

Tesis de Posgrado

Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug)

Alzogaray, Raúl A.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Alzogaray, Raúl A.. (1996). Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2815_Alzogaray.pdf

Cita tipo Chicago:

Alzogaray, Raúl A.. "Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2815_Alzogaray.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización de la toxicidad
de insecticidas piretroides
en *Triatoma infestans* (Klug)

POR

RAÚL A. ALZOGARAY

DIRIGIDO POR

EDUARDO N. ZERBA

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas
(CIPEIN - CITEFA/CONICET)

Tesis presentada para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas

—
MCMXCVI

9
Ljz

CARACTERIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DE INSECTICIDAS PIRETROIDES EN *Triatoma infestans* (Klug)

Tesis Doctoral de Raúl A. Alzogaray
Dirigida por Eduardo N. Zerba

Resumen

Se evaluaron los síntomas de intoxicación con deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas III de *T. infestans*. Se estimaron los TE 50s de distintas dosis para dos efectos: (a) incoordinación, y (b) parálisis total. Deltametrina fue tanto o más rápida en producir el primer efecto (según la dosis), *cis*-permetrina fue más rápida en producir el segundo. No hubo diferencia significativa entre las DE 50 a diferentes tiempos de los dos piretroides, y las ninfas tratadas con cualquiera de ellos mostraron una importante recuperación en función del tiempo. La recuperación fue inhibida cuando se aplicó simultáneamente butóxido de piperonilo.

Se estudió la influencia de distintas variables sobre la toxicidad de deltametrina y *cis*-permetrina. La temperatura tuvo un efecto importante sobre las CE 50s y DE 50s de los piretroides estudiados. En general la toxicidad aumentó al disminuir la temperatura; pero hubo excepciones que dependieron del insecticida, el estadio ninfal y el rango de temperatura. El efecto de la temperatura sobre los TE 50s fue poco importante. En general la velocidad de acción aumentó al disminuir la temperatura; pero hubo excepciones que dependieron del insecticida, el estadio ninfal y el rango de temperatura. En experimentos con ninfas de distintas edades y estados alimentarios, resultaron más sensibles los individuos de 1 día de edad, y más tolerantes los alimentados 7 días antes. La aplicación tópica en el tórax produjo síntomas de intoxicación más rápidamente que la aplicación tópica en el extremo abdominal. Deltametrina actuó más rápidamente que *cis*-permetrina en un amplio rango de dosis (2-1.000 ng/insecto).

En ninfas I, el isómero *cis* de la permetrina fue más tóxico que el isómero *trans* a 26 y 36°C, e igual de tóxico a 16°C. El pretratamiento con butóxido de piperonilo sinergizó la toxicidad de *cis*-permetrina pero no la de *trans*-permetrina. El pretratamiento con trifenilfosfato tuvo el efecto opuesto. La mezcla de los dos isómeros produjo un efecto de aditividad (ausencia de interacción). En ninfas III, el isómero *cis* de la permetrina fue más tóxico que el isómero *trans* a 16 y 26°C, e igual de tóxico a 36°C. Los pretratamientos con butóxido de piperonilo o trifenilfosfato no modificaron las DE 50s. La mezcla de los dos isómeros produjo un efecto de antagonismo.

Ambos piretroides produjeron hiperactividad locomotora en ninfas III. Este efecto estuvo influenciado por el modo y el lugar de aplicación de los insecticidas. La hiperactividad fue inhibida por el pretratamiento con N-etilmaleimida y por el descenso de la temperatura.

Ninguno de los dos insecticidas tuvo efectos subletales sobre la ingesta y la mortalidad de ninfas I y III, y sólo deltametrina produjo una disminución en la cantidad de ninfas I mudadas.

PALABRAS CLAVES

Triatoma infestans, deltametrina, *cis*-permetrina, piretroides, síntomas de intoxicación, toxicidad, efectos subletales, actividad locomotora, coeficientes de temperatura, acción conjunta, antagonismo.

CHARACTERIZATION OF THE TOXICITY OF PYRETHROIDS INSECTICIDES ON *Triatoma infestans* (Klug)

Dissertation by Raúl A. Alzogaray
Directed by Eduardo N. Zerba

ABSTRACT

Symptoms of poisoning by deltamethrin and *cis*-permethrin in third instars of *T. infestans* were described. The ET 50s for two effects, (a) incoordination, and (b) total paralysis were calculated. Deltamethrin was equal or more rapid to produce the onset of the first effect (according the dose), and *cis*-permethrin to produce the onset of the second one. There was not significant differences between DE 50s at different times for the two pyrethroids. They showed equivalent initial knockdown performance, but instars recovery was observed. The synergist piperonyl butoxide inhibited recovery.

The toxicities of deltamethrin and *cis*-permethrin at different intrinsic and extrinsic conditions were compared. After treatment temperature had an important effect on ED 50s of both pyrethroids, which tended to decrease when temperature decreased (but excepts depending of the insecticide, the instar, and the temperature range were observed). A low influence of temperature on ET 50s was observed. At all temperatures assayed deltamethrin was faster than *cis*-permethrin to produce symptoms of poisoning. The symptoms rapidly disappeared when instars intoxicated were moved from 16 to 28°C. Instars exposed to low doses of pyrethroids at 28°C, which did not show symptoms of poisoning, were rapidly affected when they were moved to 16°C. The toxicity of both pyrethroids was affected by the age and the nutritional estate of the instars. Topical application on the thorax was faster to produce the onset of incoordination than on the abdomen.

The toxicity of pure and mixed *cis*- and *trans*-permethrin was evaluated. The *cis* isomer was more active than the *trans* one in both first and third instars. When the two isomers were simultaneously applied an additive effect (lack of interaction) was observed in first instars, while an antagonistic effect in third instars occurred. In first instars, the toxicity of *cis*-permethrin was increased by piperonyl butoxide; and the toxicity of *trans*-permethrin was increased by triphenyl phosphate. In third instars, the toxicity of both isomers was not modified by neither piperonyl butoxide nor triphenyl phosphate.

Deltamethrin and *cis*-permethrin caused an increase in the locomotor activity of third instars. This effect was inhibited by a temperature decrease, and by N-ethylmaleimide pretreatment.

Sublethal effects on blood meal ingestion and moulting were evaluated in both first and third instars. Only deltamethrin yielded a substantial decrease in the number of moulted nymphs

KEY WORDS

Triatoma infestans, deltamethrin, *cis*-permethrin, pyrethroids, symptoms of poisoning, toxicity, sublethal effects, locomotor activity, temperature coefficients, joint action, antagonism.

AGRADECIMIENTOS

Mis padres, mi hermana, y mis tíos y abuela materna, apoyaron mi educación incondicionalmente y de todas las formas imaginables, desde los lejanos días del Jardín de Infantes hasta ahora.

Eduardo fue jefe, maestro y compañero de trabajo, ejemplar en los tres roles, y siempre dispuesto a reinos juntos de lo bueno, lo malo y lo feo.

Edgardo, Mariné, y Susana L., me enseñaron transmitiéndome sus conocimientos y a través de sus actitudes.

Andrea, Adriana M., Adriana C., Claudia, Emilia, Héctor, Mary, Norma, Paola Andino, y Susana S., cada uno me ayudó a su manera a enfrentar los incontables problemas cotidianos.

Claudio Lazzari, consejero de estudios, con quien sé que puedo contar.

José Monserrat, viejo amigo, resolvió mis balurdos estadísticos.

El trabajo experimental se realizó en el Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (Cipein), dependiente del Centro de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (Citefa) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Conicet). Durante el desarrollo de la mayor parte de la Tesis fui becario de Iniciación y de Perfeccionamiento del Conicet. La financiación del trabajo provino de subsidios otorgados a nuestro laboratorio por Chemotecnica Sintyal, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, y el Conicet.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN, **1**
 - 1.1. LOS PIRETROIDES, **2**
 - 1.1.1. Desarrollo histórico, **2**
 - 1.1.2. Interacción con los insectos, **9**
 - 1.1.2.1. Toxicocinética, **9**
 - 1.1.2.1.1. Penetración, distribución y excreción, **9**
 - 1.1.2.1.2. Metabolismo, **10**
 - 1.1.2.2. Toxicodinámica, **14**
 - 1.1.2.3. Piretroides sí, ¿otros no?, **15**
 - 1.1.2.4. Los piretroides y el control de la vinchuca, **19**
 - 1.2. ESTA TESIS. OBJETIVOS Y MOTIVOS, **21**
 - 1.2.1. Objetivos, **21**
 - 1.2.2. ¿Por qué *cis*-permetrina?, **22**
 - 1.2.3. Habla el tesista, **23**
2. MATERIALES Y MÉTODOS, **26**
 - 2.1. INSECTOS, **26**
 - 2.2. SUSTANCIAS, **26**
 - 2.3. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS TOXICOLÓGICOS, **27**
 - 2.3.1. Obtención de los datos, **27**
 - 2.3.1.1. CE 50, **27**
 - 2.3.1.2. DE 50, **28**
 - 2.3.1.3. TE 50, **28**
 - 2.3.1.4. Aplicación de sinergistas, **29**
 - 2.3.1.5. Condiciones ambientales, **30**
 - 2.3.1.6. Efectos evaluados, **30**
 - 2.3.2. Cálculo de los parámetros, **31**
 - 2.3.3. Coeficientes de temperatura, **32**
 - 2.3.4. Coeficientes de interacción, **32**

- 2.4. SÍNTOMAS DE INTOXICACIÓN, **33**
- 2.5. CAMBIOS DE TEMPERATURA, **33**
- 2.6. ACTIVIDAD LOCOMOTORA, **35**
- 2.7. EFECTOS SUBLETALES, **37**
- 2.8. LISTA DE ABREVIATURAS, **38**

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, **39**

- 3.1. SÍNTOMAS DE INTOXICACIÓN, **39**
 - 3.1.1. Resultados, **39**
 - 3.1.1.1. Fases de intoxicación, **39**
 - 3.1.1.2. Volteo y recuperación, **41**
 - 3.1.2. Discusión, **43**
 - 3.1.3. Figuras, Tablas y Lámina, **46**
- 3.2. ALGUNAS VARIABLES QUE AFECTAN LA TOXICIDAD, **56**
 - 3.2.1. Temperatura, **56**
 - 3.2.1.1. Resultados, **56**
 - 3.2.1.1.1. Cianopiretroides, **56**
 - 3.2.1.1.2. *Cis*-permetrina versus deltametrina, **58**
 - 3.2.1.2. Discusión, **59**
 - 3.2.1.3. Figuras, **63**
 - 3.2.2. Composición de isómeros, **72**
 - 3.2.2.1. Resultados, **72**
 - 3.2.2.2. Discusión, **73**
 - 3.2.2.3. Figuras, **77**
 - 3.2.3. Edad y estado alimentario, **83**
 - 3.2.3.1. Resultados, **83**
 - 3.2.3.2. Discusión, **84**
 - 3.2.3.3. Figuras, **86**
 - 3.2.4. Dosis y lugar de aplicación, **88**
 - 3.2.3.1. Resultados, **88**
 - 3.2.3.2. Discusión, **88**
 - 3.2.3.3. Figuras, **90**
- 3.3. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA, **92**
 - 3.3.1. Resultados, **92**
 - 3.3.2. Discusión, **93**
 - 3.3.3. Figuras y Tablas, **97**
- 3.4. EFECTOS SUBLETALES, **104**
 - 3.4.1. Resultados, **104**
 - 3.4.2. Discusión, **104**

3.4.3. Tablas, **106**

4. CONCLUSIÓN, **108**

5. BIBLIOGRAFÍA, **111**

INTRODUCCIÓN

La palabra Toxicología deriva del griego antiguo *toxicon*, que significa "vida de amor" (Repetto, 1988). Esta contradicción se repite en otros idiomas como el inglés y el alemán, donde *gift* significa simultáneamente regalo y veneno. En griego contemporáneo *toxon* significa arco y *toxikon* se refiere a algo propio para el arco y la flecha, quizás en referencia a las sustancias usadas para envenenar a éstas últimas.

La Toxicología es "la ciencia que estudia las sustancias químicas y los fenómenos físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad" (Repetto, 1988).

Un tóxico es entonces una sustancia capaz de producir efectos nocivos sobre los seres vivos. El concepto actual de toxicidad tiene un carácter relativo: cualquier sustancia puede tener efectos tóxicos por encima de cierto umbral de concentración en el organismo. Esto ya fue sabiamente señalado en el siglo XVI por el célebre protocientífico suizo Theophrastus Philipus Aureolus Bombastus von Hohenheim, más conocido como Paracelsus, cuando escribió (en alemán y seguramente en una agobiante caligrafía gótica) "lo que mata es la dosis" (Hayes, 1975).

El trabajo experimental de esta Tesis se enmarca en la Toxicología de Insectos o Entomotoxicología. Las sustancias estudiadas fueron los insecticidas piretroides; el organismo fue *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Argentina.

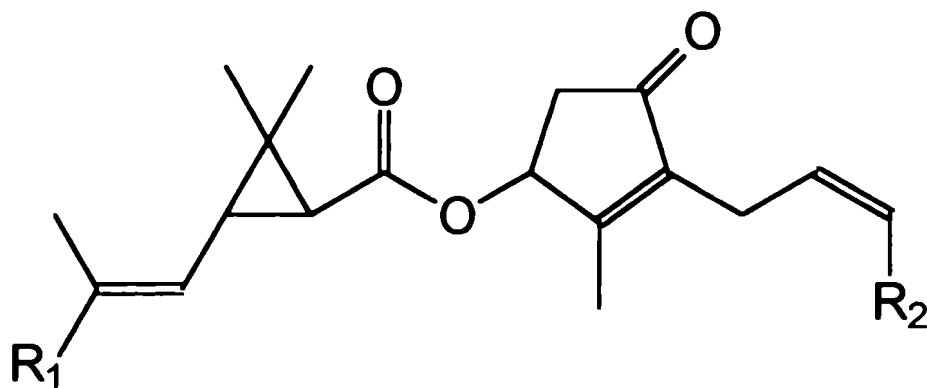
1. 1. LOS PIRETROIDES

1. 1. 1. Desarrollo histórico

En el siglo XVII los habitantes del lado asiático de los Montes Cáucaso conocían las propiedades insecticidas de las flores de ciertos crisantemos, y las usaban contra los piojos del cuerpo. Doscientos años después, Armenia y Yugoslavia producían y comercializaban esas flores con fines insecticidas. (McLaughlin, 1973). Estos dos países dominaron el mercado hasta la Primera Guerra Mundial. Mientras tanto se averiguó que los solventes orgánicos extraen de las flores secas del crisantemo una oleoresina que contiene seis moléculas con propiedades insecticidas (Head, 1973). Estas moléculas, las piretrinas, son ésteres provenientes de las distintas combinaciones entre dos ácidos y tres alcoholes (**Figura 1.1.**). Los ácidos, crisantémico y pirétrico, son ciclopropanocarboxilatos sustituidos. Los alcoholes, piretrolona, cinerolona y jasmolona, son ciclopentenolonas sustituidas. Las principales características estructurales de las piretrinas fueron esclarecidas entre 1910 y 1916 (pero reveladas en 1924) por los químicos suizos Hermann Staudinger y Leopold Ruzicka, que años después recibieron sendos premios Nobel por sus aportes en diversos campos de la química.

