

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

Efecto de un extracto alcohólico de hoja  
de *Azadirachta indica* como insecticida  
biológico aplicado a *Triatoma dimidiata*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA  
**Mireya Gómez Hernández**

Directora

Dra. Dolores Guadalupe Vidal López  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

Asesora

Dra. María Adelina Schlie Guzmán  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH



## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de las personas a mi alrededor y por las que me siento muy afortunada.

A mi directora de tesis la Dra. Dolores Guadalupe Vidal por su motivación, confianza, por su compromiso y por la revisión de esta tesis. Por haberme brindado el lugar de trabajo para realizar los bioensayos en el laboratorio multidisciplinario y bioterio, UNICACH.

A mi asesora la Dra. Adelina Schlie Guzmán por apoyarme con la identificación de los metabolitos secundarios y de ofrecerme el lugar de trabajo en el laboratorio de genética. Al biólogo Julio por apoyarme con los materiales de laboratorio.

A Biólogo Jesús y al Médico Irvin por su apoyo con el mantenimiento de los triatomíneos.

A mis padres y a mi hermana Juana por brindarme el apoyo económico durante la carrera hasta la conclusión de la tesis.

A Viridiana Cisneros por acompañarme en cada momento, sobre todo su amistad.  
A la señora Anita por sus consejos y por motivarme de seguir adelante.

## DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de cumplir esta meta, por estar en momentos buenos y malos.

A mis padres por darme la vida, a mi madre más que nada por sus consejos, por enseñarme cosas buenas, por cuidarme desde mi infancia, por estar conmigo cuando la necesito. Y sobre todo compartiendo cada circunstancia de mi vida ya sea bueno o malo.

A mi hermana Juana que siempre estuvo al tanto de mis estudios, de brindarme el apoyo económicamente y por su preocupación. A mi hermana Mary y Amalia por motivarme siempre, por siempre estar cuando las necesitaba. Por ser mis hermanas y amigas al mismo tiempo. Y por siempre aconsejarme en hacer las cosas bien. A mi hermanita la más chiquita por sus travesuras y por su compañía.

Personas especiales: Manuela Espinoza, Ingrid Viridiana, Cristian Moreno, mi cuñado Ezequiel Gomez, Luis Enrique, Mary Gómez, Amalia, Gomez, Esteban Luna, señora Ana Villatoro, Dra. Dolores Guadalupe Vidal, Esteban Gomez.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE CUADROS .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Generalidades de <i>Azadirachta indica</i> .....	3
2.1.1 Clasificación taxonómica .....	3
2.1.2. Descripción botánica .....	4
2.1.3. Distribución.....	6
2. 2. Propiedades del nim .....	6
2.2.1. Fertilizante.....	6
2.2.2. Medicinal .....	7
2.2.3. Fungicida.....	7
2.2.4. Insecticida .....	8
2.2.5. Otros usos.....	8
2.3. Metabolitos secundarios .....	9
2.3.1. Metabolitos secundarios de <i>A. indica</i> y su efecto contra los insectos ..	10
2.3.1.1. Efectos sobre la alimentación .....	12
2.3.1.2. Efecto fisiológico.....	12
2.4. Insectos vectores de enfermedades .....	13
2.5. Características generales de la Subfamilia Triatominae .....	14
2.5.1. Ecotopos .....	15
2.6. <i>Triatoma dimidiata</i> : como principal vector del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> en Chiapas.....	15
2.6.1. Clasificación taxonómica .....	16
2.6.2. Ciclo biológico .....	17
2.6.3. Distribución en México .....	18
2.7. Situación epidemiológica en México.....	19
2.8. Estrategias para el control vectorial .....	20
2.8.1. Control de triatominos vectores mediante el uso de insecticidas .....	21
2.9. Resistencia a insecticidas.....	23
III. ANTECEDENTES .....	25

IV. OBJETIVOS.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
4.1. Objetivo general.....	30
4.2. Objetivos particulares .....	30
V. AREA DE RECOLECTA .....	31
5.1. Ubicación geográfica .....	31
5.2. Clima.....	31
5.3. Vegetación.....	32
VI. MÉTODOS.....	33
6.1. Recolecta del material vegetal.....	33
6.2. Obtención del extracto de hoja de <i>A. indica</i> .....	33
6.3. Identificación de los grupos de metabolitos secundarios (MS) .....	33
6.4. Mantenimiento de triatominos.....	36
6.5. Efecto en la mortalidad, alimentación y muda en las ninfas de <i>T. dimidiata</i>	36
6.6. Repelencia en adultos .....	37
VII. RESULTADOS.....	39
7.1. Rendimiento del extracto e identificación de los grupos de metabolitos secundarios (MS).....	39
7.2. Mortalidad de las ninfas de <i>T. dimidiata</i> .....	46
7.3. Efecto en la alimentación.....	49
7.4. Efecto sobre la muda .....	49
7.3. Efecto repelente del extracto metanólico de la hoja de <i>A. indica</i> en adultos de <i>T. dimidiata</i> .....	50
VIII. DISCUSIÓN .....	52
IX. CONCLUSIÓN .....	56
X. RECOMENDACIONES .....	57
XI. LITERATURA CITADA.....	58

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Resultados de la prueba fitoquímica del extracto metanólico	46
Cuadro 2.	Comportamiento de alimentación de los triatominos posterior a la aplicación del extracto	50
Cuadro 3.	Repelencia en adultos	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Árbol del <i>A. indica</i>	4
Figura 2.	Hoja del nim	5
Figura 3.	Inflorescencias del nim	5
Figura 4.	Fruto en racimos (a) y semilla (b)	5
Figura 5.	Distribución mundial de <i>A. indica</i>	6
Figura 6.	Estructura química de la azadiractina A	11
Figura 7.	Estructura química de la Aza B	11
Figura 8.	Estructura química de ecdisona	11
Figura 9.	Morfología externa de un triatomino vista dorsal	16
Figura 10.	Ciclo de vida <i>T. dimidiata</i>	18
Figura 11.	Mapa de distribución de <i>T. dimidiata</i> en México	19
Figura 12.	Mapa de ubicación del municipio de Tuxtla Gutiérrez	31

Figura 13.	Extracto seco de <i>A. indica</i>	39
Figura 14.	Prueba de Dragendorf	39
Figura 15.	Prueba de cloruro férrico	40
Figura 16.	Prueba de Shinoda	41
Figura 17.	Prueba de Molish	42
Figura 18.	Prueba de espuma	42
Figura 19.	Prueba de taninos	43
Figura 20.	Prueba de Salkowski	44
Figura 21.	Prueba de Liebermann-Burchard	44
Figura 22.	Prueba de Baljet	45
Figura 23.	Mortalidad de ninfas del tercer estadio	47
Figura 24.	Mortalidad de ninfas del cuarto estadio	47
Figura 25.	Porcentaje de mortalidad vs sobrevivencia de las ninfas de <i>T. dimidiata</i>	48
Figura 26.	Comparación de mortalidad entre las ninfas del tercer estadio (3E) y cuarto estadio (4E).	49
Figura 27.	Porcentaje de ninfas que mudaron	50

## RESUMEN

Las plantas poseen gran número de metabolitos secundarios que actúan como mecanismo de defensa y sirven como atrayentes o repelentes de diferentes especies de animales. Actualmente se conocen alrededor de 2 400 especies de plantas utilizadas como plaguicidas, dado que principios activos se obtienen por medio de extracción de las diferentes partes de las plantas. Esta ha sido una de las alternativas para el control de insectos plagas o vectores de enfermedades, debido a que los insecticidas sintéticos provocan resistencia en las poblaciones de dichos organismos. *Azadirachta indica* (cuyo nombre vernáculo es nim) es uno de los árboles más reconocido por su efecto insecticida en 500 especies de insectos. En este estudio se pretende aportar nueva información sobre el uso de *A. indica* como control biológico de *Triatoma dimidiata*, uno de los vectores del parásito *Trypanosoma cruzi* que causa la enfermedad de Chagas. Se evaluó el efecto de un extracto alcohólico de hojas de *A. indica* en dos estadios y en adultos de *T. dimidiata*. Para obtener el extracto las hojas del nim fueron puestas en maceración en frío utilizando como diluyente alcohol metílico; se identificaron los grupos de metabolitos secundarios presentes. Se determinó la mortalidad, alimentación y muda en las ninfas del 3° y 4° estadio de *T. dimidiata* a una concentración 500 ppm del extracto. Y se determinó el efecto repelente en los adultos a las 2 y 24 h utilizando dos concentraciones: 750 y 500 ppm. Se identificaron seis grupos de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides, glucósidos, terpenos, esteroides y lactonas-sesquiterpénicas. Las ninfas del 3° estadio presentaron mortalidad a la tercera (23.3%) y cuarta (20%) semana y las del 4° estadio a la segunda (13.33%) y tercera (11.67%) semana. La mortalidad acumulada fue de 43.33% (3° estadio) y 25 % (4° estadio). El extracto redujo el porcentaje de alimentación (56.66 %) y la muda (56.66%) en ninfas del tercer estadio. Sin embargo, presentó menor efecto en ninfas del cuarto estadio puesto que el 75% de las ninfas mudaron al quinto estadio, y no mostró efecto en la alimentación. Se observó mayor efecto repelente a las 24 h (60%) en los adultos a una concentración de 750 ppm. Con los resultados obtenidos muestran que las ninfas del tercer estadio fueron más susceptibles al extracto de las hojas del *A. indica*. Este árbol podría ser una

alternativa para el manejo y control de *T. dimidiata*, sin embargo, es necesario profundizar este tipo de estudios utilizando otras concentraciones y partes del árbol del nim.

Palabras claves: bioinsecticida, nim, triatomino, mortalidad, repelencia.

# I. INTRODUCCIÓN

Las plantas cumplen una función primordial para los ecosistemas y además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa a los cuales se les ha denominado en conjunto metabolitos secundarios. Estos compuestos cumplen una función ecológica ya que actúan como mecanismo de defensa para las plantas y sirven como atrayentes o repelentes de diferentes animales; otros presentan propiedades medicinales, herbicidas, fragancias, colorantes, entre otras (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Actualmente se conoce alrededor de 2 400 especies de plantas utilizadas como plaguicidas (Villavicencio-Nieto *et al.*, 2010). Estos bioinsecticidas se obtienen a partir de extractos de las plantas mediante un proceso de extracción del principio activo y que actúan como sustancias reguladoras, de control o eliminación de los insectos. Es uno de los métodos alternativos para el control de insectos plagas o vectores de enfermedades, ya que representan una fuente promisoría, segura y sostenibilidad ecológica, es decir, bajo riesgo para la salud humana, menos costoso, son biodegradables y con baja toxicidad para el ambiente [Promoción del Desarrollo Sostenible/Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación (IPES/FAO), 2010; Leyva *et al.*, 2017].

Uno de los insecticidas naturales más conocidos son las piretrinas extraídos principalmente de la flor del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), la nicotina principio activo de la *Nicotiana tabacum* y la azadiractina presente en el árbol del nim (*Azadirachta indica*) (Pérez, 2012).

Actualmente, los métodos principales para el control de plaguicidas se basan en insecticidas sintéticos, el uso excesivo, indebido e innecesario de estas sustancias han tenido un efecto negativo sobre el medio ambiente, causando toxicidad a otros organismos vivos (García-Gutiérrez y Rodríguez-Meza, 2012). Los insecticidas actuales basados en piretroides sintéticos usados para el control de triatomíneos (vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, que causa la enfermedad

de Chagas), llegan a provocar neurotoxicidad en algunos mamíferos y, por otra parte, la aplicación de organofosforados, organoclorados, carbamatos han provocado altos niveles de resistencia hacia grupos de triatominos (Coelho *et al.*, 2006). Además, la Organización de las Naciones Unidas (OMS, año) reportó que el uso de DDT para el control/erradicación de los vectores, presenta un alto riesgo para la salud humana, por su alto nivel de toxicidad (Cervantes, 2008).

*Azadirachta indica* es uno de los árboles más reconocido por su efecto insecticida en 500 especies de insectos y también es utilizado como repelente natural; esta planta produce un tetranortriterpenoide llamado azadiractina que se encuentra acumulado principalmente en los frutos y semillas, además de las hojas (Villamil *et al.*, 2012).

Esta planta se ha utilizado principalmente para el control de plagas agrícolas y otras especies vectores de enfermedades (Ej. mosquitos), sin embargo, pocos estudios se han realizado en el control de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas. La especie *Triatoma dimidiata* es uno de los vectores del parásito *T. cruzi*, una de las más importantes en México y la más frecuente en el estado de Chiapas (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). Por tal razón, se pretende con este estudio aportar nueva información sobre el uso de esta planta (*A. indica*) como control biológico de *T. dimidiata*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades de *Azadirachta indica*

*Azadirachta indica* A. Juss pertenece a la familia Meliaceae, comúnmente conocida como nim, margosa o árbol del paraíso. Es un árbol originario de la India, de crecimiento rápido y que habita en las regiones tropicales y subtropicales; normalmente sobrevive en zonas con condiciones subáridas a subhúmedas (National academy press, 1992). El nim puede desarrollarse en diferentes tipos del suelo, pero crece mejor en suelos profundos y arenosos. Se cultiva desde el nivel del mar hasta una elevación de 1 500 m. Es una especie útil para mejorar la fertilidad del suelo en los sitios secos degradados, debido a la calidad de su hojarasca y a la tasa de descomposición foliar relativamente rápida. Es considerado como uno de los árboles más prometedores por su gran potencial para el manejo de plagas, protección al medio ambiente y medicina (Pijoan, 2004).

Ha sido introducido para cultivo en otros países y en la actualidad se encuentra distribuida en más de 78 países de Asia, África, América, Australia y las islas del sur del Pacífico (Parrotta y Chaturvedi, 1994). En México fue introducido en 1989 por la universidad autónoma de nuevo león y ha sido objeto de estudio. La distribución y aprovechamiento de este árbol como insecticida en México, representa una alternativa factible para el control de plagas agrícolas, principalmente en comunidades rurales de bajo nivel tecnológico [Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), 2004].

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Trachaeophyta

División: Pteropghyta

Subdivision: Angiosperma

Clase: Dicotiledonea

Orden: Geraniales

Familia: Meliaceae

Subfamilia: Melioideae

Género: *Azadirachta*

Especies: *A. indica* A. Juss

### 2.1.2. Descripción botánica

*A. indica* (nim) es un árbol pequeño a mediano, mide entre 15 a 30 m. de altura (figura 1), siempre verde, de crecimiento rápido y puede vivir más de 200 años. Posee un tronco recto que llega a medir hasta 2.5 metros de circunferencia cuya corteza es moderadamente gruesa, (INIFAP, 2004). Las hojas se componen de peciolo, lámina y la base que se adhiere a las hojas del tallo la cual puede llevar dos hojas pequeñas laterales como estructuras llamadas estípulas (figura 2). La flor es pequeña con una coloración blanca (figura 3), crema o amarillenta, bisexual, actinomorfa, que crece en racimos de manera axilar. En plena floración su aroma y néctar facilitan su polinización (Ramos, 2017).



Figura 1. Árbol del *A. indica*. Fuente: Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), 2019.

El fruto es una drupa elipsoidal, con un aspecto liso y mide de 1.4 a 2.4 cm de largo, producidos en racimos (figura 4A). La pulpa es jugosa y dulce, consumible por humanos, aves y animales (Parrotta y Chaturvedi, 1994). Tiene

una maduración des uniforme, no simultánea, es decir, en una misma rama se puede encontrar flores, frutos inmaduros y frutos maduros; en México generalmente maduran los frutos entre los meses de julio y septiembre. La semilla es de forma elipsoidal, mide alrededor de 1.4 cm de largo y 6.5 mm de ancho, posee una envoltura de color café (figura 4, B). Esta es la parte más importante del árbol porque en ella se almacena todas las propiedades biológicas (Espinoza, 1998).



Figura 2.- Hoja del nim (Fuente: CONAFOR, 2019).



Figura 3.- Inflorescencias del nim (Fuente: CONAFOR, 2019).



Figura 4.- Fruto en racimos (a) y semilla (b) (Fuente: CONAFOR, 2019).

### 2.1.3. Distribución

El nim tiene una amplia distribución encontrándose en diferentes partes del mundo. En América se encuentra en países como Trinidad y Tobago, Jamaica, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Surinam, Guayana, Barbados, Cuba, República Dominicana, Haití, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Bolivia, Ecuador, Argentina y Brasil. En México actualmente se encuentra distribuido en estados como Yucatán, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Durango, Baja California Sur y San Luis Potosí (INIFAP, 2004).



Figura 5.- Distribución mundial de *A. indica* (Fuente: Lorrén *et al.*, 2015).

## 2. 2. Propiedades del nim

Debido a su amplia distribución el nim ha tenido varias aplicaciones en diferentes sectores como la agricultura, industria, medicina y entre otros.

