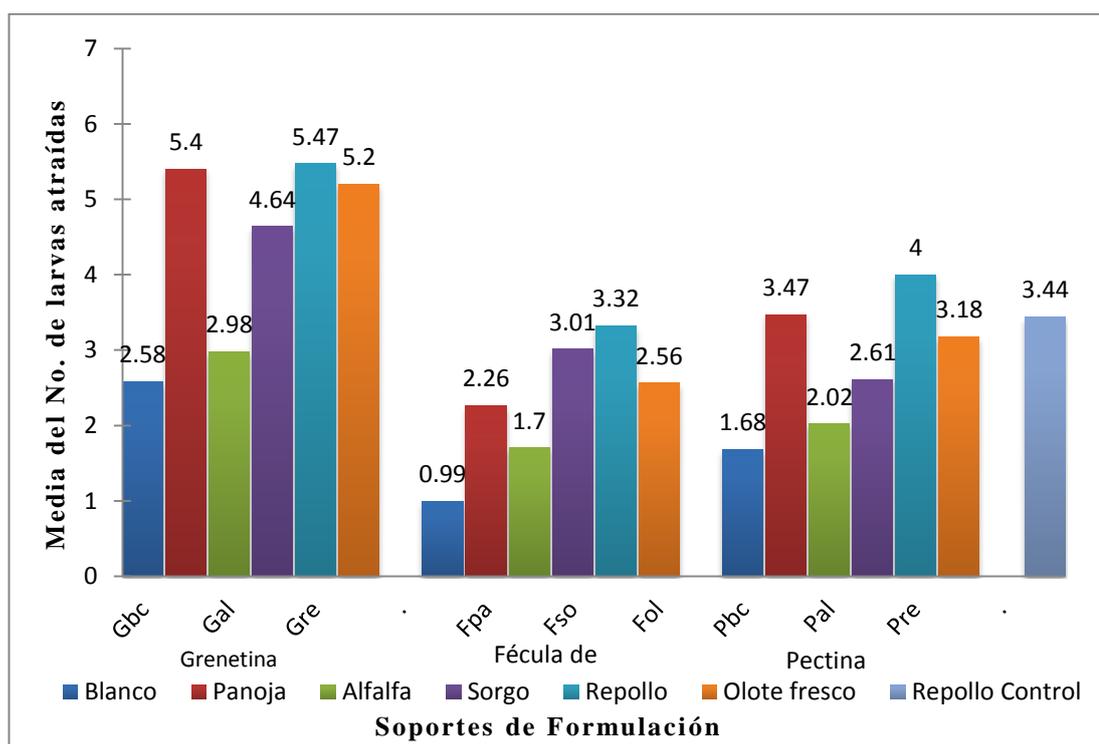
A través de un bioensayo de preferencia alimenticia se procedió a seleccionar uno o dos soportes como potenciales agentes para formular los agentes entomopatógenos. Estos soportes presentaron un efecto fagoestimulante, el cual fue contrastado contra pequeños trozos de hoja de repollo.

Inicialmente se determinó cuál de los 19 tratamientos evaluados mostraron los mejores niveles de preferencia alimenticia, para ello se realizó un análisis de varianza simple donde las variables a evaluar fueron el tipo de soporte y el número de larvas atraídas. Cuando se analiza el grado de preferencia de los soportes en relación al número de larvas atraídas por los 18 soportes diseñados y el repollo control, pudimos apreciar una alta diferencia significativa entre los niveles de preferencia presentado por los diecinueve tratamientos ($F= 46.402$, g. l.= 18, $P< 0.01$). A continuación mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey nos confirma el resultado al agruparnos los 19 tratamientos evaluados en siete grupos de significancia distintos, donde los soportes mayormente aceptados fueron los conformados por las mezclas de grenetina repollo (Gre), grenetina panoja (Gpa), grenetina olote (Gol) y grenetina sorgo (Gso). Los soportes seleccionados considerando esta evaluación fueron el soporte grenetina- repollo y grenetina panoja presentando una media de atracción de 5.47 ± 2.43 y 5.40 ± 1.84 larvas atraídas (Tabla 9).

Tabla No. 9.- Determinación de Soportes de Formulación de Agentes Entomopatógenos con Carácter Fagoestimulante hacia <i>Spodoptera exigua</i> .					
Soporte	Promedio \pm DE del Número de larvas atraídas	Nivel de Preferencia	Soporte	Promedio \pm DE del Número de larvas atraídas	Nivel de Preferencia
Gre	5.47 \pm 2.43 a	1°	Gal	2.98 \pm 2.04 de	4° 5°
Gpa	5.42 \pm 1.83 a	1°	Pso	2.61 \pm 1.67 def	4° 5° 6°
Gol	5.20 \pm 2.15 a	1°	Gbc	2.58 \pm 1.91 def	4° 5° 6°
Gso	4.64 \pm 2.11 ab	1° 2°	Fol	2.56 \pm 1.75 def	4° 5° 6°
Pre	4.00 \pm 1.64 bc	2° 3°	Fpa	2.26 \pm 1.87 ef	5° 6°
Ppa	3.47 \pm 1.78 cd	3° 4°	Pal	2.02 \pm 1.61 f	6°
Ctl	3.44 \pm 1.84 cd	3° 4°	Fal	1.79 \pm 1.43 fg	6° 7°
Fre	3.32 \pm 1.64 cd	3° 4°	Pbc	1.68 \pm 1.14 fg	6° 7°
Pol	3.18 \pm 1.87 cde	3° 4° 5°	Fbc	0.99 \pm 1.04 g	7°
Fso	3.01 \pm 1.67 de	4° 5°			

n= 90, valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables número de larvas atraídas y tipo de soporte

En la gráfica 3 se representa visualmente los diversos niveles de preferencia que presentan los soportes conformados por cada uno de los diferentes biopolímeros y se puede apreciar el efecto que ejerce cada uno de los aditivos, el efecto que ejerce la presencia de un aditivo combinado con un biopolímero y como la combinación exacta de un biopolímero y un aditivo potencia el efecto fagoestimulante tomando como referencia el alimento control.



Gráfica 3.- Niveles de Preferencia Alimenticia de *Spodoptera exigua* hacia los Soportes de Formulación.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis estadístico para comprobar el nivel de preferencia presentado por los soportes que presentan y carecen de aditivos fagoestimulantes. Para ello se examinó mediante un análisis de varianza simple el efecto del tipo de soporte con o sin fagoestimulante con relación al número de larvas atraídas. Este análisis nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables analizadas ($F= 76.76$, $g.l.=2$, $P<0.01$), lo cual se logra confirmar

mediante la prueba de Tukey, agrupándonos los tres tratamientos en 2 grupos con niveles de significancia diferentes. Los soportes más aceptados son los soportes que presentan aditivos fagoestimulantes y los trozos de repollo control, y segundo lugar de preferencia lo presentaron los soportes que carecían de fagoestimulantes presentando como medias de atracción de 3.46 ± 2.19 , 3.44 ± 1.85 y 1.75 ± 1.56 larvas respectivamente (Tabla 10).

Tabla No 10.- Efecto de la ausencia o presencia de aditivos fagoestimulantes en relación a la Preferencia de los Soportes de Formulación en <i>S. exigua</i>		
SOPORTE	Promedio \pm DE del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Soporte c/ fagoestimulantes	3.46 ± 2.19 a	1°
Hoja de repollo	3.44 ± 1.84 a	1°
Soporte s/ fagoestimulantes	1.75 ± 1.56 b	2°

N= 1710; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en **azul** corresponden al análisis variables soporte con/ sin fagoestimulante contra número de larvas atraídas.

Con la finalidad de evaluar el efecto de los polímeros microencapsulantes con relación al efecto fagoestimulante, se realizó un siguiente análisis estadístico mediante un ANOVA simple, para ello se analizaron las variables tipo de biopolímero contra el número de larvas atraídas, indicándonos una alta diferencia significativa entre las variables ($F= 98.394$, $g.l.= 3$, $P<0.01$), en donde cada uno de los tratamientos fue agrupado en un nivel de significancia diferente. Los tratamientos que fueron los más aceptados son los trozos de repollo control y la grenetina presentando como medias de atracción 3.44 ± 1.84 y 2.58 ± 1.91 larvas, respectivamente (Tabla 11).

Efecto de los Polímeros microencapsulantes en relación a la Preferencia en <i>S. exigua</i>		
SOPORTE	Promedio \pm DE del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Repollo Control	3.44 \pm 1.84 a	1°
Grenetina sola	2.58 \pm 1.91 b	2°
Pectina sola	1.68 \pm 1.14 c	3°
Fécula de maíz sola	0.99 \pm 1.04 d	4°

n=90; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de matriz microencapsulante contra número de larvas atraídas.

Al reagrupar los diversos tratamientos como biopolímeros combinados con los aditivos pudimos apreciar que el efecto fagoestimulante se ve modificado, para ello análisis de varianza se realizó con la finalidad de ver el efecto combinado de las matrices microencapsulantes en combinación con los aditivos fagoestimulantes en relación al número de larvas atraídas, lo cual nos muestra la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables ($F= 104.41$, $g.l.= 3$, $P<0.01$). Posteriormente, una prueba de comparación múltiple de Tukey nos confirmó la existencia de una alta diferencia significativa, agrupándonos los 4 tratamientos en 4 niveles de significativamente diferentes. Los soportes a partir de grenetina combinados con los aditivos fueron los más aceptados (G-comb) seguido en segundo orden por los trozos de repollo control, los cuales presentaron como medias de atracción 4.38 ± 2.39 y 3.44 ± 1.84 larvas, respectivamente (Tabla 12), con ello se puede apreciar que la presencia de los aditivos fagoestimulantes modifican el comportamiento con relación a la preferencia mostrada por cada biopolímero.

Efecto de las Polímeros Microencapsulantes combinadas con los Aditivos en Relación a la Preferencia hacia <i>S. exigua</i>		
SOPORTE	Promedio \pm DE del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Grenetina Combinada ⁿ²	4.38 \pm 2.39 a	1°
Repollo Control ⁿ¹	3.44 \pm 1.84 b	2°
Pectina Combinada ⁿ²	2.83 \pm 1.82 c	3°
Fécula de Maíz Combinada ⁿ²	2.32 \pm 1.76 d	4°

n₁= 90, n₂= 540; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en **verde** corresponden al análisis de las variables tipo de matriz microencapsulante contra número de larvas atraídas.

Finalmente, se evaluó el efecto fagoestimulante que inducen cada uno de los aditivos utilizados, para ello un análisis de varianza simple se realizó donde se analizaron las variables tipo de aditivo contra el número de larvas atraídas. Este análisis nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables ($F= 27.35$, $g.l.= 5$, $P<0.01$). La prueba de comparación múltiple de medias de Tukey nos agrupa los seis tratamientos en 3 niveles de significancia diferentes, donde los aditivos fagoestimulantes más aceptados son el repollo y la panoja de maíz, presentando como medias de atracción 4.26 ± 2.13 y 3.71 ± 2.24 larvas respectivamente (Tabla 13).

Tabla No 13.- Efecto de los Aditivos Fagoestimulantes en Relación a la Preferencia de los Soportes de Formulación contra <i>S. exigua</i>		
SOPORTE	Promedio \pm DE del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Repollo	4.26 \pm 2.13 a	1°
Panoja	3.71 \pm 2.24 ab	1°, 2°
Olote Fresco	3.64 \pm 2.23 b	2°
Control	3.44 \pm 1.84 b	2°
Sorgo	3.42 \pm 2.02 b	2°
Alfalfa	2.26 \pm 1.78 c	3°

n=90; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis las variables tipo de aditivo fagoestimulante contra número de larvas atraídas.

17.6. Formulación de Bioactivos.

Una vez teniendo seleccionados los agentes entomopatógenos más tóxicos y los soportes de formulación más aceptados mediante preferencia alimenticia, se procedió a elaborar las formulaciones. Para elaborar las formulaciones y dependiendo de la formulación a preparar, se realizó una mezcla al 2% de la matriz encapsulante, del aditivo fagoestimulante al 4%, del extracto espora- cristal de *Bacillus thuringiensis* al 7% y del extracto de neem al 2%.

