



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGÍA

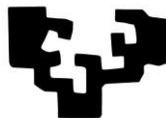
TRABAJO DE FIN DE GRADO

EFECTO DEL METOPRENO SOBRE LA METAMORFOSIS DE LA CUCARACHA, BLATTELLA GERMANICA

MIRIAM DÍEZ DÍEZ

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

RESUMEN

La alta resistencia a los insecticidas convencionales es un factor de gran importancia en el control de las plagas de cucarachas. Con el objetivo de encontrar un método de acción alternativo contra las mismas, se evaluó la efectividad de un análogo de la hormona juvenil, el cual, además, no era perjudicial para el medio ambiente. Se realizó un estudio con una colonia de *Blattella germanica* (Dyctyoptera: Blattellidae). Esta fue tratada con 5 concentraciones diferentes de metopreno y *Frontline Combo*® (insecticida convencional que contiene metopreno), suministradas a través de superficies de reposo a ninfas en V estadio larvario, con el objetivo de determinar su efecto sobre el fenotipo, porcentaje de esterilización y demora de la eclosión de la ooteca, así como el establecimiento de la dosis más apropiada para el uso comercial. Se observaron efectos morfogénicos con las concentraciones más altas de metopreno y mediante una aproximación Probit se obtuvieron valores de $EC_{50} = 18,914 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $EC_{10} = 1,947 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Además, se calcularon el $NOEC = 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $LOEC = 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Asimismo, se apreció una reducción altamente significativa en la fertilidad de los individuos tratados al aumentar la concentración del metopreno, obteniéndose un porcentaje de 100% de esterilidad con la concentración más alta ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). La aplicación del producto *Frontline Combo*® sobre ninfas de *Blattella germanica* mostró su efecto letal a las 96 horas.

Palabras clave: *Blattella germanica*, metopreno, análogo de hormona juvenil, insecticidas biorracionales, ninfa, ooteca.

SUMMARY

Widespread resistance to conventional insecticides is likely to be a major factor in cockroach infestation control. In order to identify an insecticide with an alternative mode of action that is effective against those, a juvenile hormone analogue was evaluated. We carried out a study with a colony of *Blattella germanica* (Dyctyoptera: Blattellidae), which was treated with 5 different concentrations of methoprene and *Frontline Combo*® (a conventional insecticide containing methoprene). Those were supplied to 5th insthar nymphs through resting surfaces with the aim of determining their effect on phenotype, sterilization percentage and delay of the ootheca hatching, as well as the establishment of an optimum dose for commercial use. Results show morphogenetic effects on the maximum concentrations of methoprene and by means of a Probit approximation $EC_{50} = 18,914 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $EC_{10} = 1,947 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ were obtained. $NOEC = 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $LOEC = 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ were also calculated. A significantly high reduction of fertility was seen as the concentration level of methoprene increased. In the highest concentration ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) it was reached a 100 % of sterility. Lethal effect of the application of *Frontline Combo*® to nymphs of *B. germanica* was seen 96 hours after its use.

Key words: *Blattella germanica*, methoprene, juvenile hormone analogue, biorrational insecticides, nymph, ootheca.

INTRODUCCIÓN

Los insectos son numéricamente el grupo más grande del reino animal. El número total de especies varía según el autor, pero podría estimarse entre unos 6 y 10 millones (Erwin, 1997). A esto se le añade su gran capacidad de reproducción y su facilidad de colonización, ya que son los animales que mejor se adaptan a los diferentes sistemas de vida. Su incidencia sobre la actividad humana es muy importante, siendo en algunos casos beneficiosa, como su contribución al mantenimiento de sistemas ecológicos, constituyendo el alimento de muchos animales superiores. Pero también hay que mencionar los perjuicios que causan a la especie humana, ya que son los principales transmisores de peligrosas enfermedades como el paludismo, causado por diversas especies de mosquito del género *Anopheles* (Castro, *et al.*, 2007). Las cucarachas (*Blattellidae*) también están ligadas a la transmisión de numerosas enfermedades infecciosas como la disentería o la gastroenteritis, pero sobre todo son causantes de graves problemas de alergia y asma (Gao, 2012).

Con la agricultura y la introducción de nuevas especies lejos de sus lugares de origen, el hombre ha provocado un desorden en la naturaleza que ha favorecido al ataque de enfermedades e insectos. Esto ha traído considerables pérdidas socioeconómicas y ecológicas provocadas por las plagas. Entre las que mayores pérdidas han supuesto, podríamos mencionar la del escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) en Europa o la de la mosca blanca de los cítricos (*Aleurothrixus floccosus*) en España (Soto, *et al.*, 2002). La cucaracha *Blattella germanica* también resulta ser un gran problema en la actualidad, tanto por los perjuicios que causa en la salud como por los daños que ocasiona en los productos almacenados (Rust, *et al.*, 1995). A pesar de los considerables esfuerzos que se realizan en el mundo para lograr su control, su capacidad para desarrollar resistencia frente a los insecticidas convencionales justifica la necesidad de buscar nuevos métodos de control de esta plaga (Aguilera, *et al.*, 2001). Este es precisamente el tema que más adelante abordaremos en este trabajo.

El consumo actual de insecticidas en el mercado español se cifró en el año 2005, según el Anuario de Estadística Agroalimentaria que se elabora en la Secretaría de Estado de Medio Rural y Agua del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, en 200 millones de euros. Según los datos facilitados por la AEPLA (Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas), en 2003 se emitieron un total de 21982 toneladas de insecticidas, destacando Andalucía (8.978 tm), Comunidad Valenciana (3.847 tm) y Castilla y León (3.516 tm) como principales zonas.

Existen muchos métodos de lucha contra los insectos, según se usen productos químicos o no. Entre los que no comportan la utilización de dichos productos se incluyen los métodos culturales y los métodos de destrucción física, conocidos y utilizados por el hombre desde la antigüedad (Belles, CSIC, 1988). Los avances de la ciencia y la industria química en el siglo XIX, junto con el descubrimiento del DDT de Müller en 1939 (Palumbi, 2001) abrieron las puertas e hicieron posible la

aparición de nuevos insecticidas denominados insecticidas convencionales (o de síntesis). Los más utilizados son los siguientes (Devine y Furlong, 2007):