### 2.2.1. Fertilizante

Esta planta es utilizada como fertilizante orgánico, porque es superior al estiércol vacuno, porcino o de otra fuente de fertilizantes orgánicos. Mezclada con urea da buenos resultados para abonar el suelo. Se ha visto que las hojas son las que se emplean para el abono orgánico (Hidalgo, 2002). La pasta de nim es el principal

subproducto del procesamiento, es rica en nutrientes y ayuda a mantener la tierra suelta lo cual permite que el agua y los nutrientes sean absorbidos más fácilmente por las raíces (Saldaña, 1999; INIFAP, 2004).

### **2.2.2. Medicinal**

El papel de nim como uso medicinal se remonta desde hace 4 500 años. Muchas de las propiedades están basadas en el conocimiento tradicional y anecdótico de la medicina ayurvédica. Todas las partes del árbol (frutos, semillas, aceite, hojas, raíces y corteza) son utilizadas para preparar diferentes remedios. Destaca su utilidad contra la lepra, las enfermedades de piel, las fiebres, gastritis, diabetes, cáncer, enfermedades nerviosas, las lombrices intestinales y los insectos parásitos. En el siglo XIX, los médicos alopáticos, tanto europeos como hindúes, que oficiaban en la India descubrieron que la corteza de nim era efectiva contra la malaria y fue incluido en la Pharmacopeia of India (1896) y en la Practical Materia Medica (1900) (Pijoan, 2004).

En medicina tradicional, la corteza de nim también se utiliza para aliviar inflamaciones e irritaciones cutáneas y curar heridas, hemorroides y encías sangrantes. La savia, por su parte, se emplea para curar diversas dermatosis incluidas hasta hace poco las tremendas úlceras de la lepra. La goma, similar a la arábica, se utiliza como emulgente para el dolor de garganta y las flores como vermífugos, para aliviar la tos y varias dolencias oculares, entre ellas las cataratas. Los frutos, también con poder vermífugo, sirven para tratar los trastornos urinarios, purificar la sangre y curar los granos sangrantes. El aceite, es considera como un remedio óptimo para los eccemas, abscesos, lesiones lepróticas, para la psoriasis y la caspa, para matar piojos y para aliviar comezones (Pijoan, 2004; INIFAP, 2004).

### **2.2.3. Fungicida**

Las hojas de nim contienen compuestos como los triterpenos gedunin y nimbidol que actúan como fungicidas (Saldaña, 1999). Se ha observado que alivian el pie

de atleta, la tiña y hongos tipo levadura que pueden desarrollarse internamente (García y Martínez, 2018). Estudios demuestran que los extractos de corteza, pulpa del fruto y el aceite de nim puede inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, por ejemplo, *Fusarium oxyspomm* f. sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerentium rolfsii* y *Sclerotinia sclervtorium* que producen el marchitamiento y putrefacción del garbanzo de la india (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

#### **2.2.4. Insecticida**

En muchos países, es apreciada por sus propiedades insecticidas y repelentes, especialmente contra ciertos insectos como las termitas o comejenes y los dañinos nematodos (Hidalgo, 2002). Se ha visto que los extractos obtenidos del nim actúan como anti-alimentario, inhibidor de crecimiento, prolonga las etapas inmaduras ocasionando la muerte, disminuye la fecundidad y la ovoposición, disminuye los niveles de proteínas y aminoácidos en la hemolinfa e interfiere en la síntesis de quitina (Pastorino, 2009). Muchos de los metabolitos secundarios del árbol tienen actividad biológica (Morgan, 2009), pero la azadiractina es considerada de mayor importancia ecológica (Galerani y Kemmelmeier, 2005).

Estas características hacen que las sustancias obtenidas del nim no funcionen como tóxicas, sino que intervienen en los procesos químicos y fisiológicos de los insectos. Y por ello muchos investigadores han tenido el interés, así como el deseo de conseguir un pesticida efectivo y seguro y consideran que el nim tiene esa potencialidad para el control de cualquier tipo de plagas (Mordue y Nisbet, 2000).

#### **2.2.5. Otros usos**

También es utilizado en la industria jabonera. Reemplaza a los aceites de coco, palma africana y maní. Como contiene ácidos mirísticos y láuricos, los jabones fabricados con dicho aceite tienen más espuma que aquellos fabricados con aceites comestibles. También es superior al aceite de higuera o ricino. En india se emplean la pulpa como generador de gas metano (Parraga, 2016). El aceite también es usado para preparar cosméticos (shampoo, bálsamos, jabón y cremas)

(Martínez *et al.*, 2016). Además del uso medicinal, se cultivan para disminuir la pérdida del agua en el suelo y se cree es un buen absorbente del dióxido de carbono (Espinoza, 1998).

Existe evidencia científica preliminar que demuestra que el nim es muy efectivo en el tratamiento de la sarna, pero aún faltan estudios que respalden esta información (Estrada *et al.*, s/f). El nim es recomendado a quienes sean sensibles a la permetrina, porque les causa irritación. A su vez, también existe evidencia de su efectividad en la eliminación de piojos, aunque no sus huevos (liendres) (Bronet y Garrote, 2014) y en nematodos y gusanos filiformes tanto ecto como endoparásitos del hombre (Nayan y Upadhyay, 1997).

### **2.3. Metabolitos secundarios**

Las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de energía para la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no poseen una función directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Estas moléculas se denominan metabolitos secundarios, también denominados productos secundarios o productos naturales. Se sintetizan en pequeñas cantidades y su producción es restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso algunas especies (Ávalos y Pérez-Urría, 2009). De acuerdo a la composición química de los metabolitos secundarios se clasifican en tres grandes grupos: terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados (Valle, 2012).

Los terpenos o terpenoides constituyen el mayor grupo de productos secundarios. Generalmente son insolubles en agua; son biosintetizados a partir del acetyl CoA e intermediarios glicolíticos. Comúnmente las moléculas poseen desde un par de unidades de isopreno (hidrocarburo estructurado por 5 átomos de carbono) hasta cuatro (mono, sesqui, di, tri y tetraterpenos), algunos son politerpenos. Participan en el mecanismo de defensa de las plantas, como repelentes de herbívoros y algunos mamíferos. Un ejemplo son los piretroides, un monoterpeno, la cual se encuentra en las hojas y flores de *Chrysanthemum* con una actividad insecticida muy elevada (Taiz y Zeiger, 2007).

Los compuestos fenólicos, fenoles o polifenoles vegetales son sustancias que poseen al menos un anillo aromático con un radical hidroxilo. Los polifenoles son las más abundantes dentro del reino vegetal. Se sintetizan a partir de la ruta-ácido shikimico y la ruta del ácido malónico que produce los tres aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina y triptófano; los fenilpropanoides produce derivados del ácido cinámico, precursores de los flavonoides y ligninas; los flavonoides producen diversos compuestos. Un ejemplo son las antocianinas que se encuentra en todas las familias de plantas, junto con los carotenoides de origen terpénico, dan colores rosas, naranja, rojo, violeta, azul a los pétalos de las flores y de los frutos. Esto les sirve a las plantas atraer polinizadores y dispersores de semilla (Almaraz-Abarca *et al.*, 2006).

Existe una gran cantidad de compuestos nitrogenados, comúnmente se le conoce como alcaloides, incluye a los glucósidos cianógenos (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Generalmente derivan de aminoácidos comunes, así como la lisina, triptófano y tirosina, además de la fenilalanina e histidina (Valle, 2012). Se puede encontrar cuatro clases de alcaloides: verdaderos, imperfectos, rotoalcaloides y pseudoalcaloides. Son sustancias que se encuentra en: hojas (cocaína, nicotina), flores (escopolamina), en frutos (peletiariba, coniina), semilla (piperina, arecolina), corteza (quinina, tubocurarina) y la raíz de la planta (emetina y cefalina). Actúa en la defensa contra herbívoros y patógenos (Arango, 2008).

### **2.3.1. Metabolitos secundarios de *A. indica* y su efecto contra los insectos**

El árbol del nim produce más de 300 metabolitos secundarios que pertenece a la clase de los terpenos, un tercio de los cuales son tetranortriterpenoides (limonoides); estos se encuentran en las semillas, corteza, fruto y en las hojas. Por sus efectos biológicos son de interés comercial y científico (Morgan *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 1999). Entre los limonoides con mayor importancia es la azadiractina y sus cerca de 25 análogos naturales son los más activos biológicamente. De estos, la azadiractina A (Aza A) (figura 6) es la más abundante y biológicamente activa y representa aproximadamente el 80% de la azadiractina encontrada en diferentes partes del árbol en el nim, mientras que el 15% puede ser Aza B (3-

tigloylazadirachtol) (figura7) (Soni *et al.*, 2012). La Aza es uno de los metabolitos principales utilizado especialmente para el control de insectos (Barreto, 2011), debido a que su estructura química es parecida a la hormona de muda llamada ecdisona (figura 8). Además de la AZA se ha reportado otros limonoides como el meliantrol, salanin, nimbin, nimbidina y deactilazadiractinol (National academy press, 1992).

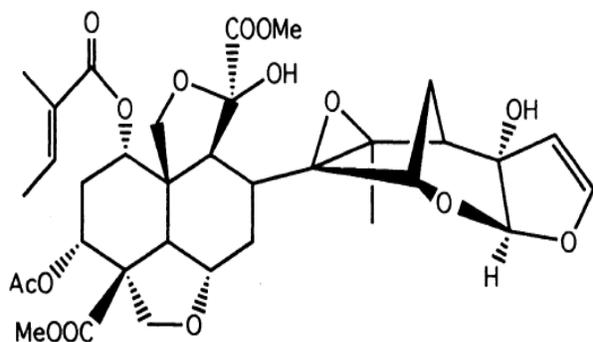


Figura 6.- Estructura química de Aza A  
(Fuente: Soni *et al.*, 2012).

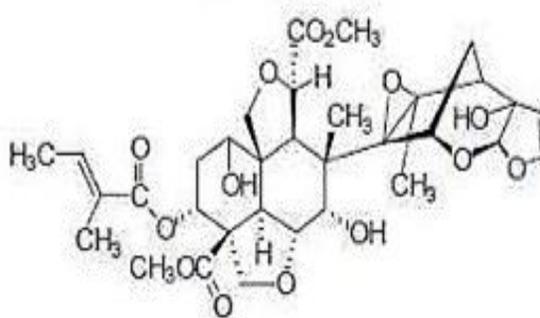


Figura 7.- Estructura química de Aza B  
(Fuente: Soni *et al.*, 2012).

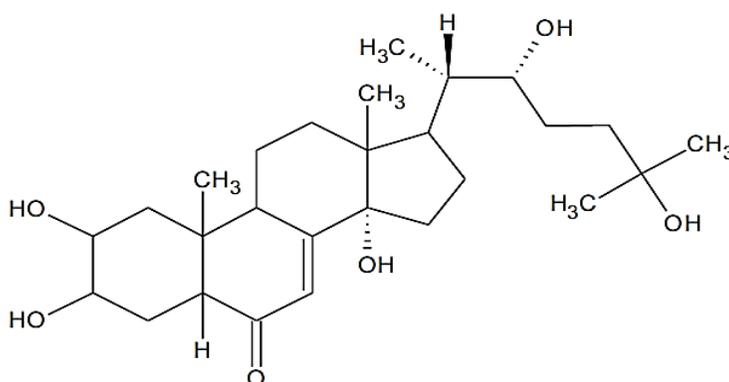


Figura 8.- Estructura química de ecdisona (fuente: Ferro *et al.*, 2005).

### **2.3.1.1. Efectos sobre la alimentación**

Se ha observado en diferentes especies de insectos pertenecientes al orden Lepidóptera, Coleóptera, Hemiptera, Hymenoptera y Orthoptera un efecto anti alimentario y está relacionado con la respuesta sensorial de los quimiorreceptores presentes en las piezas bucales de los insectos (Mordue *et al.*, 1998).

El comportamiento alimentario es diferente en cada especie, depende tanto del aporte neural de los sentidos químicos, tales como receptores del gusto en los tarsos, piezas bucales y cavidad bucal como de la integración del sistema nervioso central de ese código sensorial. Se han hecho estudios donde demuestran que la azadiractina estimula las células disuasorias específicas en los quimiorreceptores. Así, cuando un insecto entra en contacto con esta sustancia provoca un efecto antialimentario y fisiológico, el cual provoca una reducción en el consumo de alimentos como efecto secundario, debido a la alteración del sistema hormonal, inhibición de la producción de enzimas digestivas y del sistema nervioso estomatogástrico (Perera *et al.*, 2000; Mourde y Nisbet, 2000).

Además de la Aza, se reporta que el aceite melianrol y el limonoide salanin también influyen en la alimentación de los insectos. El deactilazadiractinol, aunque se encuentra en menor cantidad, funciona como una antihormona y paraliza el sistema digestivo del insecto. El 3-deacetilsalanin y el salanol, están relacionados químicamente con el salanin y también son antialimentarios. Al actuar sobre el sistema hormonal y no sobre el sistema nervioso o digestivo, impiden que dichos insectos adquieran resistencia. A diferencia de plaguicidas químicos como el malatión o el metomilo, que llegan a ser tolerados por algunas variedades o tipos de insectos (National academy press, 1992).

### **2.3.1.2. Efecto fisiológico**

La respuesta de los insectos ante la exposición del principio activo del nim afecta al crecimiento y el proceso de muda. Los efectos fisiológicos de azadiractina actúan de manera directa e indirecta (Mordue *et al.*, 1986). La manera indirecta está relacionada con el sistema endocrino, esto tiene que ver con el bloqueo de las hormonas peptídicas morfogenéticas y alatostanina, las cuales controlan la

función de las glándulas protorácicas y los *corpora allata* o cuerpos alados la cual consiste en un par de glándulas endocrinas responsables de la biosíntesis y secreción de la hormona juvenil que controla la formación de estadios juveniles en cada muda; además de la ecdisona la hormona que regula los mecanismos de señalización de la muda y formación de nuevas cutículas y los ecdicis (acto de la extracción de la cutícula anterior). En los adultos, ambas hormonas participan en la formación de yemas en los huevos. Por ende, al actuar en el sistema hormonal interrumpe la muda, regula el crecimiento y aumenta la proporción de huevecillos estériles (INIFAP, 2004). De manera directa se da a nivel celular y tejidos ya que los insectos pueden absorber los componentes del nim como si fueran hormonas reales, por ejemplo, la azadiractina posee una estructura similar a la hormona de muda que al ser absorbida provoca la inhibición de la división celular y la síntesis de proteínas (Porcuna, 2011). De igual manera se ha reportado un efecto de parálisis flácida de los músculos, necrosis en las células del intestino y la pérdida de células regenerativas, además de evitar la producción de enzimas en el intestino (Mourde y Nisbet, 2000).

En algunas especies de insectos, afecta el proceso reproductivo de machos y hembras. Por ejemplo, en áfidos inhibe la ovogénesis y la síntesis de ecdiesteroides ováricos, por lo que previene la ovoposición. Otro de los efectos es que reduce la fecundidad de las hembras e interrumpe los procesos meióticos que son responsables de la producción de espermatozoides en los machos adultos; sin embargo, hay que aclarar que cada especie responde de manera diferente ante la exposición de dicha sustancia (Mourde y Nisbet, 2000).

#### **2.4. Insectos vectores de enfermedades**

Se conoce como vector biológico a cualquier organismo vivo con la capacidad de transportar y transmitir un patógeno a otro organismo. Las más comunes, son los insectos hematófagos que, al alimentarse de un individuo infectado, ingieren los microorganismos patógenos que posteriormente transmiten a otro individuo. Un reservorio es un organismo que aloja microorganismos patógenos que pueden

causar una enfermedad contagiosa y cuando no son controlados, pueden provocar una epidemia [World Health Organization (WHO), 2019].

Los insectos hematófagos obtienen su alimento por medio de un órgano bucal alargado que ha sufrido modificaciones para poder absorber la sangre. Este órgano consiste en una trompa llamada probóscide en donde se localizan dos tubos unidos, uno de mayor tamaño por la cual absorbe la sangre y otro más delgado con el que inoculan su saliva, generalmente provista de sustancias anestésicas que permite disminuir el dolor de la picadura. De esta manera los transmisores de enfermedades pican de una manera indolora, debido a una larga adaptación en la cadena epidemiológica: reservorio → insecto vector → hombre (Fernández-Rubio, 2000).

El comportamiento alimenticio puede ser nocturno, diurno o crepuscular dependiendo de hábitos fijos de cada especie o cada género. La mayoría de los insectos con hábitos hematófagos pertenecen al orden Díptera (moscas, mosquitos, tábanos, etc.), Siphonaptera (pulgas), Ixódida (garrapatas), Hemíptera (chinchas) divididas en dos familias: Cimicidae y Reduviidae, entre otras (Calderón *et al.*, 2004; Fernández-Rubio, 2000).

