

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Determinación de Enzimas de Resistencia en *Tribolium confusum* Asociadas  
con la Tolerancia a Deltametrina

Por:

**VELQUIS ELI AREVALO MADRIGAL**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre del 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Determinación de Enzimas de Resistencia en *Tribolium confusum* Asociadas con la  
Tolerancia a Deltametrina

Por:

**VELQUIS ELI AREVALO MADRIGAL**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor Principal

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Coasesor

M.C. Omega Hernández Bautista

Coasesor

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre del 2015

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar te agradezco a tí DIOS, por ayudarme a terminar este proyecto y por darme este Ángel que siempre estuvo conmigo. Gracia díos por darme la fuerza y el coraje para este sueño se quisiera realidad, por ponerme en este loco mundo, por estar conmigo en cada momento de mi vida. Por el regalo de gracias que me has dado mis estudios.*

**Al doctor Ernesto cerna Chávez.** *Por creer en mí por sus consejos y ayuda y paciencia, dedicación para este desarrollo y estudios por su aportación técnica Para la realización de este trabajo de investigación.*

**A la Dra. Yisa maría Ochoa fuentes** *por su participación técnica Para la realización de este trabajo, Por su apoyo incondicional por creer en mí desde sexto semestre por asarme saber que los sueños se pueden lograr en base a la húmida su sabio consejo que nunca olvide gracias doctora.*

**AL M.C. Omegar Hernández Bautista** *por su apoyo disponibilidad para este estudio por Su disponibilidad para la revisión de esta tesis, paciencia, dedicación, por su atención y ayuda en el desarrollo de ese estudios, gracias.*

**A la maestra Diana Duron y el profesor Gustavo Villareal** *por ayudarme y por brindarme su apoyo como moral y*

*económico gracias maestro por ser tan buenos conmigo y por la confianza que me tuvieron durante estos 5 años gracias.*

**A la laboratorista del área de insectos** *por a verme brindado su Amistad y apoyo moral y económico cuando más lo necesitabas muchas gracias MARI.*

## **AMIS PADRES**

*A mis padres, por ser el pilar fundamental en mi vida. Por todo su apoyo económico, moral, espiritual y por su entrega como padres maravillosos, por sus desvelos, sus sacrificios y esfuerzos por ser mejor cada día, Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Por enseñarme que los sueños se logran a base de esfuerzo y dedicación. A quienes con su amor, confianza apoyo. Me han enseñado e camino correcto ,porque gracias a ellos me he realizado como profesionista y he alcanzado uno de los tantos objetivos de mi vida, gracias por todo que sin escatimar esfuerzo me han dado una formación educación y principalmente una familia a la que adoro, quiero respeto y admiro.*

## **AMIS HERMANOS**

*Ubel, Adriana Isabel, Luis Enrique, José Manuel, Erisel, Rubiel, Clary, Magalidia, vianca, Rocío, Johanner y mi hermanita karime Por su apoyo económico y moral, Gracias por apoyarme en todo momento y que este logro también es de ustedes me siento muy orgullosa de tenerlos como hermanos, gracias por creer en mí y los logro que obtenga será logros que por ustedes conquistare.*

**Y EN ESPECIAL A MI ÁNGEL A TI HERMANA  
HERMOSA ROCIO MADENI AREVALO MADRIGAS**

*Llego el tiempo de recompensa, un momento de felicidad donde lo inalcanzable fue alcanzado y lo imposible fue posible. Nunca olvides estas palabras. No tengo palabras como agradecerte todo lo que has hecho por mí por creer en mí desde principio eres la mejor hermana, mi amiga y mi Ángel condicional la mejor consejera la que siempre estuvo conmigo desde el inicio de la etapa hasta la universidad gracia por ser mi Ángel la que siempre ha estado con mígo y Gracias hermana y hora puedo decirte que todo lo que me decías sí valió la pena y este logro te lo debo a ti gracias por ser la mejor hermanita.*

**A mis cuñadas Verónica, María Eneryna, Maybet del Carme,** *por su apoyo incondicional y por creer en mí gracias cuñadas. En especial a mi cuñada verónica por creer en mí desde principio y por su apoyo que me brindó des cuando tenía 12 años gracias cuñada.*

**A Toño santizó Sánchez** *por a verme brindado su apoyo tanto moral y económico cuando más lo necesitabas gracias eso nunca lo olvidare gracias cuñis.*

**A mis compañeros de la generación cxv111** *en especial a Juan Adame, Toño Orozco, Cesar Morir, Adriana, Fabián, Fernando Por a verme Bricado su Apoyo Sincero Durante la Carrera Gracias.*

**AMI ALMA TIERRA MARTE** *La cual llevo en el corazón siempre, que me dió todo y abrió sus puertas del conocimiento, Por darme la oportunidad de realizar mis estudios en ella, por prepararme como un profesional en sus aulas, y por ser mi segundo hogar y brindarme durante 5 años muchos momentos de alegría, y por darme las bases para enfrentarme al mundo laboral.*

**AMIS MAESTROS** *A todos mis maestros de la carrera por sus conocimientos, consejos, confianza y formación.*

## **DEDICATORIA**

### **MIS PADRES**

*Magnolia Madrigal Perez ,Elio Arevalo Hernandez, Mi tesis la dedico principalmente a mis padres, a quienes con este logro quiero devolver un poco de lo que me han dado desde antes que naciera por su apoyo incondicional. Y AMI Señor, mi salvador ha estado siempre con mígo esto facilita las cosas y hoy puedo decir GRACIAS, por tu misericordia y sobre todo por creer en mí.*

### **A MIS HERMANOS**

*También dedico esta tesis a mí hermanos, Ubel, Adriana Isabel, Luis Enrique, José Manuel, Erisel, Rubiel, Clary, Magalidia, vianca, Rocio, Johanner, Karime Quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mí carrera que con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo quisiera aun cuando todo se complicaba los amo. Gracias*

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA .....	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	4
OBJETIVO.....	4
HIPÓTESIS .....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Granos almacenados.....	5
Plaga de almacén.....	6
Plagas primarias.....	7
Plagas secundarias .....	7
Plagas terciarias.....	7
<i>Tribolium confusum</i> .....	8
Origen y Distribución .....	8
Ubicación taxonómica .....	9
Importancia económica .....	9
Alimentación.....	10
Biología y hábitos .....	10
Descripción morfológica .....	12
Huevo.....	12
Larva .....	12
Pupa.....	12
Adulto.....	12
Alternativas de control .....	13
Control cultural .....	13



Limpieza.....	13
Eliminación de residuos .....	14
Control mecánico .....	14
Control físico .....	14
Temperatura .....	15
Impacto .....	15
Radiación .....	15
Control biológico.....	15
Control biológico clásico .....	16
Control biológico aumentativo .....	16
Control biológico conservativo .....	16
Control químico .....	17
Resistencia .....	19
Generalidades .....	19
Tipos de resistencia .....	20
Resistencia por comportamiento.....	20
Resistencia morfológica .....	20
Resistencia de penetración .....	20
Selección de resistencia .....	20
Resistencia cruzada y resistencia múltiple.....	21
Resistencia metabólica .....	22
Mecanismos genéticos de la resistencia .....	23
Detección de los mecanismos de la resistencia.....	23
Determinación de resistencia .....	23
Bioensayos .....	23
Electroforesis .....	24
Pruebas moleculares .....	24
Pruebas bioquímicas.....	24
Enzimas de resistencia .....	25
Esterasas .....	25
Acetilcolinesterasa .....	25

Glutación-S-Transferasa.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Ubicación del experimento .....	27
Material biológico.....	27
Bioensayos .....	27
Cuantificación de proteína .....	28
Preparación de reactivos.....	28
Preparación de homogenatos.....	29
Lectura de absorbancias .....	29
Ensayos en Microplacas.....	29
Interpretación de resultados.....	30
Pruebas bioquímicas .....	30
Preparación de reactivos.....	30
Lectura de absorbancias .....	30
Prueba de reacciones de oxidasa .....	31
Preparación de reactivos.....	31
Lectura de absorbancias .....	31
Prueba Glutathion S-transferasa .....	32
Preparación de reactivos.....	32
Lectura de absorbancias .....	32
Prueba de acetilcolinesterasa.....	32
Preparación de reactivos.....	32
Lectura de absorbancias .....	32
Análisis estadístico .....	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
CONCLUSIONES .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
LITERATURA CITADA .....	38

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Concentraciones utilizadas de ingrediente activo deltametrina Para evaluar la mortalidad y resistencia en <i>Tribolium confusum</i> .....	28
Cuadro 2 .Concentraciones letales medias y limites fiduciales de ambas poblaciones de <i>T. confusum</i> . .....	34
Cuadro 3. Niveles enzimáticos en poblaciones de <i>Tribolium confusum</i> . .....	36

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Tribolium confusum</i> .....	11
--	----

## RESUMEN

*Tribolium confusum* es una de las plagas más importantes en productos almacenados, se alimentan de cereales y otros subproductos, causa grandes pérdidas económicas por la contaminación de los dichos alimentos, bajando su valor nutritivo, contaminación indirecta al crear condiciones favorables para el crecimiento de moho, se ha estimado que las pérdidas económicas causadas por las plagas de productos almacenados ascienden desde 1,25 hasta 2,5 mil millones de dólares anuales en Estados Unidos. El objetivo de este trabajo es determinar a través de varios métodos de diagnóstico la susceptibilidad y los mecanismos de resistencia de *Tribolium confusum* que provienen de la harina. Se realizaron bioensayos, mediante la técnica de película residual para determinar la susceptibilidad de poblaciones de *T. confusum* a deltametrina. En los resultados el CL<sub>50</sub> requiere 187.677 ppm para matar el 50% de su población, la razón entre estos es de 4.443 veces mayor la población tolerante las concentraciones de deltametrina. En las pruebas bioquímicas los resultados presentaron una sobreproducción de  $\beta$ -Esterasas, Glutathion S-Transferasa y Acetilcolinesterasas, por lo que pudieran ser el mecanismo enzimático implicado en la tolerancia en *Tribolium confusum*.

**Palabras clave:** gorgojo de la harina, resistencia, susceptibilidad, niveles enzimáticos, concentración línea media.

Correo electrónico; Velquis Eli Arévalo Madrigal, [Velquis\\_27@hotmail.com](mailto:Velquis_27@hotmail.com)



## INTRODUCCIÓN

La producción de cereales y oleaginosas constituye uno de los principales soportes de la economía nacional, el almacenamiento de granos surge como consecuencia de la aleatoriedad y estacionalidad de la producción agrícola, el consumo directo e industrialización dependen de la preservación de su calidad durante el transporte y almacenamiento (Cassini *et al.*, 2005), México figura en el quinto lugar, tanto como productor de grano como de semilla; siendo Estados Unidos y China ocupan los primeros lugares, por otro lado, en cuanto a demanda de alimentos se refiere (FAO, 2013). Aproximadamente el 6% de la producción se pierde en la etapa de post-cosecha, debido a fallas en el transporte, el secado y principalmente, por daño de insectos (Descamps *et al.*, 2004).