Para la elaboración de las formulaciones asperjables se utilizaron los soportes compuestos de Grenetina repollo y Grenetina panoja para la producción de las formulaciones. Las formulaciones producidas fueron ocho: grenetina panoja blanco, grenetina panoja *B. t.* 7%, grenetina panoja neem 2%, grenetina panoja *B.t.* 7% neem 2%, grenetina repollo blanco, grenetina repollo *B.t.*7%, grenetina repollo neem 2% y grenetina repollo *B.t.* 7% y grenetina repollo *B.t.* 7% neem 2%.

Se procedió a preparar un litro de formulación donde la matriz encapsulante estaba al 2%, el aditivo fagoestimulante al 4%, *B.t.* al 7% y el neem al 2%. Los componentes que conformaron las formulaciones se presentan en la Tabla 14.

Tabla No. 14.- Composición de los Formulados Desarrollados.					
Formulación	Grenetina (g)	Aditivo (g)	Entomopatógeno (g)		H ₂ O (ml)
			<i>B. t.</i>	<i>Neem</i>	
Gpa-Bco.	20 g	40 g	0 g	0 g	1000 ml
Gpa- <i>Bt</i>	20 g	40 g	70 g	0 g	1000 ml
Gpa-Neem	20 g	40 g	0 g	20 g	1000 ml
Gpa- <i>Bt</i> -Neem	20 g	40 g	70 g	20 g	1000 ml
Gre-Bco.	20 g	40 g	0 g	0 g	1000 ml
Gre- <i>Bt.</i>	20 g	40 g	70 g	0 g	1000 ml
Gre-Neem	20 g	40 g	0 g	20 g	1000 ml
Gre- <i>Bt</i> -Neem.	20 g	40 g	70 g	20 g	1000 ml

G= grenetina, pa= panoja, re= repollo, Bco.= blanco o sin aditivo, *B.t.* = *Bacillus thuringiensis*.

Una vez preparada la solución a secar, se procedió a encender en secador por aspersión, se activaron 6 resistencias de calentamiento y se dejó transcurrir 10 minutos. Se colocó en la base del cyclone, la jarra o frasco para la recuperación del polvo seco. Posteriormente, se activó la entrada de aire a la turbina aspersora a una presión de 3,600 a 4,200 kPa/ cm² y se procedió a inyectar agua a la turbina aspersora a un flujo de 6 ml/ min. Se reguló la temperatura de la cámara de secado a 135°C y la temperatura del aire de salida a 80- 90°C. Una vez reguladas las condiciones óptimas para el secado de las formulaciones, se inició la inyección de la formulación asperjable, la cual se encontraba bajo agitación ligera durante el transcurso del proceso. Los formulados una vez deshidratados se almacenaron en recipientes herméticos de plástico y posteriormente se les determinó la humedad final

del producto con la finalidad de evaluar los rendimientos y eficiencia del secado por aspersión durante el proceso de deshidratación y microencapsulación de los ingredientes activos. En la Tabla No. 15 se concentran los datos relacionados a la eficiencia del proceso de secado de las diferentes formulaciones.

Tabla No.15.- Rendimientos del Proceso de Secado por Aspersión de las Formulaciones desarrollados					
Formulación	Componente Seco gr/ L	Componente Seco recuperado gr/L	Porcentaje de Humedad	Componente recuperado corr. gr/L	Eficiencia de Secado (%)
Gpa-bco	60	54.78	1.24	54.10	90.16
Gpa-Bt	130	123.54	1.89	121.21	93.23
Gpa-Nm	100	94.18	2.85	91.50	91.49
Gpa-BtNm	170	165.82	3.45	160.10	94.18
Gre-bco	60	45.78	1.74	44.98	74.97
Gre-Bt	130	126.49	2.05	123.90	95.31
Gre-Nm	100	89.26	2.32	87.19	87.19
Gre-BtNm	170	157.86	3.28	152.68	89.81
G= grenetina, pa= panoja, re= repollo, bco.= blanco o sin aditivo, Bt = <i>Bacillus thuringiensis</i> , BtNm= mezcla de extractos de <i>B. thurngiensis</i> y neem.					

Como se puede apreciar los rendimientos o la eficiencia de secado de las diversas formulaciones oscilaron en alrededor del noventa porciento de recuperación de sólidos al llevar a cabo el secado de las formulaciones bajo las condiciones operacionales descritas previamente en la metodología (Tabla 15).

17.7. Evaluación de los Formulados a Nivel de Laboratorio.

Dos soportes de formulación y dos ingredientes bioactivos fueron empleados para diseñar y elaborar ocho formulaciones. La composición de las formulaciones se puede observar en la Tabla No. 14.

Con la finalidad de evaluar la eficiencia de las formulaciones experimentales desarrolladas fueron empleadas dos formulaciones comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki. La primer formulación empleada fue el Thuricide HPC®, una formulación líquida concentrada aplicada de manera asperjable; mientras que la segunda formulación empleada fue el Dipel Dust®, una formulación tipo talco aplicada por espolvoreo. También fue empleada una formulación comercial a base de neem de nombre Triple Action PLUS® cuya aplicación fue realizada por medio de aspersión. Las tres formulaciones comerciales fueron aplicadas siguiendo las recomendaciones de la compañía.

La evaluación de los formulados fue realizada empleando discos de hoja de repollo tratados por inmersión en las diferentes soluciones de las formulaciones, mientras que la formulación tipo talco fue aplicado sobre los discos a una distancia 30 centímetros de altura tratado de crear una película homogénea sobre la superficie a tratar.

Con la finalidad de determinar la eficiencia de los formulados, éstos fueron evaluados en una primera instancia nivel de laboratorio. Para ello se analizaron las variables tipo de formulado contra el número de larvas muertas a las 24 horas. Este análisis nos indica la existencia de una alta diferencia significativa al relacionar ambas variables ($F= 33.302$, g.l.= 11, $P<0.05$). Dicho resultado fue confirmado mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, agrupándonos los

doce tratamientos en 4 grupos que comparten el mismo nivel de significancia (Tabla 16). Los tratamientos que produjeron la más alta mortalidad fueron la formulaciones conformadas por Gpa- *Bt*, Gre- *Bt*, Gpa- *BtNm* y Thuricide HPC® generando una mortalidad de 12.00 ± 1.41 , 11.80 ± 1.30 , 11.20 ± 2.68 y 10.60 ± 0.55 larvas, respectivamente. Los porcentajes de mortalidad generados a las 24 horas por los tratamientos descritos anteriormente fueron 48%, 47.2%, 44.8% y 43% de mortalidad, los cuales se incrementan a 100%, 100%, 96% y 92 % a los 7 días post-evaluación.

Un segundo análisis realizado consistió en comprobar el efecto de los diferentes bioactivos empleados, para ello, se realizó un análisis de varianza simple donde las variables analizadas fueron el número de larvas muertas y el tipo de bioactivo. El análisis de estas dos variables nos demuestra la existencia de una alta diferencia significativa entre ellas ($F= 49.08$, $g.l.= 7$, $P<0.05$). Esta variabilidad existente entre los tratamientos nos agrupó los 8 tipos de bioactivos en 5 grupos de significancia, donde los tratamientos que originaron la más alta mortalidad fueron G-*Bt*, Thuricide HPC® y G-*BtNm* ocasionando una mortalidad de 11.90 ± 1.29 , 10.60 ± 0.55 y 8.70 ± 3.30 larvas, respectivamente (Tabla 17). Los porcentajes de mortalidad generados a las 24 horas por los tratamientos descritos anteriormente fueron 48%, 42% y 35% de mortalidad, los cuales se incrementan a 100, 92 y 84% a los 7 días post-evaluación.

Tabla No. 16.- Evaluación de la actividad toxica de Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra *Spodoptera exigua* a nivel de laboratorio.

Formulación	24 horas			7 días	
	Promedio \pm DE del no. de larvas muertas.	Mortalidad (%) ⁿ¹	R. T.	Mortalidad (%) ⁿ²	R. T.
Gpa-Bt	12.00 \pm 1.41a	60%	1°	100%	1°
Gre-Bt	11.80 \pm 1.30a	59%	1°	100%	1°
Gpa-BtNm	11.20 \pm 2.68a	56%	1°	96%	1°
Thuricide HPC ®	10.60 \pm 0.55a	53%	1°	92%	1°
Dipel Dust ®	7.20 \pm 1.30b	36%	2°	76%	2°
Gpa-Nm	7.20 \pm 1.10b	36%	2°	76%	2°
Gre-BtNm	6.20 \pm 1.30bc	31%	2° 3°	72%	2°
Gre-Nm	4.60 \pm 0.89bc	23%	2° 3°	44%	3°
Triple Action ®	4.20 \pm 1.48c	21%	3°	36%	3°
Gpa-Bco.	0.80 \pm 0.45d	4%	4°	0%	4°
Gre-Bco.	0.00 \pm 0.00d	0%	4°	0%	4°
Control	0.00 \pm 0.00d	0%	4°	0%	4°

n¹ = 100, n² = 25; Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes (Mínima diferencia significativa, P <0.01); letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra el numero de larvas muertas; R.T.= rango de Toxicidad, Gre= grenetina-repollo, Gpa= grenetina-panoja de maíz, Bt= *Bacillus thuringiensis*, Nm= extracto de Neem, Bco= blanco.

Tabla No. 17.- Evaluación de la actividad toxica de tipo del ingrediente activo empleado en las Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra *Spodoptera exigua* a nivel de laboratorio.

		24 horas			7 días	
Formulación	Promedio ± DE del no. de larvas muertas.	Mortalidad (%) ⁿ¹	R. T.	Mortalidad (%) ⁿ²	R. T.	
G-Bt	11.90 ± 1.29a	48%	1°	100%	1°	
Thuricide HPC ®	10.60 ± 0.55ab	42%	1°2°	92%	1°	
G-BtNm	8.70 ± 3.30bc	35%	2° 3°	84%	1°	
Dipel Dust ®	7.20 ± 1.30cd	29%	3° 4°	76%	1°	
G-Nm	5.90 ± 1.66cd	24%	3° 4°	60%	2°	
Triple Action ®	4.20 ± 1.48d	17%	4°	36%	2°	
G-Bco	0.40 ± 0.52e	2%	5°	2%	2°	
Control	0.00 ± 0.00e	0%	5°	0%	3°	

n¹ = 100, n² = 25; Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes (Mínima diferencia significativa, P <0.01); letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra el numero de larvas muertas; R.T.= rango de Toxicidad, Gre= grenetina-repollo, Gpa= grenetina-panoja de maíz, Bt= *Bacillus thuringiensis*, Nm= extracto de Neem, Bco= blanco.

18.8. Evaluación de los Formulados a Nivel de Invernadero.

Finalmente, se evaluó la actividad toxica de los formulados desarrollados a nivel de invernadero con la finalidad de corroborar el efectividad de los mismos. Para ello fueron utilizadas plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* var. fibermax) de aproximadamente 2 meses de edad. Las plantas experimentales fueron rotuladas con según el nombre del producto que se aplicó y el número de la réplica. Quince réplicas fueron evaluadas por cada tratamiento las cuales fueron distribuidas en 3 filas de 5 plantas para cada tratamiento, dejando una separación del área foliar de aproximadamente 5 centímetros con respecto al área foliar de las plantas adyacentes.

Una vez preparadas las unidades experimentales, se procedió a preparar las formulaciones a asperjar. Para el caso de las formulaciones deshidratadas, éstas fueron reconstituidas tomando como referencia los datos de rendimiento del proceso de secado por aspersion mostrados en la Tabla No. 14, mientras que los formulados comerciales fueron diluidos y aplicados siguiendo las recomendaciones de la compañía.

Fueron evaluadas ocho formulaciones experimentales elaboradas a partir de la combinación de dos soportes de formulación y dos ingredientes activos los cuales se usaron de manera independiente y en combinación, considerando para ello las proporciones de Bioactivos usados de las formulaciones que poseían un solo ingrediente activo. De esta manera se obtuvieron seis formulaciones con ingrediente activos y dos formulaciones blanco. Al igual que en el ensayo de laboratorio, tres formulaciones comerciales fueron empleadas, las cuales son descritas en el apartado anterior.