## **2.5. Características generales de la Subfamilia Triatominae**

Los triatominos son una subfamilia de hemípteros (chinchas verdaderas) caracterizados por su hábito hematófago. En América se conocen más de 100 especies, algunas de las cuales son transmisores del parásito causal de la enfermedad de Chagas. Por su comportamiento y fisiología similares, todas las especies tienen la capacidad de ser portadoras del protozoo *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, condiciones como la capacidad de adaptación del vector al hábitat humano y el alto grado de antropofilia que éste posea, lo pueden convertir en un vector efectivo de la enfermedad de Chagas en humanos (Lent y Wygodzinsky, 1979). Las especies de mayor importancia epidemiológica son las que colonizan fácilmente las viviendas de los humanos y viven en grietas de las paredes de casas rurales, en donde salen para alimentarse de los ocupantes en reposo, principalmente durante la noche (Castillo y Wolff, 2000).

Se caracterizan por presentar un aparato bucal que consiste en un labio segmentado en forma de canoa, que en los fitófagos no alcanza el primer par de coxas mientras que en los hematófagos es largo y recto. Son considerados insectos paurometábolos, es decir, de metamorfosis incompleta con base en transformaciones graduales de las formas de huevo, ninfas de cinco estadios a las formas adultas (Bar, 2009).

Los estadios ninfales y los adultos comparten los mismos hábitos alimenticios y nichos ecológicos, por lo que se considera que a partir del segundo estadio poseen el mismo potencial en la transmisión del parásito (*ídem*).

### **2.5.1. Ecotopos**

Los triatominos suelen encontrarse en diferentes ambientes o ecotopos:

Silvestre: los vectores se encuentran frecuentemente en ambientes naturales como bosques y selvas. Se alimentan de sangre de mamíferos, especialmente zarigüeyas (*Didelphys marsupialis*). Suelen encontrarse en refugios de armadillos (*Xenarthra*), en palmeras, arboles viejos y huecos, cuevas de murciélagos, montículos de piedra, en ruinas Mayas (Hernández *et al.*, 2010).

Peridoméstico: son los que se encuentran cerca o alrededor de las casas rurales en gallineros, perreras, chiqueros, entre otros y se alimentan de animales domésticos (perros, gatos, gallinas) (Quirós-Gómez *et al.*, 2017).

Intradoméstico: son aquellos triatominos que se encuentran dentro de las viviendas, cerca de los lugares donde duermen las personas que habitan la casa o animales domésticos que viven en el interior de la misma, y que finalmente llegan a alimentarse de humanos. Las ninfas tienden a cubrirse con partículas de polvo (Lent y Wygodzinsky, 1979).

### **2.6. *Triatoma dimidiata*: como principal vector del parásito *Trypanosoma cruzi* en Chiapas**

*Triatoma dimidiata* es una especie de tamaño grande y un color distintivo en el cuerpo: de píceo a negro en el conexivo y de amarillo pálido a amarillo naranja en

el corium (hemelytron). El macho mide entre 24. 5 y 32 mm y, la hembra, entre 24. 5 y 35 mm (máx. 43-50 mm). La variación morfológica entre las poblaciones de triatominos podría estar asociada con la ecogeografía, la preferencia de huésped y el hábitat (Quirós-Gómez *et al.*, 2017).

Presentan una cabeza alargada y cónica, el protórax se hace angosto hacia el frente, las alas se cruzan en forma plana sobre el dorso y tienen de dos a tres celdas en la membrana; en la orilla del abdomen presenta lo que se asemeja a placas planas a los lados de las alas, en la figura 9 se muestra las partes externas del triatomino. El macho y la hembra se diferencian en cuanto a la forma de la punta de abdomen: lobulada o aguda en la hembra y redondeada y lisa en el macho, generalmente este último es de menor tamaño (Guzmán-Marín, 1990).

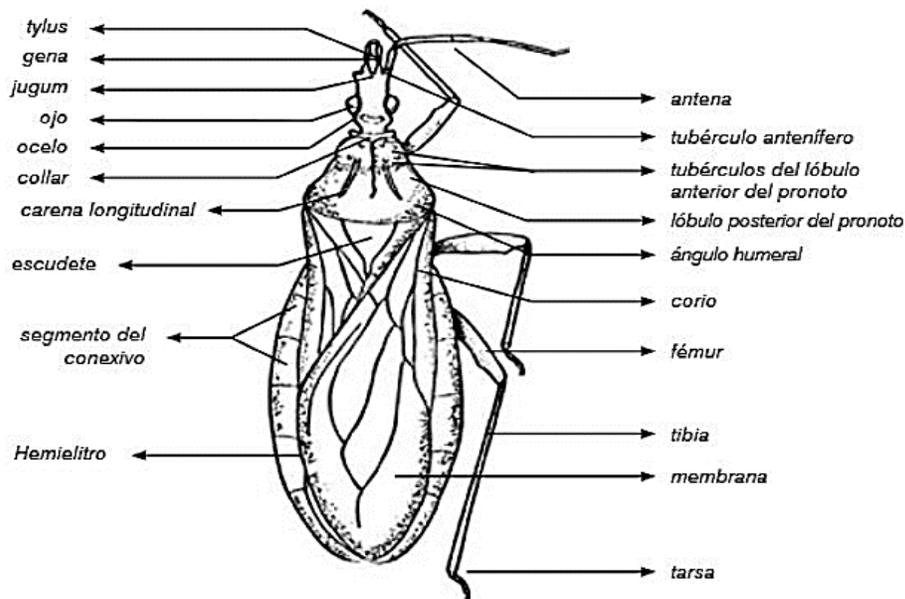


Figura 9.- Morfología externa de un triatomino vista dorsal (Fuente: Canale, 2005).

### 2.6.1. Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Subfilo: Hexapoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Género: *Triatoma*

Especie: *T. dimidiata* (Latreille, 1811).

### **2.6.2. Ciclo biológico**

El ciclo de vida de *T. dimidiata* comienza desde el huevo, pasa por cinco estadios ninfales hasta llegar a la etapa adulta (figura 10). El tiempo promedio para completar el ciclo oscila entre 5 a 12 meses, siempre y cuando las condiciones sean óptimas (Salazar *et al.*, 2005). El tiempo de vida de los adultos varía de acuerdo con el sexo; los machos viven durante 160 días, mientras que las hembras pueden vivir hasta 172 días aproximadamente con alimento disponible (Reyes-Novelo *et al.*, 2011). En los primeros dos estadios las ninfas sobreviven hasta los 25 días sin alimentarse, en el tercer y cuarto alrededor de 75 días y en el quinto puede resistir hasta casi 100 días; sin embargo, en el estado adulto solo pueden sobrevivir aproximadamente 60 días, debido a las necesidades energéticas de vuelo y reproductivas, (Moran, 2013).

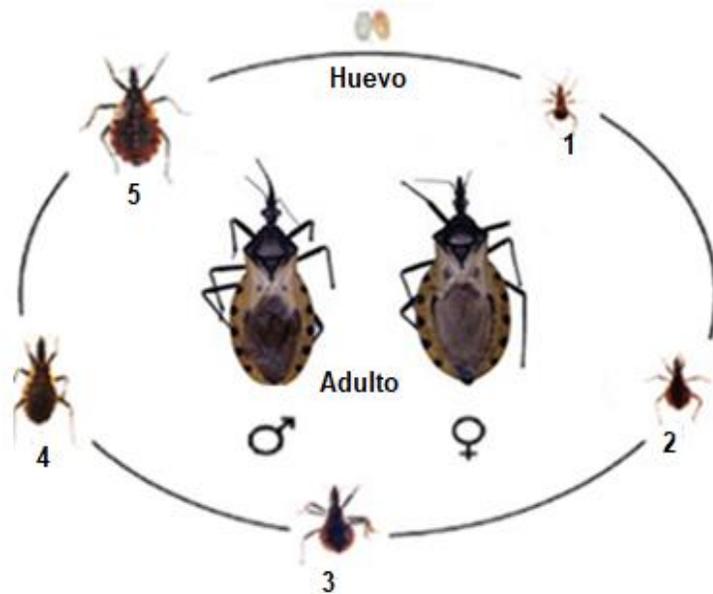


Figura 10.- Ciclo de vida *T. dimidiata* (Reyes y Angulo, 2009).

Es una especie generalista en sus hábitos alimenticios. El consumo de alimento impacta directamente en la capacidad reproductiva de esta especie y en su capacidad de colonización de nuevos ambientes. La mayoría de las hembras oviposita antes de copular, produciendo huevos infértiles (Reyes-Novelo *et al.*, 2011). Una vez que la hembra tiene alimentación y cópula, puede poner 16 huevos diarios en promedio y 1300 huevos en toda su vida reproductiva. La fertilidad de los huevos observada en esta especie es alta entre 80 y 90% de eclosión aproximadamente, por ende, tiende a tener un costo energético muy alto el cual es cobrado con alimentación abundante (hasta dos veces el peso de un individuo en promedio por cada toma de sangre), esto hace que los triatomos entren en contacto constante con sus hospederos alimenticios, incluso puede afectar la salud humana (Moran, 2013). Debido a estas características alimenticias, *Triatoma dimidiata* es considerado uno de los principales vectores del parásito *Trypanosoma cruzi* tanto en América Central y Sur de México (Gulh, 2009).

### 2.6.3. Distribución en México

México es considerado como el país latinoamericano con mayor diversidad de especies de triatomos, llegándose a encontrar hasta 35 especies y subespecies

del género *Triatoma*, 13 de ellas presentan un riesgo para la transmisión del parásito *T. cruzi* al hombre (Lent y Wygodzinsky, 1979).

*T. dimidiata* es un transmisor con un amplio rango de distribución en la República mexicana; se encuentra en 16 estados: Campeche, Colima, Chiapas, estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (figura 11). En altitudes desde el nivel del mar hasta los 2360 m (Salazar-Schettino *et al.*, 2010).



Figura 11.-Mapa de distribución de *Triatoma dimidiata* en México (Fuente: (Salazar-Schettino *et al.* 2010).

## 2.7. Situación epidemiológica en México

Debido a que *T. dimidiata* presenta una amplia distribución y facilidad de colonizar ambientes urbanos y suburbanos, las consecuencias epidemiológicas como vector de *T. cruzi* son evidentes. Las estimaciones de las tres principales formas de transmisión de la enfermedad de Chagas las cuales son: vectorial, vertical o congénita y transfusiones sanguíneas, para la República Mexicana indican que 96% de la transmisión ocurre a través del vector (Ramsey y Schofield, 2003). La transmisión, principalmente se lleva a cabo por contacto con las heces u orina

infectadas de estos insectos. Cuando el triatomino sale de noche a buscar alimento, introduce su probóscide en la piel y defecan cerca de la picadura; por donde los parásitos penetran en el orificio de la picadura. También pueden penetrar por la conjuntiva del ojo, la boca o alguna lesión cutánea abierta; después de que la persona se rasca y arrastra las heces hacia una de las zonas antes mencionadas (WHO, 2019).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera a México como uno de los países endémicos para la enfermedad de Chagas y en el 2006 estimó que 1.1 millones de personas podrían estar infectadas con *T. cruzi*. Durante el periodo de 2000 a 2007 la incidencia se mantuvo en un rango de 0.07 a 0.37 por 100 mil habitantes; a partir de 2008 ascendió de 0.61 a 0.70 por 100 mil habitantes en 2012. Los estados que presentaron mayor incidencia en el periodo de 2000-2012 fueron: Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco. La notificación de casos por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, presenta una tendencia ascendente hasta 2015, debido al registro de 53 casos retroactivos provenientes del Estado de México. Durante 2018, hasta abril, se registraron 150 casos en toda la república (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

## **2.8. Estrategias para el control vectorial**

Desde que Carlos Chagas descubrió el agente causal y modo de transmisión de la enfermedad de Chagas, sugirió que la forma de prevenir y controlar la transmisión era la modificación y mejora de viviendas en zonas rurales, en ese entonces no había programas que llevaran a cabo esa acción; los programas públicos de control de este vector empezaron a surgir hasta 20 años después de la notificación de esta enfermedad [Secretaría de Salud (SALUD), 2014]. La Organización Mundial de la Salud fundada en 1948 se encarga de planificar, aplicar y evaluar programas nacionales de vigilancia, así como de identificar los vectores y reservorios de la infección [Organización Mundial de la Salud (OMS), 1993].

En México, la enfermedad de Chagas empezó a ser reconocida en el año 1936 por Mazzotti, quien descubrió los primeros triatominos infectados

naturalmente y documentó el primer caso en 1940 en una persona indígena de Real del Carmen, Oaxaca. Desde entonces, el programa de control ha pasado por varias etapas hasta llegar a contar con un programa específico incluido en el Programa de Acción 2001- 2006 de Enfermedades Transmitidas por Vectores (incluido a su vez en el Programa Nacional de Salud 2001-2006). En 2003 fue aceptada y publicada la Norma Oficial Mexicana para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (NOM-O32-SSA2-2000) [Secretaría de salud y Organización Panamericana de la Salud (SALUD/OPS, 2003)]. A partir del 2013 se dispone del Programa de Acción Específico 2013-2018 para la Vigilancia, Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas, en donde uno de sus objetivos es: Controlar la transmisión vectorial intradomiciliaria mediante la estratificación de riesgo, el mejoramiento de la vivienda y el control químico del vector (SALUD, 2014). También debe prestarse mucha atención a la aparición de un alto porcentaje de infestación en áreas urbanas en donde antes no existía y con alturas mayores de los 2000 msnm (Guzmán-Bracho, 2001; Ramsey y Schofield, 2003).

### **2.8.1. Control de triatominos vectores mediante el uso de insecticidas**

Las intervenciones anti-vectoriales son las principales estrategias para el control de la enfermedad de Chagas. Estas intervenciones incluyen mejoras en las condiciones de la vivienda asociado con educación sanitaria a la población humana que vive en áreas endémicas de la enfermedad, así como el control a través de la fumigación con insecticida en interiores usando insecticidas sintéticos como los carbamatos, organofosforados y piretroides (Vázquez-Martínez *et al.*, 2014; Oliveira, 1997).

Para el control de los vectores de la enfermedad de Chagas en los años 50's y 60's se empleaban hidrocarburos clorinados tales como el HCH y el dieldrín; el DDT fue descartado por ser poco eficaz contra los insectos que se quería eliminar. Sin embargo, los costos operativos de los programas de rociamiento eran altos puesto que el método de aplicación del insecticida era de dos ciclos sucesivos debido a la corta duración de su acción residual (30-180

días). Por este inconveniente, se buscó otros métodos más eficaces, económicos y con un solo rociamiento. Investigaciones posteriores llevaron en 1975 a la introducción de otros insecticidas en los programas de control vectorial tales como el carbamato (propoxur), seguida de organofosforosos (diclorvos), el malatión y el fenitrotión. Desde el 1980 empezaron a utilizar los piretroides sintéticos, aunque se continúa en la búsqueda de otros insecticidas con baja toxicidad, al menor costo y con menos problema de aplicación (OMS, 1993).

Actualmente se han llevado a cabo varios estudios de campo con diferentes métodos de la aplicación de los insecticidas, cuyos resultados evidencian que el rociado convencional de insecticidas es de eficacia limitada para controlar la infestación doméstica de *Triatoma dimidiata*. En estudios piloto se ha mostrado que el uso de estrategias alternativas como el uso de mosquiteros (barreras físicas) y de cortinas impregnadas de insecticidas con efecto de larga duración (barreras químicas) se ha logrado reducir la infestación de *T. dimidiata* en las casas en un 80-95%, por al menos dos años consecutivos. Sin embargo, esta especie se dispersa de forma estacional, es decir, desde el ambiente selvático hacia los ambientes domésticos y peridomésticos. Hasta la fecha, la aspersion de insecticidas residuales resulta menos eficaz para el control de este triatominos, debido al tipo de dispersión que tiene, ya que, al ocurrir la infestación de adultos de manera estacional, el efecto del insecticida se pierde, lo que genera altos costos y pocos beneficios en la eliminación de las chinches en el interior de las viviendas al reinfestar de manera estacional (Dumonteil *et al.*, 2004; Barbu *et al.*, 2009; Ferral *et al.*, 2010).

La persistencia de algunos especímenes de triatominos, principalmente en el entorno peridoméstico, a pesar de la aplicación de insecticidas en la línea de tiempo, puede estar relacionada con el comportamiento de estos insectos. El peridomicilio presenta una amplia variedad de ecotopos que corresponden a un número infinito de escondites asociados con diferentes fuentes de alimento para *T. dimidiata*, como gallinas, perros, cerdos y gatos (Dávila *et al.*, 2015).