Gutiérrez-Díaz (1999) en lista 55 especies de insectos asociados con granos y productos almacenados mencionando sus hospederos y distribución, entre los más frecuentes en nuestro país, se hallan los Curculiónidos del género *Sitophilus* que causan importantes pérdidas en granos almacenados considerando los plagas de interés primario, seguido de las especies de *Tribolium* (Tenebrionidae), que son plagas que se alimentan de granos partidos o lesionados a consecuencia de las infestaciones primarias, así como de las harinas, cereales y derivados amiláceos. La familia Tenebrionidae se encuentra en diversos hábitats, humus del suelo, raíces y tallos de plantas, otras se han adaptado a las condiciones áridas y forman parte de la fauna de los desiertos.

Algunas especies habitan en los bosques viviendo en la cubierta vegetal, en los hongos de los árboles, detrás de las cortezas o en la madera de los árboles en descomposición, frecuentemente se les encuentra asociados con otros insectos barrenadores de la madera, algunas de las especies son plagas agrícolas que atacan plantas y semilleros en el campo (Gutiérrez-Díaz, 1999). Un número relativamente pequeño son plagas de granos y otros productos

almacenados, los cuales son considerados plagas secundarias de los granos y primarias de los productos de su molienda; otras especies como *Palorus* spp., y *Tenebrio molitor* (gusano de la harina, escarabajo molinero) son capaces de permanecer tanto en sus hábitats naturales infestando productos almacenados (Gutiérrez-Díaz, 1999)

El objetivo esencial de detectar insectos en alimentos almacenados es localizarlos en la etapa temprana de infestación, la presencia de insectos puede conducir a la destrucción del producto y por lo tanto las pérdidas económicas, existen diferentes métodos de detección convencionales, los cuales pueden resultar menos sensibles a la baja densidad de población, por lo que se deben desarrollar de mejores métodos de detección de insectos en grano, semillas, frutas y alimentos (Flinn *et al.*, 2007).

El escarabajo *Tribolium confusum* es una de las plagas más destructivas de los granos almacenados y productos relacionados (Aitken, 1975). Es plaga secundaria en los productos almacenados, este insecto causa grandes pérdidas económicas por la contaminación de los alimentos, bajando su valor nutritivo y la creación de condiciones favorable para el crecimiento de moho, se ha estimado que las pérdidas económicas causadas por las plagas de productos almacenados pueden variar desde 1,25 hasta 2,5 mil millones de dólares anuales en el estados unidos (Flinn *et al.*, 2007).

*Tribolium confusum* es una de las plagas de importancia económica en todo el mundo, se puede encontrar en instalaciones de procesamiento de alimentos y almacenes (Trematerra y Sciarretta, 2004; Abdelghany *et al.*, 2010). Los adultos pueden volar sólo distancias muy cortas (Rees, 2004) prefiriendo harina acondicionada (Naylor, 1959; Gante, 1966; Ogden, 1970).

La disponibilidad constante de granos enteros y productos molidos proporciona una excelente sitios de alimentación y ovoposición para muchos

producto almacenado insectos, (Good, 1937; Campbell y Runnion, 2003; Arthur y Campbell, 2008; Toews *et al.*, 2009). Estas especies pueden explotar con éxito parches de alimentos de diferentes tamaños y calidad (Campbell y Hagstrum, 2002; Campbell *et al.*, 2010; Ming y Cheng, 2012).

Que se generan durante las diversas operaciones de fresado, como la molienda, cernido y traslado de productos alimenticios procesado, aunque esta especie se considera que es un colonizador, secundario, puede infestar en granos (Aitken, 1975). Para su control, pesticidas residuales y fumigantes son ampliamente utilizados; sin embargo, *Tribolium spp.* ha mostrado una tendencia a tolerar diferentes insecticidas, por lo que se cree que existen poblaciones que son resistentes a muchos de estas sustancias (Champ y Dyte, 1976; Arthur, 1996).



## **JUSTIFICACIÓN**

El escarabajo *Tribolium confusum* (Coleóptera: Tenebrionidae), es una de las plagas más destructivas de los granos almacenados y relacionados productos en todo el mundo, su control está basado en el uso de insecticidas órgano sintéticos, de los cuales existen diferentes reportes de resistencia a dichas sustancia, a su vez se desconocen los mecanismos enzimáticos asociados.

## **OBJETIVO**

El presente trabajo de investigación, tiene como objetivos determinar concentraciones letales medias y límites fiduciales de ambas poblaciones.

Determinar los niveles enzimáticos en *Tribolium confusum* tolerantes a deltametrina.

## **HIPÓTESIS**

Las concentraciones letales media de ambas poblaciones serán diferentes así como el contenido de enzimas responsables de la tolerancia a deltametrina

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Granos almacenados

Las cosechas y granos almacenados son productos alimenticios para el consumo humano de primera necesidad (Padin *et al.*, 2002), uno de los grandes problemas que afronta la agricultura mundial es la pérdida de grandes volúmenes de productos alimenticios por la infesta de plagas, tanto en el sistema de cultivo, como en los de cosecha y almacenamiento (Silva *et al.*, 2005), los granos de cereales que constituyen la mayoría de los productos básicos, se mantienen en almacenamiento y representan un componente importante de la oferta mundial (Weston y Rattlingourd, 2000).

La infestación de los granos almacenados establecidas por el comercio entre los diferentes países del mundo, permitió la introducción de los diferentes granos en las regiones apropiadas para su cultivo a otras en donde se consumen, esto ha favorecido a que muchas plagas que atacan los granos almacenados se distribuyan de manera cosmopolita, estableciéndose así donde quiera que las condiciones sean favorables para su duración (Narváez, 2003).

La presencia de insectos en granos almacenados trae como consecuencia la reducción de la calidad del grano, así como para el consumo humano y para el uso posterior de la semilla (Silva *et al.*, 2005), por lo que es prioridad proteger los productos almacenados contra el deterioro, pérdida de calidad y de peso durante el almacenamiento, provocado por los insectos y hongos (Pérez *et al.*, 2004)

## Plaga de almacén

Los granos alimenticios almacenados forman un agroecosistema complejo por la serie de interacciones producidas entre la luz, temperatura, humedad y agentes bióticos, como insectos y hongos, que repercuten en la calidad del grano (Hernández *et al.*, 2009; Olakojo *et al.*, 2004; y Heethirajan *et al.*, 2007).

Una de las plagas más importantes de granos almacenados es el grupo de las palomillas, como lo son: gusano elotero (*Helicoverpa*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), barrenadores (*Elasmopalpus angustellus*) y palomillas de almacén (*Sitotroga cerealella*), así como los escarabajos conocidos como gusanos de raíz y de alambre (*Agriotes spp.*), gallinas ciegas (*Phyllophaga spp.*) gorgojos y barrenadores del grano, son algunos de los insectos más importantes y que más daños causan en granos almacenados estas plagas atacan los cultivos durante el desarrollo de la planta o durante el almacenamiento (Castro y Paredes, 2009).

Los granos se almacenan generalmente en las fincas o en grandes ascensores comerciales, donde puede estar infestados por una variedad de escarabajos, como de los orden Coleóptera (Tenebrionidae) es una de las plagas más extendidas y destructivas alimentándose de diferentes productos de grano almacenados (Weston y Rattlingourd, 2000; Mishra *et al.*, 2012). La familia Tenebrionidae ha sido asociada a los alimentos almacenados por más de 4.000 años (Levinson, 1994, 1985). Equivalente a 30.000 generaciones de *Tribolium confusum* (Sokoloff, 1972), junto con otros géneros de plagas almacenados (Levinson, 1994, 1995).

Las plagas de almacén pueden causar en los cereales pérdidas de peso y calidad, entre las especies primarias destacan los coleópteros *Rhyzopertha dominica* y *Sitophilus granarius* L, y secundaria *T. castaneum* y *T. confusum* (Viñuela *et al.*, 1993; Rees, 1996).

El género *Tribolium*, sin embargo, se desarrolló principalmente como insectos saprófitos y naturalmente se producen bajo el corteza de los árboles, en la madera muerta y ocasionalmente en los nidos de algunos Himenópteros, su amplia distribución mundial incluye desde humus del suelo, raíces y tallos de plantas, hasta hábitats con condiciones áridas desiertos (Grimm, 2001; Halstead, 1969; Magis, 1954; Sokoloff, 1974).

Robledo, (1986) indica que los insectos encontrados en los productos alimenticios almacenados pueden ser clasificados, en los siguientes tres grupos:

**Plagas primarias:** son aquellas que tienen aparato bucal masticador y son capaces de romper el pericarpio (cubierta exterior del grano) para alimentarse o para depositar ahí sus huevecillo ejemplo de este grupo son gorgojos del trigo, del maíz y del arroz, representados por el género *Sitophilus* y el pequeño barrenador de granos *Rhizopertha dominica*.

**Plagas secundarias:** generalmente se desarrollan, indica presencia, por lo tanto que existen otras plagas más peligrosas que están o estuvieron dañando el grano, un ejemplo típico Es el gorgojo de las harinas *Tribolium confusum*.

**Plagas terciarias:** son aquellas que se desarrollan una vez que el grano ha sido dañado por insecto primario y secundario. Por ejemplo el gorgojo plano del género *Cryptos poridium* estás, conviene mencionar que dentro de las especies que dañan los productos almacenados existen unas que no son insectos, pero que también se constituyen en una plaga bastante molesta una de ellas son las garrapatas que también afectan los grano almacenados.

## ***Tribolium confusum***

### **Origen y Distribución**

El gorgojo confuso de la harina fue notado primeramente en la India en 1893, (Metcalf y Flint, 1979), *T. confusum* tienen distribución cosmopolita (Arrojo, 2004) común para el almacén de granos y alimentos, este destacado insecto tiene una amplia distribución mundial y es muy abundante en los Estados Unidos (Athanassiou *et al.*, 2006). En México se ha localizado en los estados de Guerrero, Michoacán, Chiapas, Guanajuato y Morelos (Gutiérrez-Díaz, 1999).

Otros lugares donde se almacenan granos o productos de granos, una especie estrechamente relacionada, el escarabajo rojo de la harina, se encuentra a menudo asociado con el escarabajo de la harina, esta especie son difíciles de distinguir, particularmente en la etapa larval, la coexistencia de especies en las instalaciones de almacenamiento de las fuerzas insectos para regular su valor biológico, ecológico y características de comportamiento (Trematerra *et al.*, 2000; Athanassiou *et al.*, 2006).