La planta que fabrica las piretrinas, *Chrysanthemum cinerariifolium*, es una herbácea perenne de la familia Compositae. Las piretrinas están presentes en toda la planta, pero especialmente concentradas en las cabezas florales (Head, 1973).

La Primera Guerra Mundial interrumpió el comercio con Dalmacia. Entonces los japoneses, con una tradición de siglos en el cultivo de crisantemos, dominaron el mercado. El auge japonés declinó durante los primeros años '30, cuando se descubrió que el extracto de piretro producido en Kenya contenía mayor concentración de piretrinas por unidad de peso seco (McLaughlin, 1973). Y terminó de derrumbarse cuando el emperador Hirohito decidió atacar Pearl Harbour.



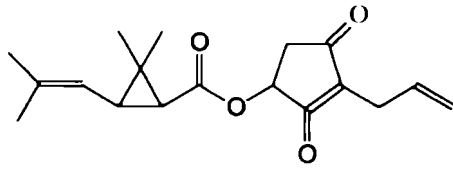
	R ₁		R ₂
	I	II	
piretrina	-CH ₃ (35)	-COOCH ₃ (32)	-CH=CH ₂
cinerina	-CH ₃ (10)	-COOCH ₃ (14)	-CH ₃
jasmolina	-CH ₃ (5)	-COOCH ₃ (4)	-CH ₂ -CH ₃

Figura 1.1. Estructura de los seis componentes insecticidas del extracto de piretro. Los números entre paréntesis indican la contribución porcentual de cada molécula en una oleoresina de piretro típica (Ruigt, 1985).

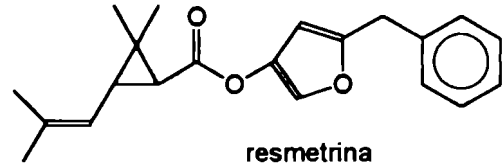
En las décadas siguientes, el cultivo y producción de piretro se hizo importante en Kenya, Tanzania, Ruanda, Ecuador y Nueva Guinea. El clima ecuatorial de estos países permite que los crisantemos florezcan durante siete a once meses al año (Casida, 1980). Hoy el piretro sigue ocupando un lugar importante en el mercado de los plaguicidas. De acuerdo con la información disponible, no presenta peligro de toxicidad aguda oral o dérmica en mamíferos porque es rápidamente metabolizado (Elliot et al., 1972). En trabajadores expuestos durante años, sólo se registraron unos pocos casos de dermatitis, que desaparecieron al interrumpir la exposición (Barthel, 1973). No hay evidencia de mutagénesis, carcinogénesis ni teratogénesis (Williams, 1973) y parece ser inocuo para la vida salvaje en general (Pillmore, 1973). Sin embargo, el uso del piretro está retringido a las plagas domésticas y de granos y frutas almacenados, porque la luz del sol lo degrada con facilidad (Mrak, 1973).

Por su utilidad contra los mosquitos transmisores de la malaria, Estados Unidos declaró al piretro material estratégico de guerra en los años '40. Varios intentos de cultivar los crisantemos en territorio norteamericano fracasaron. La dificultad para obtener materia prima durante la guerra indujo en Estados Unidos e Inglaterra la necesidad de sintetizar derivados de las moléculas naturales. Unos años después aparecieron en el mercado los primeros piretroides.

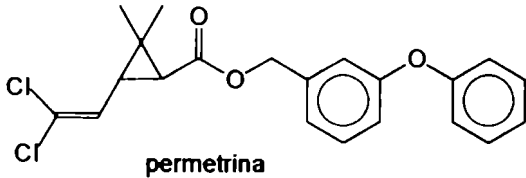
Además de esclarecer buena parte de la estructura de las piretrinas, Staudinger y Ruzicka sintetizaron unos 100 análogos que no presentaron actividad insecticida (Ruigt, 1985). Los esfuerzos iniciados durante la Segunda Guerra Mundial permitieron obtener en 1948, en Estados Unidos, el primer piretroide. Se llamó aletrina (su estructura y la de las moléculas mencionadas en los párrafos siguientes están en la **Figura 1.2.**), y presentó una actividad insecticida más rápida y más potente que las piretrinas en la mosca *Musca domestica*. Al poco tiempo se demostró que la aletrina era poco efectiva contra otros insectos (Elliot, 1989). Esta matriarca de los piretroides se puede



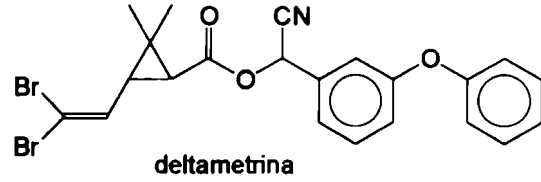
aletrina



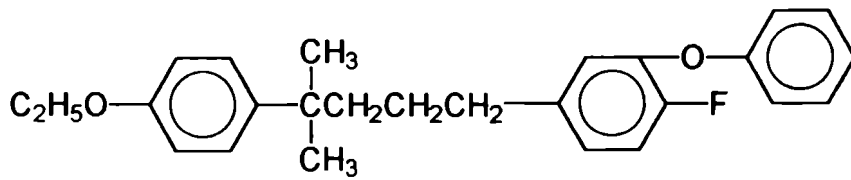
resmetrina



permetrina



deltametrina



MTI - 800

Figura 1.2. Estructura de algunos piretroides.

conseguir hoy en cualquier supermercado, formulada en espirales y tabletas termoevaporables.

El desafío que enfrentaban los químicos era sintetizar moléculas que reunieran las propiedades positivas de las piretrinas y que carecieran de sus defectos. O sea: alta toxicidad en un amplio rango de insectos, acción rápida, baja toxicidad en mamíferos y otros organismos no blanco, y estabilidad al aire libre. En aquellos años, cuando se ignoraba casi todo acerca de la toxicocinética y la toxicodinámica de las piretrinas, las nuevas moléculas se buscaban introduciendo cambios empíricos en las estructuras conocidas. Se tardaron veinte años en obtener la resmetrina, el primer piretroide con actividad insecticida similar y toxicidad en mamíferos menor que las piretrinas (Elliot et al., 1967). Unos años después se obtuvieron piretroides fotoestables (Elliot et al. 1973). Moléculas como la permetrina pudieron usarse al aire libre, y ya nada impidió que los piretroides pasaran a encabezar las listas mundiales de consumo de insecticidas.

Al incorporar un grupo cianuro a la estructura de los piretroides se consiguió un aumento drástico de la acción insecticida (Elliot et al., 1974). La deltametrina es uno de los cianopiretroides más efectivos contra una importante cantidad de plagas agrícolas, sanitarias y domésticas. La **Tabla 1.1.** ilustra la toxicidad y estabilidad en el ambiente de algunos piretroides.

Modificaciones estructurales posteriores demostraron que moléculas sin la característica unión éster, como MTI-800, podían presentar un comportamiento toxicológico similar al de las piretrinas (Udagawa et al., 1985).

El producto de la síntesis de muchos piretroides es una mezcla de isómeros (**Recuadro 1.1.**) que en forma individual pueden presentar toxicidades muy diferentes (Naumann, 1990). La tendencia actual es purificar o sintetizar en forma dirigida los isómeros activos (Anónimo, 1988).

La producción mundial de piretroides se mide en miles de toneladas anuales; el dinero que se destina a su compra en miles de millones de dólares (Naumann, 1990). Seguramente esta situación se mantendrá mientras no surjan alternativas más eficaces, veloces y baratas que la que ofrecen los piretroides para el control de un amplio espectro de plagas.

insecticida	DL 50 ^a (mg/kg)		rata (oral)	vida media al aire libre (días)
	<i>Musca domestica</i> ^b (contacto)	<i>Triatoma infestans</i> ^c (contacto)		
piretrina I	30	—	420	< 1
aletrina	6	10,7	800	< 1
resmetrina	0,6	0,6	8000	< 1
permetrina	0,7	1,5	2000	> 20
deltametrina	0,02	0,3	100	> 20

a, Dosis Letal 50 (es la dosis que mata la mitad de la población expuesta); b, mosca doméstica; c, vinchuca.

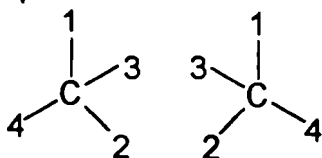
Tabla 1.1. Actividad y estabilidad al aire libre de algunos piretroides (Elliot, 1989; Casabé et al., 1988).

Recuadro 1.1. Isomería de piretroides

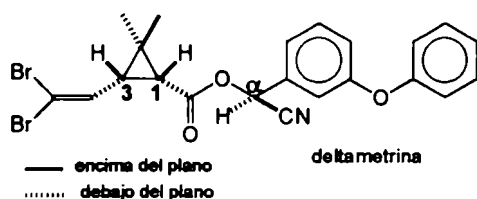
Una molécula puede adoptar distintos arreglos espaciales. Estos arreglos se llaman isómeros y aunque tienen la misma fórmula química, suelen diferir en sus propiedades físicas y químicas. Todos los piretroides presentan formas isoméricas y su actividad insecticida es extremadamente estereoespecífica.

Isomería óptica


Cada átomo de carbono puede unirse a otros cuatro átomos. Un carbono unido a cuatro átomos o grupos distintos se llama carbono asimétrico o centro quiral. Los átomos unidos a un carbono saturado siempre forman los vértices de un tetraedro regular. Bajo estas condiciones, sólo existen dos ordenamientos posibles para esos átomos, y cada uno es la imagen especular del otro. Las moléculas que reúnen estas condiciones se llaman enantiómeros. Una regla para reconocerlos es que uno de ellos no puede ser transformado en el otro sin romper enlaces covalentes.

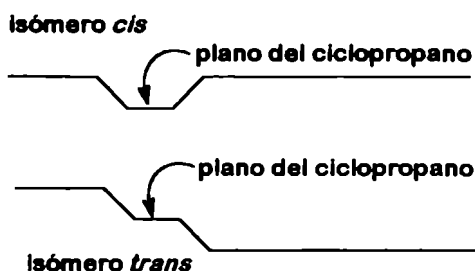


Si n es el número de carbonos asimétricos de una molécula, pueden existir 2^n isómeros. La mayoría de los piretroides tienen tres carbonos asimétricos (el 1, el 3 y el α) y entonces hasta ocho isómeros.



Isomería geométrica

Estructuras químicas como el doble enlace ($C=C$) y el ciclopropano () forman un plano en el espacio. La isomería geométrica se refiere a la posición de los sustituyentes con respecto a ese plano. Si los dos sustituyentes se encuentran del mismo lado del plano, el isómero es *cis*; si se encuentran en lados opuestos del plano, el isómero es *trans*. Mirando la molécula de deltametrina desde el plano del ciclopropano, los isómeros geométricos se verían así:



Nomenclatura

Los isómeros se nombran de acuerdo con las reglas de Cahn, Ingold y Prelog (CIP). Para los piretroides se usa una simplificación de estas reglas. El carbono 1 es llamado R cuando los sustituyentes están ordenados en la dirección de las agujas del reloj, y S cuando ocurre lo contrario (para ordenar los sustituyentes existen a su vez ciertas reglas). La estereoquímica de los carbonos 3 y α se define como *cis* o *trans*, según el arreglo espacial de sus sustituyentes respecto al carbono 1.

De acuerdo con estas reglas, el nombre de la deltametrina es (S)- α -ciano-3-fenoxibencil (1R)-*cis*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato.

(Información extraída de Alworth, 1980; Zerba, 1988; Naumann, 1990)

1.1.2. Interacción con los insectos

1.1.2.1. Toxicocinética

El encuentro entre el insecto y el insecticida es el primer paso de la interacción. A partir de ese momento, el insecticida ingresa al organismo y se desencadena una serie de eventos: las moléculas son absorbidas, distribuidas, almacenadas, metabolizadas y excretadas. Estudiar estos procesos es el objetivo de la Toxicocinética (la segunda mitad de esta palabra compuesta proviene del griego *kinetikos*, que significa movimiento).

1.1.2.1.1. Penetración, distribución y excreción.

La mayoría de los insecticidas sintéticos son lipofílicos y se disuelven con facilidad en la capa serosa externa de la cutícula. Son rutas de ingreso al organismo de los insecticidas de contacto los canales serosos que atraviesan la cutícula (Welling and Paterson, 1985), las regiones donde la cutícula es más delgada (membranas de las articulaciones, membranas intersegmentales) (Ebeling, 1974; Fontán and Zerba, 1987), y el sistema traqueal, al cual llegarían por desplazamiento lateral (Gerolt, 1983). La tasa de penetración depende de las propiedades físicas y químicas de las sustancias y los solventes usados para la aplicación (Brooks, 1976; Fontán and Zerba, 1987). Cierta proporción del insecticida queda unido a la cutícula, donde puede ser degradado por enzimas (Welling, 1979; Fontán and Zerba, 1984). La disminución de la tasa de penetración por factores genéticos es un mecanismo que confiere resistencia a insecticidas (Metcalf, 1989).