## 2.9. Resistencia a insecticidas

El análisis del control de vectores con insecticidas casi siempre lleva a la consideración de por qué las poblaciones de estos insectos se recuperan después de un intervalo post-aplicación, en general de algunos meses. Esto es debido de que los individuos pueden ser remanentes del tratamiento o reinfestantes de fuera (silvestres). Se han hecho estudios en campo donde demuestran que existe un aumento en el número de poblaciones de vectores resistentes a las insecticidas, lo que hace que las estrategias de control sean ineficientes (Guerreiro *et al.*, 2012).

La resistencia se define como la capacidad de un organismo de sobrevivir a la exposición de una dosis de un químico que sería letal. Es un cambio genético que sufre un organismo como respuesta a la selección por sustancias tóxicas. Cuando las poblaciones resistentes sobreviven llegan a reproducirse y dejan descendencias portadoras de los genes resistentes, este rasgo de resistencia es seleccionado en las siguientes generaciones y así sucesivamente, en cambio, aquellas poblaciones que son susceptibles a aquel insecticida son eliminados [Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2012]. O bien, puede ser que antes de la exposición de una sustancia tóxica ya existen individuos que portan una o más mutaciones de resistencia, a este proceso se le llama pre adaptación (Casida, 1980).

Existen tres factores principales que están involucrados en el surgimiento de resistencia a insecticidas: a) genéticos: esto tiene que ver con la frecuencia y número de mutaciones de resistencia, interacción entre los alelos, penetrancia, expresividad, selección, etc.; b) biológicos: se refiere a las generaciones siguientes, generación por generación, migración, etc. y c) operacionales: tipo de insecticida usada, relaciones con otros insecticidas usados previamente, residualidad, etc. Es importante tomar en cuenta la forma de aplicar el insecticida, la dosis aplicada, selección de alternativas, etc. (Georghiou y Saito, 1983).

Se considera que la resistencia a insecticidas en la familia Triatominae es una característica heredada de manera autosómica y semi-dominante. Varios autores han demostrado que la misma población de triatomíneos exhibe diferentes

perfiles toxicológicos cuando se expone a la misma clase de insecticida. Las especies de triatominos que han mostrado resistencia, tanto los huevos como ninfas, a los insecticidas sintéticos son: *Rhodnius prolixus*, *T. infestans*, *T. maculata*, *Panstrongylus herreri*, *T. brasiliensis*, *T. sórdida*, *P. megistus* y *T. dimidiata* (Reyes *et al.*, 2007; Pessoa *et al.*, 2015).

Los mecanismos involucrados con la resistencia de los triatominos a los insecticidas están relacionados con cambios en uno o varios pasos toxicocinéticos /toxicodinámicos ocurridos durante la interacción entre insecticida-insecticida, aislado o asociado, siendo: I) cambios en el local de la penetración química activa; II) aumento de su desintoxicación enzimática; y III) cambios en la acción. Existe dos tipos de resistencia, a nivel fisiológico y bioquímica; la resistencia fisiológica se asocia con una reducción en la penetración de insecticidas debido a cambios en la cutícula del insecto y / o en su capacidad para almacenar / excretar el insecticida. La resistencia bioquímica corresponde a un aumento significativo en las actividades de las enzimas de desintoxicación, especialmente las monooxigenasas y las esterasas (Brogdon y Mcallister, 1998).

Actualmente, en México no existe un programa de monitoreo de la resistencia de los triatominos a los insecticidas usados para el control de estos vectores. Es importante señalar que el monitoreo de la resistencia a los insecticidas constituye un elemento esencial para el planteamiento de los programas de manejo integral de las enfermedades transmitidas por vectores en nuestro país además que permite buscar otras alternativas tales como el uso de insecticidas naturales (Dávila, 2017).

### III. ANTECEDENTES

Los diversos estudios referentes a la actividad insecticida de *Azadirachta indica* son en gran medida dirigidos para el control de plagas agrícolas en donde los autores han utilizado las hoja, semilla y fruto del árbol en combinación con diferentes métodos de extracción de los metabolitos secundarios.

Esparza-Díaz *et al.* (2010), compararon diferentes métodos de extracción del nim y valoraron su efectividad insecticida sobre el pulgón *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera), así como posibles efectos tóxicos sobre la planta *Ixora coccinea* (Rubiaceae). El extracto oleoso produjo lesiones en 35 % del área foliar tratada y un daño medio y nivel 5 de fitotoxicidad en *I. coccinea*. Los autores encontraron diferencias significativas en la mortalidad de *A. gossypii* por tipo de extracto, tiempo y dosis, así como en las interacciones dosis tiempo y dosis tipo de extracto. El extracto con el mayor potencial insecticida fue el metanólico (0.2 mg AZA), con 100 % de mortalidad a 48 y 72 h después de la exposición.

Trinidad y Gaona (2011), evaluaron el efecto insecticida y repelente del polvo de nim en diferentes concentraciones sobre el escarabajo *Callosobruchus maculatus* F. que es una plaga de los granos almacenados del frijol caupí o de castilla (*Vigna unguiculata*). El polvo de nim no produjo efectos de mortalidad sobre *C. maculatus* en ninguna de las dosis propuestas (1, 2, 3 y 4%). Sin embargo, al 4% de polvo de nim mostró efectos repelentes sobre *C. maculatus* en los granos almacenados.

Villamil *et al.* (2012), determinaron la presencia de azadiractina en frutos inmaduros de *Azadirachta indica* y evaluaron la actividad insecticida del extracto etanólico sobre la chinche de los pastos *Collaria scenica* Stal. en tres concentraciones: 50, 150 y 250 ppm. La última concentración fue la más eficaz, exhibiendo una mortalidad del 97% y una reducción del número de exuvias y adultos al final del ensayo.

Córdova-Albores *et al.* (2013), evaluaron la capacidad insecticida de extractos fermentados de hojas de nim. Las soluciones de estiércol empleadas (fuente de microbiota exógena) fueron sin diluir, dilución 1:2, dilución 1:4 y sin estiércol. Los extractos se aplicaron a plantas de maíz. El mejor tratamiento con capacidad insecticida fue la mezcla de hojas con inóculo sin diluir.

Romero *et al.* (2015), determinaron la actividad insecticida de los extractos etanólicos de nim (*Azadirachta indica* L.), vinca rosea (*Catharanthus roseus* L.), ruda (*Ruta graveolens* L.), trinitaria (*Bougainvillea glabra* Choisy), cariaquito (*Lantana camara* L.) y yuquilla (*Ruellia tuberosa* L.) sobre los adultos de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) en condiciones de laboratorio. Los extractos de ruda y nim causaron una mortalidad de 99,1 y 95,6% a las 72 h, respectivamente.

Flinn *et al.* (2016), evaluaron el efecto del extracto a base de nim sobre la mosca blanca en el cultivo de tomate en huerto urbano en la Ciudad de Acapulco, Guerrero, México. El extracto no tuvo efecto en las moscas, debido a diversos factores, tanto ambientales como propios de la concentración natural del azaridactina en las hojas de nim.

Navarrete *et al.* (2017), determinaron el efecto de derivados del árbol de nim sobre las poblaciones de la mosca blanca *Bemisia tabaci* y sus controladores biológicos, además del efecto disuasivo de estas sustancias en la oviposición de *B. tabaci* en el cultivo de melón. Los tratamientos estudiados fueron extracto acuoso de semillas de nim en dosis de 25; 50; 75 y 100 g L<sup>-1</sup> y aceite formulado de nim (INBIO-75 R) en dosis de 2,50; 5,00; 7,50 y 10,00 mL L<sup>-1</sup>. Los autores señalan que los extractos acuosos a una dosis de 100 g L<sup>-1</sup> fue el tratamiento más eficaz.

Por otra parte, para control vectorial de enfermedades, se ha mostrado su efecto en diferentes especies de insectos, aunque son pocos los estudios relacionados con el control de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas.

González *et al.* (2013), determinaron el efecto insecticida de 7 extractos vegetales (*Azadirachta indica*, *Annona muricata*, *Caryca papaya*, *Euphorbia*

*dentada*, *Sapindus saponaria*, *Tagetes tenuifolia* y *Thuja occidentalis*) sobre larvas de *Culex tarsalis* en el laboratorio. Las concentraciones evaluadas fueron: 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 ppm y la lectura de muertos fue realizada a los 24, 48 y 72 h. Los extractos de semillas (*A. muricata*, *C. papaya* y *A. indica*) mostraron los mejores resultados al matar con 1000 ppm más de 80% de la población desde las 24 h.

Herrero (2015), evaluó el efecto insecticida de un preparado comercial de extractos de nim (*Azadirachta indica*) en tres dosis 1,6%, 3,2% y 6,4%, sobre larvas de *Phlebotomus papatasi* (insecto-vector de Leishmaniasis). Los tres tratamientos provocaron un efecto larvicida e inhibición de la emergencia de las pupas, provocando entre 98 y 100 % de mortalidad.

Sánchez *et al.* 2016, evaluaron el efecto repelente y tóxico de extractos metanólicos de neem (*Azadirachta indica*), malanga (*Xanthosoma roseum*), palo mulato (*Bursera simaruba*), anona (*Annona reticulata*) y epazote (*Dysphania ambrosioides*) en larvas, pupas y adultos de mosquito (*Anopheles* spp.). Las pruebas de repelencia mostraron un efecto superior al 80% para los extractos de epazote, nim y anona. La mortalidad de larvas y pupas fue del 100 % para el extracto de anona.

Alemán *et al.* (2016), evaluaron la actividad repelente de extractos acuosos de semillas de nim a concentraciones del 3 y 5 % contra mosquitos hembras de *Aedes aegypti* encontrando que ambas concentraciones mostraron repelencia entre 33-90%.

Morante 2019, determinó el efecto del extracto etanólico de hoja de *A. indica* sobre la viabilidad de los huevos y larvas de *Aedes aegypti* L. en laboratorio. Los porcentajes de eclosión de huevos y las concentraciones del extracto fueron: 86.65% para 0.0017 g/ml, 83.35% para 0.0034 g/ml y 73.35% para la 0.0051 g/ml. Por otro lado, la concentración de 0.0051 g/ml tuvo el promedio más bajo de eclosión (1.0) en la semana 1, en tanto que a 0.0034 g/ml y 0.0051 g/ml se evidenció una eclosión prolongada hasta la semana 4. Los porcentajes de mortalidad larval fueron de 11.65% para la concentración de

0.0017 g/ml, de 36.65% para 0.0034 g/ml y 73.35% para 0.0051 g/ml, así mismo, la concentración de 0.0051 g/ml mostró un efecto letal a las 24 h, seguido de 0.0034 g/ml a las 36 h y finalmente 0.0017 g/ml a las 48 h.

De manera reciente se han realizado algunos estudios sobre los vectores de la enfermedad de Chagas, los cuales han mostrado resultados prometedores.

Barrientos-Gutiérrez *et al.* (2016), evaluaron la repelencia mediante pruebas de confinamiento de seis extractos vegetales etanólicos en ninfas de primer instar del vector de la enfermedad de Chagas *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). Las especies botánicas consideradas para este estudio fueron chicalote *Argemone mexicana* (Papaveraceae), epazote de monte *Chenopodium graveolens* (Amaranthaceae), marrubio *Marrubium vulgare* (Lamiaceae), zoapatle *Montanoa tomentosa* (Asteraceae), nim *Azadirachta indica* (Meliaceae) y pirúl *Schinus molle* (Anacardiaceae). La evaluación implicó refugios impregnados con los extractos a varias concentraciones (100, 10, 1, 0.1, 0.001, 0.0001 y 0.00001 %), y diferentes tiempos de observación (35 minutos, dos y 24 horas). Los resultados obtenidos mostraron que los extractos de *A. mexicana*, *A. indica*, *C. graveolens* y *S. molle* son los más prometedores, con valores de repelencia superiores al 70 % en al menos dos de los tiempos de observación y concentraciones empleadas. Específicamente el extracto etanólico del nim a su concentración absoluta, obtuvo un valor promedio de 94 % de repelencia a los 35 minutos y dos horas, mientras que a las 24 horas el promedio de repelencia fue del 86 %. Al 10 % el extracto de nim obtuvo valores de mediana del 70 % a los tres tiempos registrados, mientras que la repelencia promedio al 10 % fue de 74 y 72 % a los 35 minutos y dos horas respectivamente, así mismo, a las 24 horas obtuvo un 66 %. Al 1 % el valor de su mediana alcanzó el 70 % a los 35 min y dos horas, el valor promedio de esta concentración a los dos tiempos señalados fue del 64 %, destacando por ser uno de los valores más altos a esta concentración

Barrientos *et al.* (2018), evaluaron en bioensayos de laboratorio el efecto del extracto etanólico y hexánico de la semilla de nim sobre el vector de la tripanosomiasis americana *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). El

extracto hexánico provocó una mortalidad de 47.9, 37.5, y 27.1% en las ninfas en concentraciones de 80, 60, y 30% respectivamente e inhibió la eclosión con un 62.5 y 35 % de huevos. Por otra parte, el extracto etanólico mostró un efecto de repelencia del 70% y 52% en concentraciones del 10 y 1% respectivamente.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto metanólico de hojas de *Azadirachta indica* en dos estadios y en adultos de *Triatoma dimidiata*.

### 4.2. Objetivos particulares

Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de hoja de *A. indica*.

Determinar la respuesta biológica ( mortalidad, alimentación y muda) del extracto metanólico de la hoja de *A. indica* en las ninfas del 3° y 4° estadio de *T. dimidiata*.

Determinar el efecto repelente del extracto metanólico de la hoja de *A. indica* en adultos de *T. dimidiata*.

.

## V. AREA DE RECOLECTA

### 5.1. Ubicación geográfica

El material de *Azadirachta indica* se recolectó en la colonia “Paraíso bajo”, ubicada en la 5ta poniente y libramiento norte en las siguientes coordenadas: 16°77'15” de latitud Norte y 93°12'18” de latitud Oeste del municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Limita al norte con los municipios de San Fernando y Usumacinta; al este con el de Chiapa de Corzo, al sur con el de Suchiapa y al oeste con los de Ocozocoautla y Berriozábal (figura 12). Presenta las siguientes coordenadas: 16° 45' 11” de latitud Norte y 93° 07' 56” de longitud Oeste y se ubica a una altitud de 600 metros sobre el nivel del mar. Cuenta con una extensión territorial de 334.61 km<sup>2</sup>, que representa 0.5% del territorio estatal y 18.6% de la superficie regional (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI), 2019).

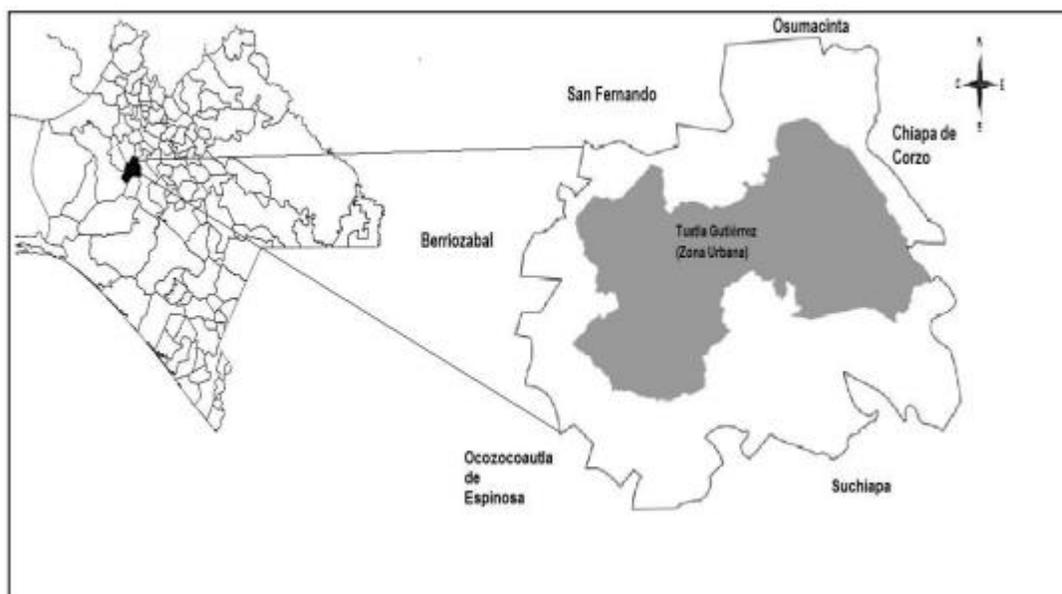


Figura 12. Mapa de ubicación del municipio de Tuxtla Gutiérrez. (Fuente: Gómez, 2014).

### 5.2. Clima

El clima del municipio es principalmente cálido subhúmedo con lluvias de verano y semicálido subhúmedo. En los meses de mayo a octubre, las temperaturas mínimas promedio son de 18 a 21°C. En tanto que las máximas promedio en este

periodo son de 30 a 33°C (80.7%). Por otro lado, durante los meses de noviembre a abril, las temperaturas mínimas promedio se distribuyen de 12 a 15°C. Mientras que las máximas promedio en este mismo periodo son de 24 a 27°C (6.97%), de 27 a 30°C (47.24%) y de 30 a 33°C (45.79%) (Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica (CEIEG), 2019).