Para llevar a cabo la aplicación de los formulados elaborados se prepararon 100 mililitros de cada una de ellas. Los formulados fueron aplicados usando un frasco

atomizador, aplicando aproximadamente 75 mililitros de la solución, lo que vendría representando 5 mililitros por planta.

Una vez realizado el bioensayo, fueron registrados algunos parámetros de daño en las plantas de algodón. Para ello se tomó el registro del número de plantas totales, el número de plantas afectadas, así como el número de hojas totales y el número de hojas afectadas. Los registros totales por tratamiento son concentrados en la Tabla No. 18.

Considerando los registros anteriores se realizaron algunas estimaciones, como el porcentaje de infestación, el cual refleja la proporción de plantas que fueron dañadas del total de plantas evaluadas. Así también se calculó el porcentaje de intensidad, el cual nos refleja la proporción de hojas dañadas del total de hojas evaluadas en cada tratamiento y finalmente se estimó el índice de intensidad el cual nos refleja el nivel de ataque del insecto.

Según se puede apreciar en la Tabla 18, los tratamientos que produjeron una mayor protección al ataque de *Spodoptera exigua* hacia las plantas de algodón tratadas fueron las formulaciones Gpa-Bt, Gre-Bt, Gpa-BtNm y Thuricide HPC®, al generar los más bajos porcentajes de infestación y de intensidad, así como el más bajo índice de intensidad (Tabla 18).

Tabla No. 18.- Estimación de parámetros de la protección generada por las diversas formulaciones bioinsecticidas dirigidas al control de *Spodoptera exigua*. a nivel Invernadero

FORMULACION	Plantas Totales	Plantas Afectadas	Hojas Totales	Hojas afectadas	Porcentaje de Infestación	Porcentaje de Intensidad	Índice de Intensidad
Control	15	15	375	365	100.0	97.3	97.3
Gpa- bco	15	15	285	281	100.0	98.6	98.6
Gre- bco	15	15	329	323	100.0	98.2	98.2
Triple Action ®	15	15	292	178	100.0	61.0	61.0
Gre- Nm	15	15	284	166	100.0	58.5	58.5
Gpa- Nm	15	14	317	217	93.3	68.5	63.9
Gre- <i>BtNm</i>	15	12	209	32	80.0	15.3	12.2
Dipel Dust ®	15	8	256	50	53.3	19.5	10.4
Thuricide HPC ®	15	3	348	49	20.0	14.1	2.8
Gpa- <i>BtNm</i>	15	3	385	43	20.0	11.2	2.2
Gre- <i>Bt</i>	15	1	269	21	6.7	7.8	0.5
Gpa- <i>Bt</i>	15	0	255	13	0.0	5.1	0.0
N= 180; n= 15.							

Una vez registrados los parámetros de daño de las plantas a nivel invernadero, además, se evaluó el grado de protección de las ocho formulaciones desarrolladas, las formulaciones comerciales (controles positivos) y un control negativo. Para determinar el grado de protección de los 12 diferentes tratamientos se realizó un análisis de varianza simple, donde las variables evaluadas fueron el número de hojas afectadas y el tipo de tratamiento. El análisis de estas dos variables nos muestra la existencia de una alta diferencia significativa entre ellas ($F= 54.63$, g.l.= 11, $P<0.05$). Esta variabilidad existente nos agrupó los 12 tratamientos en 6 grupos de significancia, donde los tratamientos que originaron el más alto nivel de protección fueron los constituidos por *Gpa-Bt*, *Gre-Bt*, Thuricide HPC ® y *Gpa-BtNm*, en los cuales se generó el menor daño al afectarse solamente 1.53 ± 1.06 , 1.73 ± 0.88 , 2.47 ± 0.84 y 2.80 ± 1.47 hojas afectadas, lo que representa un daño de 6, 7, 10 y 11% de daño respectivamente (Tabla 19). De igual manera se puede apreciar que las formulaciones desarrolladas que contienen como ingrediente activo el extracto de *Bt* presentaron una acción biocontroladora mayor que el resto de las formulaciones y los productos comerciales.

Otro aspecto a analizar consistió en determinar el tipo de bioactivo más efectivo en los diferentes tratamientos evaluados. Para ello, mediante análisis de varianza simple se evaluaron las variables tipo de bioactivo y el número de hojas afectadas. La relación de ambas variables nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre ellas ($F=61.48$, g.l.= 7, $P<0.05$). La variabilidad de la relación entre ambas factores nos agrupó los ocho tipos de bioactivos en 5 grupos con niveles de significancia diferentes, donde los bioactivos que originaron el más alto nivel de protección fueron los constituidos *Bacillus thuringiensis* asperjable en primer orden

y en segundo el tratamiento de *Bacillus thuringiensis* en polvo y la combinación de *Bt*-Neem (Tabla 20).

Tabla No. 19.- Evaluación de la actividad tóxica de Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra <i>Spodoptera exigua</i> a nivel invernadero.			
Formulación	No. de hojas con daño Promedio \pm DE	Porcentaje de Daño (%)	R. P.
Gpa- <i>Bt</i>	1.53 \pm 1.06a	6%	1°
Gre- <i>Bt</i>	1.73 \pm 0.88a	7%	1°
Thuricide HPC®	2.47 \pm 0.83ab	10%	1° 2°
Gpa- <i>BtNm</i>	2.80 \pm 1.47ab	11%	1° 2°
Dipel Dust®	4.13 \pm 1.30b	17%	2°
Gre- <i>BtNm</i>	6.40 \pm 1.30c	26%	3°
Gpa-Nm	6.80 \pm 1.57c	27%	3°
Gre-Nm	9.13 \pm 1.51d	37%	4°
Triple Action®	9.60 \pm 1.24d	38%	4°
Gre-Bco.	21.93 \pm 3.20e	88%	5°
Gpa-Bco.	22.93 \pm 0.70e	92%	5°
Control	25.00 \pm 0.00f	100%	6°

N = 180, n = 25; Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes (Mínima diferencia significativa, P <0.01); letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra el número de hojas afectadas; R.P.= rango de protección, Gre= grenetina-repollo, Gpa= grenetina-panoja de maíz, *Bt*= *Bacillus thuringiensis*, Nm= extracto de Neem, Bco= blanco.

Los ingredientes activos que ocasionaron el mayor nivel de protección fueron los tratamientos constituidos por G-*Bt*. Thuricide HPC®, Dipel Dust® y G-*BtNm*, generando un nivel de daño de 1.63 \pm 0.96, 2.47.63 \pm 0.83, 4.13 \pm 1.30, y 4.60 \pm 2.28 hojas afectadas, respectivamente (Tabla 20).

Tabla No. 20.- Evaluación del nivel de protección de los diferentes ingredientes activos empleados en las Formulaciones Bioinsecticidas Asperjables contra <i>Spodoptera exigua</i> a nivel de Invernadero.			
Formulación	No. de hojas con daño Promedio \pm DE	Porcentaje de Daño (%)	R. P.
G-Bt	1.63 \pm 0.96a	7%	1°
Thuricide HPC®	2.47 \pm 0.83a	10%	1°
Dipel Dust ®	4.13 \pm 1.30b	17%	2°
G-BtNm	4.60 \pm 2.28b	18%	2°
G-Nm	7.97 \pm 1.92c	32%	3°
Triple Action ®	9.60 \pm 1.24c	38%	3°
G-Bco.	22.43 \pm 2.33d	90%	4°
Control	25.00 \pm 0.00e	100%	5°

N = 120, n = 25; Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes (Mínima diferencia significativa, P < 0.01); letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra el número de hojas afectadas; R.P.= rango de protección, Gre= grenetina-repollo, Gpa= grenetina-panoja de maíz, Bt= *Bacillus thuringiensis*, Nm= extracto de Neem, Bco= blanco.

Un tercer efecto consistió en analizar el efecto de la mezcla de bioactivos *B. thuringiensis*-neem comparándolas con aquellas que estaban constituidas solamente de *B. thuringiensis*. Para ello, se analizaron mediante ANOVA simple las variables tipo de formulación y el número de hojas afectadas. La relación de ambas variables nos indica la existencia de una alta diferencia significativa (F=67.86, g.l.= 9, P<0.05). Esta diferencia significativa se ve reflejada en la agrupación de los diez tratamientos en 6 grupos de significancia diferentes, donde los tratamientos Gpa-Bt, Gre-Bt, Thuricide HPC ® y Gpa-BtNm fueron los que mayor nivel de protección generaron al producirse respectivamente 1.53 \pm 1.06, 1.73 \pm 0.88, 2.47 \pm 0.83 y 2.80 \pm 1.47 hojas afectadas (Tabla 21).

Tabla No. 21.-

Evaluación del nivel de protección de las Formulaciones Asperjables que contienen *Bacillus thuringiensis* como ingrediente activo en contra de *Spodoptera exigua* a nivel de Invernadero.

Formulación	No. de hojas con daño Promedio \pm DE	Porcentaje de Daño (%)	R. P.
Gpa-Bt	1.53 \pm 1.06a	6%	1°
Gre-Bt	1.73 \pm 0.88a	7%	1°
Thuricide HPC®	2.47 \pm 0.83ab	10%	1° 2°
Gpa-BtNm	2.80 \pm 1.48ab	11%	1° 2°
Dipel Dust®	4.13 \pm 1.30b	17%	2°
Gre-BtNm	6.40 \pm 1.30c	26%	3°
Triple Action ®	9.60 \pm 1.24d	38%	4°
Gre-Bco	21.93 \pm 3.20e	88%	5°
Gpa-Bco	22.93 \pm 0.70e	92%	5°
Control	25.00 \pm 0.00f	100%	6°

N =150, n = 25; Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes (Mínima diferencia significativa, P <0.01); letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra el numero de hojas afectadas; R.P.= rango de protección, Gre= grenetina-repollo, Gpa= grenetina-panoja de maíz, Bt= *Bacillus thuringiensis*, Nm= extracto de Neem, Bco= blanco.

Un cuarto efecto consistió en analizar el efecto de la mezcla de bioactivos *B. thuringiensis*-neem comparándolas con aquellas que estaban constituidas solamente de neem. Para ello, se analizaron mediante ANOVA simple las variables tipo de formulación y el número de hojas afectadas. La relación de ambas variables nos indica la existencia de una alta diferencia significativa (F=48.76, g.l.= 6, P<0.05). Esta diferencia significativa se ve reflejada en la agrupación de los siete tratamientos en 5 grupos de significancia diferentes, donde los tratamientos Gpa-BtNm, Gre-BtNm y Gpa-Nm fueron los que mayor nivel de protección generaron al producirse respectivamente 2.80 \pm 1.47, 6.40 \pm 1.30 y 6.80 \pm 1.57 hojas afectadas (Tabla 22).

Tabla No. 22.- Evaluación del nivel de protección de las Formulaciones Asperjables que contienen Neem como ingrediente activo en contra de *Spodoptera exigua* a nivel de Invernadero.

Formulación	No. de hojas con daño Promedio \pm DE	Porcentaje de Daño (%)	R. P.
Gpa-BtNm	2.80 \pm 1.47 ^a	11%	1°
Gre-BtNm	6.40 \pm 1.30 ^b	26%	1°
Gpa-Nm	6.80 \pm 1.57 ^b	27%	1° 2°
Triple Action ®	9.60 \pm 1.24 ^c	38%	1° 2°
Gre-Bco	21.93 \pm 3.20 ^d	88%	5°
Gpa-Bco	22.93 \pm 0.70 ^d	92%	5°
Control	25.00 \pm 0.00 ^e	100%	6°

N =105, n = 25; Medias seguidas por letras iguales no son significativamente diferentes (Mínima diferencia significativa, P <0.01); letras en **azul** corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra el numero de hojas afectadas; R.P.= rango de protección, Gre= grenetina-repollo, Gpa= grenetina-panoja de maíz, Bt= *Bacillus thuringiensis*, Nm= extracto de Neem, Bco= blanco.

18. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se diseñó un insecticida biorracional asperjable contra *Spodoptera exigua* partir de la combinación de un bioactivo de origen microbiano y otro vegetal. Los bioactivos utilizados en el desarrollo de los formulados fueron los extractos de *Bacillus thuringiensis* HD551 y *Azadirachta indica*, conocido comúnmente como neem. Estos dos bioactivos se evaluaron de manera individual, así como también una mezcla de los mismos. Los productos desarrollados fueron ocho formulaciones biodegradables dirigidas hacia el control del gusano soldado *Spodoptera exigua*, plaga polífaga, migratoria y cosmopolita la cual impacta fuertemente la agricultura. Dentro del hábito polífago del *Spodoptera exigua*, el insecto ataca una gran variedad de granos básicos, cultivos ornamentales y hortalizas. Entre los hospederos más fuertemente atacados destacan los cultivos de alfalfa, remolacha, brócoli, col, calabaza, soya, algodón, pimiento, sandía, melón, tabaco, tomate, papa, etc., causando principalmente defoliación del cultivo y en algunas ocasiones también atacando el fruto (Belda *et al.*, 1994).

Debido al impacto económico que representa *Spodoptera exigua* sobre los campos agrícolas, este insecto es la mayor plaga agrícola de zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial. Diversas tácticas han sido empleadas para controlar a *S. exigua*, siendo el control químico el más utilizado. Algunos reportes mencionan que el uso intensivo de insecticidas a nivel regional puede llevar a originar resistencia en las poblaciones de *S. exigua*, debido a ello, es necesario emplear otras estrategias para llevar a cabo su control (Taylor, 2006)

El uso de los bioinsecticidas como parte del manejo integrado de plagas, ha ganado gran aceptación a nivel mundial desde las últimas décadas del siglo XX. Dentro del mercado de los bioinsecticidas, *Bacillus thuringiensis* es el ingrediente activo de mayor demanda y uso comercial dentro del control biológico de insectos plaga de importancia agrícola y médica (Ahmedani *et al.*, 2008). Una segunda familia de productos bioinsecticidas son los insecticidas de origen vegetal, cuyo principal mercado hoy en día es para emplearse en parques y jardines debido a su baja persistencia en el medio ambiente, y a la baja toxicidad hacia las personas expuestas. Se espera que en 10 a 15 años, estos compuestos aumenten en un 25% su participación en el mercado de los insecticidas y no solamente se limite su uso al área de jardinería, sino que se expanda el empleo en el área agrícola y urbano (Silva *et al.*, 2002).

18.1. Evaluación Preliminar del Efecto Tóxico de Extractos Espora- Cristal de *Bacillus thuringiensis* y Neem (*Azadirachta indica*).

La primera estrategia a cumplir dentro del proyecto consistió en seleccionar los componentes para el diseño de los formulados, para ello se evaluaron diez cepas de *Bacillus thuringiensis* y un extracto de neem mediante bioensayos de toxicidad, incorporando los bioactivos en la dieta merídica del insecto. Estos dos bioinsecticidas han demostrado ser efectivos en el control de insectos plagas agrícolas, sin embargo, no se habían combinado (Hofte y Whiteley, 1989; Immaraju, 1998; Marcon *et al.*, 1999). Las cepas de *Bacillus thuringiensis* evaluadas fueron la HD1, HD2, HD9, HD29, HD73, HD125, HD133, HD227, HD551 y Bt1154, las cuales forman parte del cepario del laboratorio de Biomedicina Molecular del centro

de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Cada una de estas cepas fueron evaluadas a la dosis de 50 y 500µg/ ml. de dieta.

Basado en la toxicidad de las cepas, solamente dos cepas provocaron arriba de un 60% de mortalidad a la dosis baja. Las cepas de *B. thuringiensis* HD133 y HD551 pertenecientes a la variedad aizawai fueron las que ocasionaron la mayor toxicidad contra las larvas neonatas de *S. exigua*, provocando un 66.06% y 63.89% de mortalidad, mientras que el extracto de neem ocasionó una mortalidad del 23.61% a las dosis de 50 µg de extracto por mililitro de dieta. Con los datos de toxicidad, un aspecto observado fue la baja mortalidad originada por el extracto de neem a la dosis de 50 µg/ml. Este efecto no se consideró negativo, esto debido a que fue posible observar un efecto biológico potencial para considerarse como ingrediente activo candidato, al presentarse una disminución del tamaño y, por ende, del peso de las larvas, consecuencia comúnmente asociado un efecto antifagoestimulante o de intoxicación larvaria. Nuestros resultados coinciden con diversos autores que reportan algunos efectos negativos muy variados del neem sobre los insectos, actuando como antifagoestimulantes, reguladores del crecimiento, inhibidores de la oviposición y como esterilizantes (Nathan *et al.*, 2005).

18.2. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de extractos de *Bacillus thuringiensis* y neem contra *Spodoptera exigua*.

Una vez seleccionadas las cepas de *Bacillus thuringiensis* HD133 y HD551 y del extracto de neem como potenciales agentes entomopatógenos para el control de *Spodoptera exigua*, realizamos una caracterización toxicológica de los tres bioactivos mediante la determinación de la CL₅₀ y el TL₅₀. Para determinar la concentración

letal media de los bioactivos, estos fueron integrados a la dieta artificial del insecto a las concentraciones de 10, 20, 40, 50, 70, 90, 110 y 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$., y mediante un análisis probit se determinó que la CL_{50} para la cepa HD133 es de 77,68 $\mu\text{g}/\text{ml}$., mientras para la de la cepa HD551 fue de 68.55 $\mu\text{g}/\text{ml}$.. De igual modo la CL_{50} del extracto de neem fue de 509.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gráfico 2). Con respecto a la caracterización toxicológica completa de los ingredientes activos se realizó la determinación del tiempo letal medio (TL_{50}). Para ello, los bioactivos fueron integrados a la dieta merídica del insecto a una CL_{50} . Una vez que evaluamos este parámetro contra de *Spodoptera exigua* obtuvimos que las cepas HD133 y HD551 presentan un TL_{50} muy cercano causando una mortalidad promedio a los 5.92 y 6.46 días respectivamente, mientras que el extracto de neem produjo un TL_{50} de 9.72 días (Tabla 7).

Con relación al extracto de neem una vez terminado el bioensayo de toxicidad se llevaron a cabo los registros de los pesos de las larvas con la finalidad de evaluar el efecto antifagoestimulante inducido por este ingrediente activo (Mordue AJ, 1993). Diez concentraciones diferentes del extracto de neem fueron evaluadas, las cuales oscilaron en un rango de los 10 a 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados nos indican que a concentraciones superiores a los 40 μg de extracto por mililitro de dieta, el neem induce una pérdida en el peso de las larvas contrastando este resultado con comparándolo con el peso de los insectos control, hecho que se vio reflejado en un menor desarrollo del insectos tratados. En un estudio realizado por Nathan *et al.*, (2005) realizado en *Spodoptera litura* comprueban el efecto antifagoestimulante cuando evaluaron el efecto combinado de la azadiractina y un nucleopolihedrovirus (NPV) y contrastaron el efecto sobre la actividad enzimática de enzimas digestivas del intestino medio, encontrando además que la actividad enzimática se ve reducida

por acción de la azadiractina y el NPV en combinación, asociando esto a un efecto sinérgico a dosis bajas, presentándose un 59-72% de reducción del peso corporal.

18.3. Propagación Masiva *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva formadora de esporas se caracteriza por la producción de proteínas insecticidas, conocidas como delta-endotoxinas. Estas proteínas exhiben toxicidad larvicida tras la ingestión por parte de las larvas de insectos susceptibles (Aronson, 1993). Los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* se componen a partir de una mezcla de esporas y cristales producida fácilmente mediante fermentación líquida en un sistema aireado. Gran cantidad de esporas y cristales pueden ser producidas mediante fermentación con una alta actividad insecticida, aspecto indispensable para las aplicaciones prácticas de los insecticidas a base de *B. thuringiensis* (Pearson y Ward, 1988). Una vez seleccionados y caracterizados cada uno de los ingredientes activo a emplearse en el desarrollo de los bioinsecticidas biorracionales se procedió a propagar masivamente a nivel reactor de 14 litros una cepa de *Bacillus thuringiensis*. Considerando que la cepa HD551 de *B. thuringiensis* es la que requiere menor cantidad de bioactivo para controlar a *Spodoptera exigua*, ésta fue seleccionada para propagar masivamente a nivel reactor. Tomando en cuenta tres procesos de propagación a nivel reactor se obtuvo que el rendimiento promedio de extracto de *B. thuringiensis* HD551 por litro de medio de cultivo fue de 27.75 gramos de biomasa húmeda y 12.01 gramos de extracto seco (Tabla 8). Los parámetros de fermentación empleados en la propagación masiva en un medio a base de melaza y harina de soya fueron una fuente de inóculo del 2%, una aireación de 1 vvm, 250 r.p.m. de agitación, un pH de incubación de 7.2-7.6, una temperatura de 37°C, donde al cabo de 48 horas se obtuvo

un 80% de células vegetativas en proceso de esporulación, tiempo en el cual el proceso fue finalizado. Rodríguez *et al.* (1993) mencionan haber tenido una productividad final de 13.4 gr/L de un extracto de la cepa HD73 de *Bacillus thuringiensis* generado en un cultivo estacionario o Batch de 25 horas en un medio de cultivo simple, cepa cuya CL_{50} de $166\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *Manduca sexta*.

18.4. Bioensayo de Preferencia Alimenticia.

Una vez La tecnología de microencapsulación es una técnica que ha sido empleada ampliamente en la industria de los plaguicidas químicos es potencialmente útil para proteger los agentes entomopatógenos como *Bacillus thuringiensis* Berliner, los virus de la polihedrosis nuclear (NPV) y microsporidios (Ignoffo y Batzer, 1973; Dunkle y Shasha, 1988, Shahidi y Han, 1993). Diversos trabajos han comprobado que la eficiencia de entomopatógenos que actúan por ingestión puede ser mejorada mediante el uso de agentes microencapsulantes combinados con aditivos fagoestimulantes con la finalidad de aumentar y asegurar el consumo del agente patógeno, lo cual repercutiría en incrementar la patogénesis y mejorar el control de plagas inclusive disminuyendo la cantidad de bioactivos (Farrar y Ridgway, 1994). Debido a que la mayoría de los entomopatógenos son susceptibles a la rápida degradación ambiental causada por condiciones ambientales adversas de la naturaleza, tal como la exposición a la radiación ultravioleta, la desecación y la precipitación, estos factores limitan seriamente el uso práctico de los bioinsecticidas en el control de plagas, sin embargo, la microencapsulación se ha utilizado para mejorar algunas características de los entomopatógenos e incrementar el plazo de protección en el medio ambiente (Ignoffo *et al.*, 1976; Dunkle y Shasha, 1998; Leong *et al.*, 1980; McGuire y Shasha, 1990a, b).

Además, el uso de aditivos fagoestimulante dentro de los microencapsulados puede reducir la cantidad bioactivo para controlar un insecto plaga y reducir el daño causado a las plantas mediante el cese de la alimentación. (Bartlet, *et al.* 1990; Brar 2006; Rosas-García, 2008).

La compañía National Cash Register fue la primera en realizar este tipo de investigación durante los años 1930 y la microencapsulación se llevó a cabo comercialmente por primera vez en 1954 (Shahidi, 1993) y se puso a prueba contra el taladro del maíz europeo *Ostrinia nubilalis* (Earles y Jackson 1966). Morales-Ramos *et al.* (1998) diseñó algunas formulaciones de bioinsecticidas que utilizan métodos físicos para mejorar la protección de agentes patógenos y la eficiencia. Estudios recientes han indicado que el efecto de fagoestimulación eficientiza el control de varias especies de plagas tales como *Trichoplusia ni*, *Diatraea saccharalis*, *Ostrinia nubilalis* y *S. frugiperda*, y han demostrado que la pectina, el almidón de maíz y la gelatina tienen un excelente efecto fagoestimulante y de microencapsulación de entomopatógenos (Dunkle y Shasha 1988, Tamez-Guerra *et al.*, 1996; Morales-Ramos *et al.*, 2000, Rosas-García *et al.* 2004, Rosas-García, 2006).

