

## Efectividad de metopreno en el control de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio: efecto de la densidad larvaria

Edith Navarro<sup>1</sup>, Jesús Berti\*<sup>2</sup> & Julio E. González<sup>2</sup>

*Anopheles albimanus* Wiedemann ha sido considerado en condiciones naturales como el principal vector de la malaria humana en América Central. Metopreno es un análogo sintético de la hormona juvenil y es muy usado en el control de larvas de mosquitos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la densidad larvaria de *An. albimanus* sobre la eficacia de metopreno (Altosid-G, 1.5%) utilizando larvas de cuarto instar temprano provenientes de una población colonizada de la especie. Se evaluó la efectividad de una formulación granulada del producto (Altosid-G, 1.5%) a la concentración de 0.150 ppm del ingrediente activo y usando diferentes densidades de larvas *An. albimanus*. Las densidades probadas fueron de 20, 40, 80, 100 y 160 larvas por litro de solución de metopreno a 0.150 ppm. Se colocaron las respectivas cantidades de larvas de forma simultánea para todos los tratamientos (densidades) y cada grupo control (sin metopreno). Según los resultados obtenidos el aumento de la densidad de larvas de *An. albimanus* afectó negativamente la efectividad del producto, encontrándose diferencias estadísticas altamente significativas entre diferentes densidades. A medida que aumentó el número de larvas expuestas al producto, disminuyó el porcentaje de mortalidad de pupas. Se observó un aumento de la supervivencia de pupas sobre todo a las mayores densidades probadas (80, 100 y 160 larvas/L). Asimismo, la duración del período larva del 4to instar-pupa, se modificó (alargó) tanto por efecto de la densidad larvaria como del tratamiento con metopreno (0.150 ppm). Se encontró una relación lineal inversa entre la densidad larvaria y la mortalidad de pupas por efecto de metopreno. Asimismo, se presentó una relación lineal directa entre la densidad de larvas y la duración del período larva del cuarto instar-pupa (en el grupo tratado).

**Palabras clave:** Malaria, metopreno, inhibidores del crecimiento, *Anopheles albimanus*, control bioquímico, larvas, pupas, vectores.

### INTRODUCCIÓN

*Anopheles albimanus* Wiedemann ha sido considerado en condiciones naturales como el principal vector de la malaria humana en América Central (Carrillo *et al.*, 1981). Metopreno es un análogo sintético de la hormona juvenil muy usado en el control de mosquitos vectores. La actividad biológica y química de la hormona juvenil y sus análogos fue ampliamente

discutida por Menn & Beroza (1972). Entre los grupos de insectos contra los cuales, tales productos prometen ser muy exitosos se encuentran los mosquitos de la familia Culicidae, grupo de suma importancia en Salud Pública como vectores de enfermedades tropicales (Mulla *et al.*, 1974).

En los insectos, las mudas tienen lugar de un instar larval al otro, en presencia de altos valores de la hormona juvenil y la ecdisona. Un exceso de ecdisona causa la muda. En cambio, valores muy altos de la hormona juvenil mantienen al mosquito en su estado normal (Arias, 1973). Cuando el insecto alcanza el punto crítico de su metamorfosis para pasar de larva a la fase pupal, los valores de la hormona juvenil bajan (Bower, 1971). En muchos insectos el desarrollo del huevo también está bajo la influencia de la hormona juvenil. Existen evidencias de que esta hormona estimula

<sup>1</sup> Postgrado Entomología. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. UCV, Maracay, estado Aragua. Venezuela.

<sup>2</sup> Ministerio del Poder popular para Salud. Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", Centro de Investigación en Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental. Laboratorio Entomológico de Malaria, Las Delicias. Maracay, estado Aragua, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: jbertimoser@yahoo.com

la vitelogenésis o síntesis del vitelo (Engelmann, 1970; Chen *et al.*, 1976). En el mosquito adulto, el desarrollo de los huevos se produce cuando la hembra realiza su comida sanguínea, esta alimentación estimula la liberación de una hormona del cerebro, llamada hormona neuro-secretora del desarrollo del huevo (Lea, 1972). Esta hormona estimula al ovario para liberar ecdisona (Hagedorn & Fallon, 1973), la cual actúa sobre el cuerpo graso causando la síntesis del vitelo o vitelogenésis (Hagedorn & Judson, 1972).