## Ubicación taxonómica

Fue clasificado y descrito por Jacqueline Duval en 1868 citado por Cotton, (1979).

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Mandibulada

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Coleóptera

Suborden: Polyphaga

Superfamilia: Tenebrionioidea

Familia: Tenebrionidae

Género: *Tribolium*

Especie: *T. confusum*

## Importancia económica

Las principales pérdidas causadas por *Tribolium confusum* es principalmente por la alteración en la calidad del producto, provocando una disminución del valor nutritivo en los granos atacados y pérdida de calidad en la panificación de las harinas, a su vez también disminuye el grado de higiene del producto por la presencia de otros insectos, excrementos, huevecillos, etc. (Arthur, 1996).

Unos de los grande detrimentos que causan *Tribolium confusum* son las infestaciones dentro de molinos de harina y traen consecuencias económicas incluyendo la contaminación directa y los costos asociados con el tratamiento y el seguimiento, el rechazo y la devolución de los productos contaminados, y (Campbell y Arbogast, 2004).

Mundialmente entre el 5 y el 15% del peso total de los cereales, de los granos oleaginosas y leguminosas se pierden en postcosecha, entre el 5 y el 10% de estas pérdidas son causadas directamente por plagas (Hill, 1990). Por ejemplo, solamente los gorgojos son responsables de cerca del 34% en la reducción del rendimiento de cosechas a nivel mundial (Oerke, 2006).

Por otra parte la contaminación del producto por los insectos conjunto, huevos, insectos fragmentos, excrementos, y las pieles de fundición pueden ocurrir en las plantas de procesamiento y almacenes (Baur, 1984).

Las larvas, son las responsables de los mayores perjuicios, horadan en granos alojándose en su interior, los productos atacados se contaminan y quedan con un olor nauseabundo (Bentancourt *et al.*, 2010). Unos de los porcentaje de pérdidas de los granos almacenados producidas por insectos son de un 10% en países en desarrollo; sin embargo, en países tropicales se concluye que pueden ser más alta su pérdidas económica (Landaverde, 2003).

### **Alimentación**

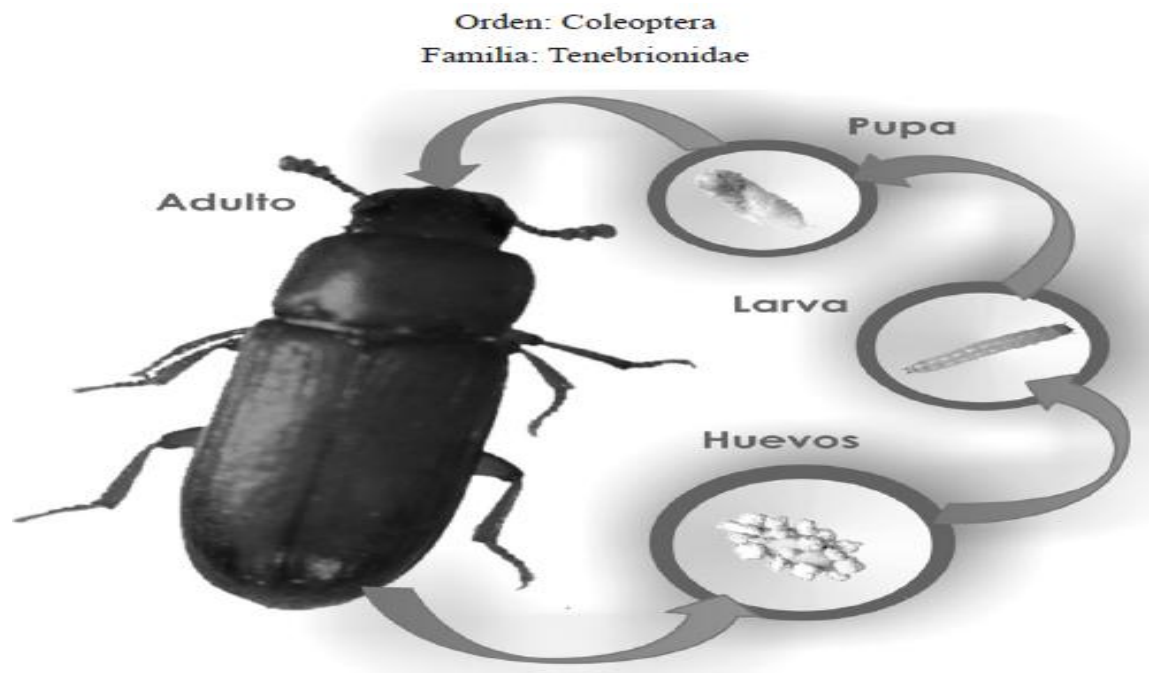
se alimentan de cereales quebrados o que han sido dañados por otros insectos, productos de la molienda de los cereales como harina, salvado (afrecho), semillas de oleaginosas y sus productos, nueces, almendras partidas, maní, alimentos suaves o molidos como galletas, cacao, concentrados alimenticios para animales, tortas de oleaginosas, frutas secas y otros productos (Halstead, 1969).

### **Biología y hábitos**

*T. confusum* presentan metamorfosis completa, es decir que pasan por los estadios huevo, larva, pupa y adulto son pequeños, prefieren sitios oscuros, se esconden en grietas muy reducidas y tienen alta capacidad de reproducción (Landaverde, 2003). Cuerpo de forma alargada y ligeramente aplanado, antenas ensanchándose gradualmente desde la base a los extremos, ojos

pequeños, redondos y la distancia entre ellos es tres veces el diámetro del ojo. Protórax densamente cubierto con diminutos puntos negro, los élitros tienen bandas longitudinales difíciles de ver a simple vista (MANTIX, 2014).

El adulto mide de 3 a 4 mm y es de color café rojizo brillante, no es capaz de volar (OIRSA, 1999) La hembra oviposita hasta 450 huevecillos entre la harina o residuos los huevecillos están cubiertos con una secreción pegajosa que permite que se adhieran a la superficie y facilita la infestación, los huevos incuban entre 5 y 12 días, dando origen a larvas pequeñas, delgadas, cilíndricas que llegan a medir 5 mm de longitud, de color blanco matizado de amarillo (MANTIX, 2014).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Tribolium confusum*



## Descripción morfológica

**Huevo:** Estos son muy pequeños de colores blanco claro cubiertos con una secreción pegajosa que les permite adherirse directamente en el material alimenticio facilitando la transmisión, que crean en un periodo de 5 a 12 días (Metcalf y Flint, 1979).

**Larva:** Las larvas son pequeñas, delgadas y cilíndricas que llegan a medir 5mm de longitud de color blanco con matices amarillos, alcanzando su completo desarrollo en 1 a 4 meses dependiendo de la temperatura y la disponibilidad de alimento (Metcalf y Flint, 1979).

**Pupa:** La pupa al principio es blanca, gradualmente cambia a amarillo, después a café y finalmente se transforma en adulto, el ciclo completo demora de 6 a 8 semanas y los adultos viven de 12 a 18 días (MANTIX, 2014).

**Adulto:** Los insectos adultos son muy activos moviéndose con rapidez cuando son perturbados, pueden sobrevivir a los inviernos moderadamente fríos si no hay una temperatura controlada, y con frecuencia viven dos años o más en el estado adulto, en cuyo periodo la hembra puede llegar a producir de 350 a 500 huevecillos (Metcalf y Flint, 1979).

## **Alternativas de control**

Los métodos de control de plagas en granos almacenados son de muy variada naturaleza, existiendo desde métodos muy sencillos como son: exponer los granos al calor del sol, limpieza de almacenes, uso de métodos como la radiación, temperaturas controladas, hasta la aplicación de insecticidas sintéticos, lo cual contribuye sin duda a la conservación del producto en almacenamiento (Acerca, 2009).

En la actualidad, el hombre en conjunto con los avances tecnológicos ha desarrollado una variada gama de técnicas de control, basadas en el conocimiento preciso de la biología y comportamiento de las especies consideradas como plagas, uno de las principales alternativas de control en los granos almacenados se encuentra los siguientes controles (Lagunes y Rodríguez, 1989).

**Control cultural:** Puede hacerse mediante distintas prácticas como rotación de cultivos, manejo del suelo y restos culturales, población adecuada de plantas, riego, abonos verdes, composta, fertilización del suelo, época y profundidad de siembra, de estas herramientas la más antigua, más eficiente y menos agresiva al ambiente, es la rotación de cultivos y es por eso la que más contribuye a la sustentabilidad ecológica de la agricultura, sin embargo, su potencialidad y uso ha sido poco investigada y adoptada en argentina debido a que la elección de cultivos que integren un sistema de rotación depende de factores fitosanitarios, técnicos y económicos que no han sido suficientemente analizados (Barreto y López, 2004).

**Limpieza:** En primer lugar, la limpieza prevención de los locales y maquinaria es fundamental y debe realizarse antes de introducir la mercancía, ya que los restos de suciedad, de grano viejo, pueden favorecer el desarrollo de insectos, para efectuar esta limpieza son útiles debiéndose quemar posteriormente los desechos ya que pueden estar infestados, igualmente es importante reparar paredes y techos, con el fin de que no tengan grietas que

sirvan de refugio a las posibles plagas, hay que tener en cuenta que la entrada de cualquier mercancía en el almacén puede ser fuente de re infestaciones, por lo que deben ser examinadas antes de introducirlas y siempre que sea posible, a una cuarentena con el fin de detectar niveles pequeños de contaminación (López, 2004).

**Eliminación de residuos:** Después de la cosecha, se deben eliminar al máximo los granos quebrados, los residuos de cosecha, polvo y los restos de tierra e insectos vivos o muertos, ya que el grano sucio o dañado se deteriora más rápido en el almacén y facilita el calentamiento y el desarrollo de plagas y enfermedades (Lindblad, 1979).

**Control mecánico:** El control mecánico de las plagas comprende las técnicas más antiguas y simples de la lucha contra los insectos, estas técnicas consisten en la remoción y destrucción de los insectos y órganos infestados de las plantas, también se incluye la exclusión de los insectos y otros animales por medio de las barreras y otros dispositivos, la aplicación de estas técnicas demanda mucha mano de obra por lo que tienden a desaparecer de las grandes y medianas áreas de cultivo, en ciertos casos, particularmente cuando se trata de la pequeña agricultura, el control mecánico puede aplicarse con relativa eficiencia (Cisneros, 1995).