En los meses de mayo a octubre, la precipitación media fluctúa entre los 900 mm y los 1,200 mm, y en el periodo de noviembre-abril, la precipitación media va de los 25 mm a 200 mm (*ídem*).

### **5.3. Vegetación**

La superficie municipal está distribuida en: 24.2% de vegetación secundaria (selva baja caducifolia y subcaducifolia con vegetación secundaria arbustiva y herbácea); 15.2% de selvas secas (selva baja caducifolia y subcaducifolia); 4.6% con pastizales y herbazales (pastizal inducido); 0.3% de vegetación secundaria (selva alta y mediana subperennifolia con vegetación secundaria arbustiva y herbácea) 0.23% selvas húmedas y subhúmedas (selva alta y mediana subperennifolia) que abarca 0.23% y 0.2% bosques deciduos (bosque de encino) (*ídem*).

## VI. MÉTODOS

### 6.1. Recolecta del material vegetal

En el mes de marzo del 2019, se seleccionaron las hojas verdes del árbol del nim, se envolvieron en una manta limpia y seca y se guardaron en bolsas de papel estraza. El material biológico se trasladó al laboratorio de docencia del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, en donde se lavaron con agua destilada y posteriormente colocadas en papel absorbente durante 5 días en condiciones de sombra hasta agotar la humedad. En una licuadora comercial se metieron las hojas secas hasta que se obtuvo un polvo con textura fina que permitió la extracción de los componentes químicos de la hoja.

### 6.2. Obtención del extracto de hoja de *A. indica*

Se utilizó el método de maceración en frío. Se colocaron 35 g del polvo de *A. indica* en un frasco ámbar de 500 ml y se añadieron 300 mL de alcohol metílico (metanol) al 99.9%, durante 72 horas agitándose 3 veces al día; los residuos se separaron por el método de filtración al vacío y el extracto obtenido se concentró en un rotaevaporador a 180 rpm y 40 °C. Éste extracto se dejó secar a temperatura ambiente y se guardó en una placa Petri envuelta con papel aluminio hasta su uso.

### 6.3. Identificación de los grupos de metabolitos secundarios (MS)

Se preparó una solución madre que consistió de 10 mg del extracto seco la cual se diluyó en 2 mL de agua destilada; para obtener una concentración final de 5 mg/mL del extracto. Posteriormente se colocaron 100 µL en cada tubo de ensayo para la realización de las pruebas coloridas, más dos tubos de control: control 1 (extracto+agua) y control 2 (agua+reactivo).

Las pruebas se realizaron por duplicado y de acuerdo con Sheel *et al.* (2014), los resultados se anotaron mediante un sistema de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos siguiendo los criterios de: muy abundante (++++), abundante (+++), medio (++) , ligero (+) y ausencia (-).

### **Alcaloides: Prueba con el reactivo de Dragendorff**

#### **Preparación del reactivo:**

- Solución A= 0.85 g de nitrato de bismuto, en 10 mL de ácido acético glacial en 40 mL de agua destilada.
- Solución B= 8 g de Yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada.
- Reactivo= 5 mL de solución A + 4 mL de solución B en 100 mL de agua destilada.

A un tubo de ensayo con 100  $\mu$ L del extracto se le añadió 1 mL de HCl al 10%, y dos gotas del reactivo de Dragendorff. Un precipitado marrón en el extracto indico la presencia de este metabolito.

### **Fenoles: Prueba de cloruro férrico**

A un tubo de ensayo con 100  $\mu$ L de extracto se le añadió 1 mL de etanol y tres gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 3% en etanol. La aparición de una coloración verde en el extracto correspondió a una reacción positiva.

### **Flavonoides: Prueba de Shinoda**

A un tubo de ensayo con 100  $\mu$ L de extracto se le añadió 1 mL de etanol, 3 trocitos de magnesio y 2 gotas de HCl concentrado. La reacción se observa de la siguiente manera:

- Naranja: flavonas
- Rojo: flavononas
- Rojo azulado: flavonoles
- Violeta: xantinas

Si hay presencia de clorofilas, al filtrado añadirle un volumen igual de solución de acetato de plomo al 4% que contenga ácido acético al 0.5 %, agitar, dejar reposar 15 minutos y filtrar. Con el filtrado realizar el ensayo.

### **Glucósidos: Prueba de Molish**

A un tubo de ensayo con 100  $\mu$ L extracto, se le añadió 1 mL de etanol, luego se agregaron dos gotas de alfa-naftol al 5% en etanol y 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , gota a gota

dejando resbalar por las paredes del tubo poco a poco. La formación de un anillo de color violeta en la interface indicó una reacción positiva.

### **Saponinas: Prueba de espuma**

A un tubo de ensayo con 100  $\mu\text{L}$  extracto, se le añadió 1 mL de agua destilada, se tapó y agitó vigorosamente durante 30 segundos, la aparición de espuma durante 2 minutos indicó la presencia de saponinas.

### **Taninos: Prueba para taninos hidrolizables y condensados**

A un tubo de ensayo con 100  $\mu\text{L}$  de extracto, se le añadieron 1 mL de agua y dos gotas de solución acuosa de  $\text{FeCl}_3$  al 2%. La aparición de una coloración azul indicó que se trataba de taninos hidrolizables y una coloración verde la presencia de taninos condensados.

### **Terpenos: Prueba de Salkowski**

A un tubo de ensayo con 100  $\mu\text{L}$  del extracto se le añadió 1 mL de cloroformo y 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado agregando gota a gota para formar una capa. Al formar una coloración marrón rojiza de la interface indica una reacción positiva para terpenos.

### **Esteroides: Prueba de Liebermann-Burchard**

#### Preparación del reactivo:

- Solución A= colocar 1 mL ácido acético anhídrido en 1 mL de cloroformo.
- Reactivo= Resbalar por la pared 1 gota de ácido sulfúrico a la solución A.

A un tubo de ensayo con 100  $\mu\text{L}$  de extracto se le añadió 1 mL de cloroformo y 1 mL del reactivo de Liebermann-Burchard. La reacción fue positiva para esteroides si se desarrolló una coloración azul verdoso o verde en la fase superior.

### **Lactonas-sesquiterpénicas: Prueba de Baljet**

#### Preparación del reactivo:

- Solución A= colocar 0.5 g de ácido pícrico en 50 mL de agua destilada.

- Solución B= 5 g de NaOH en 50 mL de agua destilada.
- Reactivo= solución A + solución B (Domínguez, 1988).

A un tubo con 100  $\mu$ L de extracto, se le agregó 1 ml de etanol y se agitó. Posteriormente se le añadió 1 mL del reactivo de Baljet. La presencia de una coloración roja (++) o precipitado de color rojo (+++) indicó una prueba positiva.

#### **6.4. Mantenimiento de triatominos**

El mantenimiento y reproducción (ninfas y adultos) de *T dimidiata* se realizó en el laboratorio Multidisciplinario Experimental y Bioterio, utilizando contenedores de plásticos de 12 cm de largo por 6 cm de diámetro, a una temperatura de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C, y 75 % de humedad y un fotoperiodo de 12:12. Cada 15 días se alimentaron “*ad libitum*” utilizando como fuente de sangre a ratones de la cepa Balb/c y se registraron los alimentados hasta repleción y siguiendo un código, para su reconocimiento posterior.

#### **6.5. Efecto en la mortalidad, alimentación y muda en las ninfas de *T. dimidiata***

Se formaron dos grupos de ninfas del 3° estadio, un experimental que se expuso a una concentración del extracto de nim a 500 ppm diluido en metanol al 99.9% (T1=500 ppm) y otro como control (solo metanol) (T2=0 ppm). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, donde cada repetición consistió de 20 ninfas escogidas al azar, para un total de 60 chinches por cada grupo. El mismo procedimiento para las ninfas del 4° estadio. El protocolo de exposición fue el siguiente.

Exposición directo (a): a cada ninfa del grupo experimental de 3° o de 4° estadio se le aplicó en la parte dorsal 5  $\mu$ L del extracto de hoja de nim (una sola aplicación) y para el grupo control se aplicó el diluyente (metanol al 99.9 %). Posterior a la aplicación se contabilizó el número de chinches muertas en las semanas 1, 2, 3 y 4 y se obtuvo el porcentaje de mortalidad, que corresponde a la relación entre el número de individuos muertos y el número total de individuos por 100 (Barrientos *et al.* 2018).

Además de la mortalidad, se determinó el efecto en la alimentación de las ninfas, donde se registró el número de ninfas que comieron a los 15 y 30 días posteriores a la aplicación del extracto y para determinar el efecto en la muda se contabilizó el número de exuvias producidas a partir de los 30 días y esto permitió obtener el porcentaje de ninfas que mudaron al siguiente estadio (de tercero al cuarto y de cuarto al quinto).

## **6.6. Repelencia en adultos**

Para determinar la actividad repelente del extracto se utilizaron las concentraciones de 750 ppm y de 500 ppm diluidos en metanol a 99.9 %. De acuerdo con Dadé *et al.* 2014, el papel filtro de 8.3 cm fue dividido en dos y una de las partes se impregnó con 500 µL del extracto a la concentración correspondiente y la otra mitad se dejó sin tratamiento. El papel se secó por 10 min y posteriormente se unieron ambas partes con una cinta adhesiva colocándolas en una caja Petri. Para el grupo control se utilizó metanol al 99.9%. En cada caja Petri se colocaron 5 triatominos y se realizó 5 repeticiones teniendo un total de 25 triatominos en cada tratamiento. Se registró la distribución de los triatominos sobre el papel a las 2 y 24 h. Para determinar el porcentaje de repelencia de cada bioensayo se utilizó la siguiente fórmula:

$$PR= (RC-50) \times 2$$

Donde:

PR= porcentaje de repelencia

RC= porcentaje de triatominos que se encuentran en al área sin tratar.

Los valores positivos (+) indican repelencia y valores negativos (-) indican atracción.

## **Análisis de datos**

Para el análisis estadístico de la mortalidad, alimentación y muda se realizó la prueba de t de student para muestras independientes (control y experimental). Los datos de repelencia no mostraron una distribución normal (prueba de Shapiro-wilk,  $p=0.63$ ) y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. El valor de significancia estadística se estableció cuando  $p \leq 0.05$ .

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Rendimiento del extracto e identificación de los grupos de metabolitos secundarios (MS)

A partir de un peso seco de 35 g hojas de nim, se obtuvieron 2.5 g del extracto metanólico, con una coloración verde oscuro, apariencia brillante, consistencia pegajosa, olor característico parecido al ajo y un sabor amargo (figura 13).

Peso seco (polvo)	Rendimiento del extracto metanólico	Porcentaje de rendimiento
35 g	2.5 g	8.51



Figura 13.- Extracto seco de *A. indica*.

### Alcaloides

No se observó la presencia de alcaloides, así como se puede ver en la figura 14, el tubo B (extracto+reactivo) dió una reacción negativa porque no presentó una coloración marrón, al igual que las del control (A y C). Posiblemente a que los vegetales contienen generalmente cantidades apreciables de materia grasa que impide el buen desarrollo en los procesos extractivos, produciendo emulsiones, por lo tanto, es necesario extraer primero la grasa del material vegetal seca y molida, utilizando como solventes el hexano o éter de petróleo, lo cual no se realizó.

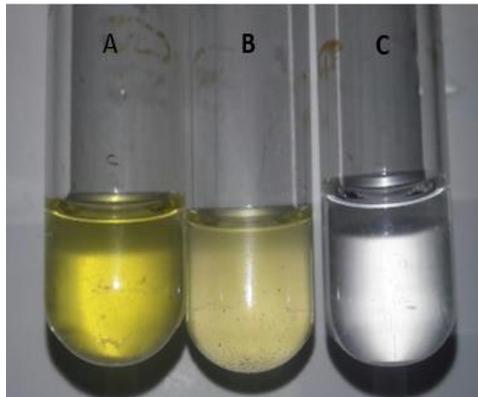


Figura 14.- Prueba de Dragendorff. A=control 1 (extracto+agua), negativa; B= extracto+reactivo, negativa y C= control 2 (agua+reactivo), negativa.

## Fenoles

En la figura 15, el tubo B (extracto+reactivo) cambió de color dando un verde-limón (reacción positiva) indicando la presencia de fenoles, a diferencia de los tubos A y C que no presentaron cambio de color. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ión cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo), lo que da una coloración verde, dependiendo de la cantidad de fenoles presentes el extracto se puede tornar de un color verde más oscura.

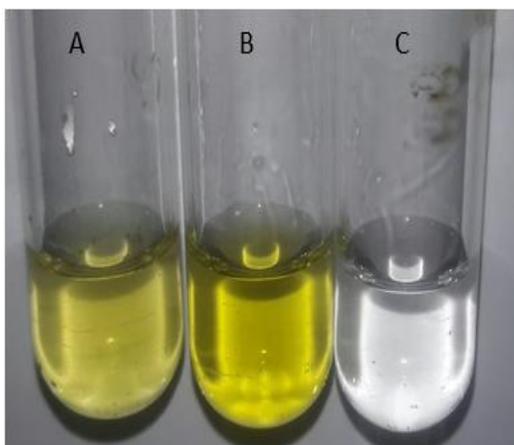


Figura 15.- Prueba de cloruro férrico. A= Control 1 (extracto+agua), negativa; B= extracto+reactivo, positiva y C=control 2 (agua + reactivo), negativa.

## Flavonoides

La reacción de Shinoda dio un resultado positivo puesto que el extracto se tornó de una coloración naranja (figura 16: B) y esto indica la presencia de flavonas, mientras que en los tubos A y C no hubo reacción. La reacción positiva se debe a la presencia de HCl concentrado y Zn o Mg como catalizadores, se genera hidrógeno que actúa sobre el anillo C (*p*-benzoquinona) dando como resultado la formación de un ión (flavilio u oxonio) que da el color desde rosa, salmón hasta magenta, naranja o rojo escarlata. Dependiendo de la concentración de flavonas, flavanonas y flavanonoles, si éstos están en mayoría, se puede ver un color verde o azulado.

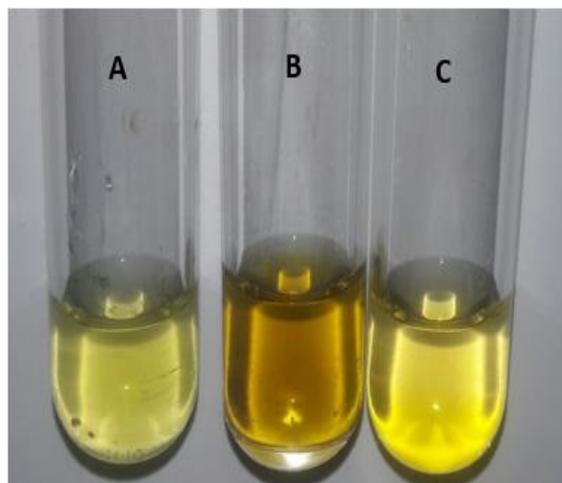


Figura 16.- Prueba de Shinoda. A= Control 1 (extracto+agua), negativa; B= extracto+reactivo positiva y C= control 2 (agua+reactivo), negativa.

## Glucósidos

Los glucósidos fueron los componentes más abundantes y posiblemente los responsables de la apariencia brillante del extracto. La prueba de Molish dió una reacción positiva como se muestra en el tubo B (extracto+reactivo) de la figura 17, donde el extracto formó un anillo de color vino-violeta, la cual indica la presencia de carbohidratos, diferentes las del tubo control (A y C), las cuales no presentaron

este color. Los glúcidos, debido a la acción del ácido sulfúrico concentrado se deshidratan formando compuestos furfúricos. Estos furfurales se condensan con el reactivo de Molish (solución alcohólica de alfa-naftol), dando un producto violeta.

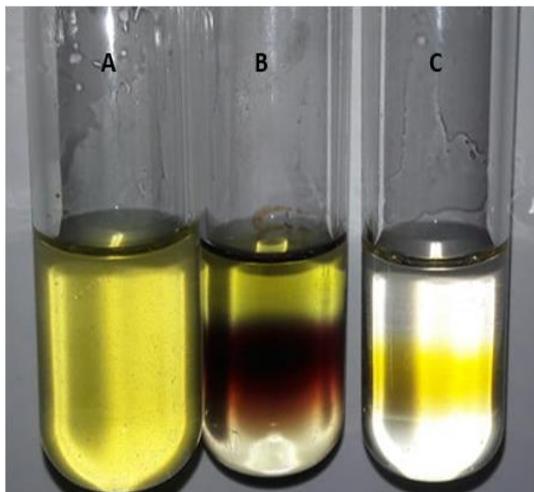


Figura 17.- Prueba de Molish. A= Control 1 (extracto+agua), negativa; B= extracto+reactivo, positiva y C= Control 2 (agua+reactivo), negativa.