- Moduladores de los canales de sodio (organoclorados, piretroides y piretrinas): interfieren en los canales de sodio en la membrana nerviosa interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas de los insectos (Zlotkin, 1999). A pesar de su alta efectividad sobre los insectos, resultan perjudiciales para la especie humana, ya que en concentraciones más elevadas también afectan a sus canales de sodio.
 - o Ejemplos: DDT, Alletrin, Deltametrina.
- Inhibidores de acetilcolinesterasa (carbamatos y organofosfatos): bloquean la acción de la enzima acetilcolinesterasa, interrumpiendo la transmisión de impulsos entre las células nerviosas. En concentraciones elevadas afectan a las sinapsis químicas en la unión neuromuscular de los humanos (Hill, *et al.*, 2004).
 - o Ejemplos: Carbaril, Malation.
- Antagonistas del canal de cloruro regulado por GABA (ciclodieno organoclorados y fenilpirazoles): interfieren en los canales de cloruro en la membrana nerviosa, interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine y Furlong, 2007). En concentraciones elevadas afectan perjudicialmente a la especie humana.
 - o Ejemplos: Fipronil, Clordano,

Todas estas sustancias anteriores, al ser ingeridas, inhaladas o depositadas sobre los insectos causan su muerte. Con todos estos insecticidas se empezaron a obtener resultados más eficaces, pero pronto comenzaron a aparecer problemas derivados de su utilización masiva. Uno de los primeros que se observó fue la resistencia que desarrollaron los insectos frente a ellos. Se ha descrito la resistencia como la respuesta atenuada de una población de especies a un agente enemigo como consecuencia de su aplicación. Se podría decir que las resistencias se desarrollan mediante tres mecanismos principales: debido a una reducción en la absorción del producto, como consecuencia de un aumento en la metabolización del insecticida por medio de esterasas, oxidasas, etc., o, por último, debido a una modificación en las células-diana con las que interacciona el insecticida. No obstante, en algunos casos las resistencias residen en un origen molecular. Estas además se transmiten a los descendientes (Mutero, *et al.*, 1994). Así, un insecticida que *a priori* es potencialmente eficaz, acaba siendo inservible a largo plazo. Por otro lado, como consecuencia del uso indiscriminado de los insecticidas de síntesis, se observaron desequilibrios ecológicos en los ecosistemas agrícolas y aparecieron nuevas plagas. A la vista de los inconvenientes, los organismos públicos reglamentaron rigurosamente el uso

de estos plaguicidas, al mismo tiempo que se buscaban otras alternativas frente a ellos. Actualmente se sigue modificando la normativa antes vigente para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, (Real Decreto 1311/2012. BOE).

En los últimos 20 años se han incorporado nuevas materias activas, lo que se conoce como “insecticidas de nueva generación” o “insecticidas biorracionales” cuya estrategia de investigación se basa en un buen conocimiento de aquellos procesos fisiológicos o mecanismos de comunicación específicos de los insectos, y en la obtención de agentes capaces de perturbarlos (Belles, CSIC, 1988). Los productos que se han comercializado hasta el momento se dividen en diferentes grupos (Devine y Furlong, 2007):

- Análogos de la hormona juvenil (HJ) y de la muda (HM) (RCI = Reguladores del Crecimiento de los Insectos). Los primeros actúan sobre el desarrollo de los insectos, alterando la fisiología reproductiva normal, y los segundos bloquean los mecanismos de la ecdisis ya que interfieren en la síntesis de la quitina (Castro, *et al.*, 2007; Mamatha, *et al.*, 2008)
- Inhibidores de la formación de la cutícula (RCI): interfieren en la formación de la nueva cutícula del insecto (Viñuela, *et al.*, 1991).
- Feromonas: son las sustancias químicas secretadas por los insectos con el fin de provocar comportamientos específicos en otros individuos. Se usan feromonas sexuales con el objetivo de dificultar el apareamiento desorientando a los individuos (Belles, CSIC, 1988).
- Insecticidas que evitan la eclosión de los huevos
- Insecticidas biológicos (plaguicidas microbianos): aquellos cuyo ingrediente activo son los microorganismos, por ejemplo, *Bacillus thuringiensis*. Estos microorganismos producen unas inclusiones cristalinas que dañan gravemente el tejido intestinal de los insectos (Höfte y Whiteley, 1989; Álvarez, *et al.*, 2009).

Todos estos insecticidas se caracterizan por su actividad más específica hacia las plagas, por su baja toxicidad para el hombre y otros organismos beneficiosos y por ser biodegradables y menos propensos al desarrollo de resistencia por los insectos. Todo esto reduce su impacto sobre el medio ambiente y los hace compatibles con los demás elementos del ecosistema permitiendo que sean utilizados en Programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Devine y Furlong, 2007; Aguilera, *et al.*, 2001).

Entre todos estos insecticidas biorracionales, los reguladores del crecimiento de los insectos han sido muy utilizados en las últimas décadas como una de las alternativas más promisorias al uso de insecticidas convencionales. Varios de ellos han sido registrados por la EPA (United States Environmental Protection Agency): S-Hidropreno, S-Kinopreno, Fenoxicarb, Metopreno... (Ware y

Whitacre, 2004). Estos actúan desequilibrando las concentraciones de las hormonas naturales durante los procesos de crecimiento y desarrollo, provocando deformidades e impidiendo la emergencia adulta (Dhadialla *et al.*, 1998).

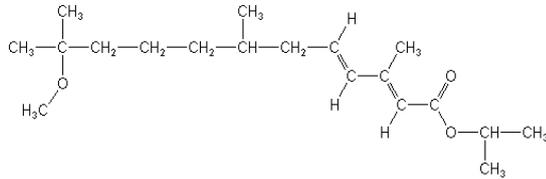


Ilustración 1: 1-metiletil (2E,4E)-11-metoxi-3,7,11-trimetil-2,4-dodecadienoato. Fórmula química del metopreno.

catalogando al metopreno en esta última.

El metopreno (*Ilustración 1*) es un análogo de la hormona juvenil (HJ) y es muy usado en EE.UU como insecticida ya que interfiere en el desarrollo normal de los insectos. La EPA (<http://www.epa.gov/>) reconoce cuatro categorías de toxicidad de los plaguicidas (I= altamente tóxico, II= moderadamente tóxico, III= ligeramente tóxico y IV= prácticamente no tóxico),

Los insectos, al igual que el resto de los artrópodos, tienen un esqueleto externo y duro, denominado exoesqueleto. Este exoesqueleto confiere al animal una estructura determinada, pero que le impide aumentar de tamaño de forma continuada. Por este motivo, para desarrollarse y alcanzar el estado de adulto, el insecto debe liberarse de su exoesqueleto mediante un complejo mecanismo denominado muda o ecdisis. La muda tiene lugar de un estadio larval a otro, y en el control de la misma intervienen células neurosecretoras y glándulas secretoras encargadas de la liberación de diferentes hormonas implicadas en el desarrollo (Gardiner, 1978). Aparecen dos tipos de glándulas, los cuerpos alados (*corpus allatum*) que liberan la hormona juvenil, y la glándula protorácica, que sintetiza ecdisona, la hormona responsable de la muda (*Ilustración 2*).