Basados en estos estudios y una vez seleccionados, caracterizados toxicológicamente y realizada la propagación masivamente de los agentes entomopatógenos con potencial para ser utilizados en el control de *Spodoptera exigua*, se desarrollaron diversos soportes basado en la tecnología de microencapsulación. Estos soportes serán empleados en el desarrollo de formulaciones biorracionales. Los soportes de formulación fueron elaborados empleando 3 matrices biopoliméricas y 5 aditivos fagoestimulantes. Un total de 18 soportes fueron diseñados a partir de la combinación de una matriz polimérica sola o en combinación de un aditivo fagoestimulante. Los componentes utilizados en el

diseño de los soportes de formulación fueron la pectina, la grenetina y la fécula de maíz, como matrices microencapsulantes, mientras que un polvo fino de panoja de maíz, alfalfa, follaje de sorgo, repollo y de olote fresco deshidratado fueron utilizados como aditivos fagoestimulantes (Tabla 2). Un total de 18 soportes fueron desarrollados, de los cuales se seleccionaron aquellos que mostraron ocasionar el más alto nivel fagoestimulante, contrastando el nivel de preferencia contra pequeños trozos de hoja de repollo. El efecto fagoestimulante fue evaluado mediante la técnica de doble alternativa de Dulmage descrita en 1970. Los soportes mayormente aceptados fueron aquellos conformados por las mezclas de grenetina- repollo y grenetina panoja presentando una media de atracción de 5.47 ± 2.43 y 5.40 ± 1.84 larvas respectivamente (Tabla 9).

Una vez evaluado el nivel de preferencia alimenticia de los 19 tratamientos evaluados, en la gráfica no. 3 se puede apreciar que el biopolímero grenetina es el mejor agente de microencapsulante con respecto a la comparación realizada con la pectina y el almidón de maíz ($F= 98.394$, g.l.= 3, $P<0.01$) atrayendo 2.58 ± 1.91 larvas. Además, se puede apreciar que la hoja de repollo deshidratada y la espiga de maíz son excelentes aditivos fagoestimulantes ($F= 27.35$, g.l.= 5, $P<0.01$) presentando como medias de atracción 4.26 ± 2.13 y 3.71 ± 2.24 larvas, respectivamente (Tabla 13). Otro aspecto importante que se puede percibir es que cuando la grenetina se mezcla con el repollo o la espiga de maíz, el efecto fagoestimulante se potencia al combinarlos, incrementándose el nivel de preferencia. Este efecto potenciado ha sido demostrado por Rosas-García and De Luna-Santillana (2006), que describen que la combinación correcta de ingredientes incrementa el efecto fagoestimulante en comparación con el que presenta cada uno de los componentes por separado.

Finalmente, se comprueba el efecto del nivel de preferencia de los soportes cuando presentan o carecen de aditivos fagoestimulantes, encontrado que los soportes más aceptados son aquellos que presentan aditivos, compartiendo el mismo nivel de aceptación que los trozos de repollo control ($F= 76.76$, $g.l.=2$, $P<0.01$), mientras que los soportes que carecen de fagoestimulantes quedan en segundo lugar de preferencia, presentando medias de atracción de 3.46 ± 2.19 , 3.44 ± 1.85 y 1.75 ± 1.56 ,larvas respectivamente (Tabla No.10).

18.5. Formulación de Bioactivos.

Una vez seleccionados todos los componentes de las formulaciones, se diseñaron 8 productos diferentes a partir de las soportes gelatina-panoja y gelatina-repollo, combinado con los bioactivos *B. thuringiensis* HD551, extracto de neem y la combinación *B.t.* HD551/neem. Las formulaciones fueron desarrolladas siguiendo la metodología descrita por De Luna Santillana (1988), donde las formulaciones asperjables se constituían de un 2% del polímero encapsulante, 4% de aditivos, y un 7% del ingrediente activo. En el presente trabajo se desarrollaron dos formulaciones asperjables constituidas a partir de la mezcla de *B.t.* y neem, donde los ingredientes activos se emplearon al 7 y 2%, respectivamente. La concentración de los bioactivos fue seleccionada considerando los reportes de De Luna-Santillana (1998), Greenberg (2005) y Rosas-García (2006). Para desarrollar los formulados asperjables se estandarizó el proceso de secado por aspersión con la finalidad de microencapsular los bioactivos. Las condiciones operacionales de secado se ajustaron considerando las reportadas anteriormente por De Luna-Santillana (1998), con la finalidad de lograr un buen secado empleando un secador por aspersión APEX® modelo SSE68. El secado por aspersión es un proceso ampliamente utilizado para llevar a cabo la

microencapsulación de alimentos y otros agentes químicos, así como también para incrementar la efectividad de fármacos y bioinsecticidas. En un estudio realizado por Tamez Guerra *et al.*, (1999), se empleó la técnica de secado por aspersión con la finalidad de microencapsular la cepa C9 de *B. thuringiensis* en un soporte conformado por la mezcla de almidón de maíz y harina de maíz nixtamalizado, logrando mantener la viabilidad y eficiencia de la cepa durante dos años, al evaluar las formulaciones contra larvas de *Trichoplusia ni* y *Epilachna varivestis*. Años más tarde, Rosas-García (2006) desarrolló formulaciones asperjables a partir de la mezcla de un almidón de maíz modificado (Capsul®), grenetina bovina y polvo deshidratado de bagazo de caña de azúcar para microencapsular la cepa GM34 de *B. thuringiensis* a una concentración del 7%, producto que produjo una mortalidad del 97.3% contra larvas de 2d de *Diatraea saccharalis*. Este trabajo fue el primer reporte donde se emplea la grenetina y el almidón para desarrollar formulaciones asperjables logrando obtener una toxicidad elevada.

Las formulaciones fueron elaboradas en un secador por aspersión marca APEX modelo SSE68 de la Unidad de Investigación y desarrollo de alimentos (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz. Ajustadas las condiciones operacionales descritas por De Luna-Santillana (2008), donde el cambio consistió en disminuir el flujo de alimentación de las soluciones de 8 ml/minuto a 6 ml/min. De manera general, el proceso de secado por aspersión resultó ser efectivo en el proceso de microencapsulación, lográndose obtener rendimientos de recuperación de alrededor del 87.2 a 95.31 % de los sólidos que conformaban las formulaciones, sólidos que poseían máximo 3.5% de humedad relativa.

18.6. Evaluación de los Formulados a Nivel de Laboratorio.

Con respecto a la evaluación a nivel de laboratorio de los ocho formulados asperjables desarrollados, la efectividad de estos fue contrastada con respecto a la efectividad que presentaron 3 formulaciones comerciales, dos cuyo ingrediente activo es *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki de nombre comercial Thuricide HPC® y Dipel Dust ®, y una tercera formulación cuyo ingrediente activo es a partir de neem de nombre comercial Triple Action PLUS®. La formulación Thuricide HPC® es una formulación asperjable a partir de la cepa SA-12 de *B. thuringiensis* la cual contiene una mezcla de esporas y cristales al 15%. Con respecto a la formulación Dipel Dust ® cabe destacar que esta formulación es un talco para espolvorear cuyo ingrediente activo es la cepa ABTS-351 de *B. thuringiensis* var. kurstaki cuyo ingrediente activo consiste de una mezcla de esporas y toxinas al 0.064%. La última formulación comercial evaluada de nombre Triple Action PLUS® es líquido emulsionable cuyo ingrediente activo es un extracto clarificado de aceite de neem al 70%. Las tres formulaciones comerciales fueron aplicadas siguiendo las instrucciones de la casa comercial y fueron evaluadas tomando los mismos parámetros evaluados para las formulaciones desarrolladas. Los bioensayos de laboratorio fueron desarrollados empleando discos de repollo tratados con los ocho tratamientos a evaluar, 3 controles comerciales positivos y un control negativo (sin tratar). Doce tratamientos fueron evaluados a nivel laboratorio y la mortalidad fue determinada a las 24 horas y 7 días post-tratamiento. De acuerdo a los resultados del ensayo de toxicidad, se encontró una variación fuerte con respecto a la mortalidad generada por los tratamientos, donde se percibe claramente que los tratamientos asperjables que contienen a *Bacillus thuringiensis* como ingrediente activo originaron la más alta mortalidad a las 24 horas post-tratamiento, y donde los

desarrollados originaron una mortalidad más alta que la formulación comercial. Las formulaciones Gpa-*Bt* y Gre-*Bt* generaron una mortalidad del 60 y 59% a las 24 horas respectivamente, mortalidad más alta que la formulación asperjable comercial Thuricide HPC® (53%). Cuatro fueron los tratamientos que estadísticamente mostraron la mortalidad más alta, los tres tratamientos anteriormente mencionados y el conformado por Gpa-*BtNm* el cual provoca una mortalidad (56%) superior al Thuricide HPC®. En este primer grupo de tratamientos se puede observar además que cuando la mezcla de *Btm* esta encapsulado con el soporte más aceptado, este genera una mayor mortalidad. En segundo orden de efectividad se encuentran el tratamiento Dipel Dust®, Gpa-Nm y Gre-*BtNm*, lo que nos reafirma que las formulaciones a partir de *B. thuringiensis* son las más efectivas aun aplicándose en forma de talco y, además, se logra percibir que el neem como bioactivo de más baja toxicidad logra ser más efectivo cuando se encapsula con el soporte con mayor interactividad como lo muestra el tratamiento Gpa-Nm. Finalmente, se aprecia que el neem es el bioactivo que menor efectividad presenta contra el insecto, lo cual se percibe claramente con el resultado presentado por el producto comercial, sin embargo, cuando este bioactivo se aplica con un soporte que induzca mayor alimentación, la efectividad se mejora, posiblemente debido a un nivel mayor de intoxicación como consecuencia de la alimentación (Tabla No. 16). Este hallazgo una vez más comprueba que el éxito de una formulación radica en la combinación correcta de ingredientes de tal manera que el ingrediente activo con los demás componentes de la formulación efficientize la acción del bioactivo, como lo describe de Rosas-García (2006). Los tratamiento agrupados en los primeros dos niveles de significancia o con la más alta toxicidad muestran un nivel de control eficiente a las 24 horas y una efectividad alta a los 7 días post-tratamiento, este hallazgo nos hace

proponer que las formulaciones elaboradas a partir de la mezcla de bioactivos posiblemente tengan el mismo nivel de efectividad al bajar la cantidad de bioactivo microbiano de un 7% a una concentración menor sin que ello afecte el efecto de protección.

Posterior a ver el efecto global de los doce tratamientos evaluados, se procedió a analizar el efecto del tipo de ingrediente activo utilizado. Para ello los tratamientos fueron reagrupados en base al tipo de bioactivo presente, como se muestra en la Tabla No. 17. Al analizar estadísticamente la relación existente entre las variables número de larvas muertas y el tipo de bioactivo formulado pudimos apreciar que existe una diferencia fuerte entre los ocho tratamientos evaluados, creando cinco niveles de significancia claramente definidos. Con respecto a los resultados obtenidos se percibe que los tratamientos más efectivos son los tratamientos a base de *Bacillus thuringiensis* aplicados de manera asperjable como lo son el tratamiento G-Bt y Thuricide HPC® y, además, que la formulación desarrollada y diseñada de manera específica contra *Spodoptera exigua* es más efectiva que la formulación comercial. En segundo de orden de efectividad lo comparten el tratamiento Thuricide HPC® y las formulaciones conformadas por la mezcla de bioactivos G-BtNm. En tercer orden de efectividad lo presentan las formulaciones G-BtNm, Dipel Dust® y G-Nm, originando una mortalidad de 35, 29 y 24 % respectivamente a las 24 horas, mortalidad que se incrementa a 84, 76 y 60% de mortalidad a los 7 días. Este último grupo de tratamientos evidencia que el bioactivo más efectivo para controlar el efecto dañino de *Spodoptera exigua* es *Bacillus thuringiensis* y, además, demuestra que la efectividad del neem como bioactivo se ve mejorado cuando es utilizado en combinación con *Bacillus thuringiensis*. Igualmente, cuando es combinado con un

soporte de formulación específico el efecto se visualiza al mostrar mejor efectividad que el producto comercial Triple Action PLUS® a base de neem.