Atravesado el integumento, la hemolinfa distribuye el insecticida por todo el organismo, unido a proteínas o dentro de partículas lipídicas (Brooks, 1976). Por sus características lipofílicas, las moléculas insecticidas sólo son excretadas después de sufrir modificaciones químicas que alteran su polaridad. Estas transformaciones son hechas por las enzimas detoxicantes.

1.1.2.1.2. Metabolismo

"Ningún hombre es una isla", escribió en 1624 el poeta metafísico inglés John Donne. Lo que sabemos hoy acerca del modo en que evolucionan los organismos sobre la Tierra nos permite parafrasear a Donne: "ningún ser vivo es una isla". Cada bacteria, hongo, planta y animal interactúa de incontables maneras con otros individuos y con el ambiente. Estas interacciones son las responsables de la evolución.

Un ejemplo de interacción es la que ocurre entre las plantas y los insectos fitófagos. Las plantas fabrican moléculas que pueden resultar letales para los insectos que las comen. Al mismo tiempo, en los insectos se manifiestan mecanismos que confieren tolerancia o resistencia a esas moléculas. Desde 1964, este proceso se llama coevolución (Berenbaum, 1986).

El principal mecanismo que protege a los insectos de la infinidad de toxinas que ingieren continuamente es la actividad de las enzimas detoxicantes. El uso del adjetivo detoxicante está bastante difundido en la bibliografía sobre el tema, pero hay ejemplos donde su aplicación es discutible: la actividad de ciertas enzimas consideradas detoxicantes genera productos más tóxicos que el sustrato (ocurre con algunos insecticidas organofosforados (Eto, 1974)). "Reacciones de activación y desactivación", "biotransformaciones", "metabolismo de xenobióticos", son términos usados para nombrar el metabolismo de moléculas exógenas (Jacoby, 1980).

Las enzimas detoxicantes comparten dos características principales (Brodie and Maickel, 1962): (a) convierten sustratos liposolubles en productos hidrosolubles fáciles de excretar; (b) son muy inespecíficas. Su actividad está dirigida hacia grupos funcionales (alquilos, arilos, ésteres), la estructura del resto de la molécula no importa demasiado.

El metabolismo de las moléculas ajenas al organismo es bifásico (Sipes and Gandolfi, 1991). Las reacciones de Fase 1 añaden o exponen grupos funcionales. Son oxidaciones, reducciones e hidrólisis. Las reacciones de Fase 2 combinan esos grupos funcionales con metabolitos endógenos solubles en agua (glucosa, aminoácidos, glutatión). Son conjugaciones.

La actividad detoxicante varía entre especies, entre individuos, entre momentos del desarrollo, con el sexo, con el estado nutricional y con la naturaleza del ambiente (Terriere, 1984; Agosin, 1985; Dauterman, 1985; Ruigt, 1985). La expresión exaltada de estas enzimas es uno de los mecanismos que confieren resistencia a los insecticidas (Oppenoorth, 1985; Devonshire, 1989).

Una manera de aumentar la toxicidad de un insecticida es aplicarlo simultáneamente con un inhibidor de las enzimas que lo degradan. Los inhibidores de enzimas detoxicantes se llaman sinergistas (Hodgson and Tate, 1976; Ruigt, 1985).

(a) HIDROLASAS. Esta actividad consiste en la adición de una molécula de agua a grupos carboxiéster, fosforoéster, carboxilamida y epóxido. Casi todos los piretroides contienen un grupo carboxiéster que los convierte en sustratos potenciales de las hidrolasas. Durante la hidrólisis se rompen el enlace éster y una molécula de agua. Una mitad del éster se convierte en ácido, la otra en alcohol.

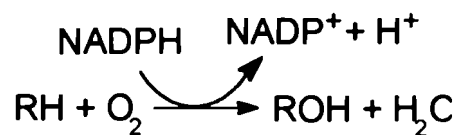


La actividad hidrolasa en los insectos presenta un título en general bajo, excepto en cepas resistentes a insecticidas (Dauterman, 1983). Su distribución tisular suele coincidir con los puntos de ingreso, acumulación y acción de los insecticidas en el organismo (Dauterman, 1985): cutícula, tubo digestivo, cuerpo graso, sistema nervioso. En *T. infestans* se estudió la actividad de hidrolasas de fosforoésteres durante el desarrollo embrionario (Villar et al., 1980), y en cutícula de adultos (Fontán and Zerba, 1984); se caracterizó y determinó su localización subcelular (Casabé and Zerba, 1981); se aisló una forma enzimática (Malkenson et al., 1984); y se desarrolló un método para estudiar la actividad sobre análogos de la deltametrina (Wallace et al., 1988).

La tasa de hidrólisis de los piretroides *trans* tiende a ser mayor que la de los *cis* (Shono et al., 1979; Ishaaya and Casida, 1983; Dowd and Sparks,

1988). La inhibición diferencial de estas actividades indica que existen distintas enzimas y no una sola enzima con diferente especificidad hacia los isómeros (Ruigt, 1985). El metabolismo preferencial de los piretroides *trans* puede ser la causa principal de la mayor toxicidad de los *cis* (Ahmad and McCaffery, 1988; Dowd and Sparks, 1988; Toth and Sparks, 1988).

(b) OXIDASAS MICROSOMALES. La palabra microsoma deriva de dos palabras griegas: *micro*, pequeño, y *soma*, cuerpo. Desde 1943 se la usa para nombrar la fracción subcelular que sedimenta cuando se ultracentrifuga (100.000 g) durante al menos una hora el sobrenadante posmitocondrial (Agosin, 1985). En este sedimento, que contiene lípidos, proteínas y ácidos ribonucleicos, se encuentran los restos del retículo endoplásmico. En las membranas reticulares existe un sistema enzimático involucrado en la oxidación y reducción de moléculas lipofílicas. Sus componentes son la NADPH - citocromo P450 reductasa, el citocromo P450 (una enzima con un grupo hemo, cuyo nombre deriva del pico de absorbancia a 450 nm producido por la forma reducida de la molécula cuando se une con el monóxido de carbono) y un fosfolípido (Agosin, 1985; Sipes and Gandolfi, 1991). El complejo está acompañado por otro citocromo, el b₅, asociado a su vez con otra reductasa. El mecanismo de acción de las oxidasas microsomales implica la ruptura de una molécula de oxígeno. Uno de los átomos es reducido a agua, el otro oxida el sustrato. Los electrones provienen del NADPH.



La **Figura 1.3.** muestra algunos sitios de acción de la actividad oxidativa sobre un piretroide.

Igual que las hidrolasas, la actividad de las oxidasas microsomales se manifiesta con más intensidad en los lugares de acceso al organismo y tránsito de los insecticidas: tubo digestivo y cuerpo graso (Nakatsugawa and Morelli,

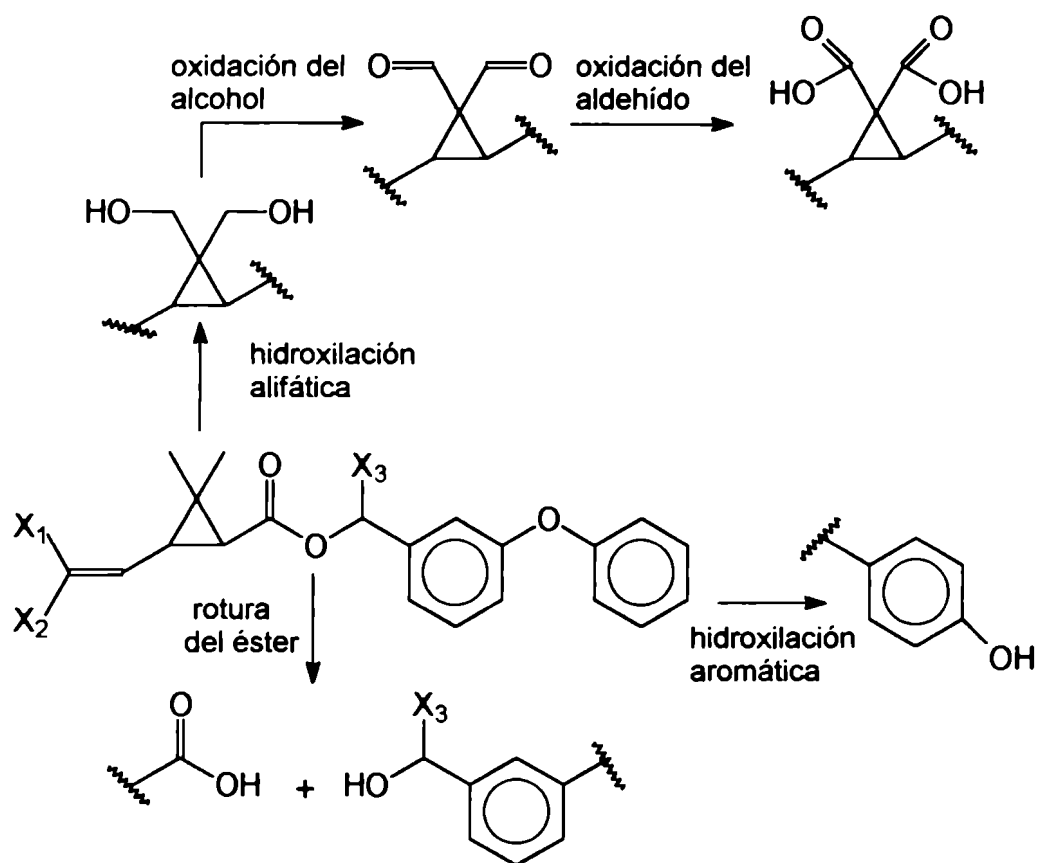


Figura 1.3. Algunos productos de la acción de oxidasas microsomales sobre un piretroide (Shono et al., 1979; Ruigt, 1985)

1976). En *T. infestans* se estudió la actividad de oxidasas microsomales hacia el DDT (Agosin, et al. 1964; Agosin et al., 1969) y hacia el malatión (Wood et al., 1985).

(c) TRANSFERASAS. Son enzimas que conjugan moléculas exógenas con metabolitos endógenos (aminoácidos, glutatión, glucosa, ácido glucurónico). La conjugación de piretroides recibió hasta ahora mucha menos atención que las actividades de hidrólisis y oxidación. Casi todos los metabolitos que conservan intacto el enlace éster son excretados como conjugados (Soderlund et al., 1983). La molécula endógena que se conjuga depende de la naturaleza del metabolito exógeno y de la especie (Ruigt, 1985). En *T. infestans* se estudió la actividad glutatión S-transferasa sobre insecticidas organofosforados y su inhibición con diversas sustancias (Sívori, 1993)

1.1.2.2. Toxicodinámica

Una proporción generalmente pequeña del insecticida que entra en contacto con el insecto alcanza un blanco molecular y ejerce su acción tóxica. Estudiar esta interacción molecular y sus consecuencias es el objetivo de la Toxicodinámica (la segunda mitad de esta palabra compuesta proviene del griego *dynamis*, que significa fuerza).

Los venenos más poderosos que se conocen interfieren el funcionamiento del sistema nervioso en vertebrados e invertebrados, y existen en la naturaleza desde hace millones de años. Afectan al sistema nervioso las toxinas del tétanos y el botulismo, las de la araña viuda negra y el pez globo, las de los escorpiones y cobras, la nicotina y el piretro (Lund, 1985). Los insecticidas sintéticos (clorados, fosforados, carbamatos y piretroides) son también neurotóxicos.

electrofisiológicos, de flujo de iones y de unión a membranas señalan como principales, y ya casi indiscutidos, sospechosos a los canales de sodio dependientes de voltaje (Ruigt, 1985; Pauron et al. 1991, Osborne and Pipper, 1992). La evidencia farmacológica indica que los piretroides no se unen a ninguno de los cinco sitios de unión a neurotoxinas identificados con otras drogas, así que se propuso la existencia de un sexto (Osborne and Pipper, 1992).

Algunos piretroides provocan descargas repetitivas en las membranas nerviosas, otros bloquean la conducción de impulsos (Naumann, 1990). Por éstas y otras características, se los clasifica en Tipo I y II (**Tabla 1.2.**). La presencia o ausencia de un grupo ciano en el carbono α , y las isomerías ópticas y geométricas (**Recuadro 1.1.**) pueden determinar grandes cambios cuantitativos y cualitativos en los efectos neurotóxicos (Ruigt, 1985; Coats, 1990). Aumentos en la densidad de canales de sodio o en la insensibilidad de las membranas nerviosas para unirse a los piretroides, son mecanismos que confieren resistencia a estos insecticidas (Osborne and Pipper, 1992).

Los piretroides afectan también la actividad de ATPasas, fosfatasas, enzimas lisosomales, oxidasas microsomales, adenilciclasas, receptores gabaérgicos y neurotransmisores (Ruigt, 1985; Vijverberg and van den Bercken, 1990).

1.1.2.3. Piretroides sí, ¿otros no?

La síntesis de los cianopiretroides resolvió el desafío planteado en los años '40: obtener moléculas que reunieran las ventajas de las piretrinas y no presentaran sus desventajas. Los cianopiretroides son muy tóxicos para un amplio rango de insectos perjudiciales (Hirano, 1989; Carter, 1989), poco tóxico para otros animales (Inglesfield, 1989; Hill, 1989), no tienen efectos graves en trabajadores expuestos (Ecobichon, 1991), no se acumulan en los seres vivos (Demoute, 1989), y su persistencia al aire libre es corta pero suficiente para usarlos con éxito en el campo (Demoute, 1989).

	Tipo I	Tipo II
estructura química	un grupo ciano en el carbono α	sin grupo ciano
síntomas en ratas	<ul style="list-style-type: none"> - hiperexcitación - movimientos agresivos de las patas - temblores en todo el cuerpo - postración 	<ul style="list-style-type: none"> - sacudidas de cabeza - salivación abundante - convulsiones - coreoatetosis
síntomas en cucaracha	<ul style="list-style-type: none"> - inquietud - incoordinación - postración - parálisis 	<ul style="list-style-type: none"> - hiperactividad - incoordinación - convulsiones
efectos electrofisiológicos en vertebrados e invertebrados	<p><u>dosis bajas</u>: descargas repetitivas después de un único estímulo</p> <p><u>dosis altas</u>: despolarización permanente</p>	despolarización prolongada sin descargas repetitivas
ejemplos	aletrina resmetrina permetrina	cipermetrina deltametrina fenvalerato

Tabla 1.2. Clasificación de los piretroides basada en los síntomas y efectos electrofisiológicos que producen (Naumann, 1990; Ecobichon, 1991).