El estímulo que dispara el proceso de la muda es la presión que ejercen los tejidos sobre la pared del cuerpo cuando se alcanza la máxima capacidad del exoesqueleto. Las células neurosecretoras liberan ecdisotropina a la hemolinfa y esta neurohormona actúa sobre las glándulas hormonales. Durante el estadio larvario (o juvenil), las glándulas de los cuerpos alados liberan la hormona juvenil, por lo tanto, los niveles de ésta en la hemolinfa son elevados, lo que está relacionado con el mantenimiento de las características larvarias en el insecto. Al desencadenar el proceso de la muda, la ecdisotropina actúa a dos niveles. Primero, inhibe la liberación de la HJ y posteriormente, estimula la producción de ecdisona por la glándula protorácica. Estos cambios hormonales provocan la muda y el desprendimiento del exoesqueleto (Gardiner, 1978). En los insectos de desarrollo hemimetábolo (metamorfosis incompleta; con cambios graduales y sin estado pupal), como es el caso de *Blattella germanica*, la concentración de HJ en la hemolinfa disminuye de forma gradual con cada muda, lo que implica que van apareciendo las características definitivas del adulto de forma gradual, y en la última muda baja bruscamente su concentración, apareciendo el adulto (*Ilustración 3*). Por consiguiente, la efectividad del metopreno reside en la aplicación del mismo en el correcto estadio larvario del insecto, ya que éste eleva la concentración de la HJ impidiendo la aparición de los

caracteres del adulto. En el caso extremo emergerían larvas supernumerarias, es decir, individuos sin ninguna propiedad típica de los adultos.

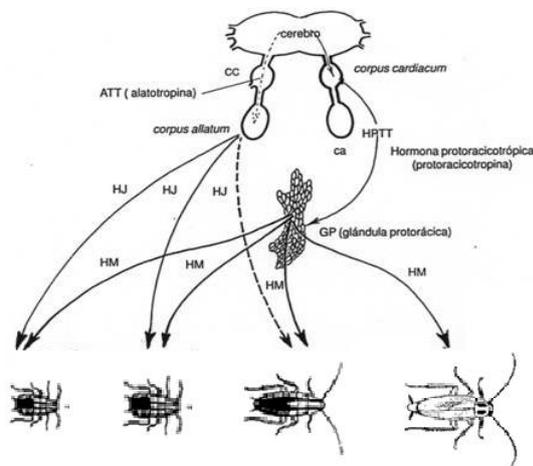


Ilustración 2: esquema de los cuerpos alados y de la glándula protorácica de los artrópodos.

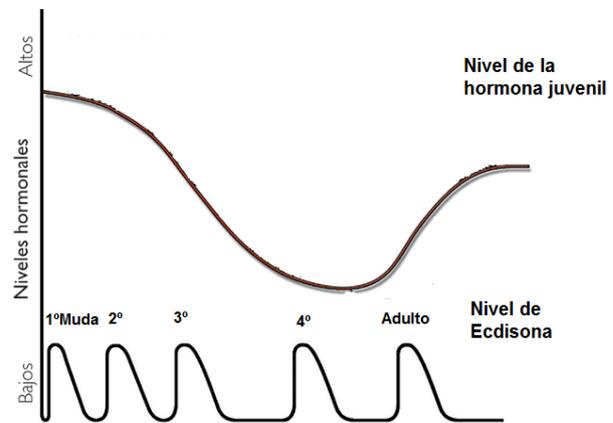


Ilustración 3: esquema del control endocrino de los artrópodos.

La esclerotización del exoesqueleto impide que cualquier producto penetre en el organismo, por lo que el metopreno debe aplicarse cuando éste todavía no esté curtido, es decir, inmediatamente después de cada muda. La bursicona es la hormona encargada de la esclerotización del exoesqueleto y se activa alrededor de dos horas después de que el adulto haya emergido (Belles, CSIC, 1988). En este margen de tiempo los individuos absorben el producto vía tópica y los efectos del mismo serán visibles después del último estadio larvario.

A pesar de que uno de los aspectos más estudiados de la HJ es su papel en la metamorfosis, esta hormona también interviene decisivamente en diversos procesos. Cabe destacar la acción gonadotrófica y gonadotrópica, además del mantenimiento de la diapausa y su influencia en diversas pautas del comportamiento (locomoción, vuelo y migración) (Belles, CSIC, 1988).

En el presente trabajo se intenta evaluar el efecto del metopreno en el desarrollo de la cucaracha *Blattella germanica* bajo condiciones de laboratorio. Los objetivos del estudio fueron los siguientes:

1. Determinar el valor de inhibición de la población y los valores de EC_{50} , EC_{10} , NOEC (la mayor concentración testada que no causa malformaciones en los individuos de la colonia) y LOEC (la primera concentración que causa diferencias en los individuos respecto al control) para la aparición de malformaciones.
2. Establecimiento de la dosis más apropiada para el uso comercial.

3. Determinar el porcentaje de esterilización de la población tras la aplicación de metopreno (mediante la cuantificación de ootecas producidas en la población expuesta y número de larvas).
4. Precisar el efecto letal de un insecticida de síntesis (*Frontline Combo*®) sobre las cucarachas *Blattella germanica* bajo condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de *Blattella germanica*

Se han utilizado 360 insectos criados en botes de metal de 3 litros de capacidad, los cuales se obtuvieron de la prole de hembras provenientes de una población colonizada de *Blattella germanica* y mantenida durante 10 años en el laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad del País Vasco. En cada recipiente de cultivo se mantienen alrededor de 50 individuos (machos y hembras) y en el momento de la aparición de las larvas se sacrifican los adultos mediante congelación para la renovación del mismo.

La base de los recipientes se ha recubierto de serrín y en cada bote se ha colocado un papel de filtro (10 cm x 10 cm) enrollado, para proveer las superficies de reposo adecuadas. Éstas servirán para que las cucarachas asimilen posteriormente el producto vía tópica. Los insectos han sido alimentados con comida para ratones *ad libitum* y se les ha suministrado agua en viales de vidrio tapados con un algodón, de manera que el agua no se desbordara y las cucarachas pudieran beber de manera dosificada. La colonia se ha mantenido en una cámara a 28°C, bajo condiciones de humedad elevada y oscuridad total.