**Control físico:** Además de la destrucción de los insectos que puede ser realizada por las prácticas agrícolas ordinarias, hay ciertas medidas especiales físicas y mecánicas, que resultan valiosas; estas difieren de las medidas de combate químico en la naturaleza de su efecto sobre los insectos, el cual es una acción física que no incluye acción química sobre el insecto, pueden ser distinguidos arbitrariamente de las medidas culturales de combate, en que incluyen el uso de ciertas operaciones o equipos especiales y generalmente dan resultados inmediatos y tangibles (Metcalf y Flint, 1979). La humedad y la temperatura: son muy importantes en el control de plagas de los granos

almacenados es importante almacenar los granos con contenidos bajos de humedad que reduce la posibilidad de incidencia de insectos (FAO, 1993).

**Temperatura:** El uso de temperaturas elevadas, o tratamientos de calor, se está convirtiendo en popular como una alternativa de bromuro de metilo para desinfectar las instalaciones de procesamiento de alimentos (Mahroof *et al.*, 2003; Roesli *et al.*, 2003). Debido a la inminente eliminación del bromuro de metilo (Makhijani y Gurne, 1995).

**Impacto:** El control de los insectos a través del imparto consiste en lanzar los granos por fuerza centrífuga contra una superficie, lo que mata los insectos en el exterior e interior de los granos, los granos infestados se rompen y los insectos expuestos son retirados por aspiración. Este proceso solo se usa en plantas introducidas que procesan granos para consumo humano a gran escala (FAO, 1993).

**Radiación:** existe varios modos de utilizar la energía radiante en el control de insectos se puede emplear la luz en trampas luminosas para atraer a los insectos y de esta manera disponer de una idea del grano de infestación (FAO, 1993).

**Control biológico:** El control biológico es una práctica muy importante para el manejo de plagas, que consiste en la utilización de organismos vivos para reducir y mantener la abundancia poblacional de una plaga por debajo de los niveles de daño económico, su valor recae en que puede resultar en un control eficiente de una plaga tanto a mediano como a largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental y una producción sustentable, resulta fundamental para los programas de control biológico considerar la ecología, biología y comportamiento de los enemigos naturales de la plaga y de la plaga misma, además de aquellos factores que podrían ser causantes de cambios poblacionales (Brower *et al.*, 1996).

El uso del control biológico en granos almacenados presenta muchas ventajas, la liberación de los enemigos naturales en ambientes confinados, los agentes controladores sobreviven hasta las últimas etapas del almacenamiento, no son dañinas como pueden llegar a serlo los residuos de plaguicidas, no se conoce resistencia por parte del insecto plaga (huésped) y no ponen en peligro a los operadores que realizan la aplicación liberación en este caso (Brower *et al.*, 1996).

Estos métodos han resultado eficaces en algunas situaciones, se ha utilizado *Bacillus thuringiensis* para controlar algunas especies de plagas de insectos en cereales almacenados (Stefanazzi, 2010).

Existen tres categorías principales de control biológico: 1- el clásico, 2- el aumentativo y 3- el conservativo (Villacide y Corley, 2012).

**Control biológico clásico:** se basa en la introducción de un enemigo natural en un nuevo ambiente con el fin de que se establezca de forma permanente y regule a la plaga de manera sostenida en el tiempo, este método es especialmente un paso crítico en los programas de control biológico clásico es el establecimiento del enemigo natural en el área de liberación.

**Control biológico aumentativo:** tiene como objetivo inmediato aumentar la abundancia de los enemigos naturales que ya están presentes en un área afectada, aunque en un número tan bajo que no alcanzan un control efectivo; otro objetivo de esta misma estrategia es la liberación periódica de enemigos naturales ausentes en la zona afectada, debido esto, a que no logran establecerse permanentemente.

**Control biológico conservativo:** Apunta a implementar varias medidas para proteger, aumentar la abundancia y mejorar las actividades de los enemigos naturales ya presentes en el área, para esto, es importante identificar cuáles son los factores que limitan a la población de enemigos naturales o que influyen de manera negativa su acción reguladora y de este modo manipular el hábitat en consecuencia, es

decir, es crítico conocer la biología, la ecología y el comportamiento tanto de los enemigos naturales como de la especie plaga. México existen tres especies de depredadores de plagas de granos almacenados: *Tephalonomia tarsalis*, *Teretriusomani grescens* y *Xolocoris flavipes*, un ejemplo exitoso de control biológico de los granos almacenados es el de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidóptera: Pyralidae) por la aplicación de *Bacillus thuringiensis*, esta bacteria actúa ocasionando una reducción de las infestaciones en más de un 80% (Mc Gaughey, 1985).

### **Control químico**

A raíz del uso irracional de los insecticidas químicos se produjo resistencia de las plagas a los mecanismos de acción de muchos plaguicidas y se pudo establecer que se necesita un método más inteligente para manejar y no necesariamente eliminar las plagas. Es a partir de estas consideraciones que surge el concepto de manejo integrado de plagas cuyas definiciones y estrategias, a pesar de todo, los insecticidas de síntesis química continúan siendo la herramienta del M.I.P. que se usa con mayor frecuencia y efectividad (INC, 2014).

Unos de los principales controles de granos almacenados se encuentra los plaguicidas químicos y especialmente los insecticidas en muchas ocasiones los únicos disponibles, después de la segunda guerra mundial, en los años 1950 se generalizó el uso de los organoclorados y a partir de ahí se desarrolló toda una gama de síntesis química que llevó al descubrimiento de muchos otros grupos químicos con acción biácida muy eficaces para el control de plagas insectiles, a raíz del uso irracional de los insecticidas químicos se produjo resistencia de las plagas a los mecanismos de acción de muchos plaguicidas (Barreto y López, 2004).

El uso de insecticidas ha sido el método más generalizado para el combate de plagas de granos almacenados, empleándose comúnmente los

organoclorados, organofosforados y piretroides (Mejía, 2003). El insecticida malatión que pertenece al grupo de los organofosforados ha sido el más utilizado para el control de granos en almacenes, pero se ha comprobado que los insectos han desarrollado resistencia (Georghiou y Lagunes, 1991).

Entre los grupos toxicológico más utilizados encontramos: organofosforados, piretroides y mezclas de fosforados y piretroides, formulados como líquidos (contratado emulsionable) o como sólidos (polvo), los gases como el bromuro de metilo, fósforos de aluminio, fósforos de magnesio, sólidos inertes como la tierra de diatomeas (reguladores del crecimiento) (INTA, 2013). Así como

La fumigación con fosfina la fosfina es un gas letal para los insectos capaz de eliminar todos sus estadios de desarrollo, incluso los de las plagas primaria ya que difunde hacia el interior del grano (Campbell *et al.*, 2010).

Puede ponerse en contacto con insecticidas tales como el malatión, clorpirifos-metilo y diclorvos en algunas cepas de *T. confusum* (Zettler, 1991). Imidacloprid y tiametoxam son nuevos insecticidas que pertenecen a los neonicotinoides con el modo de acción neurotóxica, imidacloprid ha sido ampliamente utilizado con resultados satisfactorios contra una amplia gama de plagas (Pons y Albajes, 2002; Zhang *et al.*, 2011).

Los insecticidas seleccionados se deben aplicar adecuadamente de tal forma que llegue a los estados del insecto que se quieren controlar, esto es especialmente importante para aquellos compuestos que actúen por contacto o por ingestión o para los que no tienen acción translimitar, cuando se hacen aplicaciones, se debe cuidar que se hagan en el momento apropiado (INC, 2014).

## Resistencia

### Generalidades

La resistencia se define como un cambio genético en un organismo como respuesta a la selección por sustancias tóxicas, que tolerar dosis tóxicas, las cuales resultan letales a la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (WHO,1957).

El desarrollo de la resistencia no con lleva automáticamente al deterioro del control de la plaga, por ejemplo, niveles bajos de resistencia pueden observarse en el laboratorio sin que surjan problemas inmediatos en el campo, sin embargo, si la prevención es alentada, la resistencia deberá detectarse y abordarse en estadios tempranos antes que el fallo en el control de plagas ocurra en el campo, cuando el control de plagas falla en el campo debido a la resistencia del plaguicida (Zettler, 1991).

La resistencia es una característica de fundamento genético que permite a un organismo sobrevivir a la exposición con una dosis de un plaguicida que normalmente podría resultar letal, los genes de resistencia ocurren naturalmente en plagas individuales debido a mutaciones genéticas y de carácter hereditario, los genes se diseminan a través de las poblaciones de plagas debido a un proceso de selección provocado por el uso repetido del plaguicida (FAO, 2012). La resistencia con Insecticidas residuales también se han utilizado contra *Tribolium confusum* especie en molinos y plantas de procesamiento de alimentos, tales como los organofosforados y piretroides (Subramanyam *et al.*, 1989; Collins, 1990).



## **Tipos de resistencia**

**Resistencia por comportamiento:** Se refiere a los patrones de comportamiento que contribuyen a la resistencia, estos pueden ser hábitos tales como la preferencia a descansar en áreas no tratadas con insecticidas en lugar de áreas tratadas, o bien la detección del insecticida y la tendencia a evitarlo antes de ponerse en contacto con él (Carrillo, 1984).

**Resistencia morfológica:** mecanismo físico dado por la formación de estructuras cuticulares, no permiten que el toxico penetre la cutícula del insecto, la velocidad de penetración dependerá de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del integumento del insecto, la cual varía considerablemente entre los estadios de vida (Barbera, 1989). Por otra parte (Carrillo, 1984). Dice que la Resistencia morfológica Se presenta cuando alguna característica morfológica ocasiona la resistencia, por ejemplo una menor área de exposición al tóxico.

**Resistencia de penetración:** mecanismo de resistencia esencialmente limitado a insectos, en los que la cutícula retarda la penetración del plaguicida en el cuerpo de la plaga, la resistencia de penetración está usualmente presente con otras formas de resistencia y la penetración reducida intensifica los efectos de aquellos otros mecanismos (FAO, 2012).

**Selección de resistencia:** es la sobrevivencia de individuos resistentes en una población mientras que los individuos susceptibles son eliminados por el tratamiento del plaguicida, los individuos resistentes son “seleccionados” para sobrevivir y producir nuevas generaciones resistentes, el resultado neto es que el uso continuado del plaguicida termina seleccionando una población de plagas que se convierte menos susceptible al plaguicida, el proceso de selección puede ser rápido, en uno o dos estaciones, o desarrollarse lentamente a lo largo de varios años, lo cual dependerá de la plaga, la exposición al plaguicida y la genética de la resistencia a un plaguicida particular (FAO,2012).

## **Resistencia cruzada y resistencia múltiple**

Resistencia cruzada es la necesidad de seleccionar un insecticida alternativo, un insecto puede ser resistente a 2 insecticidas o más y cada resistencia puede ser atribuida a diferentes mecanismos (WHO, 1957).