Recuadro 1.2. La enfermedad de Chagas

Es una enfermedad crónica causada por un protozoo flagelado, *Trypanosoma cruzi*. Las poblaciones de este parásito circulan entre los hospedadores, los vectores y los reservorios. Los vectores son chinches hematófagas que adquieren el parásito al alimentarse con la sangre de un hospedador infestado (principalmente mamíferos). Después de la ingestión, los parásitos migran al intestino medio de la chinche, sufren diversos cambios morfológicos y se dividen muchas veces. El vector queda infestado hasta la muerte. En el intestino medio la morfología de los parásitos se modifica de nuevo. Las nuevas formas se desplazan al intestino posterior.

Las chinches hematófagas tienen hábitos nocturnos. Se posan sobre la piel de la presa dormida, la pican y le succionan la sangre. Mientras se alimentan desalojan el contenido intestinal, liberando los parásitos. A través de escoriaciones, generalmente producidas por el rascado, los parásitos atraviesan la piel y alcanzan los vasos sanguíneos.

La enfermedad de Chagas presenta tres fases:

(a) Fase aguda. Se produce una inflamación, chagoma, en el lugar en que los parásitos ingresaron al organismo. El chagoma en el ojo es conocido como signo de Romaña. Los síntomas generales son fiebre, aumento de tamaño del hígado y el bazo, y edemas generalizados. Un tercio de los pacientes presenta

irregularidades cardíacas, que en niños menores de 2 años pueden ser letales. Por debajo de esa edad también se producen complicaciones como la meningoencefalitis, que es letal el 50% de las veces. En el resto de los casos, los síntomas desaparecen espontáneamente dentro de las ocho semanas.

(b) Fase indeterminada. No se observan síntomas y las personas pueden desarrollar normalmente actividades físicas. Los electrocardiogramas y radiografías no presentan irregularidades. La presencia del parásito en la sangre no se detecta con métodos directos, pero sí por xenodiagnóstico (picadura de una chinche y posterior análisis de su contenido intestinal)

(c) Fase crónica. Se manifiesta entre 10 y 20 años después de contraer la enfermedad. Se producen daños cardíacos, intestinales y neurológicos. Las muertes se deben principalmente a fallas del corazón.

Otras formas de adquirir la enfermedad son las transfusiones, el transplante de órganos y a través de la placenta.

Se estima que en latinoamérica 100 millones de personas viven en condiciones de riesgo, 18 millones están infestadas, 3 millones presentan complicaciones crónicas. Cada año 45.000 personas mueren a causa de esta enfermedad, y 1.000.000 la contraen.

(Información extraída de Carlomagno et al., 1989; WHO, 1991; Moncayo, 1993)

Existen alternativas mucho más seguras para el ambiente y los organismos no perjudiciales que los insecticidas sintéticos, pero con limitaciones que impiden su uso masivo en el control de plagas. La técnica del insecto estéril, las feromonas, los atractantes y repelentes de origen vegetal, el control biológico, comparten haber despertado grandes entusiasmos al ser concebidos como controladores de plagas, y alcanzado éxitos medianos o nulos en los años posteriores. Esto se atribuye a que se usaron ensayos de sensibilidad inadecuada, los bioensayos no concordaron con el uso en el campo, no se tuvo en cuenta la variabilidad innata de los insectos, se subestimó la complejidad de las interacciones entre los insectos y el ambiente (Dent, 1991). En el caso de las feromonas hubo una tendencia a usarlas apenas sintetizadas, sin estudiar sus limitaciones. En casos particulares la especificidad del método es tan alta que no se justifica el esfuerzo necesario para su desarrollo.

Algunos productos de la ingeniería genética son hoy candidatos a ocupar puestos de privilegio entre las estrategias de control de las próximas décadas. Plantas transgénicas productoras de toxinas insecticidas son ya una realidad (Gasser and Fraley, 1992; Chilton, et al., 1993). La tasa y la especificidad tisular de la expresión de los genes transgenizados todavía son problemas por resolver (Gasser and Fraley, 1992). Otras cuestiones por ahora sin respuesta son cómo se resolverá el surgimiento de resistencia a las toxinas, y si la gente aceptará comer los frutos de las plantas transgénicas.

La acción rápida y efectiva, y la relación costo-beneficio justifica por ahora el uso de los insecticidas sintéticos. En los programas de manejo integrado de plagas, son una herramienta eficaz para reducir las poblaciones de insectos antes de aplicar otros métodos de control. El uso racional puede minimizar los riesgos. Mientras tanto habría que seguir buscando alternativas que reduzcan los efectos indeseables de los insecticidas sintéticos.

1.1.2.4. Los piretroides y el control de la vinchuca

La enfermedad de Chagas (**Recuadro 1.2.**) es una endemia latinoamericana que se extiende desde México hasta la Patagonia. En la región ocupa el cuarto lugar entre las patologías discapacitantes, después de las enfermedades respiratorias, las diarreas y el SIDA (Schofield, 1994).

Lo que puede hacer la medicina por un enfermo de Chagas es poco (Schofield, 1994). Sólo un par de drogas, nifurtimox y benznidazol, curan la parasitemia si se aplican los primeros días después de la infección. Estas drogas eliminan también los síntomas de la fase aguda. La eliminación de los parásitos se hace más improbable a medida que aumenta el tiempo entre el momento de la infección y el comienzo del tratamiento. Además, estos remedios dan resultado en dosis cercanas al límite de tolerancia: los efectos secundarios son frecuentes y peligrosos. Los síntomas de la fase crónica pueden tratarse con antiarrítmicos y vasodilatantes si son leves, y con marcapasos y cirugía si son graves. Estas estrategias no siempre tienen éxito y significan un desembolso que varía entre 700 y 1600 dólares anuales.

El fracaso en el desarrollo de vacunas preventivas y la existencia de un vector que, además de transmitir la enfermedad, se alimenta de la sangre de las personas, completan el carácter funesto de esta desgracia latinoamericana.

Los expertos de la Organización Mundial de la Salud consideran que el control de la enfermedad de Chagas es científica y tecnológicamente factible, y que las herramientas y estrategias están disponibles desde hace más de 30 años (WHO, 1991). La ausencia de programas de control en la mayoría de los países afectados se debe, según estos expertos, a causas políticas y económicas, a la subestimación de la prevalencia de la enfermedad y del daño social que causa. Es patético que las palabras de Carlos Chagas, escritas hace 80 años, todavía tengan una triste vigencia: "Hay un designio nefasto en el estudio de la tripanosomiasis. Cada trabajo, cada estudio, apunta un dedo hacia una población mal nutrida, hacia un problema económico y social que a los gobernantes les produce una tremenda desazón, pues es testimonio de incapacidad para resolver un problema tremendo. Es un problema de

vinchucas que invaden y viven en habitaciones sucias, con habitantes ignorantes, mal alimentados, pobres y envilecidos, sin esperanza y sin horizonte social".

El control de los vectores parece ser la medida más rápida y eficaz para interrumpir el ciclo del parásito (Metcalf, 1975). Aunque las chinches no transmitieran enfermedades, su condición de chupadoras de sangre justifica cualquier intento de erradicarlas de los lugares donde viven las personas.

Se conocen 105 especies de chinches hematófagas distribuidas en el continente americano. En los intestinos de más de la mitad se detectó *Trypanosoma cruzi*. El principal vector de la enfermedad de Chagas en Argentina es *T. infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Su nombre de entrecasa es vinchuca, palabra quechua que significa "la que se deja caer" (de los techos para picar a las personas).

En los años '50 y '60 el control químico de los vectores se basó en el rociado de insecticidas clorados. En los años '70 se usaron carbamatos y fosforados. Ensayos de laboratorio (Grupo de Entomotoxicología de CITEFA, informe no publicado, 1978; de Licastro et al., 1982) y de campo (Gualtieri et al., 1984) decidieron que los insecticidas de la década del '80 serían los piretroides. Poco después se descubrió que la exposición de las vinchucas a vapores subletales del insecticida clorado lindano y algunos piretroides aumenta la velocidad de respiración y la incorporación de vapores por las vías respiratorias (Zerba, et al., 1982). Es una manera de sinergizar la toxicidad de insecticidas aplicados en forma de vapores o humos. Enseguida se desarrollaron potes fumígenos con lindano mezclado con otros insecticidas, incluidos los piretroides (Zerba et al., 1988). El tipo de formulado y el tipo de sinergismo no fueron las únicas novedades introducidas por los potes fumígenos. Hasta ese momento casi todas las medidas de control eran hechas por fumigadores profesionales estatales. Los potes permitieron la participación de la comunidad y la descentralización de las actividades. Ahora dos empresas comercializan tres versiones recientes de aquellos potes, todas con piretroides. El Servicio Nacional de Chagas compra y distribuye los potes

fumígenos, y existe la posibilidad de difundir su uso en otros países latinoamericanos.

Un nuevo formulado no profesional de piretroides está siendo desarrollado: telas impregnadas con insecticidas (Wood et al., 1992; Zerba, 1995). Estas telas se colocan en los ranchos a modo de cielorraso y debajo de los colchones de las camas (lugares de tránsito y refugio de las vinchucas), y actúan como complemento de los rociados y los potes fumígenos. Ensayos preliminares en domicilios de Gramilla (Dpto. Giménez, Santiago del Estero) sugieren que las telas impregnadas con piretroides podrían prevenir la reinfestación de las viviendas (Zerba, 1995).

El control químico de los vectores puede hacer mucho, pero no todo. También deben fomentarse el saneamiento de los peridomicilios, la vigilancia médica, el control de los bancos de sangre, el mejoramiento de las viviendas, la educación sanitaria y la participación de las comunidades (WHO, 1991). Imaginar América Latina sin Chagas suena utópico. Pero es una de esas utopías a las que debemos acercarnos tanto como sea posible

1.2. ESTA TESIS. OBJETIVOS Y MOTIVOS

1.2.1. Objetivos

El objetivo general fue

- ampliar la escasa información disponible acerca de la toxicología de piretroides de uso actual o potencial para el control de la vinchuca.

Los objetivos particulares fueron

- caracterizar y cuantificar los síntomas de intoxicación,
- estudiar la influencia de variables intrínsecas y extrínsecas sobre la toxicidad,
- evaluar el efecto sobre la actividad locomotora,
- evaluar efectos subletales.

Los experimentos se hicieron con ninfas I y III de *T. infestans*. Se trabajó principalmente con deltametrina y *cis*-permetrina, y en menor medida con mezclas de isómeros de cipermetrina.

1.2.2. ¿Por qué *cis*-permetrina?

Durante años los principios activos y las formulaciones usadas en las campañas de Chagas fueron seleccionados entre productos desarrollados por fabricantes extranjeros. La idea que guía los objetivos de nuestro laboratorio es que en la selección y el desarrollo de nuevos triatomicidas deben estar involucrados laboratorios latinoamericanos (Zerba, 1989); y que son estos laboratorios los que deben realizar una investigación racional que permita diseñar productos específicos para controlar la vinchuca.

El desarrollo de nuevas moléculas insecticidas requiere un esfuerzo económico impensable en regiones como la que habitamos. Se estima que el desarrollo de un nuevo principio activo, desde su síntesis inicial hasta su aplicación práctica, demanda unos 8 años y 100 millones de dólares (Klassen, 1995). Una alternativa más apropiada para nuestra realidad es aislar isómeros activos presentes en mezclas ya comercializadas. De esta manera se acorta el camino para obtener nuevos productos. Buena parte de la información toxicológica que hay que presentar para el registro ya está disponible en el caso de los isómeros, porque fue requerida cuando se registró la mezcla. Además, una vez que se identifican los isómeros inactivos, se pueden desarrollar productos que no los posean y entonces evitar la aplicación de moléculas sin actividad insecticida y con potencial impacto ambiental.

Teniendo en mente todo lo anterior, nuestro laboratorio decidió investigar la toxicidad de isómeros aislados de piretroides. Y una de las sustancias elegidas fue la permetrina.

Ya se discutió antes en esta Introducción que los piretroides, y en particular deltametrina, son los insecticidas más usados en las campañas argentinas para el control del vector de la Enfermedad de Chagas. La

permetrina comercial es una mezcla de isómeros que casi no se ha usado para el control de la vinchuca. Estudios en campo sugirieron que se necesitan 0,5 g/cm² para lograr un control efectivo, mientras que con 0,05 g/cm² de deltametrina puede obtenerse un resultado similar (Gualtieri et al., 1985). El costo de la permetrina es similar al de la cipermetrina, pero la concentración de cipermetrina recomendada para uso en Chagas es unas 4 veces menor (Zerba, comunicación personal). Esta relación costo/concentración es la principal causa por la cual no se usa permetrina para el control de la vinchuca en Latinoamérica.

Los primeros ensayos realizados por nuestro laboratorio indicaron que el isómero *cis* de la permetrina presenta una alta actividad vinchuquicida. Lo interesante de este descubrimiento es que la permetrina se fabrica en Argentina y la obtención de isómeros puros no implica técnicas particularmente sofisticadas. Además, la *cis*-permetrina es sólida y puede formularse como partículas micronizadas en agua con ayuda de un tensioactivo (formulado floable). La permetrina, en cambio, es un aceite que sólo puede formularse después de ser disuelto en un solvente orgánico (concentrado emulsionable). El uso de solventes orgánicos en las formulaciones aumenta la alergenicidad de los piretroides; en algunos casos el solvente solo es alergénico.

Estas circunstancias motivaron la ejecución de los experimentos que se presentan en esta Tesis.