Delgado (1996, 2005) llevó a cabo estudios con varias formulaciones de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) en larvas de *Anopheles aquasalis*, estos estudios demostraron que al aumentar la densidad de 0,21 larvas/cm<sup>2</sup> (20 larvas/envase) hasta 0,53 larvas/cm<sup>2</sup> (50 larvas/envase), el porcentaje de mortalidad provocado por la CL95 de cada formulación (24 horas post-tratamiento), disminuyó en relación al observado a la menor densidad probada (0,21 larvas/cm<sup>2</sup>). En los tratamientos con Vectobac-G y Tecknar, la reducción de la mortalidad fue muy significativa a las densidades de 40 y 50 larvas/envase, bajando del 100 % al 73,0 y 86,0 % respectivamente. Este autor concluyó que al aumentar la densidad larvaria de *An. aquasalis*, se observó una clara reducción en la eficacia de ambas formulaciones (Delgado, 1996, 2005).

El efecto del aumento de la densidad larval sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis israelensis* ha sido estudiado para varias especies de mosquitos. Al respecto, Mulla (1990) obtiene resultados similares a los señalados por Delgado (1996, 2005), al evaluar el efecto del aumento de la densidad de larvas de *Culex quinquefasciatus* sobre la eficacia de Bactimos (Bti a 3.000 uti/mg). Igualmente, Aly *et al.* (1988) encontraron una disminución en la mortalidad larval de *An. albimanus*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* tratadas con *Bacillus thuringiensis israelensis* a medida que aumentó la densidad de las mismas. En este caso, la reducción de la efectividad se observó más drásticamente cuando los factores introducidos modificaron el comportamiento alimenticio de las larvas; factores tales como: incremento en la edad de la larva, variación en la densidad larval, presencia o ausencia del alimento. En cuanto a estudios del efecto de la densidad larvaria de *An. albimanus* sobre la eficacia de metopreno, puede afirmarse que la disponibilidad actual de referencias es inexistente, no encontrándose hasta al presente ninguna cita bibliográfica al respecto.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la densidad larvaria de *An. albimanus* sobre la eficacia de metopreno, utilizando larvas provenientes de una población colonizada de *An. albimanus*, mantenida durante cinco años en el Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" de Maracay, adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos del estudio fueron realizados en el Laboratorio Entomológico del Centro de Investigación en Enfermedades Endémicas del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" en Maracay, Venezuela. Las condiciones ambientales para la cría de larvas de *An. albimanus* y para la realización de cada ensayo fueron las siguientes: temperatura de  $29,0 \pm 1,0$  °C; humedad relativa de  $80,0 \pm 5,0$  % HR y un foto-período de 12:12 horas (luz/oscuridad). En cada ensayo se utilizaron larvas del IV estadio temprano (entre 0 - 16 h después de la muda) las cuales se obtuvieron de la progenie de hembras provenientes de una población colonizada de *An. albimanus* mantenida durante cinco años en el Centro de Investigación antes mencionado.

La población inicial de esta colonia proviene de hembras *An. albimanus* capturadas en Caño Rico, localidad adyacente al Lago de Valencia, a 30 km de la ciudad de Maracay, estado Aragua. Para el establecimiento y el mantenimiento de la colonia de esta especie se siguió la metodología descrita por Zerpa *et al.* (1997). En la cría de las larvas y la preparación de todas las soluciones o concentraciones se utilizó agua mineral de consumo humano embotellada en envases de plástico de 18 litros de capacidad. La formulación granulada de metopreno evaluada tiene 1,5 % de ingrediente activo.

Durante cada experimento, las larvas fueron alimentadas con la misma fórmula usada por Delgado (2005) en la cría de *Anopheles aquasalis* Curry. Este alimento fue una mezcla de Ictiosan® (alimento para peces, 55,0 %), levadura de cerveza (15,0 %), avena (7,5 %), germen de trigo (7,5 %) e hígado de res deshidratado en polvo (15,0 %). Se suministraba el alimento diariamente, entre las 8:00 y 8:30 horas; para lo cual se agregaban 20 mg de la mezcla en cada envase con larvas, tanto tratados como no tratados (controles).