Se realizaron dos experimentos, suministrando metopreno en el primero (*Experimento 1A*), y *Frontline Combo*® en el segundo (*Experimento 2*) a los individuos de *B. germanica*. En cada uno de ellos se utilizaron 160 individuos. Posteriormente se realizó otro experimento (*Experimento 1B*) con las hembras tratadas con metopreno para evaluar su reproducción. Dichos experimentos se llevaron a cabo en recipientes de metal más pequeños (0,85 litros) que los del cultivo, igualmente con una base de serrín como sustrato, comida y agua.

Método de ensayo Experimentos 1A y 2

- *Experimento 1A*: la muestra se ha tratado con metopreno de calidad analítica, un análogo de la hormona juvenil. Las condiciones de almacenado son -4°C y en recipiente de vidrio tapado.
- *Experimento 2*: la muestra se ha tratado con un producto comercializado con el nombre de *Frontline Combo*®, el cual contiene la siguiente composición:

- Fipronil 10%: (C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS): se trata de un insecticida de amplio espectro que se comenzó a comercializar en 1993 y que pertenece a la clase de insecticidas fenil pirazola. Es un antagonista del canal de cloruro regulado por el gamma-ácido aminobútrico (GABA) y su acción se realiza por contacto e ingestión (Devine y Furlong, 2007) (Raymond-Delpech, et al., 2005)
- Metopreno 9%
- Butilhidroxianisol (E320) y Butilhidroxitolueno (E321)
- Excipiente 0,67 ml

Las condiciones de almacenado para este producto son recipiente de plástico y temperatura ambiente.

La aplicación de los productos en ambos experimentos se realizó por medio de las superficies de reposo (100 cm²), de manera que las ninfas recibieron el producto por vía tópica. Se empapó el papel de filtro con el producto diluido en 1 ml de acetona (Panreac Acetone QP, CH₃COCH₃, M=58,08), y se dejó secar, de manera que la acetona se evapora y el papel queda impregnado con el producto. Finalmente, se enrolló y se introdujo en el bote para que las ninfas lo usaran como zona de reposo mientras absorbían el producto.

Para llevar a cabo ambos experimentos se han utilizado las siguientes concentraciones de producto:

- 100 µg producto/cm²
- 10 µg producto/cm²
- 1 µg producto/cm²
- 0.1 µg producto/cm²
- 0.01 µg producto/cm²

Por cada concentración se han utilizado tres réplicas con 10 ninfas de *Blattella germanica*. Además, se han utilizado otras tres réplicas para el control, dosificando la superficie de reposo con idéntica cantidad de disolvente puro (1ml).

En todos los bioensayos se utilizaron larvas en V estadio larvario (penúltimo estadio larvario de su ciclo de vida) ya que es cuando la concentración de HJ disminuye de manera natural. Además, la muda del insecto, tal y como se explica en la introducción, favorece la penetración del producto en su organismo.

Observación y determinación del grado de alteración de los individuos sometidos al *experimento IA*

Tras 20 días de exposición, la mayoría de las cucarachas habían mudado dos veces alcanzando la fase séptima de desarrollo (estadio adulto en condiciones normales), lo que nos ha permitido observar las anomalías provocadas por la exposición de los insectos al análogo de la hormona juvenil: individuos intermedios entre larva y adulto, o, en el caso extremo larvas supernumerarias. Los resultados individuales se expresan mediante la gradación de valores (*Tabla 1*) descrita por Martínez Pardo y Ribó Canut en el experimento que realizaron con el fin de determinar los efectos de algunos hormonomiméticos sobre colonias de *B. germanica*.

Tabla 1: Grados de actividad morfogenética sobre la metamorfosis de *Blattella germanica* (Pardo, R. y Canut, J., 1975).

Grados	Características morfológicas
Grado 0	Machos y hembras perfectos, sin alteraciones en las alas. Pueden tener un color más oscuro de lo normal. Las hembras pueden tener la ooteca girada 90°
Grado 1	Adulto con alas mesotorácicas y metatorácicas de igual longitud y abarquilladas en el extremo. Coloración similar a la del adulto o notablemente más oscuras
Grado 2	Adultos con alas mesotorácicas muy atrofiadas y separadas del cuerpo. Alas metatorácicas muy atrofiadas, son prácticamente restos de alas. Coloración típica de la ninfa
Grado 3	Adultos con alas mesotorácicas y metatorácicas completamente atrofiadas. Sólo presentes restos de alas. Coloración muy oscura, casi negra, propia de las larvas.
Grado 4	Larva supernumeraria, sin restos de alas. Más grandes que los adultos.

Con el fin de favorecer la observación y así facilitar la asignación del grado, los insectos se metieron en el congelador durante aproximadamente un minuto para reducir la actividad de los mismos. A continuación, bajo una lupa binocular (Olympus SZ30) se analizaron los individuos y se les asignó el valor del grado correspondiente.

Método de ensayo *Experimento IB*

Una vez se dio por finalizado el test, se eligió una hembra con ooteca por cada réplica del *experimento IA* y se pusieron en recipientes individuales. Estos botes también fueron aprovisionados de comida, agua y una superficie de reposo sin tratar, sumando un total de 18 botes. Posteriormente este material se usó para llevar a cabo el *experimento IB*, el cual hace referencia a la reproducción.

Se hizo un seguimiento diario para determinar el día de eclosión de la ooteca. Una vez suelta la ooteca, se esperó 3 días para que todas las larvas salieran de ésta. A continuación se sacrificaron los animales mediante congelación (24 horas) y se realizó el recuento de las mismas. Éste se llevo a cabo visual y manualmente.

Seguimiento de las larvas tratadas en el *Experimento 2*

Se calculó el porcentaje de mortalidad mediante un recuento manual de las larvas muertas transcurridas las 72 horas desde la aplicación del producto *Frontline Combo*®. Una vez transcurridas otras 24 horas se repitió el procedimiento.

Análisis estadístico de los resultados

La actividad sobre la población se calculó del modo siguiente:

$$\text{Valor de inhibición de la población} = \sum \frac{n_i \cdot v}{n}$$

- n_i : número de insectos afectados en cada grado
- v : valor individual según la gradación citada anteriormente
- n : número total de insectos

Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico de Levene. Tras comprobar que los datos no seguían una distribución normal, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la de Mann-Whitney para comprobar el nivel de significación de los resultados obtenidos. Este procedimiento se llevó a cabo para el cálculo de los valores NOEC y LOEC, el porcentaje de desarrollo de ootecas en hembras tratadas, la demora en el día de eclosión de las mismas y el promedio de descendientes por cada ooteca. Además, se trabajó con la aproximación de Probit para el cálculo de la EC_{50} y la EC_{10} . Respecto al *Experimento 2*, se realizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la de Mann-Whitney para comprobar el nivel de significación de los resultados obtenidos. En todos los casos se consideró un nivel de significación $p=0,05$. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS Statistics 20.0.