Según LA FAO (2012) La Resistencia cruzada es transferida a otro plaguicida aun cuando la plaga no ha estado expuesta a este último producto, la resistencia cruzada ocurre debido a que dos o más compuestos actúan sobre el mismo sitio objeto de acción o se afectan por igual mecanismo de resistencia, la resistencia cruzada se desarrolla más comúnmente con compuestos que tienen el mismo modo de acción y que son con frecuencia, pero no siempre, químicamente relacionados dentro de un mismo grupo químico, la resistencia puede ser completa o parcial (si hay más de un mecanismo responsable de la resistencia).

Por otra parte la FAO (2012) Menciona que la resistencia múltiple la presencia simultánea de varios mecanismos diferentes de resistencia en el mismo organismo, los distintos mecanismos de resistencia pueden combinarse para aportar resistencia a clases múltiples de plaguicidas, en el campo, la resistencia múltiple y la resistencia cruzada pueden aparecer, pero la primera se desarrolla a partir de casos de selección por separado, mientras que la segunda resulta de los mecanismos de resistencia compartida.

Georghiou (1983) menciona que la resistencia múltiple se basa en la premisa de que el control se puede alcanzar mediante la acción de varios factores que actúan de manera independiente, incluyendo a los insecticidas, donde cada uno ejerce una presión de selección que está abajo desnivel que puede conllevar al desarrollo de la resistencia, en un sentido amplio, este enfoque incluye la aplicación de insecticidas en mezcla o en rotaciones.

**Resistencia metabólica:** Marrero y Colomé (2006) han realizado estudios recientes de detoxificación en insectos revelan que la versatilidad en la adaptación de los insectos a su medio es provista por el fenómeno de inducción, este es un proceso en el cual un estímulo químico promueve la actividad del sistema de detoxificación mediante la producción de enzimas adicionales, un total de 12 especies de insectos responden a inductores mediante la producción de niveles incrementados de enzimas como las oxidasas microsomales, deshidroclorinasas, fosfotransferasas, carboxilesterasas, epoxidohidratasa y sulfotransferasas, los sistemas de detoxificación más importantes que constituyen la resistencia metabólica en insectos son: las oxidasas microsomales, la glutatión s-transferasa, de importancia en el metabolismo de insecticidas organofosforados, y las carboxilesterasas, las cuales degradan carbamatos, organofosforados y piretroides (Bisset, 2002).

La FAO (2012) reporta que la resistencia metabólica en insectos permite que sean capaces de desintoxicar o descomponer la toxina más rápidamente que los insectos susceptibles, o que rápidamente eliminen las moléculas tóxicas de sus cuerpos. Los insectos usan sus sistemas enzimáticos para descomponer los insecticidas y las cepas resistentes pueden poseer niveles más altos de estas enzimas o de enzimas que son más eficientes durante la desintoxicación además, para ser más eficientes, estos sistemas enzimáticos tienen también un espectro más amplio de actividad, o sea ellos pueden degradar muchos plaguicidas diferentes, resistencia de conducta, cualquier modificación en la conducta de la plaga que le ayuda a evitar los efectos letales de los plaguicidas, el organismo, plaga es aún sensible al plaguicida y será eliminado de exponerse a una dosis letal del plaguicida, por consiguiente, aquellos individuos que evaden la exposición logran sobrevivir y reproducirse, lo cual puede conllevar al desarrollo de una cepa o individuo resistente en su comportamiento (FAO 2012).

## **Mecanismos genéticos de la resistencia**

El fenómeno de la resistencia surge como resultado de la interacción insecto, insecticida, originando focos o poblaciones resistentes, como esta capacidad llega a estar determinada genéticamente, es heredable a nuevas generaciones, que siguen sobreviviendo al tratamiento con insecticida mientras se disminuye la proporción de individuos susceptibles en la población, de esta manera el insecticida actúa como una fuerza selectiva poderosa que concentra individuos resistentes en la población (Cochran, 1989).

## **Detección de los mecanismos de la resistencia.**

Los conocimientos adquiridos a través de estudios genéticos y bioquímicos permiten establecer dos conceptos importantes al momento de estudiar y comprender el fenómeno de la resistencia en poblaciones de insectos el primero de ellos es el de la resistencia cruzada la cual ocurre cuando la selección para un compuesto produce simultáneamente resistencia a uno o más compuestos a los que el insecto no ha sido expuesto (Soderlund y Bloomquist, 1990).

## **Determinación de resistencia**

La resistencia se ha mostrado mediante la utilización de pruebas de susceptibilidad a insecticidas, conocidas también como bioensayos, basados principalmente en pruebas de dosis-mortalidad, estos métodos permiten cuantificar el nivel de resistencia a insecticidas, pero no detectan los mecanismos responsables de ésta (Cruz y Rodríguez, 2014).

## **Bioensayos**

El bioensayo es considerado como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de alguna sustancia o material, es medida en términos

de la respuesta biológica que produce, los objetivos de mayor importancia al realizar un bioensayo, se encuentran: la determinación de varios tóxicos contra una población de insectos, la determinación de la susceptibilidad de diferentes especies de artrópodos a un tóxico, así como la cantidad de un tóxico en un sustrato (Cruz y Rodríguez, 2014).

### **Electroforesis**

Separa moléculas en dependencia fundamental de su carga, desplazando proteínas bajo influencia de un campo eléctrico, se emplean geles de acrilamida que se polimeriza y forma redes que permiten el paso de proteínas de diferentes pesos moleculares (Ibel *et al.*, 1990).

### **Pruebas moleculares**

Métodos moleculares se pueden usar tanto para verificar la presencia de un organismo como para identificarlo métodos diagnósticos moleculares para la detección precoz de esta enfermedad, incrementa la precisión y reduce la variabilidad asociada a los bioensayos (Devonshire, 1990). Se obtienen patrones de banda de ADN que son utilizados como marcadores genéticos para una especie (Ffrench *et al.*, 1994).

### **Pruebas bioquímicas**

Pruebas bioquímicas, son ensayos múltiples que permiten analizar a una población de insectos cuantifican los niveles de una reacción enzimática (Brown y Brodon, 1987). Desarrollados para cuantificar niveles de este razas (Brogdon y Dickinson, 1983). Acetilcolinesterasa, (Devonshire y Moores, 1984). Glutation S-Transferasas (Brogdon y Barber, 1990). Y oxidasas (Brogdon *et al.*, 1997). Para la identificación de los distintos microorganismos aislados se realizarán pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas, estos procedimientos nos permiten aplicar técnicas de siembra por estría en el medio, obtener

cultivos puros del microorganismo y luego proceder a la identificación de cada uno de los aislados clínicos (Marrero, y Colomé, 2006).

### **Enzimas de resistencia**

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones centrales en procesos metabólicos (Mahan *et al.*, 2004). y sus inhibidores están presentes en la naturaleza jugando importantes papeles fisiológicos, como la regulación de actividad de enzimas propias (García y Hernández, 2000). Los inhibidores proteínicos de enzimas proteolíticas han sido reportados en todos los taxos y son particularmente abundantes en órganos de almacenamiento, como semillas o huevos, donde representan una gran proporción de la fracción soluble de proteínas (Konarev *et al.*, 2000).

### **Esterasas**

Esterasas constituyen una gran familia de enzimas que son responsables del metabolismo lipídico y de la detoxificación de xenobiotico, entre otras funciones, (Oakestott *et al.*, 2005).

### **Acetilcolinesterasa**

La acetilcolinesterasa es una enzima clave del sistema colinérgico porque regula el nivel de la acetilcolina en las terminaciones de los impulsos nerviosos mediante la catalización de la hidrólisis de la acetilcolina, los insecticidas y carbamatos se han desarrollado como inhibidores de esta enzima, estos insecticidas tienen propiedades similares a la acetilcolina pero son hemisubstratos porque fosforilan o carbamilan la serina de sitio activo que conduce a la inhibición irreversible de la enzima, (Bourguet *et al.*, 1997).

En la acetilcolinesterasa modificada, se produce una disminución de la reacción con el insecticida, perdiendo éste su efectividad, en ocasiones también se ve disminuida la función catalítica de la enzima, pero debido a su función

vital, nunca lo hace por debajo de un valor umbral compatible con la supervivencia, también puede darse el caso de que la resistencia se deba a un incremento de la actividad, causada a su vez por una mayor efectividad catalítica o por un incremento en la cantidad de enzima, pero este hecho suele ser menos frecuente (Fournier y Mutero, 1994).

### **Glutación-S-Transferasa**

Según Jakoby y Habig (1980) son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación de componentes hidrofóbicos con el 30 tripéptido glutatión en la reacción, el grupo tiol del glutatión reacciona con un lugar electrofílico del compuesto para formar el conjugado que puede ser metabolizado o excretado. GST pueden metabolizar los insecticidas al facilitar su deshidrocloración reductiva o mediante las reacciones de conjugaciones con glutatión reducido, para producir metabolitos solubles en agua que se excretan más fácilmente (Enayati *et al.*, 2005). Se ha asociado como uno de los mecanismos de resistencia a los insecticidas carbamatos (Lalah *et al.*, 1995). En estudios bioquímicos realizados con DDT se relacionó con el incremento de las GST (Mourya *et al.*, 1994; Ranson y Hemingway, 2004; Lumjuam, *et al.*, 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en la Universidad autónoma Agraria Antonio Narro En Saltillo, Coahuila, México. En el laboratorio de toxicología del departamento de Parasitología Agrícola.

### Material biológico

El trabajo se desarrolló a partir de una colonia de *Tribolium confusum*, facilitado por el laboratorio de toxicología del departamento de parasitología, Se realizó la identificación de *Tribolium confusum* según las características señaladas en la revisión de literatura, posteriormente los insectos se mantuvieron en la cámara bioclimática LAB-LINE® colocados en frascos de vidrio con capacidad de 3900 ml. con harina integral y se mantuvieron a una temperatura de  $30 \pm 2$  ° C, con una humedad relativa de 30 %, con oscuridad las 24 horas, se dejó para su reproducción hasta tener la cantidad de adultos suficientes para realizar pruebas futuras

### Bioensayos

Se utilizó la técnica de película residual (Dennehy *et al.*, 1987). Se realizaron diferentes concentraciones de deltametrina del producto DECIS® al 10.7 % con tres repeticiones más un testigo al cual solo se le aplicó acetona. Se tomó 1ml de cada concentración y se distribuyó uniformemente en toda la superficie de caja Petri, se esperó a que se volatilizara el solvente, posteriormente se introdujeron diez insectos por repetición,



**Cuadro 1.** Concentraciones utilizadas de ingrediente activo deltametrina Para evaluar la mortalidad y resistencia en *Tribolium confusum*.