### *Obtención de las larvas experimentales.*

Se colocaron machos y hembras provenientes de la colonia, dentro de cestos o jaulas de metal de 19 x 29 x 32 cm, se suministró un algodón empapado en miel de abeja diluida en agua como fuente de alimento. En estas jaulas se llevó a cabo el apareamiento de adultos de ambos sexos. Las mismas están recubiertas casi totalmente de tela metálica, salvo en la parte superior, que cuenta con una malla fina de tul, donde se inmovilizó una paloma que se colocó con la parte dorsal descubierta, de modo que se permitiera su contacto a través del tul con las hembras y poder llevar a cabo su alimentación. Una vez alimentadas y apareadas, en el fondo de estas jaulas se colocaron pedazos de papel de filtro humedecido con agua para mantener la humedad relativa y estimular la oviposición. Después se esperó cuatro días para iniciar el retiro y conteo de huevos. Cada día se extraía el papel de filtro con las posturas, se procedía al conteo de huevos y se sustituía este papel por uno limpio. Las larvas de *An. albimanus* emergidas de estos huevos eclosionados, fueron utilizadas para la realización de los respectivos ensayos para determinar el efecto de la densidad larvaria sobre la eficacia de metopreno.

### *Determinación del efecto del aumento de la densidad larvaria sobre la eficacia.*

Larvas de *An. albimanus* del cuarto instar temprano fueron expuestas o tratadas a la concentración de 0.150 ppm. Esta cantidad de metopreno en mg (0.150) fue pesada y se colocó en envases plásticos circulares de 20 cms de diámetro y 5 cms de altura junto con 1 lt de agua mineral. Las densidades de larvas probadas fueron 20, 40, 80, 100 y 160 larvas/L (1 L / envase a 0.150 ppm). Se colocaron de forma simultánea las respectivas cantidades de larvas para todos los tratamientos y cada grupo control; el cual solo contenía la respectiva cantidad de larvas (20, 40, 80, 100 y 160) en 1L de agua mineral no tratada. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorio (aleatorizado). Se prepararon tres repeticiones por tratamiento, con igual número de repeticiones tanto en el control como en cada tratamiento (densidad). La mortalidad de pupas solo fue registrada a partir del tercer día de exponer las larvas al producto. Diariamente, entre las 14:00 y 14:30 horas, se registró el número de pupas formadas, pupas muertas y adultos emergidos por cada envase tratado y su respectivo control. Se efectuaron dos ensayos sucesivos aplicando la misma metodología

anterior. La temperatura promedio en ambas pruebas fue de  $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa fue de  $80\% \pm 5\%$ . En cada tratamiento y control se determinó el porcentaje de mortalidad de pupas y se aplicó un análisis de varianza con un solo criterio de clasificación o de una vía. Estos porcentajes fueron transformados a arcoseno a fin de normalizar los datos y luego aplicar las pruebas estadísticas de Duncan y del mínimo rango significativo con un nivel de significancia del 5%. La mortalidad observada fue corregida con la mortalidad del control, solo en los casos en que ésta excedió del 5% y según la fórmula siguiente: % Mortalidad corregida =  $(X - Y / X) \times 100$ , donde X = Porcentaje de larvas vivas en el control, e Y = Porcentaje de larvas vivas en el tratamiento (Abbott, 1925).

El nivel del agua en cada envase, tanto control como tratado, se mantuvo igual durante la duración del ensayo; para ello fue necesario colocar otro envase con la misma cantidad de agua y diariamente se vaciaba su contenido en un cilindro graduado, lo cual permitía obtener el volumen exacto de agua (que se evaporaba) a ser agregada; manteniéndose así la concentración inicial del producto en cada envase tratado (0.150 ppm).

## RESULTADOS

Según los resultados obtenidos en ambos ensayos, el aumento de la densidad larvaria afectó negativamente la efectividad del producto (Tablas I y II). Al analizar el porcentaje de mortalidad de pupas en función del aumento de la densidad larvaria, en ambos ensayos se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos o densidades (Tablas I y II). Asimismo, puede observarse como a medida que aumentó la densidad larvaria disminuyó el porcentaje de pupas muertas, es decir, disminuyó la efectividad del producto; sobre todo a las mayores (80, 100 y 160 larvas) densidades probadas (Tablas I y II). Las pruebas de análisis de correlación y regresión entre la densidad de larvas y la mortalidad de pupas (Fig. 1 y 2) confirmaron la presencia de una relación lineal e inversa entre en ambas variables (en ambos ensayos), es decir, que a mayor densidad larvaria menor porcentaje de mortalidad por efecto de metopreno ( $y = 87.08 - 0.3605 x$ ;  $y = 86.393 - 0.421 x$ ;  $x =$  densidad larval). Asimismo, en ambos casos se observó una alta correlación negativa ( $r = - 0.96641$ ;  $y r = - 0.93456$  respectivamente) entre las dos variables (Fig. 1 y 2).