18.7. Evaluación de los Formulados a Nivel de Invernadero.

La última etapa del proyecto consistió en evaluar la efectividad de los formulados desarrollados a nivel invernadero y comprobar el efecto biológico obtenido a nivel de laboratorio en un microambiente *in vivo* bajo condiciones controladas. El ensayo a nivel invernadero fue desarrollado sobre plantas de algodón *Gossypium hirsutum* var. deltapine. Los tratamientos evaluados fueron los doce tratamientos evaluados a nivel laboratorio, constituidos por 8 formulaciones desarrolladas (*Gpa-Bco*, *Gpa-Bt*, *Gpa-BtNm*, *Gpa-Nm*, *Gre-Bco*, *Gre-Bt*, *Gre-BtNm* y *Gre-Nm*), 3 formulaciones comerciales (controles positivos: Thuricide HPC®, Dipel Dust® y Triple Action Plus®) y un control negativo (sin tratamiento alguno).

Una vez desarrollado y terminado el bioensayo a nivel de invernadero, se registraron 4 parámetros de daño con la finalidad de calcular evaluaron cuatro estimadores de protección. Los parámetros de daño registrados fueron el número de plantas totales y plantas afectadas para cada tratamiento, así como el número de hojas totales y afectadas. Los estimadores de protección calculados son el porcentaje de infestación y el porcentaje de intensidad, los cuales reflejan las plantas dañadas y las hojas dañadas del total evaluadas. Los datos registrados y calculados del nivel de protección generado por los diversos tratamientos se concentran en la Tabla no. 18, donde se puede apreciar que los tratamientos que mayor protección dieron fueron los tratamientos *Gpa-Bt*, *Gre-Bt*, *Gpa-BtNm* y Thuricide HPC®, resultados que se confirma con relación a los resultados obtenidos a nivel de laboratorio (Tabla No. 16).

El nivel de protección obtenida se evaluó estadísticamente analizando las variables número de hojas afectadas y el tipo de tratamiento. El resultado de este análisis nos asocia los doce tratamientos en grupos con el mismo nivel de significancia, donde los mejores tratamientos resultaron ser Gpa-Bt, Gre-Bt, Thuricide HPC ® y Gpa-BtNm afectando 1.53 ± 1.06 , 1.73 ± 0.88 , 2.47 ± 0.84 y 2.80 ± 1.47 hojas por tratamiento, lo que representa un 6%, 7%, 10% y 11% de daño respectivamente. Al igual que en la evaluación a nivel laboratorio, en la Tabla No. 19 se puede percibir de manera general que los tratamientos a base de *Bacillus thuringiensis* son más eficientes que el resto de las formulaciones e inclusive que las formulaciones desarrolladas son más efectivas que los productos comerciales. Este hecho comprueba nuevamente la importancia del diseño específico de una formulación dirigido hacia un insecto en particular.

Con relación al tipo de ingredientes activo presentes en las formulaciones, en la Tabla No. 20 se puede observar y confirmar el resultado a nivel de laboratorio. En la Tabla No. 17 también se confirma que los formulaciones que presentan *B. thuringiensis* son las más efectivas, pero además, se observa que en segundo orden de efectividad se encuentran las formulaciones a partir de la mezcla de BtNm. Además, también se aprecia claramente que el neem como bioactivo es más eficiente que la formulación comercial cuando este es encapsulado en un soporte fagoestimulante.

Otro efecto que también se contrastó fue evaluar el efecto de las formulaciones constituidas a partir de BtNm contra aquellas que presentan solamente *Bacillus thuringiensis*, observándose que aquellas formulaciones que presentan *B. thuringiensis* como bioactivo son los que mayor protección generaron a excepción del tratamiento Dipel Dust® y Gre-BtNm los cuales generan un nivel de daño del

17% y 26%, respectivamente. Además, después del análisis estadístico se aprecia que los diez tratamientos evaluados quedan agrupados en 6 niveles de significancia con relación al nivel de daño, y donde tratamientos Dipel Dust® y Gre-*BtNm* quedan en el segundo y tercer grupo (Tabla No. 21).

Además, se analizó el nivel de daño que presentan los tratamientos constituidos a partir de neem y de la mezcla *BtNm*. Los resultados obtenidos nos muestran que todos los tratamientos que poseen neem como ingrediente activo generan estadísticamente tres niveles de protección, donde el tratamiento conformado por Gpa-*BtNm* presenta el menor daño. Igualmente, también se detecta que aunque los tratamientos desarrollados a partir de neem generan niveles de protección agrupados en diferentes niveles, estos resultaron ser más efectivos que el tratamiento control Triple Action PLUS®.

19. CONCLUSIONES

La importancia de desarrollar una formulación bioinsecticida radica principalmente en que este producto es capaz de controlar una población específica de insectos plaga, efecto que es logrado mediante el diseño de soportes de microencapsulación con acción fagoestimulante o atrayente, dependiendo del modo de acción del ingrediente activo. Otro aspecto positivo que se logra con el diseño de una formulación es eficientizar la acción de los ingredientes activo.

En el presente trabajo se obtuvieron formulaciones asperjables a partir de una mezcla de ingredientes activo a partir de un extracto de neem y de *Bacillus thuringiensis*.

Mediante el desarrollo del presente proyecto, las conclusiones principales de este trabajo fueron:

1. Mediante un ensayo preliminar de toxicidad se seleccionaron las cepas HD133 y HD551 de *Bacillus thuringiensis* y un extracto de neem como ingredientes potenciales para formularse para controlar poblaciones plaga de *Spodoptera exigua*, los cuales produjeron una mortalidad del 66.1, 63.9 y 23.6% de mortalidad respectivamente a la dosis de 50µg/ml.
2. Se observó un efecto biológico positivo del extracto de neem hacia *Spodoptera exigua* al disminuir significativamente el desarrollo del insecto.

3. Se determinó la concentración letal media para los extractos HD133, HD551 y neem mediante un análisis probit obteniéndose valores de 77,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 68.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 509.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente para cada uno de los extractos.
4. El tiempo letal medio para los extractos HD133, HD551 y neem fue de 5.9, 6.5 y 9.7 días, respectivamente para cada extracto.
5. Con relación al efecto positivo para considerarse el extracto de neem como ingrediente activo candidato, se percibió un cese del desarrollo larvario debido a un proceso intoxicación larvario.
6. Se diseñaron dos soportes de formulación los cuales presentan una elevada propiedad fagoestimulante, cuya constitución es a partir de una mezcla de gelatina-repollo y gelatina-panoja, los cuales atrajeron en promedio 5.47 ± 2.43 y 5.40 ± 1.84 larvas, respectivamente.
7. Se comprueba que el uso de aditivos en los soportes de formulación elaborados eleva al doble el nivel de fagoestimulación, observándose que aquellos soportes que presentan aditivos fagoestimulantes son mayormente preferidos en contraste con los que carecen de ellos, atrayendo 3.46 ± 2.19 y 1.75 ± 1.56 larvas, respectivamente.
8. En relación al uso de polímeros microencapsulantes y aditivos fagoestimulantes, se comprobó que la grenetina, el polvo de repollo y panoja de maíz son los componentes mayormente aceptados, atrayendo 3.44 ± 1.84 , 4.26 ± 2.13 y 3.71 ± 2.24 larvas, respectivamente.

9. Además se comprobó que cuando la grenetina se combina con los aditivos, el nivel de preferencia de la grenetina se incrementa con relación a la preferencia originada por los trozos de repollo control.
10. Se observó que el proceso de secado por aspersion es una buena técnica para microencapsular bioinsecticidas a partir de un extracto de *Bacillus thuringiensis* y de neem, manteniendo la actividad biológica y, además, con porcentajes de recuperación del 87% al 94% de los sólidos que conforman la formulación
11. Con relación a los resultados de toxicidad de los formulados a nivel laboratorio se comprueba que los tratamientos que originaron la más alta toxicidad están conformados por los tratamientos Gpa- *Bt*, Gre- *Bt*, Gpa- *BtNm* y Thuricide HPC®, generando una mortalidad de 12.00 ± 1.41 , 11.80 ± 1.30 , 11.20 ± 2.68 y 10.60 ± 0.55 larvas, respectivamente.
12. Al analizar el efecto del tipo de ingrediente activo utilizado con relación a la mortalidad generada, se comprueba que los bioactivos G-*Bt* y Thuricide HPC® ocasionan la más alta toxicidad originando una mortalidad de 11.90 ± 1.29 y 10.60 ± 0.55 larvas, respectivamente.
13. Con relación a los resultados de toxicidad de los formulados a nivel de invernadero en relación a los parámetros de daño registrado y los porcentajes de infestación e intensidad se comprueba que los tratamientos que mayor protección generaron fue dado por los tratamientos conformadas por Gpa-*Bt*, Gre-*Bt*, Gpa-*BtNm* y Thuricide HPC®.
14. Del total de los 12 tratamientos evaluados, al analizar las numero de hojas dañadas de cada tratamiento se comprueba que los tratamientos Gpa-*Bt*,

Gre-*Bt*, Thuricide HPC ® y Gpa-*BtNm* generaron una protección elevada, generándose 1.53 ± 1.06 , 1.73 ± 0.88 , 2.47 ± 0.84 y 2.80 ± 1.47 hojas afectadas, respectivamente.

15. Por otro lado, al analizar el efecto del tipo de ingrediente activo con relación al número de hojas afectadas de cada tratamiento, al igual que el resultado de laboratorio, se comprueba que el los formulados a base de *Bacillus thuringiensis* aplicado de manera asperjable son los más efectivos, de tal manera que los tratamientos G-*Bt* y Thuricide HPC® produjeron un nivel de daño de 1.63 ± 0.96 y $2.47.63 \pm 0.83$ hojas afectadas.

16. A nivel invernadero se comprueba que la efectividad de la mezcla de bioactivos *B. thuringiensis*-neem origina una protección un nivel inferior al generado por los productos que contienen solamente por *Bacillus thuringiensis*. Además, es posible comprobar que cuando se desarrollan formulados a partir de la mezcla de bioactivos *Bt*-neem y/o neem se genera un nivel de protección mayor al que presenta la formulación comercial a base de neem.

20. LITERATURA CITADA

1. Adamczyk JJ, Greenberg S, Armstrong JS, Mullins WJ, Braxton LB, Lassiter RB, Siebert MW. 2008. Evaluations of Bollgard, Bollgard II, and Widestrike technologies against beet and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*. 91(4):531-536.
2. Adamczyk JJ, Williams MR, Reed JT, Hubbard DW, Hardee DD. 2003. Spatial and Temporal occurrence of Beet Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) moths in Mississippi. *Florida Entomologist*. 86(3):229-232.
3. Adams LF, Mathews PO, Petersen A. 1994. Elucidation of the mechanism of CryIIIa overproduction in a mutagenized strain of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Molecular Microbiology*. 14:381- 389.
4. Ahmedani MS, Haque MI, Afzal SN, Iqbal U, Naz S. 2008. Scope of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an alternative to methyl bromide against *Tribolium castaneum* adults. *Pakistan Journal of Botany*. 40(5):2149-2156.
5. Ahmed S, Grainge M. 1986. Potential of the neem tree (*Azadirachta indica*) for pest control and rural development. *Economic Botany*. 40(2):201-209.
6. Ahmed S, Bamefleh S, Munshi M. 1989. Cultivation of neem (*Azadirachta indica*, Meliaceae) in Saudi Arabia. *Economic Botany*. 41(1):201-209.
7. Akhtar M. 2000. Nematicidal potential of the Neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). *Integrated Pest Management Reviews*. 5:57-66.