1.2.3. Habla el tesista

Una fría tarde de invierno, hace algunos años, saqué de la cámara climatizada unas ninfas de vinchucas tratadas con dosis bajas de piretroides. Al quedar expuestas a la baja temperatura exterior las ninfas, que hasta ese momento se veían normales, se incoordinaron en pocos minutos. No era novedad que el descenso de temperatura suele aumentar la toxicidad de los piretroides, pero yo no lo sabía. Por aquel entonces estaba terminando el Seminario de Licenciatura y estábamos viendo qué sería de mi vida (quiero decir qué iba a

seguir investigando, por lo demás me sigo preguntando qué va a ser de mi vida). En el laboratorio se estaba trabajando con isómeros de cipermetrina, y como no había sido investigado antes, decidimos evaluar el efecto de la temperatura sobre la toxicidad de estos piretroides. Así empecé a hacer los primeros experimentos de esta Tesis.

Casi enseguida descubrimos que la toxicidad en vinchuca de uno de los isómeros geométricos de permetrina era equivalente a la toxicidad de deltametrina. Decidimos que el resto de la Tesis estaría dedicado a comparar distintos aspectos de la toxicología de estos dos piretroides. Los evaluamos en distintas condiciones intrínsecas y extrínsecas, e investigamos si producían efectos subletales.

Empíricamente desarrollamos un método para cuantificar la incoordinación. Sabíamos que las ninfas tratadas con piretroides tardaban varios días en morir, pero ¿qué pasaba mientras tanto?. Para averiguarlo describimos y cuantificamos los síntomas de intoxicación.

Mientras tanto la Organización Mundial de la Salud aceptó nuestro pedido de un analizador de imágenes y se abrió en nuestro laboratorio una nueva línea de trabajo relacionada con el comportamiento y la actividad sensorial de los insectos. A mí, que estaba estudiando síntomas y efectos subletales de piretroides, me tocó estudiar la repelencia y el efecto sobre la actividad locomotora. Parte de los resultados son presentados aquí.

No se acostumbra en estas circunstancias enumerar las cosas que se quisieron pero no se pudieron hacer, así que no voy a mencionar que yo le tenía muchas ganas a los estudios metabólicos de los isómeros de permetrina y que el precio que nos pasaron para sintetizar las moléculas radiactivas me quitó las ganas.

Ahora estoy entusiasmado con inminentes experimentos sobre los efectos de los piretroides en los sistemas nerviosos central y periférico. Los avatares políticos y económicos de la Argentina impiden prever si habrá vida después de la Tesis. Uno viene sobreviviendo y habituándose a rumores de interrupciones de sueldos y de becas, y pronósticos funestos sobre el futuro inmediato de la investigación y los investigadores. Pero sigue metido en lo que

lo apasiona, con la esperanza de tiempos venideros mejores. Después de todo, parafraseando al poeta García, "yo no quiero meterme en problemas, yo no quiero asuntos que queman, yo tan solo les digo que es un bajón; yo no quiero sembrar la anarquía, yo no quiero vivir como digan, tengo algo que late en mi corazón; yo no quiero vivir paranoico, yo no quiero ver chicos con odio, yo no quiero sentir esta depresión; voy buscando el placer de estar vivo, no me importa si soy un bandido, voy pateando basura en el callejón".

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INSECTOS

Se trabajó con ninfas I y III de *T. infestans* criadas en el insectario del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas. La cría se realizó en una cámara climatizada, a 28°C y un fotoperíodo 12: 12 (L: O). La alimentación se hizo sobre paloma. Se usaron ninfas I de 7-10 días de edad, ayunadas desde la eclosión; y ninfas III de 11-16 días de edad, ayunadas desde la última muda (excepto, para ambos estadios, cuando se indica otra cosa).

2.2. SUSTANCIAS

Todos los piretroides fueron de grado técnico (el origen se indica entre paréntesis). Deltametrina (S)- α -ciano-3-fenoxibencil (1R)-*cis*-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato (Roussel-Uclaf, Francia). *Cis*- y *trans*-permetrina 3-fenoxibencil (1RS)-*cis*, *trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato (Environmental Protection Agency, USA; Chemotecnica Sintyal, Argentina). Mezclas *cis*-permetrina: *trans*-permetrina 82: 18, 60: 40, 42: 58 (Chemotecnica Sintyal, Argentina), y 24: 76 (obtenida a partir de la mezcla de los isómeros puros). Cipermetrina (RS)- α -ciano-3-fenoxibencil (1RS)-*cis*, *trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato (Chemotecnica Sintyal, Argentina). Mezclas de isómeros de cipermetrina:

β -cipermetrina (38% /1Rcis/S+/1Scis/R; 57,5% /1Rtrans/S+/1Strans/R) (Chemotecnica Sintyal, Argentina); cipermetrina High cis (con alto contenido de isómeros cis, en adelante llamada cipermetrina AC) (> 80% /1Rcis/S+/1Scis/R+/1Scis/S+/1Rcis/R) (Ciba Geigy, Suiza); alfamecina (95% /1Rcis/S+/1Scis/R; 4,4% /1Scis/S+/1Rcis/R) (Shell, Reino Unido).

Se usaron también butóxido de piperonilo (Chemotecnica Sintyal), trifenilfosfato (Aldrich), N-etilmaleimida (Aldrich), y acetona para análisis (Merck).

2. 3. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS TOXICOLÓGICOS

2.3.1. Obtención de los datos

2.3.1.1. CE 50

Los insectos fueron expuestos a filmes de los insecticidas sobre papel de filtro Whatman Nro. 1. Los papeles fueron tratados con diluciones seriales de los insecticidas en acetona (generalmente por un factor 2 ó 3) y se dejaron secar 30 minutos para eliminar el solvente por evaporación. La elección de concentraciones que produjeran entre 0 y 100% de efecto se hizo en base a los resultados de ensayos preliminares. Los controles fueron expuestos a papeles tratados con acetona sola. La exposición se hizo en frascos de vidrio con el fondo cubierto por los papeles tratados. La boca de los frascos fue cubierta con una gasa sostenida por una banda elástica. Se expusieron al menos 5 insectos por concentración, y se usaron al menos tres dosis para estimar cada CE 50. Los resultados fueron evaluados a las 24 horas. Se hicieron 2-3 réplicas independientes de cada experimento.

2.3.1.2. DE 50

Se hizo aplicación tópica de los insecticidas disueltos en acetona. Se usó una microjeringa provista de pulsador, y cada insecto recibió 0,2 µl de solución en la parte ventral del abdomen (excepto cuando se indica otra cosa). Se aplicaron diluciones seriales de los insecticidas (generalmente por un factor 2 ó 3). La elección de dosis que produjeran entre 0 y 100% de efecto se hizo en base a los resultados de ensayos preliminares. Los controles recibieron acetona sola. Los insectos tratados fueron colocados en vasos de plástico con un trozo de papel plegado en su interior. La boca de los frascos fue cerrada con una gasa sostenida por una banda elástica. Se usaron al menos 5 insectos por dosis, y al menos tres dosis para estimar cada DE 50. Los resultados fueron evaluados a las 24 horas (excepto cuando se indica otra cosa). Se hicieron 2-3 réplicas independientes de cada experimento.

2.3.1.3. TE 50

Se hizo exposición a filmes de insecticidas o aplicación tópica, como se describió para las CE 50s y las DE 50s. Los controles fueron expuestos o recibieron aplicación tópica de acetona sola. En cada experimento se aplicó una única concentración o dosis de insecticida y se evaluó el resultado a distintos tiempos.

Los insectos tratados fueron colocados en vasos de plástico con un trozo de papel plegado en su interior. Se usaron al menos 5 insectos por experimento, y al menos 5 tiempos para estimar cada TE 50. Se hicieron 2-4 réplicas independientes de cada experimento.

Se eligieron concentraciones o dosis que produjeran los efectos buscados en tiempos relativamente cortos (pocas horas después de la aplicación). A continuación se detallan las concentraciones y dosis usadas en cada experimento y sus respectivas toxicidades.

experimento	concentración o dosis	toxicidad
Figuras 3.2. y 3.3	0,02 µg/insecto	DE 99 (deltametrina, 26°C, ninfas III)
Figuras 3.2. y 3.3.	2 µg/insecto	100 x DE 99 (deltametrina, 26°C, ninfas III)
Figura 3. 6.	55,5 µg/cm ²	10 x CE 99 (deltametrina, 28°C, ninfas III)
Figuras 3.7. y 3.8.	14 ng/cm ²	0,01 x CE 5 (deltametrina, 28°C, III)
Figura 3.12.	0,1 µg/insecto	20 x DE 99 (deltametrina, 26°C, ninfas I)
Figura 3.13.	20 µg/insecto	100 x DE 99 (deltametrina, 26°C, ninfas III)

2.3.1.4. Aplicación de sinergistas

Se hizo exposición a filmes de los insecticidas sobre papel de filtro Whatman Nro. 1. Los papeles fueron tratados con soluciones de sinergistas en acetona y se dejaron secar 30 minutos para eliminar el solvente por evaporación. En los experimentos de volteo y recuperación (**Figura 3.4.**) los insectos estuvieron expuestos en forma permanente a 0,07 mg/cm² de butóxido de piperonilo. En los experimentos con isómeros de permetrina (**Figuras 3.18. y 3.19.**), estuvieron expuestos a butóxido de piperonilo o trifenilfosfato (0,7 mg/cm² en ambos casos) durante las 24 horas previas a la aplicación de los insecticidas. En todos los experimentos se hicieron controles exponiendo insectos a papeles tratados con acetona sola y con sinergistas disueltos en acetona.

2.3.1.5. Condiciones ambientales

Después de la aplicación de los insecticidas, los insectos fueron colocados en una cámara climatizada a 28 ó 26°C (excepto cuando se indica otra cosa). El fotoperíodo fue 12: 12 (L: O), y la humedad relativa varió entre 60 y 90%.

2.3.1.6. Efectos evaluados

Se evaluaron los tres siguientes efectos:

- (a) **Incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro.** Se colocó un disco de papel de filtro (15 cm de diámetro) en el centro de una cuba rectangular de plástico (21 x 33 cm). Los insectos fueron depositados en el centro del disco de papel y estimulados con el toque suave de una pinza entomológica de acero inoxidable. Los insectos controles (tratados con acetona sola) abandonaban el disco de papel dentro de los 5 segundos posteriores al estímulo, y muchas veces en ausencia de éste, dirigiéndose rápidamente y en línea recta hacia las paredes de la cuba. Los insectos tratados mostraron distintos comportamientos de acuerdo con el grado de intoxicación. Insectos poco intoxicados demoraron más tiempo que los controles en abandonar el círculo de papel, porque sus movimientos eran más lentos o porque se desplazaban en forma circular en vez de hacerlo en línea recta. Insectos más intoxicados tenían paralizado el tercer par de patas, se desplazaban con dificultad hasta el borde del papel pero no podían abandonarlo porque las uñas de las patas posteriores quedaban enganchadas en las irregularidades del papel. Insectos muy intoxicados con incoordinación en todas las patas se arrastraban con dificultad, en forma errática y sin llegar al borde del papel. Insectos altamente intoxicados carecían por completo de actividad locomotora, aunque las patas seguían agitadas por movimientos incoordinados.

Se consideraron afectados aquellos insectos que no abandonaron el disco de papel en 50 segundos, es decir en aproximadamente 10 veces el tiempo empleado por los controles. Esta definición no se refiere a insectos que muestran un síntoma determinado, abarca a insectos con distintos síntomas. En otras palabras, se consideraron afectados todos los individuos comprendidos en cierto rango de intoxicación y que tenían en común la incapacidad de abandonar el círculo de papel. Se obró de esta manera porque, a causa de la variabilidad biológica, en cualquier grupo de insectos tratados con piretroides coexisten individuos con distintos grados de afectación.

- (b) **Ausencia de actividad locomotora.** Los insectos fueron observados durante 50 segundos. Se consideraron afectados los que no mostraron actividad locomotora (aunque continuaran agitando las patas en forma incoordinada), ni siquiera después de ser estimulados con el toque suave de una pinza entomológica.

- (c) **Ausencia de movimiento en patas, antenas y proboscis.** Los insectos fueron observados durante 2 minutos. Se consideraron afectados los que no realizaron movimiento alguno de los apéndices, ni siquiera después de ser estimulados con el toque suave de una pinza entomológica.

2.3.2. Cálculo de los parámetros

Se usó el programa *Microprobit 3.0* (Sparks and Sparks, no publicado), basado en el método de Finney (1971). Este programa calcula CE 50s, DE 50s, o TE 50s, con sus respectivos intervalos de confianza del 95%; y aplica factores de corrección para hasta un 10% de mortalidad en los controles y para los casos en que los datos son ligeramente heterogéneos. Los datos de las réplicas fueron mezclados para calcular cada parámetro definitivo (Tabashnik et al.,

1987). Se consideraron significativamente diferentes los valores cuyos intervalos de confianza del 95% no se superpusieron (Toth and Sparks, 1990).

2.3.3. Coeficientes de temperatura

Se calcularon dividiendo la CE 50 (o DE 50, o TE 50) mayor por la CE 50 (o DE 50, o TE 50) menor (Toth and Sparks, 1988). Se asignó signo negativo a los coeficientes cuando la CE 50 (o DE 50, o TE 50) a la mayor temperatura fue mayor que la CE 50 (o DE 50, o TE 50) a la menor temperatura. De acuerdo con esta definición, un coeficiente de temperatura puede ser positivo o negativo, y tomar valores igual o mayores que 1. Los coeficientes iguales a 1 (neutros) corresponden a los casos en que la temperatura no afectó la toxicidad. Se consideraron significativamente diferentes que 1 los coeficientes calculados a partir de parámetros cuyos intervalos de confianza del 95% no se superpusieron (Toth and Sparks, 1988).

2.3.4. Coeficientes de interacción

Se usó el programa *Dose-effect Analysis with Microcomputers* (Chou and Chou, 1987). Los coeficientes de interacción pueden ser menores (sinergismo), iguales (aditividad), o mayores (antagonismo) que 1. Se calcularon los coeficientes para cada réplica de los experimentos de mezclas de *cis*- y *trans*-permetrina, se obtuvieron los promedios \pm DE y se determinó si los valores eran significativamente distintos que 1 mediante la Prueba t para una muestra del programa *GraphPad InStat* (Uchitel, 1990).