**Tabla I. Porcentajes de mortalidad de pupas de *Anopheles albimanus* a diferentes densidades de larvas del IV instar temprano expuestas a una concentración de 0.15 ppm de metopreno (Primer ensayo).**

Densidad Larvas/litro	Densidad Larvas/cm <sup>2</sup>	% Mortalidad por replicación	% Mortalidad Promedio *
20	0,063694	65 - 90 - 95	83,3 a
40	0,127388	77,5 - 77,5 - 55	70,0 a
80	0,254777	46,3 - 51,3- 56,3	51,3 b
100	0,318471	31- 61 - 81	57,6 b
160	0,509554	17,5 - 40,6	29,0 c

\* Porcentajes de mortalidad seguidos por letras distintas difieren entre si (p< 0. 05), al aplicar las pruebas de Duncan y del mínimo rango significativo con un nivel de significancia del 5 %. Los datos originales fueron transformados a arcoseno y corregidos según la formula de Abbott. Promedios de tres replicaciones por tratamiento, salvo con la densidad de 160 larvas (2 repeticiones).

**Tabla II. Porcentaje de mortalidad de pupas de *An. albimanus* a diferentes densidades de larvas del IV instar temprano expuestas a una concentración de 0.15 ppm de metopreno (Segundo ensayo).**

Densidad Larvas/litro	Densidad Larvas/cm <sup>2</sup>	% Mortalidad por replicación	% Mortalidad Promedio *
20	0,063694	77-85-65	75,6 a
40	0,127388	67,5 -80 -70	72,5 a
80	0,254777	22,5 -51,3- 66,3	46,7 b
100	0,318471	37- 62 - 61	53,3 b
160	0,509554	13,1 -11,9 -22,5	15, 8 c

\* Porcentajes de mortalidad seguidos por letras distintas difieren entre si (p< 0. 05), al aplicar las pruebas de Duncan y del mínimo rango significativo, con un nivel de significancia del 5 %. Los datos originales fueron transformados a arcoseno y corregidos según la formula de Abbott. Promedios de tres replicaciones por tratamiento (densidad).

**Fig. 1. Relación lineal entre la mortalidad de pupas de *An. albimanus* y la densidad larvaria de esta especie en el grupo tratado con metopreno.**