## Saponinas

Las saponinas son consideradas glicósidos solubles en agua, que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua generando así la espuma, para una prueba positiva esta espuma se mantiene hasta media hora después de haber agitado el tubo. Esta prueba dió un resultado negativo, puesto que el extracto no formó ninguna espuma (figura 18, A) después de agitar, al igual que el tubo control (B), indicando la ausencia de este metabolito.

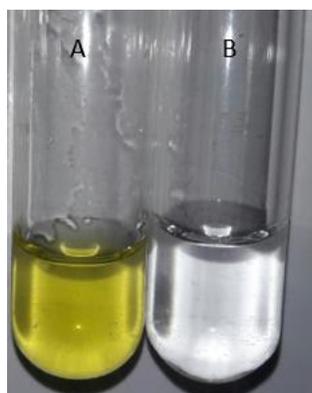


Figura 18.- Prueba de espuma. A= extracto + agua, negativa y B= control (agua), negativa.

## Taninos

El cloruro férrico reacciona con los grupos oxhidrilos (-OH) presentes en los compuestos polifenólicos y provoca un cambio de color en los extractos (azul, verde). Esta prueba dió un resultado negativo, como se muestra en la figura 19, el tubo B (extracto+reactivo) no mostró ningún cambio de color, al igual que los tubos de control (A y C), indicando la ausencia de este metabolito.

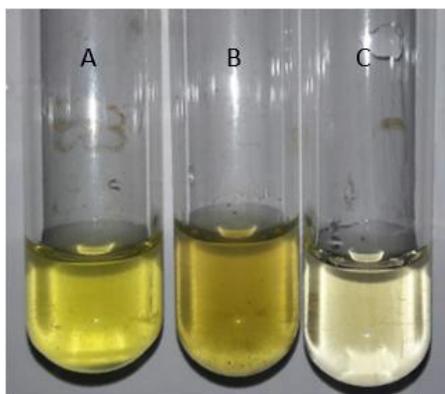


Figura 19.- Prueba de taninos. A= control 1 (extracto+agua), negativa; B= extracto+reactivo, negativa y C= control 2 (agua+reactivo), negativa.

## Terpenos

La presencia de compuestos triterpenoides insaturados provoca la formación de un anillo color rojo, café o marrón rojizo, debido a la acción del ácido sulfúrico. Este efecto se observó en el tubo B (extracto+reactivo) de la figura 20, donde se formó una coloración café en la interfase, a diferencia de los tubos control (A y C), la reacción positiva indica la presencia de este metabolito, la cual es el responsable del olor característico del extracto de hoja del nim.

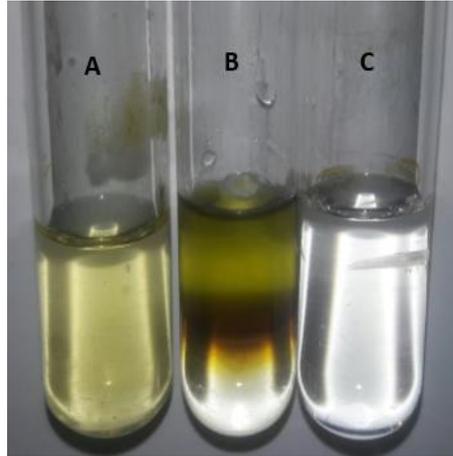


Figura 20.- Prueba de Salkowski. A= control 1 (extracto +agua), negativa; B= extracto+reactivo, positiva y C= Control 2 (agua+reactivo), negativa.

## Esteroides

Para la prueba de Liebermann-Burchard dió un resultado positivo, puesto que el extracto presentó una coloración verdosa en la fase superior (figura 21, B) donde se encuentra el medio anhidro, indicando la presencia de este metabolito. Mientras que el control 1 (A) y 2 (C) no formaron ninguna coloración en la parte superior. Esta reacción tiene que ver con la pérdida de agua y protonización del colesterol, donde los polímeros de hidrocarburos no saturados se condensan en el medio anhidro, dando esta coloración verde.

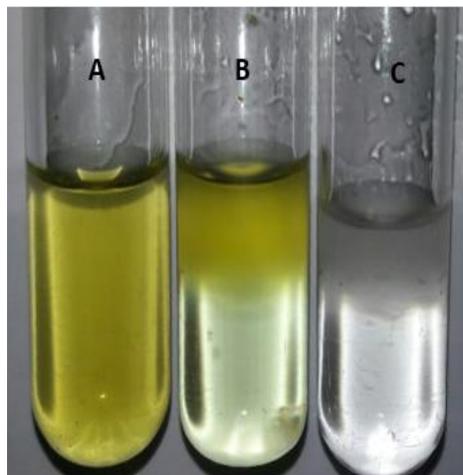


Figura 21.- Prueba de Liebermann-Burchard. A= control 1 (extracto+agua), negativa; B= extracto+reactivo, positiva y C= Control 2 (agua +reactivo), negativa.

## Lactonas-sesquiterpénicas

Las lactonas-sesquiterpénicas se caracterizan por poseer un anillo lactónico en su estructura. La prueba de Baljet se basa en la formación de un complejo entre el ácido pícrico y la lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas dando un coloración naranja o rojo oscuro. En la figura 22 se puede observar que el tubo B (extracto+reactivo) se tornó de una coloración más naranja que el tubo C (agua+reactivo), mientras que el tubo A (extracto+agua) no cambió de color. Una coloración naranja indica la presencia de este compuesto y posiblemente son los responsables del sabor amargo del extracto.



Figura 22.- Prueba de Baljet. A=control 1 (extracto+agua), negativa B= extracto+reactivo, positiva y C= control 2 (agua+reactivo), negativa.

En general, los compuestos fitoquímicos identificados fueron: fenoles, flavonoides (flavona), glucósidos, terpenos y esteroides. El compuesto con mayor cantidad presente en la hoja del nim fueron los glucósidos (++++), seguido de terpenos (+++), esteroides (+++) y flavonoides (++) (cuadro 1).

Cuadro 1.- Resultados de la prueba fitoquímica del extracto metanólico de la hoja de nim.

Grupos de metabolitos secundarios identificados	Reacción
Alcaloides	-
Fenoles	+
Flavonoides - Flavonas	++
Glucósidos	++++
Saponinas	-
Taninos	-
Terpenos	+++
Esteroides	+++
Lactonas-sesquiterpénicas	+

Criterio: ausencia (-), ligero (+), medio (++) , abundante (+++) y muy abundante (++++).

## 7.2. Mortalidad de las ninfas de *T. dimidata*

La mortalidad de las ninfas del 3° estadio expuestas a 500 ppm de extracto se registró hasta la tercera semana con un promedio de 23.33 % y 20 % en la cuarta semana; a diferencia del grupo control, donde la mortalidad fue de 11.67 % hasta la cuarta semana (figura 23), encontrando una diferencia significativa ( $p=0.002$ ) entre el grupo control (0 ppm) y experimental (500 ppm).

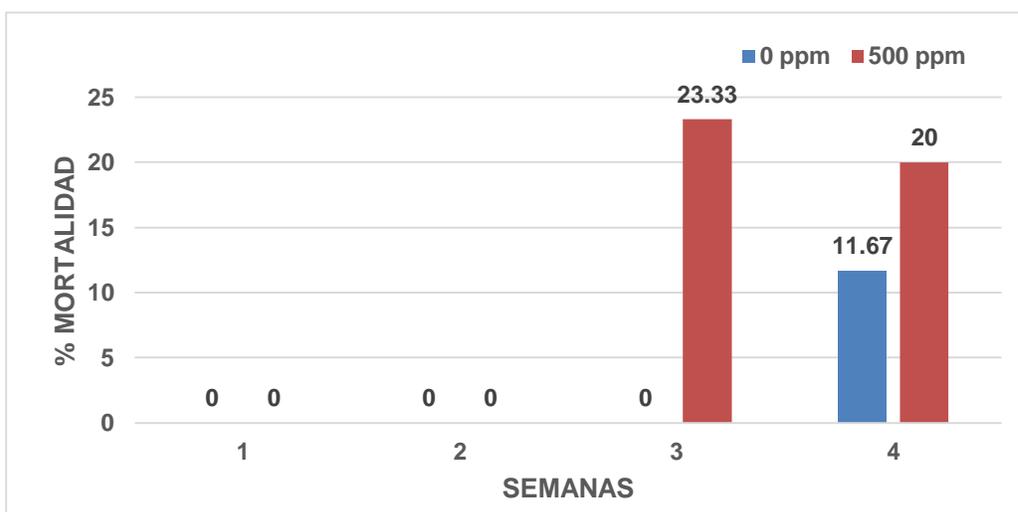


Figura 23.- Mortalidad de ninfas del tercer estadio. (3 repeticiones y n=20).

En las ninfas del 4° estadio la mortalidad fue de 13.33 % y 11.67 % en la segunda y tercera semana respectivamente y ninguna en la cuarta semana. Por otro lado, el grupo control presentó una mortalidad de 11.67 % hasta la tercera semana. No se encontró una diferencia significativa (prueba de t de student,  $p=0.07$ ) entre las concentraciones (0 ppm y 500 ppm).

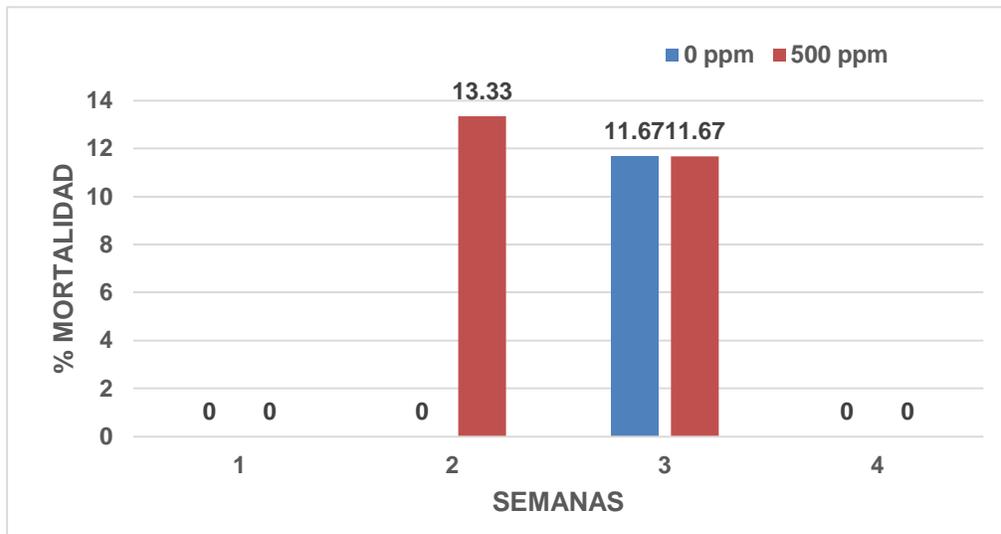


Figura 24.- Mortalidad de ninfas del cuarto estadio. (3 repeticiones y  $n=20$ ).

En la figura 25 se presenta los porcentajes de mortalidad acumulada al final de dicho periodo, siendo 43.33 % para el tercer estadio y 25 % para el cuarto, mientras el grupo control fue de 11.67 % para ambos estadios. Realizando el análisis estadístico, se encontró una diferencia estadísticamente significativa (prueba de t de student,  $p=0.002$ ) entre los grupos experimentales, así como se demuestra en la figura 26. Se puede decir que las ninfas del tercer estadio fueron más susceptibles al efecto del extracto de hoja del nim puesto que el 56.67% sobrevivió después de las cuatro semanas, a diferencia de las ninfas del cuarto estadio el porcentaje de sobrevivencia fue del 75%; mientras que el grupo control fue superior a 80% en ambos estadios (figura 25).

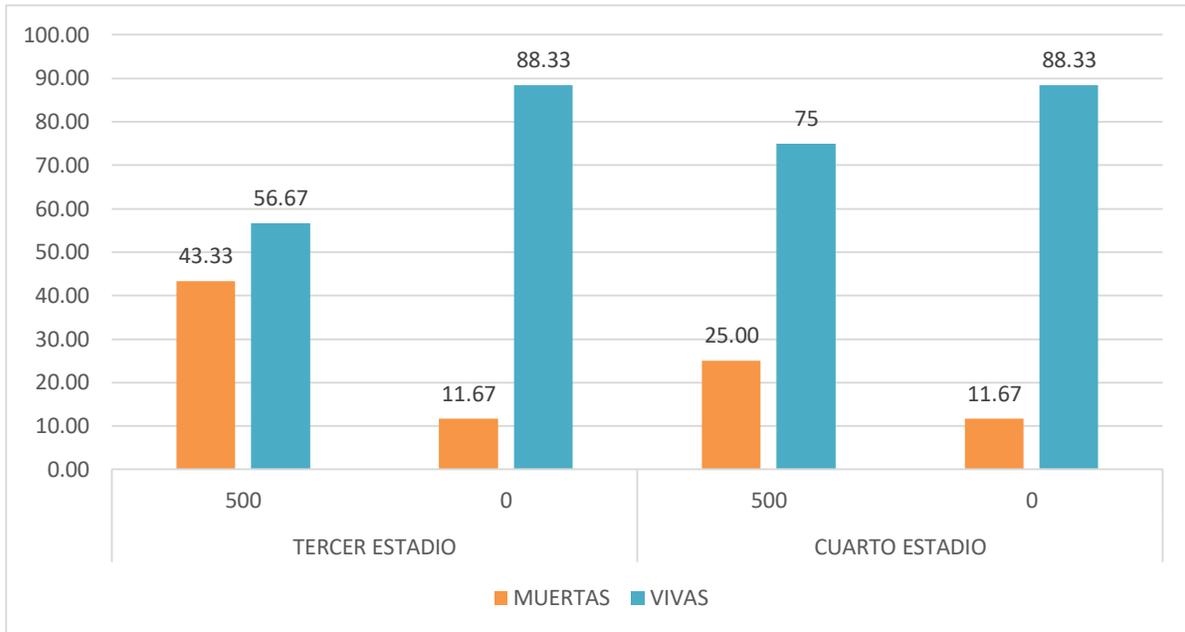


Figura 25.- Porcentaje de mortalidad vs sobrevivencia de las ninfas de *T. dimidiata* al final del periodo de observación.

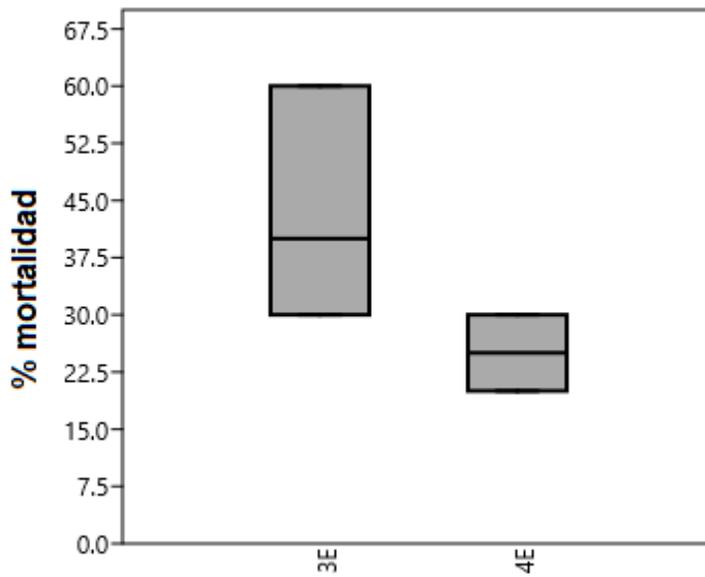


Figura 26.- Comparación de mortalidad acumulada entre las ninfas del tercer (3E) y cuarto estadio (4E).

### 7.3. Efecto en la alimentación

El 85% de las ninfas del tercer estadio expuestas al extracto comieron a los 15 días post tratamiento y este porcentaje se redujo a 56.66 % a los 30 días. Respecto al grupo control, la alimentación se mantuvo en un porcentaje superior al 80% (cuadro 2). El análisis estadístico mostró una diferencia significativa (prueba de t de student  $p=0.02$ ) a los 30 días entre los dos grupos y puede que el extracto inhibió la alimentación de las ninfas.

El porcentaje de las ninfas del cuarto estadio que comieron a los 15 días fue del 33.3% y aumento al 75% a los 30 días, diferente al grupo control (cuadro 2). Al hacer la prueba estadística se encontró una diferencia significativa (prueba de t de student,  $p=0.017$ ) a los 15 días entre el grupo experimental y el control. Prácticamente el extracto no afecto el comportamiento de alimentación en las del cuarto estadio.

Cuadro 2.- Comportamiento alimentario de los triatomíneos posterior a la aplicación del extracto.