2.4. SÍNTOMAS DE INTOXICACIÓN

Se hizo aplicación tópica, con una microjeringa provista de pulsador, en el lado ventral del abdomen. Cada ninfa recibió 0,02 ó 2 μg de insecticida en 0,2 μl de acetona. Se determinaron la naturaleza y el orden de aparición de los síntomas de intoxicación por observación continua e individual de al menos 10 ninfas por dosis y por insecticida. Como controles se usaron ninfas tratadas con acetona sola.

Para cada una de las dosis mencionadas se determinó la cantidad de ninfas con el abdomen inflado y de ninfas recuperadas del volteo al cabo de 21 días. Se hicieron 4 réplicas independientes ($n = 5$). La idea inicial era someter estos datos al análisis de la varianza. Algunos tratamientos no produjeron efectos y la ausencia de varianza impidió usar esa prueba estadística. Entonces se usó la Prueba t de Student del programa *GraphPad InStat* (Uchitel, 1990).

El efecto del tiempo sobre la DE 50 se analizó en la forma propuesta por Sawicki (1962) con ligeras modificaciones. Se graficó DE 50 vs logaritmo del tiempo para obtener una curva con 3 fases (fase 1, descendente; fase 2, ascendente; fase 3, meseta). El Punto Final del Volteo (PFV) es la mínima DE 50, es decir el punto de inflexión entre las fases 1 y 2. La Tasa de Recuperación del Volteo (TRV) es la pendiente de la recta que se obtiene al graficar las DE 50s de la fase 2 en función del logaritmo del tiempo. La TRV es una medida de cuán rápidamente se recuperan del volteo los insectos. La Proporción Efectividad: Volteo (PEV) se obtiene dividiendo la DE 50 en el PFV por la DE 50 en la meseta, y es una medida de cuánta recuperación ocurre.

2.5. CAMBIOS DE TEMPERATURA

Se expusieron grupos de ninfas III a filmes de piretroides sobre papel de filtro Whatman Nro. 1 (14 ng/cm^2) durante 24 horas a 28°C. Los papeles fueron tratados con soluciones de los insecticidas en acetona y se dejaron secar 30

minutos antes de exponer las ninfas. Después de la exposición las ninfas fueron mantenidas otras 24 horas a la misma temperatura. La concentración usada fue subtóxica, de modo que al término del segundo día ningún insecto mostró síntomas de intoxicación. Se realizaron entonces tres tipos de experimentos (en todos los casos el efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro):

- (a) Las ninfas fueron transferidas de 28 a 16°C. Al disminuir la temperatura aparecieron los síntomas de intoxicación. Entonces se determinó la cantidad de ninfas afectadas en función del tiempo. Se calcularon los TE 50s como se describió previamente. Se hicieron 2 réplicas independientes de cada experimento (n = 20).
- (b) Las ninfas fueron transferidas de 28 a 16°C. Dos y media ó 24 horas después fueron regresadas a 28°C (en los dos casos, el 100% de las ninfas estaba afectado al realizar el segundo cambio de temperatura). Entonces se determinó la cantidad de ninfas recuperadas en función del tiempo (se consideraron recuperadas las ninfas que abandonaron el disco de papel de filtro en menos de 50 segundos). Se calcularon los Tiempos de Recuperación del 50% de la población (TR 50) del mismo modo que se describió antes para los TE 50s. Se hicieron 2 réplicas independientes de cada experimento (n = 20).
- (c) Las ninfas fueron transferidas de 28 a 16°C diariamente durante 2 horas. Se determinó la cantidad de ninfas afectadas al cabo de ese tiempo y se las regresó a 28°C. Se verificó que cada día, antes del primer cambio de temperatura, ninguna ninfa mostró síntomas de intoxicación. Los datos fueron analizados con el método de regresión lineal (Sokal and Rohlf, 1981).

2.6. ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Las ninfas fueron expuestas a filmes de los insecticidas sobre papel de filtro Whatman Nro. 1. Los papeles fueron tratados con soluciones de los insecticidas en acetona y se dejaron secar 30 minutos para eliminar el solvente por evaporación. Los controles fueron expuestos a papeles tratados con acetona sola. Se trabajó con diluciones seriales (factor 10). Se eligió como mayor concentración la que no produjo síntomas visibles de intoxicación dentro de los 30 minutos de exposición permanente, y como mínima la primera (en orden descendente) que no tuviera un efecto significativo sobre la actividad locomotora. La arena experimental fue un recipiente circular de plástico blanco (7,5 cm de diámetro; 4 cm de alto) con el fondo cubierto con un disco de papel de filtro tratado. Los insectos fueron depositados en la arena experimental e inmediatamente se midió la actividad locomotora con un analizador de imágenes.

Las imágenes fueron registradas con una cámara de video blanco y negro (Sanyo) e ingresadas a un analizador de imágenes (Videomex-V, Columbus) con una resolución de 256 x 192 pixels y una velocidad de adquisición y procesado de 30 cuadros por segundo. Se usó el programa *Multiple Objects Motion for Videomex-V*, que mide el movimiento de múltiples objetos en una única zona. Para calcular la cantidad de movimiento durante una determinada sesión, este programa compara la imagen actual con la imagen previa y determina la cantidad de pixels que cambiaron de estado (de encendido a apagado y viceversa). Al final de la sesión expresa la sumatoria de los pixels que cambiaron de estado. También registra la cantidad de pixels encendidos en cada imagen, los suma y los promedia por la cantidad de imágenes procesadas durante la sesión. Este valor representa el área promedio.

La arena experimental fue colocada a 15 cm de la cámara de video. Se graduó el contraste de la imagen de tal manera que la cámara registrara únicamente el tórax y el abdomen de las ninfas. La iluminación fue provista por un tubo fluorescente (15 watts, estándar) colocado debajo del plano de la

arena experimental. Esta ubicación permitió eliminar por completo las sombras producidas por los insectos, la cámara y las paredes del recipiente.

La actividad de las ninfas fue medida durante los 30 minutos siguientes al comienzo de la exposición a los insecticidas (excepto cuando se indica otra cosa). La información fue almacenada en una computadora IBM compatible.

La actividad locomotora se expresó como pixels que cambiaron de estado/ área promedio. De esta forma se relativizó el movimiento en función del área, la cual no se mantuvo constante a lo largo de las sesiones. El área disminuyó por ejemplo cada vez que una ninfa pasó por encima de otra, o se irguió sobre sus patas intentando (infructuosamente) subir por las paredes del recipiente. Este procedimiento experimental produjo resultados altamente repetitivos.

Los experimentos se hicieron en un ambiente climatizado a $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Se hicieron 5 réplicas independientes de cada ensayo ($n = 5$). Los datos fueron analizados con el método de regresión lineal (Sokal and Rohlf, 1981).

Después de cada experimento se verificó que las ninfas no presentaran síntomas visibles de intoxicación, y se las mantuvo durante 24 horas en una cámara climatizada a 26°C ; entonces se determinó la cantidad de individuos afectados. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro.

Se hicieron experimentos similares exponiendo las ninfas a una concentración de $14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de los insecticidas. En un caso se midió la actividad a 16 y 36°C , en el otro a 26°C después de tratar a las ninfas con N-etilmaleimida (aplicación tópica en el lado dorsal del abdomen de $20 \mu\text{g}/\text{insecto}$ 5 minutos antes de exponer a los piretroides).

También se hizo aplicación tópica de los insecticidas en el extremo dorsal del abdomen o en el lado dorsal de la cabeza. Las dosis aplicadas se eligieron con el mismo criterio usado para la elección de las concentraciones. Cuando la aplicación se hizo en la cabeza de las ninfas, sólo se midió la actividad durante 15 minutos, porque los síntomas de intoxicación se manifestaron antes de 30 minutos. Igual que antes, las ninfas fueron

mantenidas durante 24 horas a 26°C, entonces se evaluó el efecto de los piretroides.

Los datos de estos últimos experimentos fueron transformados a $\log x$ para que reunieran los requisitos de normalidad y homocedasticidad, y sometidos al análisis de la varianza (Sokal and Rohlf, 1981). Las medias fueron separadas con la Prueba de rangos múltiples de Duncan (Duncan, 1955).

2.7. EFECTOS SUBLETALES

Se usaron ninfas I y III de 6 días de edad, ayunadas desde la eclosión o la última muda. Se hizo exposición a filmes secos de piretroides (14 ng/cm²) sobre tela (blanca, 100% algodón). Las telas fueron tratadas con soluciones de los insecticidas en acetona y se dejaron secar 30 minutos antes de la exposición. Los controles fueron expuestos a telas tratadas con acetona sola. La elección de la concentración se realizó exponiendo grupos de ninfas a diluciones seriales (factor 10) de deltametrina. Se eligió para el experimento la máxima concentración que no afectó a los insectos al cabo de 7 días de exposición.

Se trabajó con rectángulos de tela (6 x 6 cm) sobre los cuales se colocaron aros de vidrio (5 cm de diámetro, 2,5 cm de alto). Se depositaron las ninfas sobre las telas y se cubrió la parte superior de los aros con película para transparencia. Al cuarto día de exposición las ninfas fueron alimentadas sobre paloma. Se determinaron el peso antes y después de la ingesta, y la cantidad de ninfas que no se alimentó. La exposición a los insecticidas fue permanente durante 40 días. Entonces se determinó la cantidad de ninfas que mudaron y que murieron. Se hicieron 5 réplicas independientes de cada experimento (n = 15-20). Los resultados fueron sometidos al análisis de la varianza (Sokal and Rohlf, 1981).

2.8. LISTA DE ABREVIATURAS

BP, butóxido de piperonilo.

CE 50, concentración efectiva para el 50% de la población.

Ci, coeficiente de interacción.

Cipermetrina AC, cipermetrina enriquecida en el isómero *cis* (> 80%)

DE 50, dosis efectiva para el 50% de la población.

NSIC, no superposición de los intervalos de confianza del 95%.

PEV, proporción efectividad:volteo.

SIC, superposición de los intervalos de confianza del 95%.

PFV, punto final de volteo.

TE 50, tiempo efectivo para el 50% de la población.

TF, trifenilfosfato.

TR 50, tiempo de recuperación para el 50% de la población.

TRV, tasa de recuperación del volteo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SÍNTOMAS DE INTOXICACIÓN

3.1.1. Resultados

3.1.1.1. Fases de intoxicación

Se determinaron los síntomas de intoxicación producidos por la aplicación tópica de distintas dosis de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas III. Se evaluaron para ambos piretroides el efecto sobre la actividad locomotora y los TE 50 de distintos síntomas.

La **Tabla 3.1.** resume las fases de intoxicación, la variación de la actividad locomotora y los síntomas en las patas de las ninfas intoxicadas.

La fase de latencia es el tiempo transcurrido desde que comienza la exposición de las ninfas al insecticida hasta la aparición de los síntomas visibles de intoxicación. En ese lapso, las moléculas insecticidas alcanzan un blanco molecular e interaccionan con él.

El comienzo de la fase de excitación coincidió con la manifestación del primer síntoma visible, que fue el aumento de la actividad locomotora o hiperactividad. La **Figura 3.1.** muestra la variación de la actividad locomotora en función del tiempo posterior al tratamiento. La aplicación tópica de 2 µg/insecto de deltametrina produjo un aumento inmediato de la actividad locomotora. El efecto de igual dosis de *cis*-permetrina fue menos pronunciado. La hiperactividad producida por estos piretroides en ninfas III de *T. infestans*

depende de la dosis, la forma de aplicación y la temperatura, y es afectada por el tratamiento con N-etilmaleimida (un inhibidor de la quimiorrección). Los resultados que fundamentan estas afirmaciones son presentados y discutidos más adelante (**3.3. Efecto sobre la actividad locomotora.**).

Durante la fase de incoordinación la actividad locomotora disminuyó, pero siguió siendo superior a la de los controles. En esta etapa se observaron síntomas de intoxicación en los apéndices de la cabeza y el cuerpo. Los síntomas en las patas fueron un buen marcador del desarrollo del proceso de intoxicación. Los primeros síntomas fueron temblores leves y contracciones momentáneas; por momentos las ninfas se desplazaban hacia atrás o de costado. Al principio estos síntomas fueron intermitentes, y entre una y otra manifestación las patas tenían un comportamiento normal. La frecuencia en la aparición de los síntomas aumentó en función del tiempo y de la dosis de insecticida. Otros síntomas esporádicos fueron el estiramiento de la proboscis y las antenas rígidas apuntando hacia adelante. Avanzada la fase de incoordinación se paralizó el tercer par de patas (**Lámina 3.1.b.**) y los síntomas se manifestaron en forma continua. La **Figura 3.2.** muestra los TE 50s para 0,02 y 2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ de deltametrina y *cis*-permetrina. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Los TE 50s de los dos piretroides fueron inversamente proporcionales a las dosis. Cuando la dosis fue 0,02 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ no hubo diferencia significativa entre los TE 50s de los dos insecticidas (SIC, $P > 0,05$); pero cuando fue 2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ el TE 50 de deltametrina fue significativamente menor que el de *cis*-permetrina (NSIC, $P < 0,05$).

La fase de tetanización se caracterizó por violentos movimientos convulsivos en todas las patas. La actividad locomotora fue menor que la de los controles. En general las ninfas sólo podían arrastrarse con dificultad y las patas incoordinadas formaban ángulos anormales con el cuerpo (**Lámina 3.1.c.**). Cerca del final de esta fase dejó de haber actividad locomotora, pero las patas siguieron agitadas por convulsiones violentas.

En la fase de postración las ninfas yacían de costado o sobre la parte dorsal del cuerpo. Los apéndices mostraban temblores y movimientos lentos y

esporádicos (**Lámina 3.1.d.**), cuya frecuencia disminuyó en función del tiempo hasta desaparecer.