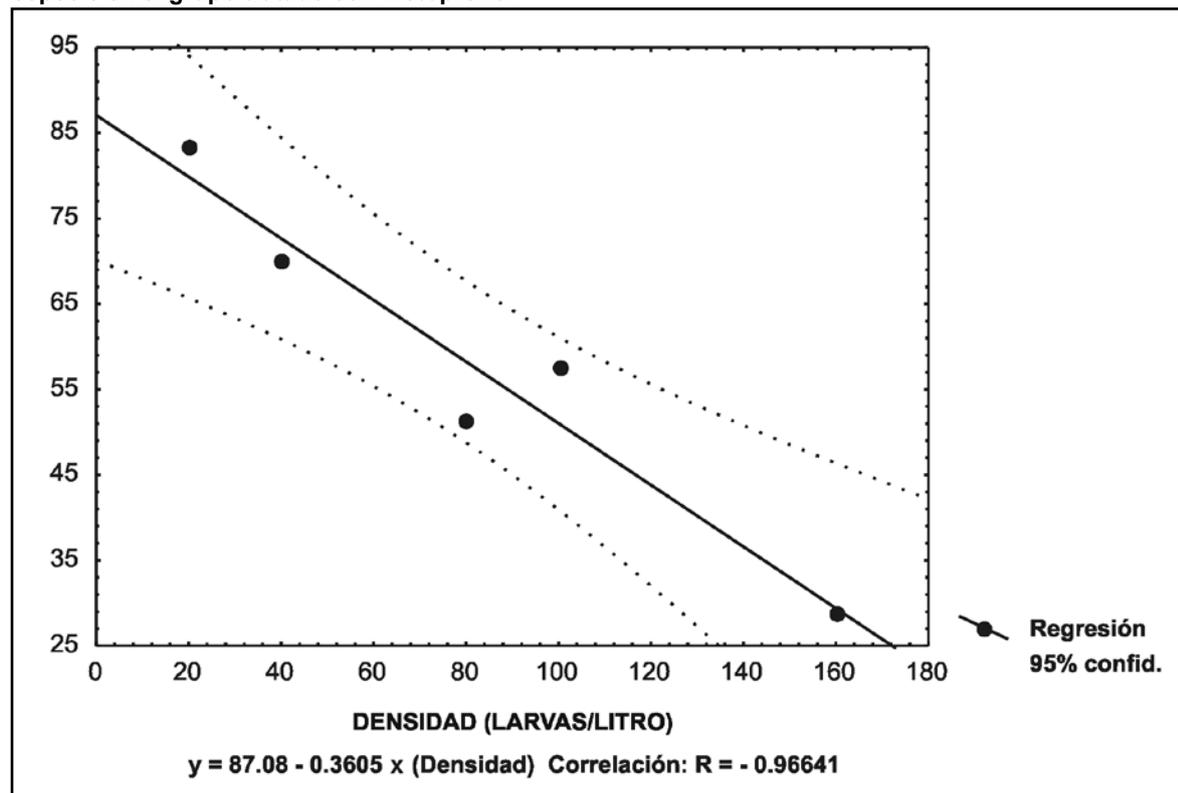


Fig. 2. Relación lineal entre la mortalidad de pupas de *An. albimanus* y la densidad larvaria de esta especie en el grupo tratado con metopreno.