RESULTADOS

Resultados Experimento 1A

A pesar de la tabla de gradación de valores establecida por *Pardo, R. y Canut, J. (1975)* para la aparición de malformaciones en la población de *B. germanica* tras la aplicación de metopreno, durante la fase de observación de los insectos del presente experimento, se detectaron individuos que presentaban anomalías intermedias entre el grado 1 y 2. Por ello se consideró la conveniencia de establecer un nuevo grado (1,5) con las siguientes características: adultos con alas mesotorácicas muy separadas entre sí y abarquilladas en el extremo pero sin evidencias claras de malformaciones. Las alas metatorácicas, en cambio aparecen muy atrofiadas. Coloración un poco más oscura que la de los adultos normales.



Ilustración 4: *Adultoide de Blattella germanica con malformaciones de grado 1,5.*

Las anomalías en los individuos de *B. germanica* resultan visibles a nivel externo a partir de la concentración de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (*Tabla 2*), en la cual se muestran alterados el 50% de los individuos. Así, 8 de ellos presentan anomalías de grado 1, tres de grado 1,5 y por último, cuatro de grado 2. Para esta concentración no se encontraron individuos afectados de grado 3 ni 4. Al aumentar la concentración a $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, el porcentaje de insectos afectados se incrementó hasta un 76´6%, encontrándose 7 insectos con anomalías de grado 1 y tan sólo uno de grado 1,5. No obstante, el efecto de la hormona es evidente ya que nueve insectos presentan anomalías de grado 2 y finalmente cinco de grado 3. Se apreció cierto grado de adormecimiento y torpor en los movimientos en los individuos con malformaciones de grado 3. Las malformaciones morfogenéticas se pueden apreciar en las ilustraciones 6, 7, 8, 9 y 10.

Tabla 2: Número de insectos afectados en cada grado según la concentración de metopreno (valor expresado sobre 30 individuos).

Tratamiento	Grado 0	Grado 1	Grado 1,5	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Nº individuos alterados
0 µg/cm ² (Control)	30						0
0,01 µg/cm ²	30						0
0,1 µg/cm ²	30						0
1 µg/cm ²	30						0
10 µg/cm ²	15	8	3	4			15
100 µg/cm ²	7	7	1	9	5		23

Efecto del metopreno sobre las ninfas de *Blattella germanica*



Ilustración 5: adulto normal sin alteraciones (macho).



Ilustración 6: adultoide con malformaciones de grado 1.



Ilustración 7: adultoide con malformaciones de grado 1,5.



Ilustración 8: adultoide con malformaciones de grado 2.



Ilustración 9: adultoide con malformaciones de grado 3.



Ilustración 10: hembra de grado 0 con ooteca girada 90°.

Valor de inhibición

En la tabla 3 puede observarse el valor de inhibición para cada concentración, determinado según se indica en el apartado de material y métodos. El metopreno sólo presenta actividad a este nivel a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, concentración con la cual muestra un valor de inhibición = 0,68. No obstante, para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ presenta un valor de inhibición de 1,40. Este valor indica el promedio del grado de malformación que presentan los individuos de *B. germanica* para cada tratamiento.

Tabla 3: Valor de inhibición del metopreno para las diferentes concentraciones.

Producto	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Control)	0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
Metopreno	0	0	0	0	0,68	1,40

EC₅₀ y EC₁₀

El valor de la EC₅₀ indica la concentración que causa la aparición de malformaciones morfológicas externas descritas por *Pardo, R.* y *Canut, J.* (apartado material y métodos) en el 50% de la población de la colonia de *B. germanica*. El valor de la EC₁₀, en cambio, señala la concentración que causa la aparición de estas mismas malformaciones en el 10% de la colonia.

Los resultados de la aproximación Probit para las concentraciones evaluadas fueron los siguientes (*Tabla 4*): el valor de la EC₅₀ se sitúa en 18,914 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y el valor de la EC₁₀ en 1,947 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Tabla 4: Resultados de la aproximación Probit.

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Tratamiento (metopreno)			Límites de confianza al 95% para log (Tratamiento) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT^a						
EC10	1,947	,219	5,059	,289	-,659	,704
EC50	18,914	8,094	49,486	1,277	,908	1,694

El valor del NOEC indica la mayor concentración que no causa malformaciones en los individuos testados de la colonia de *Blattella germanica*. El LOEC, en cambio, indica la primera concentración que causa diferencias en los individuos de *B. germanica* respecto al control.

Al respecto, puede afirmarse que según los resultados obtenidos (Tabla 2), el valor del NOEC corresponde a la concentración de 1 µg/cm² ya que se comprobó estadísticamente que no mostraba diferencias significativas respecto al control (p=1,00), no observándose malformaciones tras la exposición a este tratamiento. Asimismo, el valor del LOEC corresponde a la concentración de 10 µg/cm², ya que se comprobó estadísticamente la existencia de diferencias significativas respecto al control (p=0,037).

Porcentaje de hembras que desarrollan ooteca en cada tratamiento

Únicamente con la concentración más baja (0,01 µg metopreno/cm²) el 100 % de las hembras desarrolló ooteca. Las demás hembras expuestas a concentraciones mayores (0,1 µg/cm², 1 µg/cm² y 10 µg/cm²), sin embargo, presentaron una clara disminución en el desarrollo de la misma. Las hembras expuestas a 100 µg/cm² no desarrollaron ooteca (Tabla 5).

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al porcentaje de hembras que desarrolló ooteca entre los diferentes tratamientos (p=0,019). Según el test de Mann-Whitney, las hembras tratadas con 100 µg/cm² mostraban diferencias significativas respecto al control (p=0,025). Además estas también presentaban diferencias con las tratadas con 10 µg/cm² (p=0,037), 1 µg/cm² (p=0,034), 0,1 µg/cm² (p=0,037) y 0,01 µg/cm² (p=0,025). Asimismo, el número de hembras que desarrolló ooteca con la concentración de 10 µg/cm² de metopreno, fue significativamente menor que las que la desarrollaron a 0,01 µg/cm² (p=0,037). Entre el control y el resto de tratamientos no se encontraron diferencias significativas (p>0,05).

Además, se observó que la mayoría de las hembras catalogadas como grado 0 y 1 presentaban la ooteca girada 90°.

Tabla 5: Porcentaje de hembras que han desarrollado ooteca en cada tratamiento.