Producto	Concentración(ppm)						
Deltametrina	100	150	200	250	300	350	400

Se tomaron las lecturas de mortalidad en cada concentración, los conteos se realizaron a las 24 horas después de haberlos introducido en las cajas Petri, se utilizó un termo agitador, cuya función es la de transmitir calor y estimularlos al movimiento y diferenciar a los insectos vivos de los muertos se consideró como criterio de muerte apéndices pegadas al cuerpo, cambio de coloración, movilidad nula al estímulo del pincel y de calor.

### **Cuantificación de proteína**

Para conocer la cantidad de proteína total se empleó la metodología descrita por Brogdon (1984). Dicho método consiste en cuantificar una proteína de referencia “Albumina sérica bovina” (BSA) para la obtención de una curva estándar, donde se consideraran los datos comprendidos entre 80 y 140  $\mu\text{L/mL}$  de proteína.

### **Preparación de reactivos.**

Reagente: Se disolvió 20 mL de colorante (reagente) con 80 mL de H<sub>2</sub>O esterilizada, se pasó por papel filtro para obtener una dilución, posteriormente la preparación de Buffer (KPO<sub>4</sub>). Se disolvió 6.6 g de fosfato dibasico con 1.7 g fosfato monobasico, aforando a 1000 mL de H<sub>2</sub>O esterilizada.

### **Preparación de homogenatos.**

En tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron una muestra de un insecto: (1), cada muestra con 3 repeticiones. Se agregó 500 mL de diluyente buffer  $KPO_4$  (fosfato de potasio) se trituraron con un homogenizador de tejidos, se aforó a 1 mL adicionándole 900  $\mu$ L de diluyente.

### **Lectura de absorbancias**

Se colocó un insecto *T. confusum* en el tubo Eppendorf y se trituró con ayuda de un macerador de tejidos, para eliminar los restos de los élitros, se extrajeron las hemolinfas con ayuda de una piteta y se colocan ordenadamente con diferentes concentrados de 0.25 a 3 insectos en tubos de Eppendorf, posteriormente se aforan con una solución buffer a 1 mL y se mantuvieron en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente se colocó en la placa 20 $\mu$ L de homogenato 80  $\mu$ L de solución buffer y 200 microlitros de colorante diluido por último se colocan en las placas de 96 pozos que es el lector de placas en donde nos da la absorbancia de resultado. Las pruebas se corrieron por triplicado cada una en placas de 96 cavidades, posteriormente fueron leídas mediante el lector de placas (BIOTEK® ELx800, BioTek Instruments). Obteniendo los valores de absorbancia con un filtro de 630 nM, sin filtro diferencial.

### **Ensayos en Microplacas**

Se realizó una serie de pruebas bioquímicas (ensayos en microplacas), los métodos en microplacas se tuvieron que adaptar a partir de los métodos ya descritos para mosquitos (Brogdon *et al.*, 1983, 1984, 1988, 1990, y 1997). Para poder determinar los niveles de  $\alpha$ -esterasas,  $\beta$ -esterasas, oxidasas, glutatión s-transferasas y acetilcolinesterasa

## Interpretación de resultados

A los datos arrojados por el lector de placas, se les obtuvo la media de cada repetición (tres pozos), mediante la ecuación de la curva estándar de referencia del método de Brogdon (1984) dada por la interpolación de  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de proteína y la

Absorbancia, se obtuvieron analíticamente los valores comprendidos en un rango establecido por el autor. La ecuación de la recta fue:  $y = - 0.5033 + 0.7249 (x)$ ; donde se sustituyen los valores de las medias de las absorbancias, obteniendo los valores de  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de proteína, fueron tabuladas y se obtuvo la media del contenido de proteína, comparándolas para decidir la cantidad de insectos a emplear para la determinación de enzimas.

## Pruebas bioquímicas

Prueba de esterasas elevadas no específicas ( $\beta$ -Esterasas)

Mide los niveles de  $\beta$ -Esterasas no específicas presentes.

**Preparación de reactivos.** Acetato de  $\beta$ -naftil: se disolvió 56 mg de  $\beta$ -naphthyl acetate en 20 mL de acetona y se agregó 80 mL de buffer ( $\text{KPO}_4$ ). Para preparar O-Dianisidina (fastblue), se disolvió 50 mg de O-Dianisidine (fast-blue) en 50 mL De  $\text{H}_2\text{O}$  esterilizada. Este último reactivo se preparó inmediatamente antes de usarlo, ya que se degrada fácilmente, un indicador es su coloración, cuando adquiere una tonalidad ámbar se descarta y se prepara uno nuevo.

**Lectura de absorbancias.** En cada pozo de la microplaca, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  del homogenato de insectos, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de acetato de  $\beta$ -naftil, se dejó incubar por 10 minutos, pasado el tiempo, agregando 100  $\mu\text{L}$  de Dianisidina, estos pasos se realizan por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se dejaron incubar durante 2 minutos y se corre en el lector de

placas usando un filtro de 540 nM. Una vez arrojadas las lecturas de absorbancias, se promedian según su muestra y su repetición para el análisis de resultados. Se emplearon los pozos G10, G11, G12 como control positivo donde se agregó 300  $\mu$ L de  $\beta$ -naftil a cada uno y H10, H11, H12 para control negativo agregando 300  $\mu$ L de de buffer ( $KPO_4$ ).

### **Prueba de reacciones de oxidasa**

Mide los niveles de peroxidasas

**Preparación de reactivos.** Buffer de Acetato de Na (0.25 M): se disolvió 16.6 mL de 3M Sodium Acetate en 180 mL de H<sub>2</sub>O esterilizada, después se aforó a 200 mL, ajustando el pH 5.0 adicionándole ácido acético glacial. Para el TMBZ, se disolvió 50 mg de 3, 3', 5, 5'- Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride, en 25 mL de Metanol, agregando 75 mL de 0.25 M Na Acetate buffer, se dejó disolver durante varios minutos. Por último para el Cytochrome-C: se pesaron 10 mg de Cytochrome-C (de corazón de bovino) y fueron disueltos en 100 mL de Buffer de Acetato de Na (0.25 M) pH 5.

**Lectura de absorbancias.** Se colocaron 100  $\mu$ L del homogenato de insectos, se agregan 200  $\mu$ L de TMBZ, agregado una gota (25)  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 3%, estos pasos se realizaron por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se dejó incubar por 5 minutos, pasado el tiempo se corrió en el lector de placas usando un filtro de 620 nM. Una vez arrojadas las lecturas de absorbancias, se promediaron según su muestra y repetición para el análisis de resultados. Se emplearon los pozos G10, G11, G12 como control positivo donde se agregó 300  $\mu$ L de Cytochrome-C a cada uno y H10, H11, H12 para control negativo agregando 300  $\mu$ L de buffer ( $KPO_4$ ).

## **Prueba Glutathion S-transferasa**

Mide los niveles de Glutathion S-transferasa presentes

**Preparación de reactivos.** Reduced glutathione: se disolvieron 61 mg de reduced glutathione en 100 mL de buffer ( $KPO_4$ ). Para cDNB, fueron disueltos 20 mg de 1-chloro-2,4'- dinitrobenzene en 10 mL de Acetona y se agregaron 90 mL de buffer ( $KPO_4$ ); este reactivo es viable de 3 a 4 días a 4 °C.

**Lectura de absorbancias.** Se colocó 100  $\mu$ L del homogenato de insectos, se agregaron 100  $\mu$ L de Reduced glutathione, y 100  $\mu$ L de cDNB, estos pasos se realizaron por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se corrió inmediatamente (T0) en el lector de placas usando un filtro de 340 nM, se volvió a correr transcurridos 5 minutos (T5). Las lecturas de absorbancias, se promediaron según su muestra y su repetición en donde se tomaron en cuenta las diferencias de ambos tiempos (T5 - T0) para el análisis de resultados. En esta prueba en particular no se contemplan controles, tanto los positivo como los negativos por lo que se dejaron los espacios vacíos.

## **Prueba de acetilcolinesterasa**

Mide la cantidad de acetilcolinesterasa presente

**Preparación de reactivos.** ATCH: se disolvió 70 mg de Acetylthiocholine iodide (ATCH) en 10 mL de acetona y se agregó 90 mL de buffer ( $KPO_4$ ); para el DTNB, se prepararon 13 mg de Dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) y fueron agregados 100 mL de buffer ( $KPO_4$ ), este reactivo puede durar de 3 a 4 días a 4 °C.

**Lectura de absorbancias.** Se colocaron 100  $\mu$ L del homogenato de insectos, se agregaron 100  $\mu$ L de ATCH y 100  $\mu$ L de DNTB, estos pasos se realizan por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se corrieron inmediatamente (T0) en el lector de placas usando un filtro de 414 nM, se volvió

a correr transcurridos 10 minutos (T10). Las lecturas de absorbancias se promediaron según su muestra y su repetición en donde se tomararon en cuenta las diferencias entre ambos tiempos (T10 - T0) para el análisis de resultados. Se emplearon los pozos G10, G11, G12 y H10, H11, H12 para control negativo, los cuales se les agregó 300 de  $\mu\text{L}$  buffer ( $\text{KPO}_4$ ) a cada uno.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron para obtener las proporciones de resistencia, para poder referenciar las poblaciones respecto a su contenido de enzimas cuantificadas en absorbancias, las cuales fueron arrojadas por un espectrofotómetro, leídos con diferentes filtros según la enzima a analizar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados observados en los experimentos:

Como se puede observar en el cuadro 2, el valor de la CL<sub>50</sub> para la población susceptible es de 42.231 ppm, mientras que, para la población tolerante requiere 187.677 ppm para matar el 50% de su población, la razón entre estos es de 4.443 veces mayor la población tolerante, respecto a la susceptible, por lo que no se puede hablar de resistencia, ya que para ello se necesita una proporción mayor a 10x. Los límites fiduciales al 95 % para la línea tolerante es 179.829 y 195.273 ppm, mientras que para la susceptible es de 39.235 y 45.394 ppm,

Arenas y Sánchez, (1988) Reporta una CL<sub>50</sub> de 134.1 ppm para una población tolerante, estos resultados son menores en comparación a los reportados en esta investigación, siendo 3.17x más tolerante comparada con nuestra línea susceptible, esto sugiere que nuestra población susceptible presenta una tendencia a tolerar concentraciones de deltametrina y su nivel de susceptibilidad es baja

**Cuadro 2.** Concentraciones letales medias y límites fiduciales de ambas poblaciones de *T. confusum*.

Especie	Pob	Concentración letal media				Ec. pr.
		Ppm				
		CL <sub>50</sub>	Lim. Fid.	CL <sub>05</sub>	CL <sub>95</sub>	
<i>T. confusum</i>	L.	187.67	179.829-	118.56	297.07	Y=-
	T.	7	195.273	6	2	33.561+14.763*log(x)
	L.	42.231	39.235-45.394	17.715	100.67	Y=-12.686
	S.				5	+7.804*log(x)

Pob: población, L. R.: línea resistente, L. S.: línea susceptible, Ppm: partes por millón, CL: concentración letal, Lim. fid.: límites fiduciales (95%), Ec. pr.: ecuación de predicción.