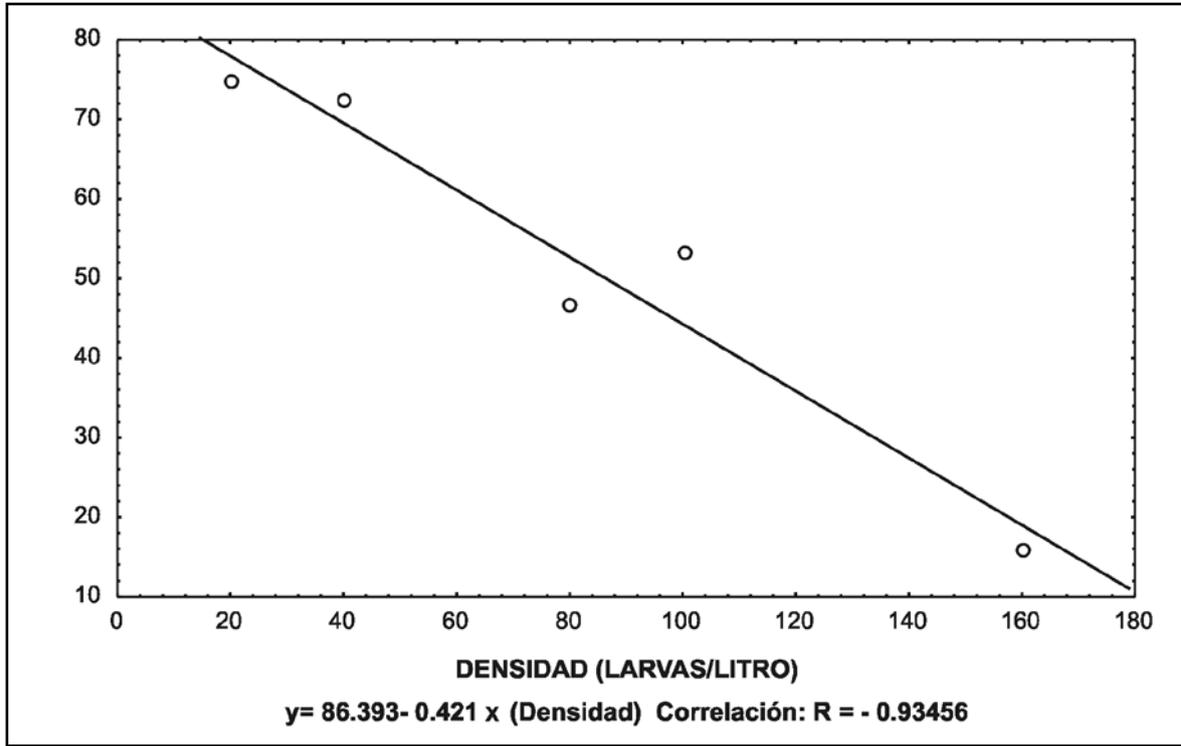
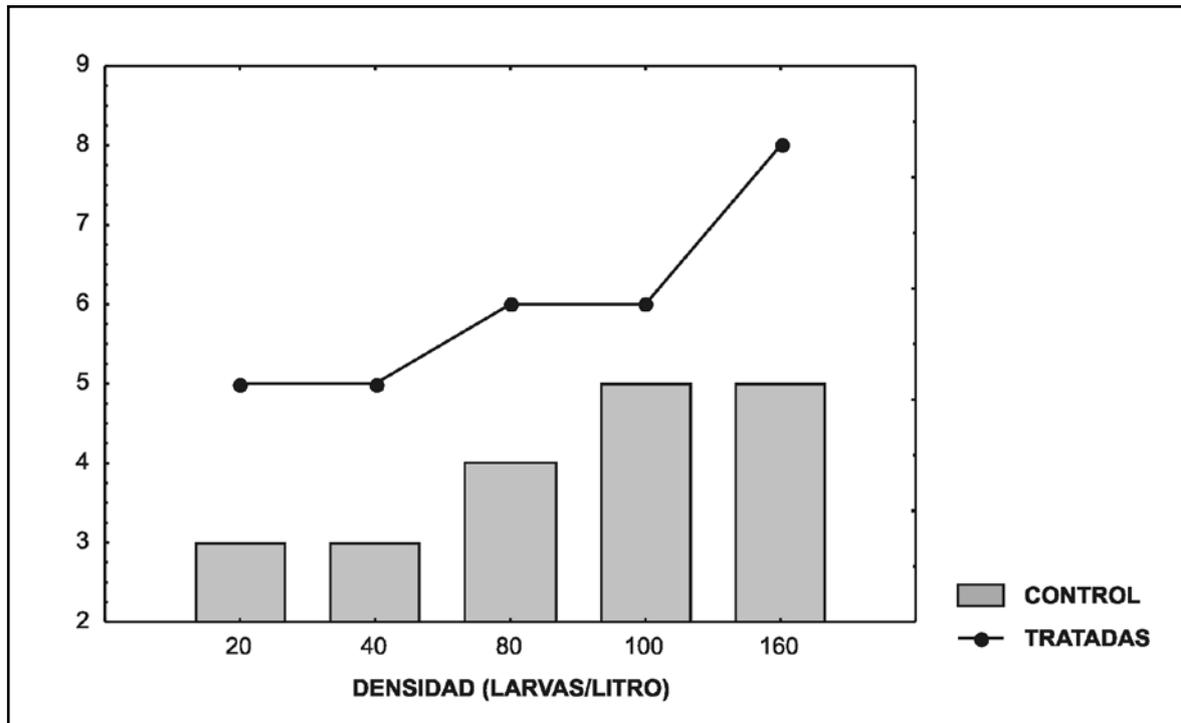
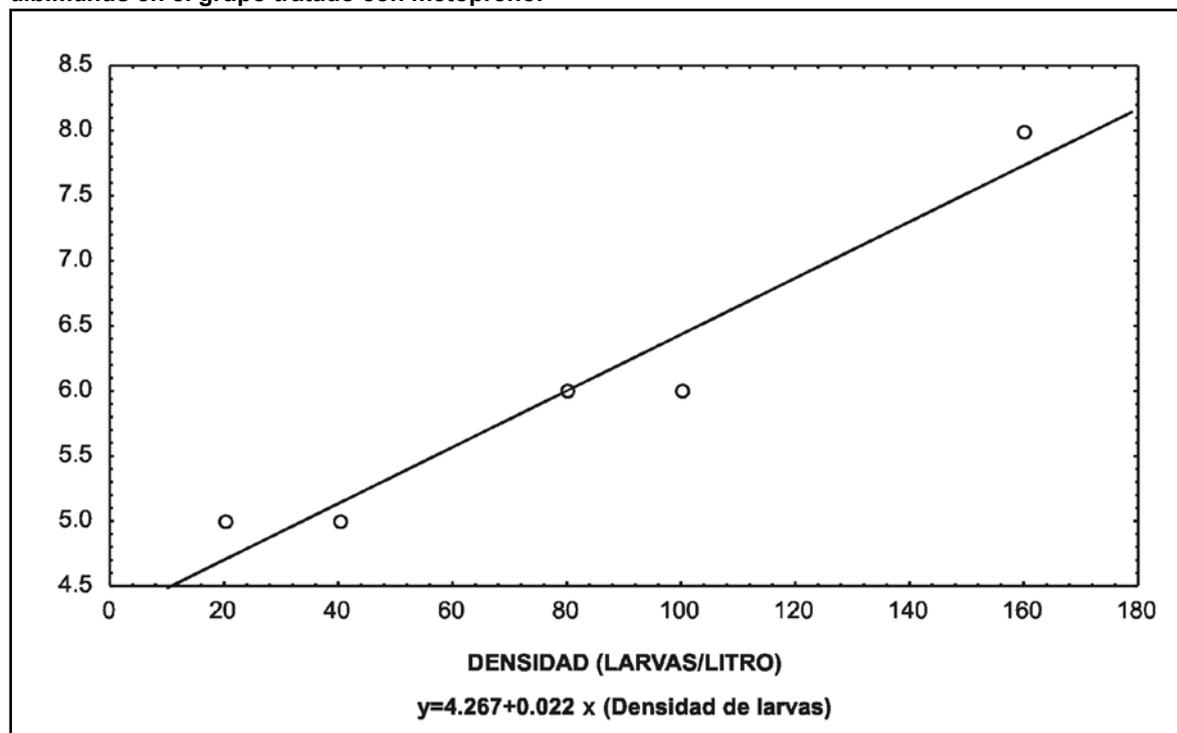