8. Angus TA. 1954. A Bacterial Toxin paralyzing Silkworm larvae. *Nature*. 173:545-546.
9. Anónimo, 1988. *Azadirachta indica* A. de Jussieu. Bois et Forêts des Tropiques. 217: 33-47.
10. Aronson AI, Beckman N, Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and the related insect pathogens. *Microbiology Review*. 50:1-24.
11. Aronson, AI. 1993. The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post exponential survival. *Molecular Microbiology*. 7:489-496
12. Avilés GM. 1997. Estrategias de Manejo Integrado de Plagas en Chile Bell. In: Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas A.C. (eds). Memoria del VII Congreso Nacional de Horticultura. Culiacán, Sinaloa, México, Marzo 16-20.
13. Avisar D, Eilenberg H, Keller M, Reznik N Segal M. 2009. The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science*. 176(3): 315-324.
14. Bartlett RJ, McGuire MR, Black DA. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch- based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Entomology*. 19:182-189.
15. Beeson CFC. 1953. The ecology and control of the forest insects of India and the neighboring countries. 2a Ed. New Delhi: Government of India Press. 767p.
16. Belda J, Justicia L, Pascual F, Cabello T. 1994. Distribución espacial de *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivo de pimiento en invernadero. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*. 20:287-301

17. Benthall AP 1933. The trees of Calcutta and its neighborhood. Calcutta: Thacker Spink & Co. 513 p.
18. Betancourt A. 1972. Paraíso de la India (*Azadirachta indica* Juss). Desarrollo alcanzado en Cuba por dicha especie. Revista Baracoa. 2(4):17- 23
19. Bohorova N. Cabrera M. Abarca C. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI- type insecticidal toxins. Journal of Economic Entomology. 90(2):412- 415.
20. Brown ES, Dewhurst CF. 1975. The genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Africa and the Near East. Bulletin of Entomology Research. 65:221-262.
21. Bulla LA. Kramer KJ. Cox DJ. 1985. Insecticidal Bacilli. In: The molecular biology of the bacilli, Bulla LA (eds). Academic Press: New York, pp185-209.
22. Caballero P, Ferré J. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. In: Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas, Caballero P and Iriarte J (eds). Phytoma-Universidad de Navarra. S. L.: Valencia, España, pp. 9-44.
23. Cabello TS, Gómez V, Abad MM, Belda JJ. 1990. Problemática fitosanitaria en cultivos hortícolas intensivos de Almería. Agrícola Vergel. 104:640-647.
24. Cannon RJC. 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. Biological Reviews. 71:561- 636.
25. Carpinella MC, Defago MT, Valladares G, Palacios SM 2003. Antifeedant and insecticide properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:369-374

26. Carpinella MC, Ferrayoli C, Valladares G, Defago M, Palacios SM. 2002. Potent Limonoid Insect Antifeedant from *Melia azedarach*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 66:1731-1736.
27. Casanova H, Ortiz C, Peláez C, Vallejo A, Moreno ME, Acevedo M. 2002. Insecticide Formulations Based on Nicotine Oleate Stabilized by Sodium Caseinate, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50(22):6389-6394.
28. Cerón JA. 2001. Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis*. In: Bioinsecticidas: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas, Caballero P and Iriarte J (eds). Phytoma- Universidad de Navarra. S. L.: Valencia, España, pp. 153- 168
29. Céspedes CL, Calderón JS, Lina L, Aranda E. 2000. Growth effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela spp.* (Meliaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48:1903-1908.
30. Charleston DS, Kfir R, Dicke M, Vet LEM. 2006. Impact of botanical extracts derives from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xylostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings. Biological Control. 39:105-114.
31. Charleston DS, Kfir R, Dicke M, Vet LEM. 2005. Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. Biological Control. 33: 131-142.
32. Chaturvedi AN. 1985. Firewood farming on degraded lands in the Gangetic Plain. U.P. Forest Bulletin. 50:1-52.

33. Ciesla WM. 1993. What is happening to the neem in the Sahel? *Unasyuva*. 44:172, 45-51.
34. Cisneros J, Perez JA, Penagos DI, Ruiz J, Goulson D, Caballero P, Cave RD, Williams T. 2002. Formulation of a Nucleopolyhedrovirus with Boric Acid for Control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize. *Biological Control*. 23:87-95.
35. Couch TL. 1978. Formulations of Microbial Insecticides: Conventional Formulations; Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America 10(5):3-10.
36. Coventry E, Allan EJ. 2001. Microbial and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: New Data on Antimicrobial Activity. *Phytoparasitica* 29(5):441-450.
37. Crickmore N, Bone EJ, Williams JA. 1995. Contribution of the individual components of the δ - endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*. 131:249-254.
38. De Bach VP. 1964. *Biological Control of Insects Pests and Weeds*. Chapman and Hall: London, pp. 844.
39. De Bach VP. 1968. Éxitos, tendencias y posibilidades futuras. In: *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*, De Bach (ed). CECSA: México, pp. 789-831.
40. De Bach VP, Rosen D. 1991. *Biological control by natural enemies*. Cambridge University Press: New York, pp. 31-34.

41. De-Barjac H, Bonnefoi A. 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus thuringiensis* du Type. *BioControl*. 7(1):5-31.
42. De-Faria MR. and Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43: 237-256.
43. De Luna-Santillana, EJ. 1998. Formulaciones Asperjables de *Bacillus thuringiensis* a base de pectina y gelatina, y evaluación tóxica contra *Trichoplusia ni*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.
44. De Luna-Santillana, EJ. 2002. Desarrollo de Formulaciones de *Bacillus thuringiensis* a partir de gelatina y/o pectina y evaluación tóxica contra el barrenador del tallo de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* fabricius. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
45. De-Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. 2003. Structure, diversity; and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetic*. 37:409-433.
46. Dietz FJ, Van der Ploeg F, Van der Straaten J. 1991. *Environmental Policy and the Economy*. Elsevier, Holanda, pp. 12.
47. Dixon R. 2001 Progress Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-347.
48. Duke SO. 1990. Natural pesticides from plants. In: *Advances in new crops*, Janick J and Simon JE (eds.). Timber Press: Portland, Ore, USA, pp. 511-517.

49. Dulmage HT. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. Journal of Invertebrate Pathology. 15(2):232-239.
50. Dunkle RL, Shasha BS. 1988. Starch- encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environmental Entomology. 17:120-126.
51. Duso C, Malagnini V, Pozzebon A, Castagnoli M, Liguoni M, Simoni S. 2008. Comparative toxicity of botanical and reduced-risk insecticides to Mediterranean populations of *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari Tetranychidae, Phytoseiidae). Biological Control. 47:16-21.
52. Farrar RR, Ridway RL. 1994. Comparative studies of the effects of nutrient-based phago-stimulants on six lepidopterous insect pests. Journal of Economical Entomology. 87:44-52.
53. Frankenhuyzen KV. 1993. The Challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs, S (eds). John Wiley & Sons, Inc.: New York, pp. 1- 23.
54. French RA. 1969. Migration of *Laphygma exigua* Hubner (Lepidoptera: Nuctidae) to British Isles in relation to large-scale weather systems. J. Anim. Ecol. 38: 199-210
55. Gaertner FH, Quick TC, Thompson MA. 1993. CellCap: An encapsulation system for insecticidal biotoxins proteins In: Advanced Engineering Pesticides, Kim L. (ed). Marcel Dekker Inc.: New York, pp. 73- 83.
56. Galán-Wong LJ. 1993. Selección de cepas nativas y extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hubne) y *Heliothis virescens* (Fabricius). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma

- de Nuevo León Monterrey.
57. Gamble JS. 1922. A manual of Indian timbers. Sampson Low, Marston and Co.: London, pp 866-889
 58. Gelernter W, Schawab GE. 1993. Transgenic Bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery Systems. In: *Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs, S (eds). John Wiley & Sons, Inc.: New York, pp. 89-104
 59. Gill SS, Cowels EA, Pietrantonio PV. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 37:615- 636.
 60. Gillespie RL, McGuire MR, Shasha BS. 1994. Palatability of the Flour Granular Formulations to European Corner Borer Larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*. 37:452- 457.
 61. Goldberg LJ, Margalit J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*. 37(3):355-358.
 62. Gordon RE, Haynes WC, Pang CH. 1973. The genus *Bacillus*. *Agricultural handbook No. 427*. U.S. Department of Agriculture, Washington, pp. 109-126.
 63. Greenberg Showler AT, Lui TX. 2005. Effects of Neem-based insecticides on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*. 12:17-23.
 64. Gressel, J. 2010. Needs for and environmental risks from transgenic crops in the developing world. *New Biotechnology*. 27(5):522-527.
 65. Hannay CL. 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Spore-forming Bacteria.

Nature. 172:1004.

66. Hannay CL, Fitz-James P. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Canadian Journal of Microbiology. 1(8):694–710
67. Hall FR, Menn JJ. 1999. Methods in Biotechnology. In Biopesticides: Use and delivery. Humana Press: Totowa, New Jersey, USA, pp. 233–270.
68. Lee SM, Klocke JA, Barnby MA, Yamasaki RB, Balandrin MF. 1991. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae). In: Naturally occurring pest bioregulators, Heiden P. (ed). ACS Symposium Series-American Chemical Society: Washington, pp. 293-304
69. Hofte H, Whitely HR. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiology Reviews. 53(2):242- 255.
70. Hokkanen HMT. 1985. Success in classical biological control. CRC Critical Review of Plant Science. 3:35-72.
71. Huffaker CB. 1985. Biological control in integrated pest management: an entomological perspective. In: Biological control in agriculture IPM systems, Hoy MA and Herzog DC (eds). Academic Press: Nueva York, pp. 13-23.
72. Ignoffo CM, Batzer OF. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. J. of Invertebrate Pathology 64:850-853.
73. Ignoffo CM, Puttler B, Hostetter DL, Dickerson WA. 1976. Suceptibility of cabbage looper, *Trichoplusia ni* and the velver bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, to several isolates of the enthomopatogenic fungus *Nomurea rileyi*. Journal of Invertebrat Pathology. 28: 259.262.
74. Immaraju JA. 1998. The commercial use of Azadirachtin and its integration into viable pest control programs. Pesticide Science. 54:285-289.

75. Jacobson M. 1989. Botanical Pesticides: Past, present and future. In: Insecticides of Plant Origin. Arnason JT, Philogene BJR, Morand P.(eds). Proceeding of the American Chemical Society: Washington, D.C. 1989, pp. 1-10
76. Javed N, Gowen SR, Inam-ul-Haq M, Addullah K, Shashina F. 2007. Systemic and persistent effect of Neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. Crop Protection. 26:911-916.
77. Javed N, Gowen SR, El-Hassan SA, Inam-ul-Haq M, Shashina F, Pembroke B. 2008. Efficacy of Neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. Crop Protection. 27: 36-43.
78. Jefferies PR, Casida JE. 1993. Ryanoid Chemistry and Action. In: Natural and Engineered Pest Management Agents, Hedin PA, Menn JJ, Hollingworth RM (eds). ACS Symposium Series-American Chemical Society: Washington, pp.130-14
79. Jotwani MG, Srivastava KP. 1981. Neem insecticide of the future. I. As protectant against stored grain pests. Pesticides. 15(10):19-23.
80. Kausik B, Ishita Ch, Ranajit KB, Uday B. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science. 82(11):1336-1345
81. Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhous WK, Theoharides AD, Dobek AS. 1984. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the Unites States. J. Nat. Prod. 47:15-717.