Concentración (ppm)	Días	% alimentación	
		Tercer estadio	Cuarto estadio
500	15	85a	33.3b
	30	56.66b	75a
0	15	90a	88.33a
	30	88.33a	86.66a

(3 repeticiones y  $n=20$ , por estadio). La letra a y b indican diferencias significativas, por estadio

### 7.4. Efecto sobre la muda

Las ninfas del tercer y cuarto estadio completaron su desarrollo entre 40-75 días en promedio para ambos grupos (control y experimental). A pesar de que las condiciones de temperatura ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ) y humedad (75 %) fueron constantes, se

observó un menor porcentaje de muda en el grupo experimental en las ninfas del tercer estadio (56.6%), diferente al grupo control. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa (prueba de t,  $p=0.03$ ) entre estos dos grupos. Mientras que, en las ninfas del cuarto estadio, el porcentaje de muda fue superior al 70% en los dos concentraciones (0 ppm y 500 ppm). Por lo tanto, no se encontró una diferencia significativa (prueba de t,  $p=0.07$ ), por lo que las ninfas no se vieron afectados por el extracto de nim.

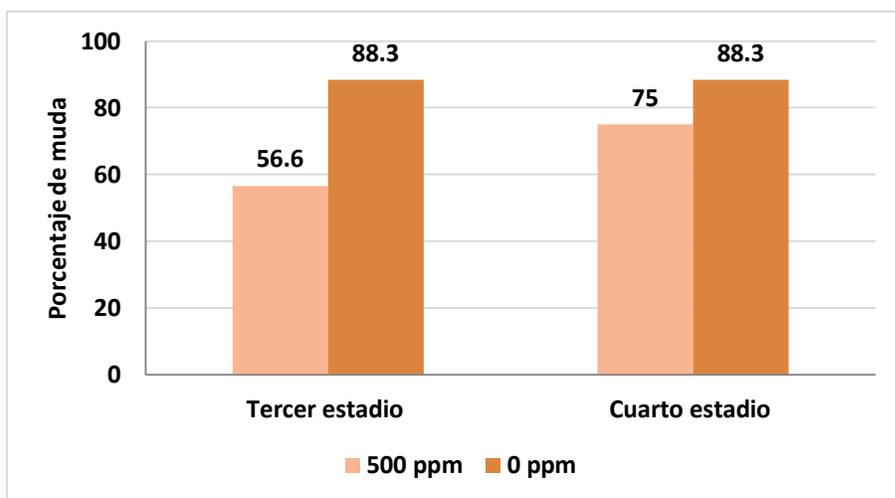


Figura 27. Porcentaje de ninfas que mudaron.

### 7.3. Efecto repelente del extracto metanólico de la hoja de *A. indica* en adultos de *T. dimidiata*

Los datos analizados estadísticamente mostraron una diferencia significativa (prueba de Kruskal-wallis,  $p=0.027$ ) sobre el efecto de repelencia con relación a las concentraciones utilizadas. La concentración de 750 ppm presentó mayor efecto de repelencia 50 y 60% a las 2 y 24 h respectivamente. Mientras que la concentración de 500 ppm presentó una menor repelencia siendo el mismo porcentaje (26%) a las 2 y 24 horas; en el grupo control no se encontró repelencia alguna (cuadro 3).

Cuadro 3.- Repelencia en adultos\*

Concentración (ppm)	% de repelencia	
	2 h	24 h
<b>750</b>	50±9.5 a	60±5 a
<b>500</b>	26±5.5 b	26±5.5 b
<b>0</b>	0±0 c	0±0 c

\*promedio de 5 repeticiones con n=5 cada una, total 25 adultos. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas.

## VIII. DISCUSIÓN

Los problemas causados por el uso excesivo de insecticidas sintéticos obligan a buscar nuevas alternativas de manejo de insectos que causan daño en la agricultura y la salud humana. Una de las alternativas es el uso de sustancias semioquímicas derivadas de metabolismo secundario de las plantas que tienen la capacidad de intervenir en la comunicación química entre organismo (Mareigani, 2001).

El rendimiento total que se obtuvo del extracto metanólico de la hoja fue 8.51%, es un porcentaje promedio (6.21%) entre lo reportado por Kurniati *et al.* (2018) y Ávalos-Soto *et al.* (2014) mayor al 12.15%. El alcohol metílico permite obtener mayor rendimiento de los extractos, porque este solvente puede extraer tanto compuestos polares y no polares, a diferencias de otros solventes.

El extracto metanólico reveló la presencia de terpenos, glucósidos, flavonoides, esteroides, fenoles, lactonas-sesquiterpénicas, similar a lo reportado por Madaki *et al.* (2016) y Priyanka *et al.* (2017). Sin embargo, Kurniati *et al.* (2018) solo identificaron esteroides, terpenoides y saponinas. Según Esparza-Díaz *et al.* (2010), el proceso de extrusión en frío con alcohol metílico produce un extracto con más constituyentes fitoquímicos y con mayor contenido del principio activo del nim (azadiractina). Aunque los resultados mostraron que en el extracto metanólico de hoja del nim se extrajo una buena cantidad de terpenos, es necesario comprobar la presencia de Triterpenoides, dado que Angulo Escalante *et al.* (2004) y Ramos *et al.* (2004) afirman que la azadiractina pertenece a esta clasificación y es el compuesto químico responsable de la actividad repelente del nim, anti alimentaria, inhibidor del crecimiento, además de otros efectos. Cabe mencionar que el principio activo del nim (azadiractina) y otros triterpenos (salanina, meliantrol, nimbina y nimbidina), se encuentra en mayor proporción en las semillas que en las hojas.

En este estudio se observó el efecto insecticida del extracto la hoja de *A. indica* en las ninfas de tercer estadio cuya mortalidad se registró a la tercera y

cuarta semana 23.33% y 20% respectivamente y en las del cuarto estadio la mortalidad con porcentajes más bajos con 13.33 % en la segunda semana y 11.67 % en tercera. Barrientos *et al.* (2018), reportó la mortalidad en las dos primeras semanas con porcentajes más altos hasta un 47.9% en la cuarta semana; utilizando extractos etanólicos sin diluir de la semilla, aun con diluciones al 80 y 60% la mortalidad fue, en ambas concentraciones, del 27.1% de mortalidad, manteniéndose durante las 4 semanas. El efecto a largo plazo, es decir, varias semanas después de la aplicación puede deberse a que la azadiractina actúa de una manera lenta por contacto que por digestión y que se debe pasar algunos días para manifestar su efectividad en los insectos (Arias *et al.* 2009; López y Estrada, 2005). También se debe a que los compuestos triterpénicos se encuentran en mayor cantidad en las semillas que en las hojas del nim.

En otras especies de insectos los resultados han sido más altos como lo reportado por Gonzales *et al.* (2013), en donde con una concentración de 1000 ppm del extracto de semilla, la mortalidad de larvas de *Culex tarsalis* fue superior al 80% desde las 24 h. Así mismo, Morante (2019) reportaron una mortalidad de 11.65% al 73.35% desde las 24 h en larvas de *Aedes aegypti* L. También se ha observado la toxicidad de los derivados del nim en otros insectos hemípteros como *Rodnius prolixus* (Alzogaray y Zerba 2016), *Nezara viridula* (Durmusoglu *et al.*, 2003) y en garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) (Nolasco *at al.*, 2018). Los bajos porcentajes de mortalidad (25 y 43.33%) registrados en las ninfas de *T. dimidiata* es debido a que los extractos del nim son más efectivos contra insectos con cutícula blanda que con cutícula gruesa. Ya que los hidrocarburos cuticulares de los triatominos, no solo están implicados para evitar la pérdida de agua letal por evaporación, sino que también participan en la comunicación química y tienen un rol relevante en evitar la fácil penetración de los tóxicos (Moriconi, 2020), además la cutícula de *T. dimidiata* se encuentra más desarrollada que de otros insectos.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto metanólico de hojas del nim tuvo efecto sobre la alimentación de las ninfas del tercer estadio puesto que el 85% comieron a los 15 días y este porcentaje se redujo a 56.6% a los 30 días. Por

el contrario, las ninfas del cuarto el 33.3% comieron a los 15 días, pero este porcentaje aumentó al 75% en la segunda alimentación. Se ha observado también el efecto antialimentario del nim en ninfas de *Rhodnius prolixus*, insecto hematófago con importancia epidemiológica (García et al. (1991), en larvas de *Spodoptera frugiperda* (Capataz et al., 2007); y *Tenebrio molitor* (Coleoptera), a concentraciones bajas (Kurniati et al., 2018). Se ha demostrado que los insectos cuando están expuestos al extracto del nim dejan de alimentarse (Morgan, 2009). Debido a que el árbol del nim *A. indica* A. Juss. contiene diversos componentes con actividad insecticida, siendo la más importante la azadiractina (AZA), y el salanin (Niir, 2004). Las cuales son unos de los triterpenos que estimulan las células disuasorias de alimentación y esto hace que los insectos pierdan el apetito y eviten comer lo que se conoce como efecto antialimentario.

El extracto de *A. indica* no retardó el proceso de muda en los dos estadios de *T. dimidiata* puesto que la muda se presentó entre 40 a 75 días en promedio, al igual que el grupo control. Estos resultados son similares a lo reportado por Reyes y Angulo (2009) que, en condiciones de laboratorio las ninfas de tercero y cuarto estadio de *T. dimidiata* completan su desarrollo entre 41 y 61 días. Sin embargo, el 56.6% de las ninfas de tercer estadio mudaron al cuarto, y el 75% del cuarto estadio mudaron al quinto. Los resultados obtenidos se deben posiblemente a la presencia de azadiractina, la cual es uno de los triterpenos que actúa como anti-muda. Su modo de acción es más efectivo contra insectos fitófagos porque ingieren directamente las plantas tratadas y actúa de una manera rápida. Por el contrario, en insectos no fitófagos, como *T. dimidiata*, la efectividad es menor porque no siempre los insectos absorben por completo la sustancia debido a la cutícula

El efecto repelente del extracto de *A. indica* en adultos de *T. dimidiata* fue significativa a la concentración de 760 ppm con un 50% y 60% a las 2 y 24 h respectivamente. El nim está catalogada como insecticida efectivo en diferentes especies de insectos, actuando como repelente. Barrientos et al. (2018) y Barrientos et al. (2016) mencionan que con extracto de semilla de nim obtuvieron una repelencia mayor al 70 % en adultos y ninfas del triatómino *Meccus*

*pallidipennis*. Falasca y Bernabé (2009), han atribuido la acción repelente de *A. indica* al salanin (o salannin) que se encuentra en hojas y semillas. Trinidad y Ganoa (2011) confirman el efecto repelente del polvo de hojas de nim contra coleópteros. El extracto de *A. indica* al poseer un olor característico al ajo, debido a la presencia de la azadiractina y el salanin, hace que los insectos se alejen de la zona impregnada.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto metanólico de las hojas de *A. indica* podría ser una alternativa para el manejo y control del vector *T. dimidiata*. Por lo que se propone realizar otros estudios más específicos para obtener mejores, utilizando otras partes del árbol del nim (*A. indica*) y con concentraciones >500 ppm.

## IX. CONCLUSIÓN

Se identificaron seis grupos de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides, glucósidos, terpenos, esteroides y lactonas-sesquiterpénicas, en el extracto metanólico de las hojas del nim (*A. indica*).

Las ninfas del tercer estadio fueron más susceptibles al extracto metanólico de las hojas del nim con una mortalidad acumulada del 43.33%.

El extracto metanólico tuvo un efecto antialimentario del 28.4% entre la primera y segunda alimentación en ninfas del tercer estadio.

El extracto metanólico tuvo efecto sobre la muda en ninfas del tercer estadio.

El extracto metanólico de la hoja de *A. indica* tuvo mayor efecto repelente a las 24 h (60%) en adultos de *T. dimidiata* a una concentración de 750 ppm.

## X. RECOMENDACIONES

Realizar otros estudios para determinar, principalmente, los compuestos triterpénicos presentes en los extractos del *A. indica* e identificar la presencia de azadiractina, puesto que es uno de los triterpenos más potentes contra los insectos.

Realizar otros métodos de extracción y solventes que permitan obtener mayor rendimiento del extracto de nim.

Evaluar el efecto insecticida de otras partes del árbol de *A. indica*, utilizando concentraciones >500 ppm tanto en ninfas y adultos de *T. dimidiata*.

Determinar el índice antialimentario (IA) para obtener resultados precisos sobre el efecto en la alimentación de las ninfas.

## XI. LITERATURA CITADA

- Almaraz-Abarca, N., Ávila-Reyes, J. A., Delgado-Alvarado, E. A., Naranjo-Jiménez, N. y Herrera-Corral, J. 2006. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/METABOLISMO%20SECUNDARIO-ALMARAZ.pdf>. Consultado el 23 de Febrero de 2019.
- Alemán, N. L., Gurdíán, X. K. y Ortiz, H. R. 2016. Evaluación in vivo de la actividad repelente de semillas *Azadirachta indica* a. juss (neem) contra *Aedes aegypti* vector de importancia en salud pública. Monografía. Facultad de Ciencias e Ingenierías. Departamento de Química. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Managua, Nicaragua.
- Alzogaray, A. R., y Zerba, N. E. 2016. *Rhodnius prolixus* intoxicated. *J. Insect Physiol.* 97: 93-113.
- Arango, G. J. 2008. Alcaloides Y compuestos nitrogenados. Facultad de química farmaceutica. Universidad de Antioquia. Medellin, Antioquia, Colombia.
- Ávalos-Soto, J., Treviño-Neávez, J. F., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Moran-Martínez, J., Serrano-Gallardo, L. B. y Morales-Rubio, M. E. 2014. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Revista mexicana de Ciencias Farmaceuticas.* 45(3):39-44.
- Ávalos, A., y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Biología Serie Fisiología Vegetal.* 2 (3): 119–145.
- Azcón-Bieto, J., y Talón, M. 2008. Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill. Madrid España. Pp. 597-623.
- Bar, M. E. 2009. Orden Hemíptera. *Biología de los Artrópodos.* 1-7 p.

- Barreto, D. 2011. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua*. Tesis de grado. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Barrientos-Gutiérrez, J. E., Zumaquero-Rios, J. L., Rodríguez-Hernández, C., Romero-Nápoles, J., López-Olguín, J. F. y Huerta-De la Peña, A. 2016. Repelencia de extractos etanólicos a ninfas de primer instar de *Meccus pallidipennis* (Stål), 1872 (Hemiptera: Reduviidae) en pruebas de confinamiento en laboratorio. *Entomologia Mexicana*. 3: 701–714.
- Barrientos, J. E., Rodríguez, C., Zumaquero, J. L., López J. F., Huerta, A. y Romero, J. 2018. Efecto de extractos de semillas de *Azadirachta indica* aplicado a *Meccus pallidipennis* (Stål) en condiciones de laboratorio. *Southwestern Entomologist*. 43 (2): 465-474.
- Barbu, C., Dumonteil, E., y Gourbière, S. 2009. Optimization of control strategies for non-domiciliated *Triatoma dimidiata*, Chagas disease vector in the Yucatan peninsula, Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 3(4): e416.
- Bronet, R. y Garrote, A. 2014. Stop a los piojos. *Farmacia Profesional*. 28 (4): 33-37.
- Brogdon, W. G. y McAllister, J. C. 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. 4(4): 605-613.
- Calderon, L., Tay, J., Sanchez, J.T. y Ruiz D. 2004. Los artrópodos y su importancia en medicina humana. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 47(5):192-199.
- Casida, J. E. 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 34: 189-202.
- Castillo, D. y Wolff, M. 2000. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*. 20 (1): 59-64

- Cervantes, R. 2008. Uso de insecticidas para el control de enfermedades transmitidas por vectores. *Entorno*. 6: 1-3.
- Coelho, A. A. M., De Paula, J. E. y Espíndola, L. S. 2006. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*. 35 (1): 133-138.
- Comision Nacional Forestal (CONAFOR), 2019. *Azadirachta indica* A. Juss. [https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/especies\\_forestales/detalles.php?tipo\\_especie=22](https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/especies_forestales/detalles.php?tipo_especie=22). Consultado el 24 de febrero del 2019.
- Comité Estatal de Información Estadística y Geográfica (CEIEG), 2019. Municipio de Tuxtla Gutiérrez. <http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/perfiles/Inicio>. Consultado el 20 de enero 2019.
- Córdova-Albores, L. C., Torres De Los Santos, R., Adriano-Anaya, M. L., Flores-Garcia, L. y Salvador-Figuerroa, M. 2013. Extractos fermentados de hojas de *Azadirachta indica* A. Juss para el combate de insectos plaga. *Que hacer Científico en Chiapas*. 8 (2): 69-79.
- Dadé, M., Daniele M., Buchamer, A., Shinella G. y Mestorino, N. 2014. Actividad repelente e insecticida de extractos vegetales sobre *Triatoma infestans*. Segundo encuentro investigadores de la RADU.
- Dai, J., Yaylayan, V., Vijaya, G. S. y Pare, J. 1999. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47: 3738-3742.
- Dávila, G. C., Albajar, P., Luiz, A. C. y Diotaiuti, L. 2015. History of insecticide resistance of Triatominae vectors. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(4):380-389.
- Dávila, J. A. 2017. Mutaciones “kdr” y enzimas asociadas a la resistencia a piretroides en triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la

enfermedad de Chagas en México. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Autónoma de Nuevo León. México.