Fig. 3. Duración promedio del periodo (días) de larva del IV instar-pupa a diferentes densidades larvarias tanto en el grupo control como el grupo tratado con metopreno.



**Fig. 4. Relación lineal entre la duración del periodo larva del IV instar-pupa y la densidad larvaria de *An. albimanus* en el grupo tratado con metopreno.**



Por otro lado, también se pudo determinar que tanto en el grupo tratado como en el control, a medida que aumentó la densidad de larvas aumentó la duración del período larva del cuarto instar-pupa (Fig. 3); aunque este aumento fue mucho más evidente en el grupo tratado que en el control (Fig. 3). Según este resultado, tanto el aumento de la densidad larvaria como el tratamiento con metopreno afectaron (alargaron) la duración del periodo larva del cuarto instar-pupa. Asimismo, entre la densidad de larvas y la duración del período larva del IV instar-pupa, en el grupo tratado, se presentó una relación lineal directa entre las variables mencionadas (Fig. 4).

#### DISCUSIÓN

Varias citas señalan la presencia de una relación lineal e inversa entre la densidad larvaria de *Culex pipiens* y *Aedes vexans* y la mortalidad larval, causada por *Bacillus thuringiensis israelensis* o *B. sphaericus* (Becker *et al.*, 1992, 1993); sin embargo no existen referencias en relación a este aspecto y la utilización de metopreno con especies de *Anopheles*, *Culex* o *Aedes*.

El comportamiento gregario en insectos acuáticos es una estrategia para favorecer la supervivencia durante las etapas inmaduras, sobre todo frente a las condiciones climáticas adversas y/o los enemigos naturales. Esto se puede evidenciar en el campo en los criaderos naturales de muchas especies de mosquitos (Mogi, 1984; Service, 1985, 1993; Sandoski *et al.*, 1987). Tal comportamiento puede afectar negativamente la eficacia de este producto (metopreno) en condiciones naturales, debido a que su modo de acción es por contacto y no por ingestión como es el caso de las toxinas estomacales de *Bacillus thuringiensis israelensis* y *B. sphaericus* (Aly *et al.*, 1988). Existen límites de densidad máxima en la cual la supervivencia de larvas será nula o muy baja, sobre todo cuando se trabaja con larvas de mosquitos en condiciones de laboratorio. Esto se llegó a evidenciar en ambos ensayos, ya que cuando se aumentó la densidad de 160 a 320 larvas por litro, la supervivencia del grupo control fue sumamente baja (casi nula) muy probablemente debido a la competencia por alimento y espacio.

**Efficacy of metoprene for the control of *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) in laboratory conditions: effect of larval density.**

SUMMARY

*Anopheles albimanus* Wiedemann has been considered under natural conditions as the main vector of human malaria in Central America. Metoprene is a synthetic juvenile hormone which is used in the larval mosquito control. The aim of this study was to evaluate the efficacy of metoprene in relation to the larval density of colonized *An. albimanus*. A concentration of 0.15 ppm active ingredient of metoprene was evaluated at five larval densities: 20, 40, 80, 100 and 160 larvae/lt. According to the results obtained the increase of the larval density reduced the mortality of pupae and negatively affected the product's efficacy. Significant differences occurred between treatments (densities) and as the number of larvae increased, the percentage of dead pupae diminished. Increase of pupae survival was observed, especially in the major densities (80, 100 and 160 larvae/lt). The duration of the larva IV instar-pupa period was modified (lengthened) due to the larval density and metoprene effects. The statistical analysis revealed a negative relationship between the mosquito larval density and mortality of pupae; while there was a positive relationship between the mosquito larval density and the duration of the larva IV instar-pupa period.