La **Figura 3.3.** muestra los TE 50s para el efecto ausencia de movimiento en patas, antenas y proboscis. A las dos dosis aplicadas, la ausencia de movimientos en los apéndices se produjo significativamente más rápido en las ninfas tratadas con *cis*-permetrina (NSIC, $P < 0,05$). Las ninfas tratadas con cualquiera de las dos dosis de deltametrina permanecieron unas tres semanas en las fases de incoordinación o tetanización. La fase de postración duró unas pocas horas y entonces se produjo la ausencia total de movimientos. Las ninfas tratadas con *cis*-permetrina alcanzaron la fase de postración dentro de las 24 horas después de la aplicación, y permanecieron en ella alrededor de una semana antes que los movimientos desaparecieran. Dentro de un mismo insecticida no hubo diferencia significativa entre los tiempos efectivos de las dos dosis (SIC, $P > 0,05$).

Un efecto observado sólo en las ninfas tratadas con *cis*-permetrina fue el inflamamiento del abdomen, que ocurrió dentro de las 24 horas posteriores a la aplicación (**Lámina 3.1.e.**). Las dos dosis de *cis*-permetrina aplicadas produjeron este efecto (**Tabla 3.2.**), pero no hubo diferencia significativa entre los porcentajes promedios de ninfas con el abdomen inflado para cada dosis (Prueba t de Student; $t = 0,7$; g. l. = 6; $P > 0,05$). Las ninfas con el abdomen inflado continuaron vivas varios días.

La muerte de las ninfas intoxicadas sólo fue evidente algún tiempo después de ocurrida, cuando la deshidratación momificó a los insectos, la cutícula se oscureció, y las patas y antenas se volvieron quebradizas al tocarlas suavemente con una pinza de metal. Algunas ninfas adquirieron un color rojizo debido al derramamiento del contenido intestinal en la hemolinfa.

3.1.1.2. Volteo y recuperación

Se determinó la variación de las DE 50s de cada piretroide en función del tiempo y el efecto del butóxido de piperonilo (inhibidor de la actividad de

oxidasas microsomales) sobre dicha variación. Se hizo aplicación tópica y el efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro de 15 cm de diámetro.

En la curva de DE 50 en función del logaritmo del tiempo para la *cis*-permetrina en ausencia de butóxido de piperonilo (**Figura 3.4.b.**), se observaron tres fases: curva descendente (fase 1), curva ascendente (fase 2), y meseta (fase 3). En la curva para deltametrina (**Figura 3.4.a.**) sólo se observaron las dos primeras fases (el día 21 se interrumpió el experimento porque la mortalidad en el grupo control superó el 10%).

En ninguno de los tiempos evaluados se encontró diferencia significativa entre las DE 50s de deltametrina y *cis*-permetrina (NSIC, $P > 0,05$). El Punto Final del Volteo (PFV), es decir el tiempo para la mínima DE 50, fue el mismo para los dos insecticidas: 24 horas. La Tasa de Recuperación del Volteo (TRV) de la deltametrina fue algo mayor que la de la *cis*-permetrina (0,67 y 0,55; respectivamente). La Proporción Efectividad: Volteo (PEV) de la deltametrina fue al menos tres veces mayor que la de la *cis*-permetrina ($\geq 8,1$ y 2,7; respectivamente). Estos resultados significan que ambos insecticidas mostraron un poder de volteo similar, y que las ninfas tratadas con deltametrina se recuperaron con mayor velocidad y en mayor cantidad que las tratadas con *cis*-permetrina.

No se observó recuperación en ninfas expuestas a filmes de butóxido de piperonilo después de la aplicación de los insecticidas. Las curvas de DE 50s en función del logaritmo del tiempo presentaron solamente las fases descendente y meseta (**Figuras 3.4.a. y 3.4.b.**). Los PFVs para cada insecticida no fueron significativamente diferentes de los respectivos valores en ausencia de butóxido de piperonilo (SIC, $P > 0,05$).

Cuando se aplicaron dosis mayores, el porcentaje de ninfas recuperadas dependió de la dosis para los dos piretroides (**Tabla 3.3.**). Cuando la dosis fue 0,02 $\mu\text{g}/\text{insecto}$, no hubo diferencia significativa entre los porcentajes promedio de ninfas recuperadas para deltametrina y *cis*-permetrina (Prueba t de Student, $t = 1$, g. l. = 6, $P > 0,05$). Cuando la dosis fue 2 $\mu\text{g}/\text{insecto}$ no se observó recuperación en ninguno de los dos tratamientos.

3.1.2. Discusión

Las fases y los síntomas generales de intoxicación en ninfas de *T. infestans* tratadas con piretroides son similares a los descritos en la mosca *M. domestica* (Adams and Miller, 1980), la cucaracha *Periplaneta americana* (Gammon et al., 1981; Benoit et al., 1985), y larvas de las mariposas *Pieris brassicae* (Tan, 1982), *Plutella xylostella* (Chen et al., 1985), y *Trichoplusia ni* (Toth and Sparks, 1990). En *P. americana* se estableció una correlación entre síntomas visibles de intoxicación y eventos neurofisiológicos (Gammon, 1978).

El inflamamiento abdominal es el unico síntoma no mencionado en la bibliografía disponible. Este evento puede originarse en la producción endógena de compuestos gaseosos.

En dosis toxicológicamente altas, los síntomas de incoordinación aparecieron con mayor velocidad en las ninfas tratadas con deltametrina (**Figura 3.2.**). Se verá más adelante que esta situación se repitió a otras temperaturas (**Figura 3.13.**), en otro estadio ninfal (**Figura 3.12.**) y en un amplio rango de dosis (**Figura 3.21.**). Inversamente, las ninfas tratadas con *cis*-permetrina alcanzaron más rápido la fase de postración, y los resultados de la **Figura 3.3.** sugieren que también murieron antes que las tratadas con deltametrina. En algunos casos se demostró que la velocidad de acción está relacionada con las propiedades físicas de las sustancias y en particular con la polaridad (Briggs et al., 1976). La interpretación de este fenómeno es que las características de partición en medios no polares y polares gobiernan la tasa de transporte al sitio de acción de los insecticidas. La polaridad óptima para producir incoordinación sería ligeramente mayor que la óptima para producir la muerte. Los piretroides más polares penetrarían más rápido y se equilibrarían a mayores concentraciones en la hemolinfa; los menos polares actuarían más lentamente y se equilibrarían a mayores concentraciones en las membranas celulares. Los resultados presentados aquí coinciden con esta tendencia, ya que deltametrina es más polar que *cis*-permetrina (los coeficientes de partición octanol/ agua son 270.000 y 1.200.000, respectivamente). Otros autores llegaron a la conclusión que las características estructurales son más

importantes que las físico-químicas, y que la presencia del grupo ciano en moléculas como deltametrina es determinante de las diferencias toxicológicas (Clements and May, 1977).

El volteo fue definido como un estado de parálisis rápida y reversible producido por piretrinas y piretroides (Miller and Adams, 1982). Todavía no está claro si el volteo es el comienzo de un proceso toxicológico que termina con la muerte cuando la dosis lo permite, o si los mecanismos de volteo y letalidad son independientes (Naumann, 1990).

Las tres fases en la curva de DE 50 en función del logaritmo del tiempo fueron descritas para los principios activos del piretro (Sawicki, 1962) y varios piretroides (Scott and Georghiu, 1984) en la mosca *M. domestica*. En este insecto el volteo (fase 1) se manifestó en cuestión de minutos, la recuperación (fase 2) en cuestión de horas; el fin de la recuperación (fase 3) fue alcanzado en un día. Los datos presentados aquí indican que la cinética del proceso fue muy diferente en ninfas III de *T. infestans*: el efecto insecticida fue máximo recién 24 horas después de la aplicación, la recuperación se prolongó a lo largo de dos o tres semanas. Cuando cada insecticida fue aplicado simultáneamente con el sinergista butóxido de piperonilo (un inhibidor de la actividad de oxidasas microsomales), no se modificaron los PFVs ni los valores mínimos de las respectivas DE 50s. Sin embargo, la presencia del sinergista impidió la recuperación. Resultados similares obtenidos en *M. domestica* (Sawicki, 1962) fueron atribuidos a la degradación de las moléculas insecticidas en el sitio de acción. Esta hipótesis fue apoyada por evidencia de muy pobre recuperación de la actividad nerviosa normal en experimentos con sistemas nerviosos aislados tratados con piretrinas (Camougis, 1973).

Se cree que la muerte producida por los piretroides, y otros insecticidas que actúan sobre el sistema nervioso, se debe a un descontrol de los mecanismos de homeostasis (Lund, 1985; Naumann, 1990). Hormonas que

controlan los metabolismos de carbohidratos y lípidos, y los balances de agua y sales a través de la excreción, son sintetizadas, almacenadas y liberadas por el sistema nervioso. La evidencia experimental indica que concentraciones muy bajas de piretroides (10^{-7} - 10^{-11} M) bastan para excitar las células neurosecretoras (Naumann, 1990) e inducir la liberación de neurohormonas como la trihalosémica (en la mosca *Calliphora vicina*), la hiperlipémica y la adipocinética (en *Rhodnius prolixus*) (Miller and Adams, 1982; Naumann, 1990). Una disminución en el volumen de la hemolinfa en ninfas de *R. prolixus* tratadas con piretroides fue atribuida a la liberación de hormona diurética (Maddrell and Casida, 1971). Pequeños cambios en las concentraciones de iones de la hemolinfa pueden ser incompatibles con el funcionamiento normal de los tejidos y conducir a la muerte celular.

3.1.3. Figuras, Tablas y Lámina

fase	actividad locomotora (respecto a insectos no tratados)	síntomas en las patas (en orden aproximado de aparición)
latencia	igual	-
excitación	mayor (creciente)	-
incoordinación	mayor (decreciente)	<ol style="list-style-type: none"> 1. temblores leves 2. desplazamiento hacia atrás o de costado 3. contracción de los tres pares por debajo del cuerpo (breve) 4. elevación por encima del cuerpo (breve) 5. parálisis del tercer par
tetanización	menor	<ol style="list-style-type: none"> 6. violentos movimientos convulsivos en los tres pares
postración	ausente	<ol style="list-style-type: none"> 7. parálisis de los tres pares 8. temblores, movimientos lentos y ocasionales 9. ausencia de movimiento
muerte	-	-

Tabla 3.1. Fases y síntomas de la intoxicación con piretroides en ninfas III de *T. infestans*. Se hizo aplicación tópica en la parte ventral del abdomen de deltametrina o *cis*-permetrina (0.02 ó 2 ug/insecto). La naturaleza y el orden de aparición de los síntomas fueron evaluados por observación individual de 10 ninfas por dosis para cada insecticida.

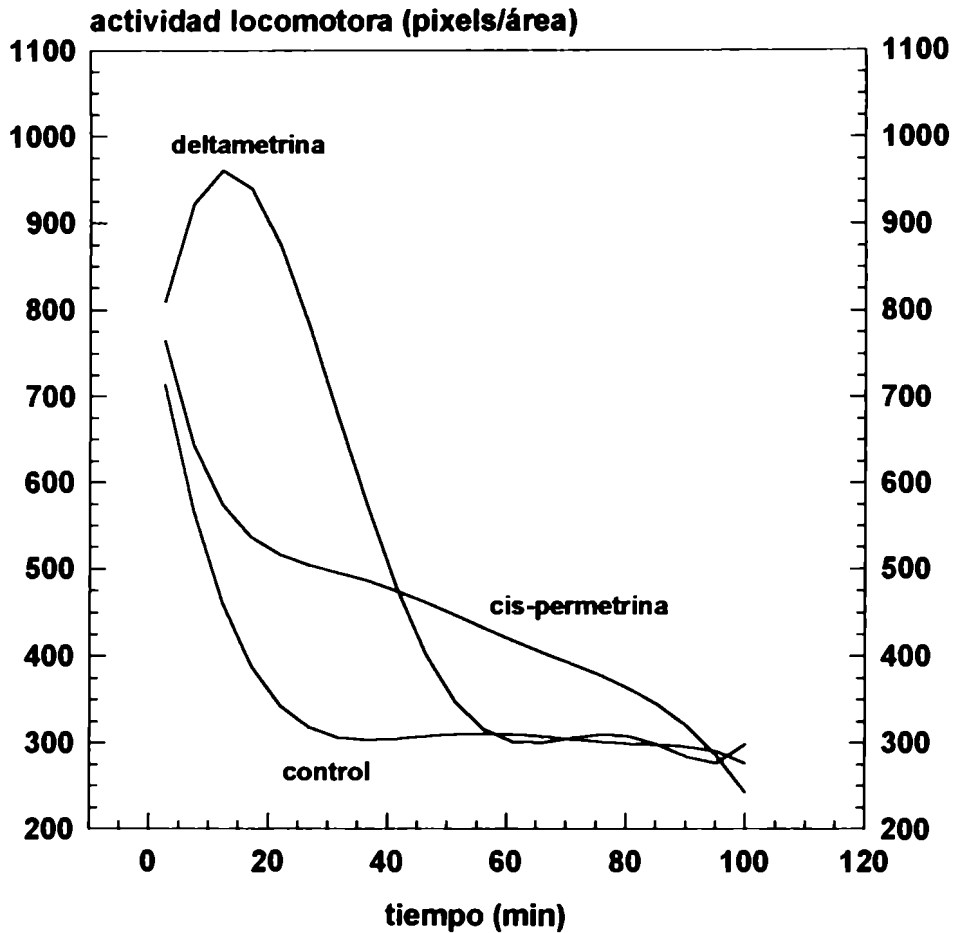


Figura 3.1. Efecto de piretroides sobre la actividad locomotora de ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen (2 ug/insecto). La actividad locomotora se midió durante los 100 minutos posteriores a la aplicación, en 40 sesiones de 2,5 minutos cada una. Actividad locomotora = P/A ; donde P es el número de pixels que cambiaron de estado durante la sesión (de apagado a encendido y viceversa), y A es el promedio de pixels encendidos durante la sesión. Cada curva se obtuvo promediando los datos de 2 réplicas independientes ($n = 5$).

Lámina 3.1. Síntomas de intoxicación con piretroides en ninfas III. Se hizo tópica de distintas dosis de deltametrina o *cis*-permetrina en el lado ventral del abdomen. (a) ninfa no tratada; (b) parálisis del tercer par de patas; (c) incoordinación general; (d) postración (una de las patas del tercer par se agita convulsionada); (e) abdomen inflado (observado sólo en ninfas tratadas con *cis*-permetrina).