Tratamiento	% Hembras con ooteca
0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Control)	100 %
0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	100 %
0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	64,6 %
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	91,6 %
10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	55 %
100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0 %

Resultados Experimento 1B

Día de eclosión de la ooteca

Se registró el día de eclosión de la ooteca (*Tabla 6*) en las hembras tratadas con metopreno en el *Experimento 1A*.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las medias de los tratamientos respecto al día de eclosión de la ooteca ($p = 0,253$). No se puede afirmar que el tratamiento con metopreno retrasa la eclosión de la ooteca en *B. germanica* aunque se observa que las hembras que primero soltaron la ooteca fueron las del control (día 23 desde la aparición).

Tabla 6: Promedio día de eclosión de la ooteca según tratamiento para las ninfas expuestas al metopreno en el experimento 1A.

Tratamiento	Promedio día de eclosión	Desviación típica
0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	23	2,081
0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	27	6,557
0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	29	2,309
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	30	0,577
10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	29	6,429
100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	-	-

Fertilidad

Se ha comprobado que las hembras resultantes de aquellas larvas de *B. germanica* tratadas con metopreno (*Experimento 1 A*), presentan una reducción en la producción de larvas en comparación con las que no fueron tratadas (*Tabla 7*).

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos respecto al número de descendientes por ooteca ($p=0,047$). Según las pruebas de Mann-Whitney, las hembras expuestas a los tratamientos de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ presentaban diferencias significativas respecto al control, $p=0,046$, $p=0,037$, $p=0,05$ y $p=0,046$ respectivamente. Las hembras expuestas a la concentración de $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no desarrollaron ooteca, por lo tanto no tuvieron descendencia.

Tabla 7: Promedio de descendientes por ooteca según el tratamiento para las ninfas expuestas al metopreno en el Experimento 1 A.

Tratamiento	Promedio descendientes por ooteca	Desviación típica
Control	38	4,509
0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	9	16,165
0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	18	16,289
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	0
10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	0
100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Sin ooteca	

Resultados Experimento 2

Los resultados obtenidos confirman el efecto letal del producto *Frontline Combo*® sobre las ninfas de *B. germanica* (*Tabla 8*). Su efecto letal fue totalmente visible transcurridas 72 horas desde su aplicación, donde en ningún caso más del 7% de la colonia había sobrevivido. La mortalidad larvaria de *B. germanica* fue de 100%, a las 96 horas de la aplicación. La prueba de Kruskal y Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos ni a las 72 horas ($p>0,05$) de la aplicación del producto ni una vez transcurridas 96 horas ($p>0,05$). Pero sí, en cambio, entre el control y el resto de tratamientos ($0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a las 76 horas $p=0,034$ para todos los casos, y entre el control y el resto de tratamientos a las 96 horas ($p=0,025$ para todos los casos).

Tabla 8: Porcentaje promedio de mortalidad de larvas de *B. germanica* a las 72 y 96 horas de cada tratamiento.

Tratamiento	% Mortalidad transcurridas 72h	% Mortalidad transcurridas 96h
0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Control)	0 %	0 %
0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	93 %	100 %
0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	93 %	100%
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 %	100%
10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 %	100%
100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	96 %	100%

Los resultados reflejan que la alta mortalidad registrada tras la aplicación de *Frontline Combo*® sobre ninfas de *B. germanica* es debido al Fipronil, componente clave del producto, el cual inhibe los canales de cloro de los insectos causando su muerte.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados muestran claramente el efecto del metopreno sobre las ninfas de *Blattella germanica*. El impacto causado en la morfología y fertilidad de las mismas son comparables con los resultados observados en otros insectos hemimetábolos como *Cimex lectularius* (Naylor *et al*, 2008). Estos observaron la presencia de anomalías y malformaciones en adultos que lograron emerger después de ser expuestos a 80, 160 y 300 $\mu\text{g}(\text{S})\text{-methoprene}/\text{cm}^2$. El impacto morfológico más significativo fue la presencia de larvas supernumerarias, es decir, larvas carentes de aparato reproductor externo y con malformaciones severas en las patas, lo que provocó una mayor lentitud en sus movimientos. En el trabajo que nos ocupa no se han encontrado larvas supernumerarias, lo cual puede indicar que la concentración de metopreno utilizada en los diferentes tratamientos no es lo suficientemente alta como para su aparición. En caso de haber utilizado concentraciones mayores (1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) sería probable la aparición de las larvas mencionadas anteriormente, aunque esta afirmación dependerá de los resultados de los experimentos requeridos. Los efectos subletales observados por Naylor *et al* son de gran importancia, ya que la limitación de los insectos para la cópula o apareamiento debido a la lentitud de sus movimientos, provoca una clara disminución de la supervivencia. Estos mismos síntomas de letargo concuerdan con los observados en el presente experimento en los insectos tratados con la concentración más alta de metopreno. A pesar de que la dosis utilizada no ha provocado la aparición de larvas supernumerarias, sí es efectiva, ya que ha sido suficiente para esterilizar al 100% de los individuos sometidos a ese tratamiento (100 μg metopreno/ cm^2).

Martínez Pardo y Ribó Canut (1975) realizaron numerosos bioensayos con diferentes miméticos de la hormona juvenil sobre colonias de *Blattella germanica*. Determinaron el valor de

inhibición de los productos en función de los diferentes tratamientos (*Tabla 9*), al igual que se hizo en el presente trabajo. Observamos que el metopreno presenta un valor intermedio a los observados por los autores. Este sólo es activo a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ duplica su actividad.

Entre los hormonomiméticos ensayados por estos autores, también pueden observarse grandes diferencias (el rango observado en los distintos productos fue de 0,30 a 3,30 para la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Mientras que el compuesto de Bowers y el Farnesil-metil-éter no presentan ninguna actividad apreciable, el análogo 10-4772, la hormona juvenil de Röller y el análogo RO- 08-9801 presentan una actividad significativa hasta para la concentración de 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Estos dos últimos, además, muestran actividad importante en insectos como *Ceratitis capitata*, *Tenebrio molitor* y *Tribolium castaneum*. Por el contrario, el compuesto de Romanuk presenta sólo actividad significativa sobre *Ceratitis capitata*.

Tabla 9: Valor de inhibición de hormonomiméticos aplicados sobre superficies de reposo en poblaciones de ninfas en V estadio de *Blattella germanica*.

Producto	100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Control)
Metopreno	1,40	0,68	0	0	0	0
HJ Röller*	3,30	3,30	2,90	1,10	1,08	
Compuesto de Romanuk*	3,10	1,50	0,24	-	-	
Análogo 10-4772*	3,05	2,64	2,10	1,00	0,90	
Farnesil-Metil-Eter*	1,05	0	-	-	-	
Compuesto de Bowers*	0,30	0	-	-	-	
Análogo RO- 08-9801*	3,20	3,03	2,70	0,90	0,60	

*Resultados obtenidos por Martínez Pardo y Ribó Canut (1975).