En el caso de la cuantificación de  $\alpha$ -Esterasas, en (Cuadro 3) muestran los valores de ambas poblaciones son 1.922 y 1.888 para *T. confusum* tolerante y susceptible respectivamente, ambos valores se encuentran en el mismo grupo estadístico, no habiendo diferencia estadística entre ellos, por lo que el contenido de  $\alpha$ -Esterasas, es indistinto sea tolerante o sea susceptible.

Brown (1990) menciona que los insecticidas usados convencionalmente en el control de plagas de granos almacenados, son insecticidas organofosforados, carbámicos y piretroides, los cuales son altamente susceptibles al ataque de enzimas esterasas, provocando en las poblaciones de insectos el incremento de esterasas como medio de detoxificación de los plaguicidas.

En cuanto las  $\beta$ -esterasas (Cuadro 3) muestran que si hubo diferencia significativa en la cuantificación de ambas poblaciones, registrando 1.1385 y 1.8427 para las poblaciones susceptible y tolerante respectivamente, por lo tanto, las  $\beta$ -esterasas contenidas mayormente en las poblaciones tolerantes permiten tolerar cierto grado más al insecticida deltametrina, ya que se requiere mayor concentración para matar el 50 % de la población (Cuadro 2), por lo tanto la población susceptible tienden a producir  $\beta$ -esterasas en menor cantidad respecto a las tolerantes.

Ponce *et al.* (2009) reportan que la sobreproducción de  $\beta$ -Esterasas es un mecanismo detoxificativo en insecticidas sintéticos, al registrar los valores más altos en adultos resistentes de *Aedes albopictus*; por su parte (Flores *et al.*, 2006) determina proporciones de resistencia del 100 % en mosquitos de *Aedes aegypti* relacionadas a estas enzimas, responsables de resistencia, a través de la detoxificación de organofosforados y carbamatos.



**Cuadro 3.** Niveles enzimáticos en poblaciones de *Tribolium confusum*

Enzima	<i>Tribolium confusum</i> (Media $\pm$ SD *)			
	Susceptible		Tolerante	
$\alpha$ -EST	1.9222	$\pm$ 0.308 a	1.8888	$\pm$ 0.738 a
$\beta$ -EST	1.1385	$\pm$ 0.186 b	1.8427	$\pm$ 0.180 a
Ox	0.0375	$\pm$ 0.003 a	0.0310	$\pm$ 0.002 a
GST	0.0082	$\pm$ 0.001 b	0.0153	$\pm$ 0.004 a
ACE	0.0146	$\pm$ 0.003 b	0.1440	$\pm$ 0.006 a

S.D.: desviación estándar, \*: líneas con diferente letra son estadísticamente diferentes

Para el caso de las oxidasas en el (cuadro 3) nos enseñan los valores de ambas poblaciones son 0.0375 y 0.0310 para la población tolerante y susceptible respectivamente, el contenido de estas enzimas presentan los mismos niveles estadísticamente, por lo que se puede asociar que las oxidasas para este experimento en particular no inducen tolerancia de deltametrina.

Por su parte Pimentel *et al.* (2008), mencionan que las enzimas oxidasa juegan un papel fundamental en la detoxificación de varios compuestos plaguicidas, estas participan directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y los puedan detoxificar (Benhalima *et al.*, 2004).

Respecto a la enzima Glutation S-Transferasas, observando el (cuadro 3) entre las poblaciones se registra diferencia estadísticamente significativa con valores de 0.0153 0.0153 y 0.0082 para tolerante y susceptible respectivamente, siendo la población susceptible la que presento menor

contenido de GSTs, y por lo tanto la población tolerante registró mayores niveles, esto permite inferir que las GST confieren tolerancia a deltametrina para *T. confusum*, con efecto similar se presenta el contenido de acetilcolinesterasas siendo estadísticamente diferentes, donde la producción de acetilcolinesterasas es mayor en la población tolerante con 0.1440, y 0.0146 para la población susceptible.

Por otra parte, Glutación S-transferasas y la cantidad de enzima individual presente en insectos susceptibles y resistentes han demostrado ser uno de los factores responsables de la resistencia a varios insecticidas entre ellos los organoclorado y el DDT a través de la dehidroclorinación (Brattsten *et al.*, 1986; Paton *et al.*, 2000). En lo que respecta a acetilcolinesterasa varios autores reportan a estas enzimas como causa de resistencia en especies de insectos, tanto que la actividad enzimática entre individuos (Dauterman, 1983)

## CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en nuestros experimentos, podemos concluir lo siguiente:

La población tolerante requiere 187.677 ppm de deltametrina para matar el 50% de su población, siendo esta concentración mayor respecto a la  $CL_{50}$  de la población susceptible, la razón entre ambas concentraciones de 4.443 veces mayor.

Las  $\beta$ -Esterasas, acetilcolinesterasas Y Glutación S-Transferasas se encuentran mayormente en las poblaciones tolerantes, por lo que en nuestra población de *T. confusum*, dichas enzimas confieren un cierto grado de protección contra deltametrina.

## LITERATURA CITADA

- Agrolinkfito, 2012. Único banco interactivo de agrotóxicos e fitosanitarios do Brasil. Cultura x Classe: Selecciona herbicidas, insecticidas, fungicidas entre otros, para cada cultura. Available from: <http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito>.
- Aitken, A. D. 1975. Insect Travelers. I: Coleoptera. Techn. Bull. 31. H.M.S.O. London. 190 pp.
- Arias. V. C 1981. Manual de procedimientos para el análisis de granos. Universidad autónoma de Chapingo, México.p.38
- Arthur. F .H .2008. Aerosol distribution and efficacy in a commercial food warehouse. Insect Science 15, 133-140.
- Arrojo. W .L. Tantaleán M. Huanca-M. Javier. 2004. Registró de nuevo huésped intermediario de *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) en el Perú. v.11 n.1p38
- Arthur. F. H. 1996. Grain protectants: current status and prospects for the future. J. Stored Prod. Res. 32:293-302.
- Aserca. 2009. El manejo de los granos básicos. Apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria. Sagarpa. México, D.F.37p.
- Athanassiou. C. G. Kavallieratos, N.G. Trematera, P. 2006. Responses of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) to traps baited with pheromone and food volatiles. European Journal of Entomology 103, 371-378.
- Baur. F.J. 1984. Introductory background information. In: Baur, F.J. (Ed.), Insect management for food storage and processing. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 1e14.

- Bisset. J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Instituto de medicina tropical "pedro kouri".p54
- Brower. J. I. smith. P. V y Flinn. P. 1996. Biological control in: Subramanian.b y d. hag strum (eds). Integrated management of insects in stored products. Marcel Dekker, Inc. New York. USA p 223-286.
- Brown. T. M. Brogdon, W. G. 1987. Improved detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. Annu. Rev. Entomol. 32: 145-162.
- Campbell, J. F., y C. R. 2003. Patch exploitation by female red flour beetles, *Tribolium castaneum*. J. Insect Sci. 3: 20. (insectscience.org/3.20)
- Campbell. J .F. y Arbogast. R. T. 2004. Stored product insects in a flour mill: population dynamics and response to fumigation treatments. Entomologia Experimentalis et Applicata 112, 217e225.
- Campbell, J. F., Toews, M. D., Arthur, F. H., Arbogast. R. T., 2010. Long-term monitoringof *Tribolium castaneum* populations in two flour mills: rebound after fumigation.J. Econ. Entomol. 103, 1002 a 1011.
- Carillo. R .H. 1984. Análisis de acción conjunta de insecticidas en larvas de gusano cogollero del maíz (j.e. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) tesis de maestría en ciencias. Centro de entomología y acarología. Colegio de postgraduados. Chapingo México. p. 82.
- Castro. G. H. y Paredes H. E., 2009. Manual para el manejo de granos almacenados en silos metálicos y plagas en pos cosecha. Universidad autónoma Chapingo centro regional universitario sur. 38p.

- Christeller. J. T. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *The FEBS Journal* 272: 5710-5722.
- Cochran. D. G. 1989. Monitoring for insecticide resistance in field collected strains of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 82:336–41.
- Cruz. G. C. y Rodríguez. P. C. Ocañaz. F J. 2014. Susceptibilidad y resistencia a insecticida en mosquito transmisor del dengue salud en tabasco. Secretaría de salud del estado de tabasco. p 54-59
- Cassini, C., Rodríguez. J., Bartosik. R., Peiretti, J. Cabral, G. 2005. Trigo eficiencia de cosecha y postcosecha de granos. Manual técnico n.º 1. Sección pos cosecha. ediciones inta. 120 p.
- Cisneros. V. F. 1995. Control de plagas agrícola. AGCS. Electronicos, Lima, Perú. p. 313.
- Descamps. I .R., Reviriego. M .E., Suárez. A. A., Ferrero. A. A. 2004. Reproducción de *sitophilus oryzae* L. (coleoptera: curculionidae) y de *Tribolium castaneum herbst.* (Coleóptera: Tenebrionidae) en cultivares de trigo argentinos bol. San. Veg. Plagas, 30 (1), 171-176.
- Devonshire. A. I. Moores. G. D. 1982. Acarboxyl esterase with broad substrate specificity causes organ phosphorous, carbamate and parathyroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 18: 235- 246.
- Devonshire. A. I. 1990. Biochemical and molecular genetic analysis of insects populations resistant to insecticides. Brighton crop protection conference. Pest and diseases. pp. 889-896