**Key words:** Malaria, metoprene, growth inhibitors, *Anopheles albimanus*, biochemical control, larvae, pupae, vectors.

REFERENCIAS

- Abbott W. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Ent.* **18**: 265-267.
- Arias J. (1973). Biophysiological activity of insect growth regulators against mosquitoes (Dissertation of PhD). Riverside California Univ. 100 pp.
- Aly C., Mulla M., Xu B. & Schnettre W. (1988). Rate of ingestion by mosquito larvae (Diptera: Culicidae) as a factor in the effectiveness of a bacterial stomach toxin. *J Med Entomol.* **35**: 191-196.
- Becker N., Zgomba M., Ludwing M., Petric D. & Rettich F. (1992). Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J Amer Mosq Control Assoc.* **8**: 285-289.
- Becker N., Ludwing M., Beck M. & Zgomba M. (1993). The impact of environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* against *Culex pipiens*. *Bull Soc Vector Ecol.* **18**: 61-66.
- Bower W. S. (1971). Insect hormones and their derivatives as insecticides. *Bull World Health Org.* **44**: 381-89.
- Carrillo, M., Suárez, M., Morales, A. & Espinal, C. (1981). Colonización y mantenimiento de una cepa colombiana de *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Biomédica.* **1**: 64-66.
- Chen T., Couble P., De Lucca F. & Wyatt G. (1976). *The Juvenile Hormones*. New York: Plenum Press, 529 p.
- Delgado N. (1996). *Implicaciones ecofisiológicas de la introducción de Bacillus thuringiensis var. israelensis como controlador biológico de Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae)*. [Tesis de grado]. Maracay: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 245 p.
- Delgado N. (2005). Factores que afectan la eficacia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. *Entomotopica.* **20**: 213- 233.
- Engelmann F. (1970). *The physiology of insect reproduction*. New York: Pergamon Press, 312 p.
- Hagedorn H. & Judson C. (1972). Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins. *J Exp Zool.* **182**: 367-77.
- Hagedorn H. & Fallon A. (1973). Ovarian control of vitellogenin synthesis by the fat body in *Aedes aegypti*. *Nature.* **244**: 103-05.
- Lea A. (1972). Regulation of egg maturation in the mosquito by the neurosecretory system: the role of the corpus cardiacum. *Gen Comp Endocrin.* **8** (Suppl. 3): 602-08.

- Menn J. J. & Beroza M. (1972). *Insect juvenile hormones, chemistry and action*. Academic Press. New York. 341 pp.
- Mogi M. (1984). Distribution and overcrowding effects on mosquito larvae (Diptera: Culicidae) inhabiting Taro axils in the Ruykus, Japan. *J. Med. Entomol.* **21**: 3-8.
- Mulla M. S., Norland R., Ikeshoji T. & Kramer W. L. (1974). Insect growth regulators for the control aquatic midges. *J. Econ. Entomol.* **67**: 165-70.
- Mulla M. (1990). *Activity, field efficacy, and use of Bacillus thuringiensis israelensis against mosquitoes*. pp:134-160. In: Bacterial Control of Mosquitoes & and Black Flies. H. de Barjac and D. Sutherland Editors. Rutgers Univ. Press.
- Service M. (1985). *Some ecological considerations basic to the biocontrol of Culicidae and other medically important insects*. pp: 9-30. In: Integrated mosquito Control Methodologies. Volume 2. M. Laird and J. Miles Editors. Academic Press, London.
- Service M. (1993). *Mosquito Ecology. Field Sampling Methods*. 2nd. Edition. Elsevier Science Publishers, LTD. 988 p.
- Sandoski, C., Kring, T. Yearian, W. And Meisch, M. (1987). Sampling and distribution of *Anopheles quadrimaculatus* immatures in rice field. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **3**: 611-615.
- Zerpa N, Moreno J, González J, Noya, O. (1997). Colonization and laboratory maintenance of *Anopheles albimanus* Wiedemann in Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* **40**: 173-76.

Recibido el 15/06/2007  
Aceptado el 25/03/2008