Estos mismos autores realizaron ensayos aplicando los hormonomiméticos en la dieta alimenticia de las ninfas de *B. germanica*. Los resultados obtenidos muestran un menor grado de inhibición (2,4 tanto en el caso de la HJ de Röller como para el análogo RO- 08-9801, a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ alimento). Esta baja eficacia sugiere la existencia de un proceso de desactivación de los hormonomiméticos provocado por los enzimas digestivos del insecto. Las proteasas constituyen los principales enzimas del aparato digestivo de estos y actúan sobre los enlaces peptídicos de las macromoléculas proteicas reduciéndolas a monómeros orgánicos. Durante mucho tiempo se pensó que al igual que los vertebrados, los insectos sólo sintetizaban serín y aspartato

proteasa, pero recientes estudios han demostrado la existencia de otras clases, entre las que se incluyen las cisteín proteasas y metalo aminopeptidasas. Se sugiere el uso de estos nuevos enzimas como un modo de adaptación evolutiva que permite a ciertos insectos alimentarse de leguminosas que contienen altos niveles de inhibidores de serín proteasas sin causarles daños (Jongsma y Bolter, 1997). De la misma forma, los blatodeos en este caso han podido desarrollar ciertos enzimas que les permiten disminuir o desactivar la acción insecticida de diferentes productos, a pesar de que no se han encontrado estudios que lo corroboren.

Por el contrario, los resultados obtenidos con la aplicación de metopreno sobre las superficies de reposo son altamente prometedores. Las dosis requeridas para causar irregularidades en el desarrollo de una colonia son muy bajas, situándose el LOEC en $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A pesar de que la concentración más alta testada en este trabajo ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) no causa la muerte de los individuos, sí es efectiva para el control de estos insectos ya que la fertilidad se ve afectada en la mayoría de los casos. Las hembras expuestas a 1 y $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ desarrollaron ooteca pero la liberaron de forma prematura evitando que las larvas se desarrollaran. No obstante, las hembras tratadas con $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no la desarrollaron. En la misma línea, cabe destacar el estudio llevado a cabo por Cruickshank, P.A. (1971) cuyos resultados corroboran lo anterior. Las cucarachas fueron tratadas con el compuesto $\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$ (derivado de la hormona juvenil) a una concentración de 20 ppm. Esto provocó que las hembras desarrollaran la ooteca de manera normal, pero que la liberaran de forma prematura, previniendo que las larvas desarrollaran. Además, también afirman que la esperanza de vida de los adultos fue más baja de lo normal.

Se han realizado estudios con metopreno en mosquitos australianos *Aedes vigilax* y *Culex sitiens*, obteniéndose una reducción significativa de su población. La cepa de *Aedes vigilax* fue especialmente susceptible, situándose la $\text{LC}_{90} < 0,2$ ppb (S)-Metopreno. En cambio, la LC_{90} para *Culex sitiens* fue 39 veces más grande (Ritchie, *et al.*, 1997; Berti-Moser y Navarro-Bueno (2008), con el mismo producto también observó malformaciones en adultos de *Anopheles albimanus* y comprobó que las hembras sobrevivientes presentaban una clara reducción de fertilidad. Por otro lado, Robert y Olson también registraron reducción en la producción de huevos en las hembras sobrevivientes de *Culex quinquefasciatus* que fueron expuestas como larvas a la concentración letal 50% (CL_{50}) del mismo producto (Robert, L. y Olson, J. K., 1989).

Varios autores han realizado estudios con otro tipo de reguladores del crecimiento de los insectos (RCI), los ecdisoides, análogos de la hormona de la muda. Estos tienen por objetivo bloquear los mecanismos de la ecdisis y las muertes ocurren en el momento de las mudas (Devine y Furlong, 2007). La acción de esteroides análogos a las HM fue descubierta al ver que tras mudar, se inhibía el endurecimiento de la cutícula de *Pyrrhocoris apterus* (Viñuela *et al.*, 1991).

Aguilera *et al* (2001) experimentaron con Diflubenzuron, un RCI de tipo ecdisoide, en ninfas de *Blattella germanica*. La mayor mortalidad ninfal se observó en el periodo de desarrollo comprendido entre el segundo y tercer estadio larvario. Las ninfas fueron incapaces de separarse de la exuvia, lo que les provocó finalmente la muerte. Pero también se observaron efectos subletales relacionados con los contemplados en el presente experimento. Estos efectos morfogenéticos resultaron en adultos con alas más cortas y deformadas, que presentaban además un ligero oscurecimiento del color del cuerpo.

Ameen *et al* (2005) comprobaron el efecto letal de Noviflumuron, otro RCI de tipo ecdisoide, en ninfas de *B. germanica*. Siete días después de la aplicación del producto comenzaron a observar síntomas de adormecimiento e incluso mortalidad de algunos individuos. En cambio, no describen la aparición de malformaciones a nivel externo. En el presente experimento también se observaron estos síntomas de letargo y torpor sobre todo en los adultos con anomalías de grado 3.

Otros autores (Koehler y Patterson, 1989) plantearon que al exponer ninfas de *B. germanica* de primer estadio de desarrollo a varios productos inhibidores de la síntesis de la quitina, las mayores mortalidades ocurrieron principalmente en las mudas de primer a segundo y de segundo a tercer estadio ninfal. Además también encontraron malformaciones morfogenéticas similares a las observadas en el presente trabajo: oscurecimiento del cuerpo y reducción de la fertilidad. Destacaron que estos efectos persistieron hasta el segundo ciclo de ooteca, volviéndose a normalizar al tercero.

A pesar de los esperanzadores resultados obtenidos tras la aplicación de hormonas juveniles en insectos para erradicar las plagas minimizando el impacto en el medio ambiente, numerosas casas comerciales apuestan por los productos mixtos. Estos combinan reguladores del crecimiento de los insectos con insecticidas convencionales, disminuyendo así la emisión de estos últimos. De esta forma la extinción de la plaga está 100 % asegurada, al mismo tiempo que disminuye el impacto en el ecosistema (Naylor, *et al.*, 2008). En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del producto mixto *Frontline Combo*®, el cual está compuesto por Fipronil (insecticida convencional) y metopreno (análogo de la HJ). Tras su aplicación la mortalidad de las larvas fue de un 100%, presumiblemente debido principalmente al Fipronil y a su efecto de bloqueo sobre los canales de cloruro. Otros autores han comprobado que las cucarachas resistentes a los insecticidas convencionales se vuelven más susceptibles tras ser tratadas con RCIs (Kramer, *et al.*, 1990).