- Ehrlich, P. R., Ehrlich, A. 1981. Extinction: the causes and consequences of the disappearance of species. Random house, New York City, USA. 305.
- Enayati. A. A. H., Hemingway. J. 2005. Insect glutathione Transferases and insecticide resistance. *Insect mol.Biol.*19.3-8.
- FAO.1985. Manual of pest control for food security reserve grain stocks. Fao. Plan production and protection paper n° 63 Rome (Italy).200 pp.
- FAO, 1993. Manual de madejo postcosecha de granos a nivel rural. Controles curativos. Depósito de documento de la FAO .departamento de agricultura.
- FAO. 1999. Pesticide Residues in Food-1998 Evaluations. Part II. Toxicological. World Health Organization. (Food and Agriculture Organization [WHO/PCS/99/18].
- FAO. 2012. Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas.p59
- Faostat. 2013. Food and agriculture organization of United Nations (FAO), statistics division, roma. En: <<http://faostat.fao.org/>> [accesado el día 14 de mayo de 2013]
- Flinn, P. W., D. W. Hagstrum, C. Reed, and T. W. Phillips. 2007. Stored Grain Advisor Pro: decision support systemfor insect management in commercial grain elevators. *J. Stored Products Res.* 43: 375-383.
- Fernández. A. M., Llompart, M., Lamas, J. P., Lores, M. G., Jares, C., Cela, R. Dagnac.T. 2008. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural

- soils by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1188, 154-163.
- García. C. F. L. Y Hernández. C. (2000). Use of Protease Inhibitors in Seafood Products. In *Seafood Enzymes. Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. New York: Marcel Dekker, Inc. (ed. N. F. Haard & B. K. Simpson), pp. 531-547.
- Georghiou. G. P. 1983. Management of resistance in arthropods, pp 769-792. In *Pest resistance to pesticides*. G. P. Georghiou y T. Saito, eds., New York, Plenum Publishing.
- Good, N. E. 1937. Insects found in the milling streams of flour mills in the southwestern milling area. *J. Kans. Entomol. Soc.* 10: 135-148.
- Grimm R. 2001. Faunistik und taxonomie einiger arten der gattung *Tribolium* MacLay, 1825, mit beschreibung von drei neuen arten aus Africa (Coleoptera, Tenebrionidae). *Entomofauna* 22: 393-404.
- Gutiérrez. D. I. J. 1999. Insectos asociados a granos y productos almacenados. In: *catálogo de insectos y ácaros plaga de los cultivos agrícolas de México*. Sociedad Mexicana de entomología. Publicaciones especiales número 1. México. pp. 107-124.
- Halstead. D. G. H. 1969. A new species of *Tribolium* from north America previously confused with *Tribolium madens* (Chap.). (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal Stored Prod. Res.* 2 (4) 273-313.
- Hernández, C., Rodríguez, Y. Nino. Z. 2009. Effect of storage of maize (*Zea mays*) on the quality of oil extracted. *Inf. Technol.* 20 (4):21-30



- Ibel. K. May, R. P., Kirscheer. K. Szadkowski. H. Mascher, E. A. Lundahl. P. 1990. Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate protein complexes as determined by neutron scattering. *Eur. J. Biochem.* 190: 311-318.
- Konarev. A.V. Anisimova IN, Gavrilova. V.A. Rozhkova. V.T, Fido. R. Tatham. A.S & Shewry PR (2000) Novel proteinase inhibitors in seed of sunflower (*Helianthus annuus* L.)
- Lagares. A. 1994. Extractos de polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas del maíz y el frijol en la agricultura de subsistencia. Usaid conacyt buroconsa. P.35
- Lalah. J. O. Chien. C. I. 1995. Motayama N and Dauterman. W.C. Glutathione S-transferases:  $\alpha$ -Naphthyl acetate activity and possible role in insecticide resistance. *J Econ Ent.* ; 88:768-70.
- Lawrence. P.K. & Koundal. K. R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology.* 5: 93-109
- Levinson H, Levinson A. 1994. Origin of grain storage and insect species consuming desiccated food. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* 67:47-60.
- Levinson H. Z, Levinson A. R. 1985. Storage and insect species of stored grain and tombs in ancient Egypt. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 100:321-339. Sokoloff A. 1972. *The Biology of Tribolium* vol. 1 Clarendon Press, Oxford, UK.
- Lozowicka, B., Kaczynski, P., Paritova, A. E., Kuzembekova, G. B., Abzhalieva, A. B., Sarsembayeva, N. B., Alihan, K., 2014. Pesticide residues in grain from Kazakhstan and potential health risks associated with exposure to detected pesticides. *Food Chem. Toxicol.* 64, 238-248.

- Lumjuan. N. Rajatileka. S. Changsom. D. Wicheer J, Leelapat. P. 2011. Prapanthadara, et al. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol.*; 41:203-9.
- Magis N. 1954. Aperçu de l'histoire naturelle des complexes d'espèces du genre (*Coleoptera, Tribolium* (Mc-Leay, 1825). Tenebrionidae). *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* 30: 1-10.
- Mahan J R. Dotroay PA & Light G (2004) Thermal dependence of enzyme function and inhibition; implications for, herbicide efficacy and tolerance. *Physiologia Plantarum* 120: 187-195.
- Mahroof, R., B. H. Subramanyam. A. D. E. 2003. Temperature and relative humidity profiles during heat treatment of mills and its efficacy against *Tribolium castaneum* (Herbst) life stages. *J. Stored Prod. Res.* 39: 555-569
- Makhijani. A. A. Gurney, K. R. Gurney. 1995. Mending the ozone hole: science, technology and policy. MIT Press, Cambridge,
- MANTIX. 2014. <http://www.mantixmip.com/plaga-de-grano-.html>. Consultado el 18 de agosto de 2014
- MC. Gaughey. W. H. 1985. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* for controlling Indian meal moths (Lepidoptera: pyralidae) in farm grain bins and elevator silos. *J. econ. Entomol.* 78 (5):1089-1094.
- Metcalf. C. I y Flint W. P. 1979. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control. Editorial continental s.a. cuarta edición. México, d.f.1208

- Mourya. D. T. Gokhale. M.D. Mishra A.C. 1994. Biochemical basis of DDT resistance in *Aedes aegypti* population from a dengue affected area in Shahjahanpur city. *Indian J Med Res.*; 99:212-5
- Narváez, z. 2003. Entomofauna agrícola venezolana. Universidad central de Venezuela, facultad de agronomía departamento de zoología agrícola. Fundación polar. maracay, Venezuela. 191 p. en <http://www.plagas-agricolas.info.ve/doc/pdf/entomofaunaven.pdf> [acceso: 11-02-2011].
- Oakeshott. J. G. C. claudianos, P. M. Campbell, R. D. Newcomb. R. J. Ressel. 2005 biochemical genetics and genomics of insect esterases, pp. 309-381. In L.I.Gilbert, kiatro, and s. gill Eds, comprehensive molecular insect science. Elsevier, oxford, united.
- Oerke. E.C. 2006. Crop losses to pests. *j. agr. sci.* 144: pp. 31-43
- Padin. S., dal Bello, G., Fabricio. M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *J. stored. Prod. res.* 38:69-74
- Peckman, P.S., Arthur, F.H., 2006. Insecticide space treatments in food plants. In: Heaps, J.W. (Ed.), *Insect management for food storage and processing*, second edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 175-182.
- Pérez. M. J., Flinn. P. W., Campbell. J. F., Hagstrum, D. W., Throne, J. E. 2004. Detection of stored grain insect infestation in wheat transported in railroad hopper cars. *j. econ. Entomol.* 97:pp. 1474-1483

- Pons, X., Albajes, R. 2002. Control of maize pests with imidacloprid seed dressing treatment in Catalonia (NE Iberian Peninsula) under traditional crop conditions. *Crop Prot.* 21, 943e950.
- Ranson. H., Hemingway. J. 2004 Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol.*; 401:226-41
- Rees. D. P. 2004. Insects of stored products. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Rees. D. P. 1996. Coleóptera. En: Subramanyam, B., Hagstrum, D.W. (eds.): *Integrated Management of Insects in Stored Products*. Marcel Dekker, Inc., New York, Estados Unidos, pp. 1-4
- Roesli, R., B. H., Subramanyam, F. J. Fairchild, and K. C. Behnke. 2003. Trap catches of stored product insects before and after heat treatment in a pilot feed mill. *J. Stored Prod. Res.* 39: 521-540.
- Robledo-R E. 1986. Insectos y ácaros de almacén.p36
- Ryan. C. A. 1973. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology* 24: 173-196.
- Stefanazzi. H. 2010. essential oils, an alternative tool for integrated handling of stored-grain pests. Universidad nacional Del sur [Argentina]. Tesis doctoral en biología
- Silva. G., Orrego. O., Hepp, R., Tapia, m. 2005. Pesquisas plantas COM propriedades insecticidas para o controle de sitophilus zeamais e M milho armazenado. *pesq. Agropec. Bras.* 40 (1): 11-17.
- Subramanyam, B. H., Harein, P.K., Cutkomp, L.K., 1989. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and

sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. J. Econ. Entomol. 82, 989e995

Toews. M. D., Campbell, J. F., Arthur, F. H., West, M. 2005. Monitoring *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) in pilot-scale warehouses treated with residual applications of (S)-methoprene and cyfluthrin. Journal of Economic Entomology 98, 1391-1398

Toews, M.D., Arthur, F.H., Campbell, J.F., 2009. Monitoring *Tribolium castaneum* (Herbst) in pilot-scale warehouses treated with B-cyfluthrin: are residual insecticides and trapping compatible? Bulletin of Entomological Research 99,121e129.

Trematerra. P., Sciarretta, Á. Tamasi, Å. 2000, Behavioural responses of *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* to naturally and artificially damaged durum wheat kernels. Entomologia Experimentalis et Applicata 94, 195-200

Trematerra, P. A. Sciarretta. A. 2004. Spatial distribution of some beetles infesting a feed mill with spatio-temporal dynamics of *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. Journal of Stored Products Research, 40: 363-377.

Universidad nacional de colombia.2014<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/agronomia/2006631/lecciones/cap03/lec03a.html>Componentes del manejo integrado de plagas: plaguicidas químicos. Edificio477 Consultado el 3 de agosto de 2014

Valueva. T. A. & Mosolov. V. V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. Biochemistry (Moscow) 69: 1305-1309.

- Villacide. J y corley. J. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas deborah fischbein.p21.
- Vinuela. E. AyBudía,V. M1993. Plagas de los productos almacenados. Hojas divulgadoras Núm 1/93 HD. MAPA, Madrid. P.31
- Warner. T., Shoeib. M., Kozma. M., Gobas, F .A. 2005. Hexachlorocyclohexanes and endosulfans in urban, rural, and high altitude air samples in the Fraser Valley, British Columbia: evidence for trans-Pacific transport. Environ Sci. Technol. 39, 724-731.
- WHO. 1957. Seventh report Expert Committee on insecticides WHO Tech Report.p125:37.
- Williams, G. D., and K. A., Rosentrater. 2007. Design considerations for the construction and operation of flour milling facilities. Part I: planning, structural, and life safety considerations. Paper presented at the Annual International Meeting of American Society of Agricultural and Biological Engineers. ASABE Paper No. 074116, 17-20 June 2007, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, MN.