Dumonteil, E., Ruiz-Pina, H., Rodríguez-Felix, E., Barrera-Pérez, M., Ramírez-Sierra, M. J. y Rabinovich, J. E. 2004. Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intra-domicile insecticide application in the Yucatan peninsula, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99(3): 253–6.

Durmusoglu, E., Karsavuran. Y., Ozgen, I. and A. Guncan. 2003. Effects of two different neem products on different stages of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera, Pentatomidae). *Journal of Pest Science*, 76: 151–154.

Escalante, M. A., Gardea, A. A., Vélez, R., García, R. S., Carrillo, A., Chaides, C. y López, J. 2004. Contenido de Azadiractina en semillas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. *Fitotecnia Mexicana*. 27(4): 305-311.

Engleman, E. M., González-Hernández, V. A., Ramos, C. A. y Rodríguez D. A. 2004. Variación en contenido de azadirachtina en frutos de Margosa durante su desarrollo. *Fitotecnia Mexicana*. 27(1): 81-85.

Esparza-Díaz, G., López-Collado, J., Villanueva-Jiménez, J. A., Osorio-Acosta, F., Otero-Colina, G. y Camacho-Díaz, E. 2010. Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. JUSS. *Agrociencia*. 44 (7): 821-833.

Espinoza, M. M. 1998. Factibilidad técnica-económica de las sustancias insecticidas del neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en sistemas ecológico-ambiental del sur de Sonora. Tesis de maestría. Instituto tecnológico de Monterrey. Universidad del Instituto Tecnológico y Estudios superiores de Monterrey. México.

Estrada, J., López, M. T., Puig, N., Larramendy, R., Febles, G., Hernández, J., González, E., Guerra, A. A. Dublín, D. y Benines, O. s/f. Bioderivados del nim (*Azadirachta indica* A. Juss) para el control de parásitos que afectan a los animales de cría.

- Falasca, S. y Bernabé, M. A. 2009. El árbol del Neem (*Azadirachta indica*) para controlar enfermedades endémicas en Argentina. *Revista Geográfica*. 146: 111-124.
- Fernández, rubio, F. 2000. artrópodos y salud humana. Monografía. Departamento de salud pública
- Ferro, N., Tacoronte, J. E., Montero, L. A., Cabrera, M. T. y Zaldo, A. 2005. Ecdiesteroides II. Propiedades geométricas y electrónicas: una aproximación QSAR para determinar el potencial de actividad biológica. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciencias Químicas*. 36(2): 106-114.
- Ferral, J., Chavez-Nuñez, L., Euan-Garcia, M., Ramírez-Sierra, M. J., Najera-Vazquez, M. R. y Dumonteil, E. 2010. Comparative field trial of alternative vector control strategies for non-domiciliated *Triatoma dimidiata*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82(1): 60–6.
- Flinn, R. A., García, S. y Rivas, M. 2016. Eficiencia del bioinsecticida del neem sobre la mosca blanca en el cultivo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) en huerto urbano, Acapulco, Guerrero, México. *Tlamati Sabiduría*. 7(2): 1-10.
- Galerani, M. y Kemmelmeier, C. 2005. A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 24(1): 139-148.
- García, E. S., Gonzales, M. S. y Azambuja, P. 1991. Effects azadirachtin in *Rhodnius prolixus*: data and hypotheses. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 86(11): 107-111.
- García, R. y Martínez, S. P. 2018. Elaboración de un fungicida natural a base de neem, caléndula y gobernadora. Centro educativo “CRUZ AZUL”, A.C. Lagunas, Oaxaca.
- García-Gutiérrez, C. y Rodríguez-Meza, G. D. 2012. Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*. 8 (3): 1-10.

- Gomez, C. A. 2014. Actividad biológica de *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) e identificación de sus metabolitos secundarios. Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- González, R., Flores, M., Guerrero, E., Mendoza, R., Cárdenas, A., Aguirre, L. A. y Cerna, E. 2013. Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio. *Ciencias Agrícolas*. 4 (2): 273-284.
- Guerreiro, A., Cecati, F. M., Ardanaz, C. E., Tonn, C. E. y Sosa, M. E. 2012. Variación geográfica y estacional en la composición química de *Baccharis salicifolia* Ruiz y actividad insecticida frente a *Triatoma infestans* Klug. [https://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=40991&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=2564023](https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=40991&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=2564023). Consultado el 24 de febrero del 2019.
- Guhl, F. 2009. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Biomedica*. 20: 228-234.
- Guzman-Bracho, C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in parasitology*. 17(8): 372-376.
- Guzman-Marin, E. del S. 1990. Los transmisores de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*. 1(3): 144-153.
- Georghiou, G. P y Saito, T. 1983. Pest Resistance to Pesticides. Plenum Press. New York.
- Herrero, R. 2015. Efecto insecticida de *Azadirachta indica* frente a *Phlebotomus papatasi*. Tesis de grado. Facultad de veterinaria. Universidad Zaragoza.
- Hernández, J.L., Rebollar-Téllez, E. A., Infante, F., Morón, A. y Castillo, A. 2010. Indicadores de Infestación, Colonización e Infección de *Triatoma dimidiata* (Latreille) (Hemiptera: Reduviidae) en Campeche, México. *Neotropical Entomology*. 39 (6): 1024-1031.

- Hidalgo, M. C. 2002. Obtención del aceite de semilla de nim por extracción de gasolina natural. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil. Guayaquil –Ecuador.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2004. El árbol del Nim, establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. Folleto técnico núm. 3. San Luis Potosí, México.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI), 2019. México en cifras. <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/?ag=00>. Consultado el 20 de enero del 2019.
- Kurniati, R., Saidi, N. y Nasution, R. 2018. Antifeedant activity from neem leaf extract (*Azadirachta indica* A Juss). *Natural*. 18(1): 7-10.
- Lent, H. y Wygodzinsky, P. W. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the AMNH. Bulletin of the American museum of natural history*. 163 (3): 123-520.
- Leyva, M., French, L., Pino, O., Montada, D., Morejón, G. y Marquetti, M. del C. 2017. Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Americas. *Biomédica*. 28 (3): 137-178.
- Lorrén, F., Ramirez, P., Ramirez, T., Regalado, K. y Saldarriaga, J. 2015. Diseño de una línea de producción para la elaboración de repelente natural a base de aceite de neem. Repositorio institucional PIRHUA. Piura.
- Madaki, F.M., Kabiru, A.Y., Bakare-Odunola, M.T., Mailafiya, S.C., Hamzah, R.U. y Edward, J. 2018. Phytochemical and proximate analyses of methanol leaf extract of neem *Azadirachta indica*. *European Journal of Medicinal Plants*. 15(2): 1-6.
- Mareggian, G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo integrado de Plagas*. 60(1):22-30.

- Martínez-Romero, A. Ortega-Sánchez, J. L. Hernández-González, S. L. Olivas-Calderón, E. H. y Alba-Romero, J. J. 2016. Application of neem tree in agriculture, industry, medicine, and environment: a review. *Traditional Complementary and Alternative Medicine*. 13 (2): 191-198.
- Mordue, (Luntz), A. J., Evans, K. A. y Charlet, M. 1986. Azadirachtin, ecdysteroids y ecdysis en *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 85: 297-301.
- Mordue, A. J., Simmonds, M. S. J., Ley, S., Blaney, W. M., Mordue, W., Nasiruddin, M. y Nisbet, A. J. 1998. Acciones de azadiractina, un aleloquímicos planta, contra los insectos. *Pesticide Science*. 54: 277-284
- Mourde, A. J. y Nisbet, A. J. 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Entomology Brasil*. 29(4): 615-632.
- Morán, A. E. 2013. Ficha Técnica de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). *Bioma*. 37-39.
- Morante, P. M. 2019. Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762 en laboratorio. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Escuela profesional de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Piura. Piura, Perú.
- Morgan, E., Jarvis, A. y Jonesa, G. 2000. Ratio of products formed on photo oxidation of the neem triterpenoids nimbin and salannin. *Arkivok*. 1(3): 312-319.
- Morgan, D. 2009. Azadirachtin a scientific gold mine. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*. 17: 4096–4105.
- National academy press. 1992. Neem: A tree for solving global problems. Ed. National academy of sciences. Washington D.C.

- Navarrete, B., Valarezo, O., Cañarte, E. y Solorzano, R. 2017. Efecto del nim (*Azadirachta indica* JUSS.) sobre *Bemisia tabaci* Gennadius (hemiptera: aleyrodidae) y controladores biológicos en el cultivo del melón *Cucumis melo* L. *Ciencias de la Vida*. 25(1):33-44.
- Nayan, K. y Upadhyay, V. 1997. Development & Ecological role of Neem in India. India Institute of Public Administration. New Delhi.
- Niir Board. 2004. Handbook on Neem and Allied Products. National Institute of Industrial Research. New Delhi, India. 478 p.
- Nolasco, G., Albarrán, E. y Rosales, M. 2018. Efecto del extracto acuoso de Neem (*Azadirachta indica*) en el control de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en perros. *e-CUCBA*. 9:1-8.
- Oliveira, A. M. 1997. Uso de nuevas herramientas para el control de triatomíneos en diferentes situaciones entomológicas en el continente americano. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 30(1):41-46.
- Ogbuewu, I. P., Odoemenam, V. U., Obikaonu, H. O., Opara, M. N., Emenalom, M. C. Uchegbu, O. O., Okoli, I. C., Esonu, B. O. y Lloeje, M. U. 2011. The growing importance of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in agriculture, industry, medicine and environment. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 230-245.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 1993. Control de la enfermedad de Chagas. WHO library. Buenos aires, Argentina.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2012. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas.
- Parrotta A, Chaturvedi A. 1994. *Azadirachta indica* A. Juss. neem, margosa Meliaceae. Mahogany family. *Agridyne Technologies*. 65-72.

- Parraga G. 2016. El neem como planta de usos múltiples en el bosque seco tropical del ecuador. En: Desarrollo Local De Las Comunidades Agrícolas Rurales. Universidad ECOTEC. Samborondón – Ecuador
- Pastorino, M. 2009. Bases genéticas de la resistencia de los árboles a las plagas. En: Villacide J. y Corley J. Manejo Integrado de Plagas Forestales. INTA. Buenos aires, Argentina
- Perera, D. R., Armb, G. y Senanayake, N. 2000. Efecto de antialimentadores sobre polilla de la col (*plutella xylostella*) y su parasitoide *Cotesia plutellae*. *Administrar Plagas* . 56: 486-490.
- Pérez, E. 2012. Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*. 6 (1): 51–59.
- Pessoa, G. C., Dávila, V., P. Albajar, R., Aline, C. L. y Diotaiuti, L. 2015. History of insecticide resistance of Triatominae vectors. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48 (4):380-389.
- Pijoan, M. 2004. El neem, la farmacia de la aldea. *Ámbito Farmacéutico Etnofarmacia*. 23(5): 128-133.
- Porcuna, J. L. 2011. Aceite de Neem: Azadirachtina. Ficha técnica. Insumos. N° 3.
- Promoción del Desarrollo Sostenible/Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación (IPES/FAO). 2010. Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana.
- Priyanka, S., Dixit, S. y Sahoo, S. 2017. Phytochemical and biochemical characterizations from leaf extracts from *Azadirachta Indica*: an important medicinal plant. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 6(2):1-4.
- Quirós-Gómez, O., Jaramillo, N., Angulo, V. M. y Parra-Henao, G. 2017. *Triatoma dimidiata* en Colombia; distribución, ecología e importancia epidemiológica. *Biomédica*. 37:274-285.

- Ramos, A. 2017. Elaboración a base de hojas de neem (*Azadirachta indica*) y evaluación de su potencial hipoglucemiante. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos. Universidad autónoma agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. México.
- Ramsey, J. M. y Schofield, C. J. 2003. Control of Chagas disease vectors. *Salud Publica mexicana*. 45 (2): 123-128.
- Reyes, M. y Angulo, V. M. 2009. Ciclo de vida de *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811 (Hemiptera, Reduviidae) en condiciones de laboratorio: producción de ninfas para ensayos biológicos. *Biomédica*. 29: 119-126.
- Reyes, M., Angulo, V. M. y Sandoval, C. M. 2007. Efecto tóxico de b-cipermetrina, deltametrina y fenitrotión en cepas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae). *Biomédica*. 27(1): 75-82.
- Reyes-Novelo, E., Ruíz-Piña, H., Escobedo-Ortegón, J., Rodríguez-Vivas, I., Bolio-González, M., Polanco-Rodríguez, Á. y Manrique-Saide, Pablo. 2011. Situación actual y perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y olvidadas en la península de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14 (1): 35-54.
- Romero, R., Morales, P., Pino, O., Cermeli, M. y González, E. 2015. Actividad insecticida de seis extractos etanólicos de plantas sobre mosca blanca. *Protección Vegetal*. 30: 11-16.
- Rojo-Medina, J., Ruiz -Matus, C., Salazar-Schettino, P. M. y González-Roldán, J. F. 2018. Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica de México*. 154:605-612.
- Salazar-Schettino, P. M., Rojas-Wastavino, G. E., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres M. I., Martínez-Ibarra, J. A., Monroy-Escobar, M. C., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M. O., Ruiz-Hernández, A. L. y Torres-Gutiérrez, E. 2010. Revisión de 13 especies de la familia Triatominae

- (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 1(1):57-80.
- Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I. Cabrera-Bravo, M., De Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. A. y Perera-Salazar, M. G. 2016. Enfermedad de Chagas en México. *Facultad de Medicina de la UNAM*. 59 (3): 1-16.
- Saldaña, L. 1999. Impacto ambiental del árbol de neem *Azadirachta indica* A.Juss en el sur de Sonora. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Universidad tecnológica de Monterrey. Monterrey. México.
- Sánchez, N. del C., Hernández, E., Nila-Ménde, A. G. y Gabino, F. J., .2016. Efecto repelente y biocida de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Xanthosoma roseum*, *Bursera simaruba*, *Annona reticulata* y *Dysphania ambrosioides* sobre *Anopheles* spp. *Ingeniantes*. 1(1): 2-7.
- Secretaria de salud y Organización Panamericana de la Salud (SALUD/OPS). 2003. Taller nacional de vigilancia epidemiológica, prevención y control de la enfermedad de Chagas en Mexico. Huatilco, Oaxaca, México.
- Secretaria de salud (SALUD). 2014. Prevención y control de la Enfermedad de Chagas 2013-2018. D. F., México.
- Soni, H., Mishra, K., Sharma, S. y Singhai, A. K. 2012. Characterization of Azadirachtin from ethanolic extract of leaves of *Azadirachta indica*. *Journal of Pharmacy Research*. 5(1):199-201.
- Sheel, R., Nisha, K. y Kumar, J. 2014. Preliminary phytochemical screening of methanolic extract of *Clerodendron infortunatum*. *Journal of Applied Chemistry*. 7(1): 10-13.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2007. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. USA.

- Traverso, M. 2019. Detoxificación de insecticidas en triatominos: un enfoque transcriptómico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata.
- Trinidad, V. L. y Gaona, E. F. 2011. Acción insecticida y repelente del Neem sobre adultos de *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) en granos de poroto (*Vigna unguiculata*). *Investigacion Agraria*. 13 (2): 107-111.
- Valle, C. 2012. Los valores interiores menos conocidos de las plantas: poliaminas y metabolitos secundarios. *Encuentros en la biología*. 5 (138-139): 33-34.
- Vazquez-Martinez, M. G., Cirerol-Cruz, B. E., Torres-Estrada, J. L. y Rodríguez, M. H. 2014. Potential for entomopathogenic fungi to control *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of Chagas disease in México. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 47(6):716-722.
- Villamil, D. A., Naranjo, N. y Van, M. A. 2012. Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* Stal (Hemiptera: Miridae). *Entomo Brasiliis*. 5 (2): 125–129.
- Villavicencio-Nieto, M. A., Pérez-Escandón, B. E. y Gordillo-Martínez, A. J. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*. 30: 193-238.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M. y Martínez-Escudero, E. 2015. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*. 64(2):1-21.
- World Health Organization (WHO). 2019. Vector borne diseases. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Consultado el 20 de agosto de 2019.
- World Health Organization. 2019. Chagas disease (American trypanosomiasis). [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Consultado el 22 de septiembre de 2019.