En conclusión, se demuestra la eficacia del metopreno como método alternativo a los insecticidas convencionales para controlar la superpoblación de ninfas de *Blattella germanica*. Dada la dificultad para erradicar la plaga de los mismos debido a las resistencias desarrolladas a los insecticidas de síntesis, productos con un método de acción alternativo como el metopreno podrían ser de gran utilidad. Se obtuvo esterilidad total en las hembras expuestas a 100 µg/cm², además de efectos

externos visibles a concentraciones menores del producto. Su uso combinado con insecticidas neurotóxicos también sería efectivo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Maite Martínez Madrid, Profesora Agregada de Fisiología Animal del Departamento de Genética, Antropología Física y Antropología Animal de la Facultad de Ciencia y Tecnología (UPV/EHU) su ayuda para la realización de este trabajo así como su supervisión para la finalización del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- AEPLA (Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas) <http://www.aepla.es/>
- Aguilera, L., Marquetti, M. y Navarro, A. 2001. *Actividad biológica del diflubenzuron sobre Blattella germanica (Dictyoptera: Blattellidae)*. Rev Cubana Med Trop; 53(1): 48-52
- Álvarez, A., Virla, E. G., Pera, L. M., Baigorí, M. D. 2009. *Characterization of native Bacillus thuringiensis strains and selection of an isolate active against Spodoptera frugiperda and Peridroma saucia*. Biotechnology Letters. Volume 31, Issue 12, pp 1899-1903
- Ameen, A., Wang, C., Kaakeh, C., Bennett, G.W., King, J. E., Karr, L. L. y Xie, J. 2005. *Residual Activity and Population Effects of Noviflumuron for German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) Control*. J. Econ. Entomol. 98(3): 899-905
- Anuario de Estadística Agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Belles, X. 1988. Consejo Superior de Investigación Científica. *Insecticidas Biorracionales*. Colección Nuevas Tendencias; N°9.
- Berti-Moser, J. y Navarro-Bueno, E. 2008. *Efectividad y persistencia de la actividad letal de metopreno sobre pupas de Anopheles albimanus (Diptera: Culicidae)*. Rev Biomed; 19:27-34
- Boletín Oficial del Estado Num 223. Sec. I. Pág. 65127
- Castro, J., Díaz, D., Correa, G., Medina, F. 2007. *Evaluación de la actividad larvicida del metopreno (Altosid)® sobre mosquitos vectores, en un área de alta transmisión*.
- Cruickshank, P. A. (1971). *Insect juvenile hormone analogues: effects on some terpenoid amide derivatives*. Bull. Wildl. Health. Org. 44, 395-396
- Devine, G. J. y Furlong, M. J. 2007. *Insecticide use: Contexts and ecological consequences*. Agriculture and Human Values, 24 3: 281-306.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. y Le, D.P. 1998. *New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity*. Annual Review of Entomology. Vol. 43: 545-569.
- Erwin, T. L. 1997. *Biodiversity at its utmost: Tropical Forest Beetles*. pp. 27-40.

- Gao, P. 2012. *Sensitization to Cockroach Allergen: Immune Regulation and Genetic Determinants*. Clin Dev Immunol. 2012: 563760. doi: 10.1155/2012/563760
- Gardiner, M.S. 1978. *Biología de los invertebrados*. Ediciones Omega S.A., Barcelona, (pag 728-736)
- Hill, R. W., Wyse, G. A., Anderson, M. 2004. *Fisiología Animal*
- Höfte, H. y Whiteley, H. R. 1989. *Insecticidal crystal proteins of Bacillus thuringiensis..* Microbiol. Rev. 53(2):242.
- Jongasma, M. A. y Bolter, C. 1997. *The Adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors*. J. Insect Physiol. Vol. 43, No. 10, pp. 885–895
- Koheler, P.G. y Patterson, R.S. 1989. *Effects of chitin synthesis inhibitors on german cockroach (Orthoptera: Blattellidae) mortality and reproduction*. J Econ Entomol, 82 (1):143-8
- Kramer, R.D., Koehler, P.G., Patterson, S. 1990. *Effects of hydroprene exposure on the physiology and insecticide susceptibility of German cockroaches (Orthoptera: Blattellidae)*. J. Econ. Entomol. 83(6):2310-6.
- Mamatha, D. M., Kanji, V. K., Cohly, H. y Rajeswara Rao, M. 2008. *Juvenile hormone analogues, methoprene and fenoxycarb dose dependently enhance certain enzyme activities in the silkworm Bombyx mori (L)*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 5 (2), 120-124
- Martínez Pardo, R. y Ribó Canut, J. 1975. *Efectos de algunos hormonomiméticos sobre la metamorphosis y reproducción de Blattella germanica*. A. T. A. Vol.15, núm 3
- Mutero, A., Pralavorio, M., Bride, J-M y Fournier, D. 1994. *Resistance-associated point mutations in insecticideinsensitive acetylcholinesterase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 91, pp. 5922-5926. Genetics
- Naylor, R., Bajomi, D. y Boase, C. 2008. *Efficacy of (S)-Methoprene against Cimex Lectularius (Hemiptera:Cimicidae)*. *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests*. William H Robinson and Dániel Bajomi (editors).
- Palumbi, S. R. 2001. *Humans as the World's Greatest Evolutionary Force*. REVIEW. Science 7. Vol. 293 no. 5536 pp. 1786-1790.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., Sattelle, D.B. 2005. *Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides*. Invert Neurosci: 1-15.
- Ritchie, S.A., Asnicar, M., Kay y B.H.J. 1997. *Acute and sublethal effects of (S)-methoprene on some Australian mosquitoes*. Journal of the American Mosquito Control Association, 13(2):153-155'
- Robert, L., Olson, J.K. 1989. *Effects of sublethal dosage of insecticides on Culex quinquefasciatus*. J. Am. Mosq. Control Assoc.; 5(2):239-46
- Rust, M. K., Owens, J. M., y Reiersen, D. A. 1995. *Understanding and controlling the German cockroach*. Oxford University Press on Demand.

- Soto, A., Ohlenschläeger, F. y García-marí, F. 2002. *Distribution and Sampling of the whiteflies Aleurothrixus floccosus, Dialeurodes citri, and Parabemisia myricae (Homoptera: Aleyrodidae) in Citrus in Spain*. Journal of Economic Entomology 95(1):167-173. 2002
- Viñuela, E., Budia, F. y del Estal, P. 1991. *Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula*. San. Veg. Plagas, 17: 391-400
- Ware, G. W. y Whitacre, D. M. 2004. *Introducción a los Insecticidas. The Pesticide Book*, 6th ed*.
- Zlotkin, E. 1999. *The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides*. Annual Review of Entomology. Vol. 44: 429-455.