82. Krieg A, Huger AM, Lagenbruch GA and Schnetter W. 1983. *Bacillus var. tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. Journal of Applied Entomology. 96(5):500-508.
83. Lambert B, Peteroen M. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. Bioscience. 42:112-122.
84. Lasa R, Ruiz-Portero C, Alcázar MD, Belda JE, Caballero P, Williams T. 2007. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as biological insecticide in greenhouses in southern Spain. Biological Control. 40:89-96.
85. Leong KL, Cano RJ, Kubinski AM. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. Environmental Entomology. 9(5):593-599.
86. Lewis WH, Elvin-Lewis MPF. 1983. Neem (*Azadirachta indica*) cultivated in Haiti. Economic Botany. 37(1):69-70.
87. Liang GM, Chen W, Liu TX. 2003. Effects of three Neem-based insecticides on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Crop Protection (22): 333-340.
88. Little EL, Woodbury RO, Wadsworth FH. 1974. Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. USDA Agricultural Handbook 449: Washington, DC, pp. 1024.
89. McGuire MR, Shasha BS. 1990a. Sprayable Self- Encapsulating Starch Formulations for *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 83(5):1813-1817.
90. McGuire MR.; Shasha, B.S.; Leslie, L.C.; Bartel, R.J.; Kinney, K. 1990b. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis*

- against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology. 83(6):2207- 2210.
91. McGuire MR, Shasha BS. 1992a. Adherent starch granules for encapsulation of insect control agents. Journal of Economic Entomology. 85(4):1425- 1433.
92. McGuire MR, Shasha BS. 1992b. Starch matrices for slow release of pesticides. In: Pesticide Formulations and applications System, Bode LE and Chasin DG (eds). American Society for Testing and Materials: Ann Arbor, MI, USA, pp. 33-40.
93. McGuire MR, Shasha BS, Lewis LC. 1994. Residual activity of granular starch- encapsulated *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 87(3):631- 637.
94. Meadows MP. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the Environment: Ecology and Risk Assessment en *Bacillus thuringiensis*. In: *Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs, S (eds). John Wiley & Sons, Inc.: New York, pp. 193- 220
95. Montes-Molina JA, Luna-Guido ML, Espinoza-Paz N, Govaerts B, Gutierrez-Miceli FA, Dendooven L. 2008. Are extracts of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (L)) and *Gliricidia sepium* (Jacquin) an alternative to control pests on maize (*Zea mays* L.)?. Crop protection. 27:763- 774.
96. Morales-Ramos LH, McGuire MR, Galán-Wong LJ. 1998. Utilization of Several Biopolymers for Granular Formulations of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 91(5):1109- 1113.
97. Morales-Ramos LH, McGuire MR, Galán-Wong LJ, Castro RF. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus*

- thuringiensis*. Southwestern Entomologist. 25(1):59- 67.
98. Mordue AJ, Blackwell A. 1993. Azadirachtin: an Update. Journal of Insect Physiology. 39(11):903- 924
99. Nathan SS, Kalaivanic K, Chunga PG. 2005. The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). Pesticide Biochemistry and Physiology. 83(1): 46-57.
100. Nathan SS, Choi MY, Paik CH, Seo HY, Kim JD, Kang SM. 2007. The toxic effects of Neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (BPH) Homoptera Delphacidae). Chemosphere. 67:80-88.
101. Nathan SS. Kalaivanin K. 2005. Efficacy of nucleopolyhedrovirus and azadirachtin on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidade). Biological Control. 34:93-98.
102. Nathan SS. Kalaivanin K. 2006. Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Biological Control. 39:96-104.
103. National Research Council. 1992. Neem: A tree for solving global problems. National Academy Press: Washington, DC, pp. 39-59.
104. Okos MR, Narsimham G. 1990. Establishing the parameters for a Spray dryer. In Handbook of Food Engineering, Heldman DR, Lund DB (ed). Marcel Dekker Inc.: New York, pp.108- 112.
105. Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. 2009. Agroforestry Database: A tree reference and selection guide version 4.0 [Internet]. Disponible en el sitio de red:

http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Melia_azedarach.pdf.

[Revisado el 20 de enero del 2011 Internet].

106. Pascual-Villalobos MJ. 1996. Evaluación de la actividad insecticida de extractos vegetales de *Chrysanthemum coronarium*. Boletín de Sanidad Vegetal:Plagas. 22(2):411-420.
107. Pearson D and Ward O. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. israeliensis and development of media for production of the protein cristal endotoxin. Biotechnology Letters. 10: 451–456.
108. Radwanski SA, Wickens GE. 1981. Vegetative fallows and potential value of the neem tree (*Azadirachta indica*) in the Tropics. Economic Botany. 35(4):398-414.
109. Raghunath TAVS. 1979. Additional records of new insect pests in Andhra Pradesh. Current Research. 8(6):103-104.
110. Raghunath TAVS, Allam MA, Venkaiah K. 1982. Fire ant, (*Solenopsis* sp.) damaging neem (*Azadirachta indica* Juss.). Indian Forester. 108(5):375.
111. Rao PJ, Maresh Kumar K, Singh S, and Subrahmanyam S. 1999. Effect of *Artemisia annua* oil on development and reproduction of *Discercus koenigii* F. (Hem. Pyrrhocoridae). Journal of Applied Entomology. 5:315-318.
112. Roberts DW, Fuxa JR, Gaugler R. Goettel M, Jaques R, Maddox J. 1991. Use of pathogens in insect control. In: Handbook of Pest Management in Agriculture, Pimentel D. (ed): CRC Press, Boca Raton, Fl. E.U.A., pp. 243-278
113. Rodríguez del Bosque LA. 1991. Teoría y bases ecológicas del control biológico. In: Rodríguez del Bosque LA and Alatorre R. (eds). Memorias del

II Curso de Control Biológico, Sociedad Mexicana Control Biológico-UAAAN, Saltillo, Coahuila, México. Octubre 7-9.

114. Rosas-García NM., Arévalo-Niño K, Galán-Wong LJ, Morales-Ramos LH. 2004. Evaluation of feeding stimulants combined with polymers to develop formulations against *Diatraea saccharalis* (F). *Southwestern Entomologist*. 29: 153-158.
115. Rosas-García NM. 2006. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against sugarcane borer. *Pest Management Science*. 62: 855-861.
116. Rosas-García NM, De Luna-Santillana E.J. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Revisata de Contaminación Ambiental*. 22(3): 135-142.
117. Ruiu L, Satta A, Floris I. 2008. Effects of an azadirachtin- based formulation on the non-target muscoid fly parasitoid *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae); *Biological Control*. 47:66-70.
118. Salama HS, Morris ON. 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in Developing Countries. In: *Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs, S (eds). John Wiley & Sons, Inc.: New York, pp. 237- 253.
119. Rodriguez M, Razo E, Villafana J, de Urquijo E, de la Torre M. 1993. Development of a high production process for the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. In: *The Biopesticide Bacillus thuringiensis and its Applications in Developing Countries*, Salama HS, Morris ON, Rached E. (eds). Al-Ahram Commercial Press: Quailiub, Egypt, pp

120. Sawicka EM, Couch TL. 1983. Formulations of entomopathogens. In: Pesticides Formulations and Application System: Third Symposium. ASTM STP. Kaneko, TM. (ed) American Society for Testing and Materials (ed): Philadelphia, USA, pp. 5- 11.
121. Schmutterer H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Reviews of Entomology. 35:271-297.
122. Seljasen R, Meadow R. 2006. Effects of Neem on oviposition and egg and larval development of *Mamestra brassicae* L: Dose response, residual activity, repellent effect and systemic activity in cabbage plants. Crop Protection. 25:338-345.
123. Shahidi F, Qing-Han XL. 1993. Encapsulation of Food Ingredients; Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 33(6):501- 547.
124. Silva G, Lagunés A, Rodríguez JC, Rodríguez D. 2002. Insecticidas vegetales: Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Revista Manejo Integrado de Plagas. 66:4-12.
125. Summy KR, French JV. 1988. Biological control of agricultural pest: Concepts every producer should understand. Journal of Rio Grande Valley Horticultural Society. 41:119-133.
126. Suresh G, Gopalakrishnan G, Wesley SD, Pradeep N D, Malathi R, Rajan SS. 2002. Insect antifeedant activity of tetranortriterpenoids from the rutales. A perusal of structural relations. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:4484-4490.
127. Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, Skrzecz I, Lobo-de Souza M. 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. Biotechnology Advances 24:143-160.

128. Tabashnik BE. 1994. Evolution of the resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annual Reviews of Entomology. 39:47-49.
129. Tamez-Guerra P, García-Gutiérrez C, Medrano-Roldán H, Galán-Wong LJ, Sandoval-Coronado CF. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. Southwestern Entomologist. 24(1): 37- 48.
130. Tamez-Guerra P, McGuire MR, Medrano-Roldán H, Galán-Wong LJ, Shasha BS, Vega FE. 1996. Sprayable granulate formulations for *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology. 89: 1424-1430.
131. Taylor JE. 2006. Impact of *Spodoptera exigua*, Beet armyworm on Tomato. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Georgia.
132. Tewari DN. 1993. Neem Research at Indian Council for Forestry Research and Education (ICFRE). In: Genetic Improvement of Neem, Read MD and French JH (eds). Craftsman Press Ltd.: Bangkok, Tailandia, pp. 1-10.
133. Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK and Khanuja SPS. 2000. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. Journal of Economic Entomology. 93:43-47.
134. Tripathi AK, Prajapati V, Aggarwal KK and Kumar S. 2001. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology. 94:979-83.
135. Troup RS. 1981. The silviculture of Indian trees. Rev. Delhi Ed.: pp 311 p.
136. Uthamasamy S, Rao PVS, Mohanasundaram V and Subramaniam TR. 1973. A note on some new pests attacking the neem tree (*Azadirachta indica*) in Tamil Nadu. Science and Culture. 39:399-400.

137. Valladares G, Defagó MT, Palacios SM, Carpinella MC. 1997. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the Elm Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 90:747-750.
138. Van den Bosch R, Messenger PS, and Gutierrez AP. 1982. An introduction to biological control. Plenum Press: New York, USA, pp. uuuu
139. Van Driesche RG, Bellows TS. 1996. Biological Control. In: Parasitoids and predators of Arthropods and Molluscs, Van Driesche RG and Bellows TS (eds). Chapman & Hall: New York, pp. 37-65.

RESÚMEN BIOGRÁFICO

Erick de Jesús de Luna Santillana.

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Tesis: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE BIOINSECTICIDAS MICROENCAPSULADOS A PARTIR DE *Bacillus thuringiensis* Y NEEM PARA EL CONTROL DEL GUSANO SOLDADO *Spodoptera exigua* (Hübner).

Campo de estudio: Ciencias Agrícolas

FORMACIÓN ACADÉMICA

1. Licenciatura: Químico Bacteriólogo Parasitólogo.

Institución: Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)

Proyecto de Tesis: Formulaciones Asperjables de *Bacillus thuringiensis* a base de Pectina y Gelatina, y evaluación tóxica contra *T. ni*.

Fecha de obtención del grado: 17 de Agosto de 1999

2. Posgrado: Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología

Institución: Facultad de Ciencias Biológicas (FCB) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)

Proyecto de Tesis: Desarrollo de formulados de *Bacillus thuringiensis* a base de pectina y/o gelatina, y su evaluación contra el barrenador del tallo de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* fabricius.

Fecha de obtención del grado: 12 de Febrero de 2002.

EXPERIENCIA PROFESIONAL

Profesor Asociado Nivel C adscrito al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. Posee quince años de experiencia en la línea de control biológico de insectos, así como en el desarrollo de formulados de bioinsecticidas y evaluación de bioactivos. Ha recibido cinco premios y distinciones por sus actividades científicas y académicas entre los cuales se incluyen una Mención Honorífica otorgada por la Asociación Neoleonesa de Investigadores, Científicos y Tecnólogos; la Medalla Diario de México y la distinción como el mejor estudiante de México 2002 otorgado por el ATENALCYT; el Premio de Investigación Ciencia UANL en el año 2002 dentro del área de las Ciencias Naturales, Reconocimiento por su trabajo de investigación presentados durante los Congresos organizados por la Subtropical Plant Science Society en el 2012, y la Entomological Society of America en el 2010.

En el área de la divulgación de los productos de investigación ha asistido a 15 congresos nacionales y 11 congresos internacionales presentando 32 y 23 trabajos respectivamente. Además ha asistido y participado en 5 simposium nacionales.

Dentro de las publicaciones generadas cuenta con 2 artículo de divulgación y 14 artículos científicos de arbitraje internacional.

Ha dirigido 9 proyectos Institucionales de investigación y participado como colaborador de 18 proyectos de investigación dentro de los cuales 14 fueron desarrollados en el Instituto Politécnico Nacional y 4 fueron desarrollados con la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En lo que respecta a la formación de recursos humanos, ha dirigido 6 alumnos de Maestría en Ciencias y ha participado en como jurado evaluador en 16 exámenes profesionales de Maestría.