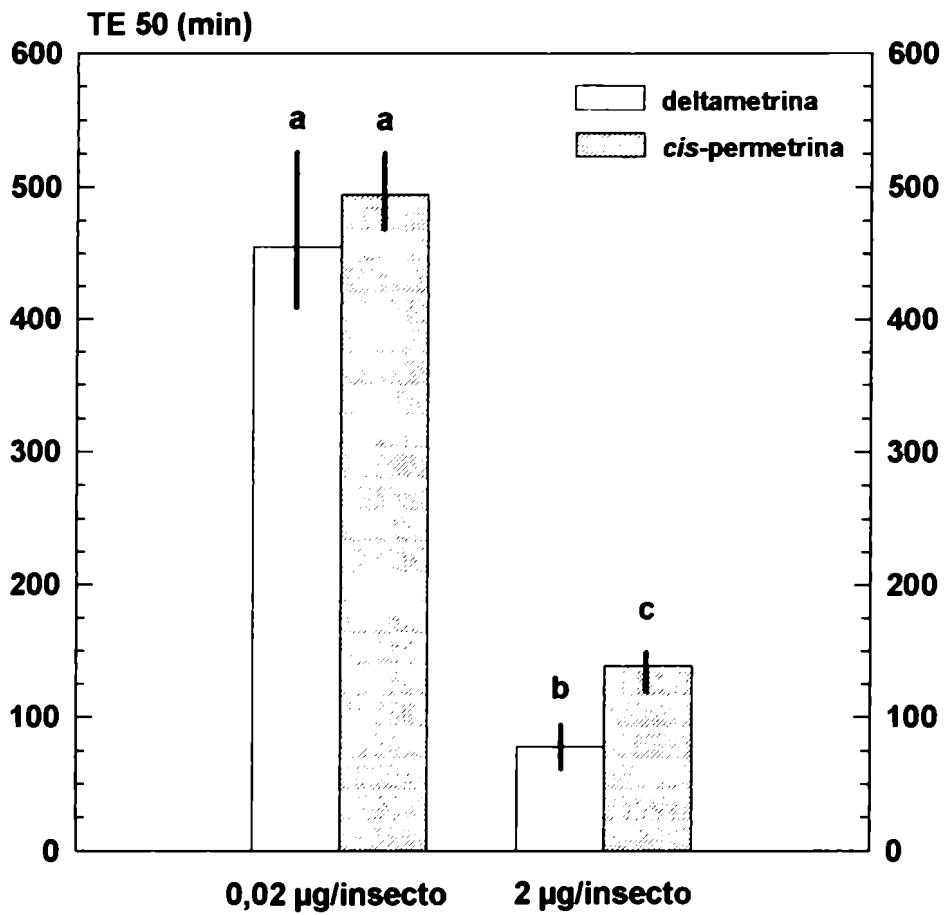


Figura 3.2. TE 50 de piretroides en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0.05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 4 réplicas independientes ($n = 5$).

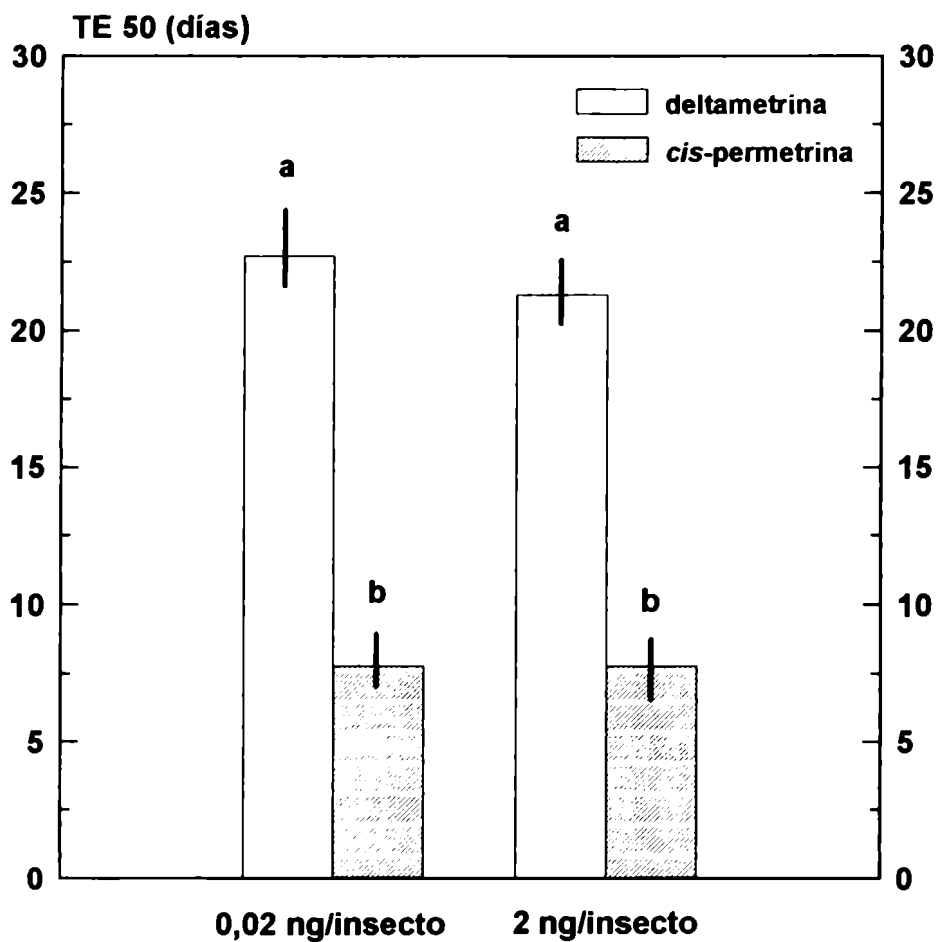


Figura 3.3. TE 50 de piretroides en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue la ausencia de movimientos en patas, antenas y proboscis. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 4 réplicas independientes ($n = 5$).

porcentaje de ninfas con el abdomen inflado (promedio \pm DE)		
dosis (ug/insecto)	deltametrina	<i>cis</i> -permetrina
0,02	0	25,0 \pm 19,1a
2	0	35,0 \pm 19,1a

Tabla 3.2. Porcentaje de ninfas III con el abdomen inflado después del tratamiento con piretroides. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencia significativa (Prueba t de Student, $P > 0.05$). Cada valor es el promedio de 4 réplicas independientes ($n = 5$).

(a)

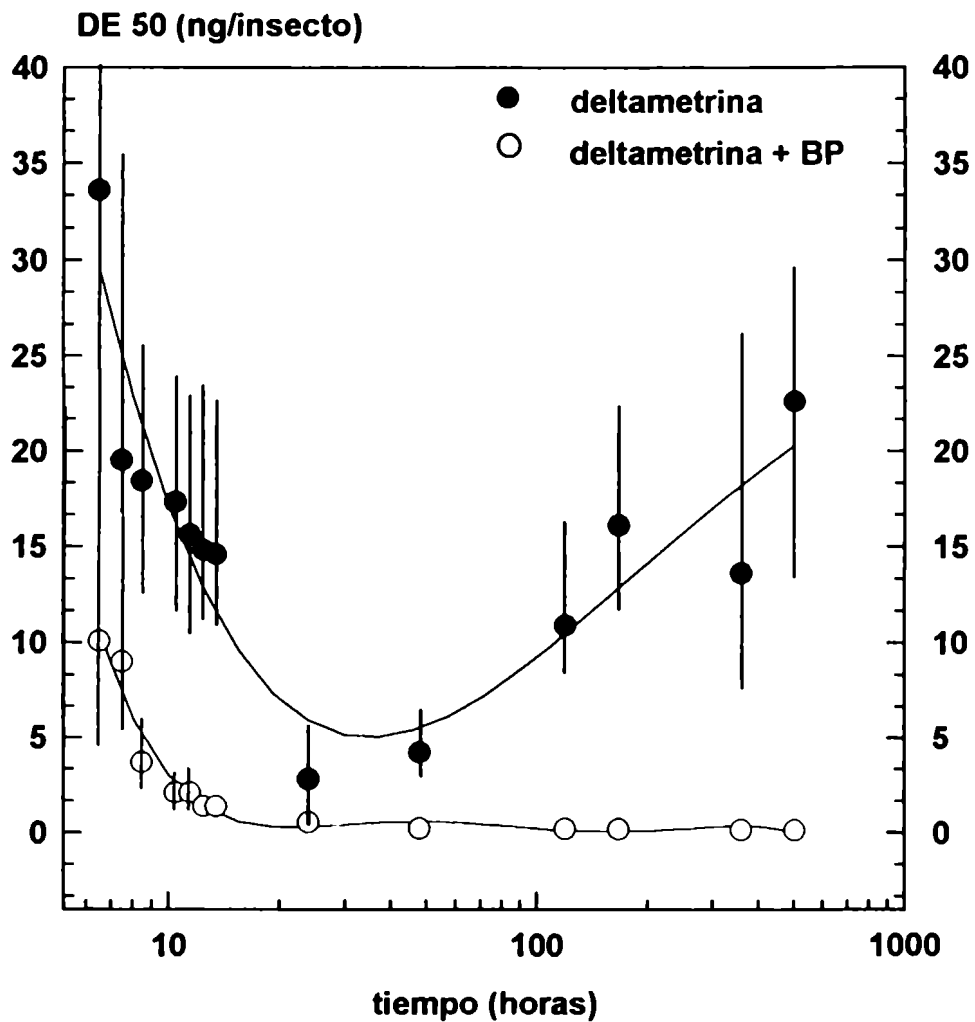


Figura 3.4. Variación de la DE 50 de piretroides en función del tiempo, con y sin butóxido de piperonilo en ninfas III. Se hizo aplicación tópica de (a) deltametrina o (b) *cis*-permetrina, en el lado ventral del abdomen. El butóxido de piperonilo (BP) se aplicó en forma de filme sobre papel de filtro (0,07 mg/cm²). La exposición duró desde la aplicación de los piretroides hasta el fin del experimento. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2 réplicas independientes (N = 30-60).

(b)

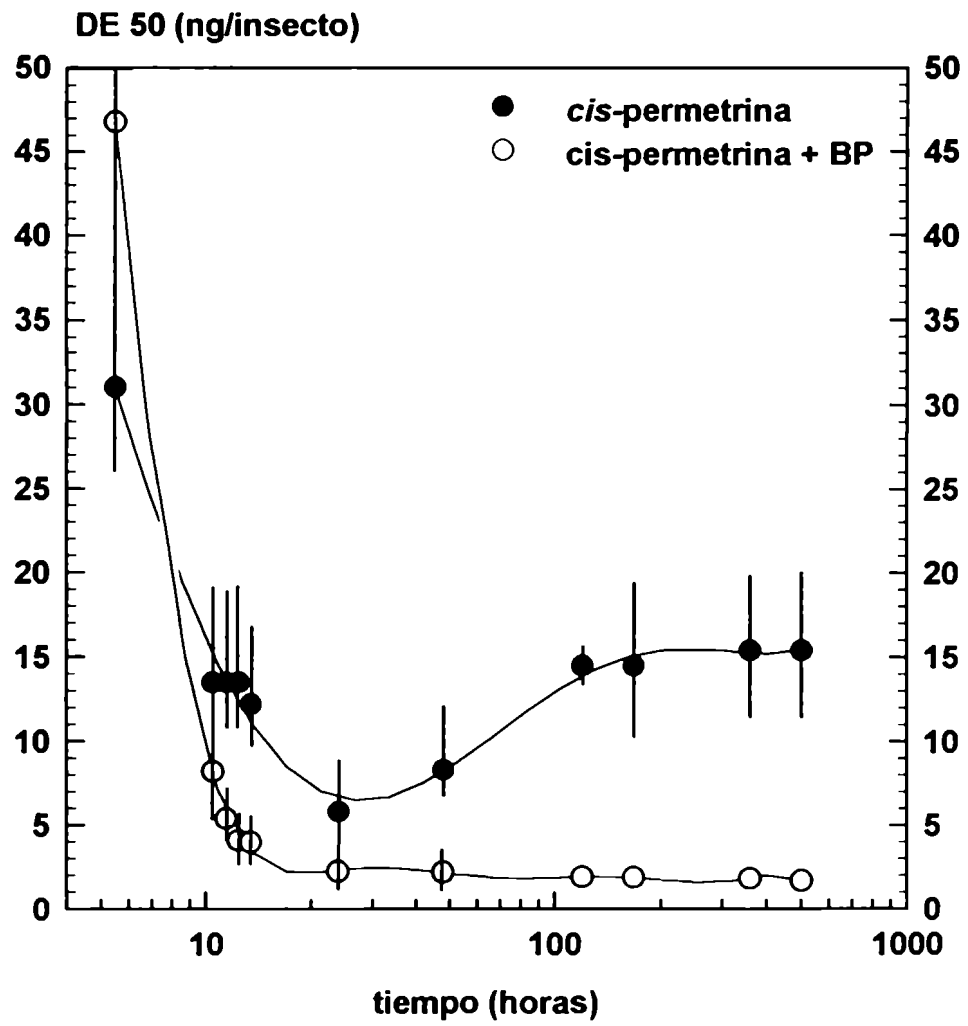


Figura 3.4. Continuación.

porcentaje de ninfas recuperadas del volteo (promedio \pm DE)		
dosis (ug/insecto)	deltametrina	<i>cis</i> -permetrina
0,02	30,0 \pm 11,5a	20,0 \pm 16,4a
2	0	0

Tabla 3.3. Recuperación del volteo en ninfas III tratadas con piretroides. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. Los resultados se evaluaron 21 días después del tratamiento. Los valores seguidos por la misma letra no presentan diferencia significativa (Prueba t de Student, $P > 0,05$). Cada valor es el promedio de 4 réplicas independientes ($n = 5$).

3. 2. ALGUNAS VARIABLES QUE AFECTAN LA TOXICIDAD

3. 2. 1. Temperatura

3.2.1.1. Resultados

3.2.1.1.1. Cianopiretroides

Se evaluaron las CE 50s y los TE 50s a 16 y 28°C de deltametrina, cipermetrina, β -cipermetrina, alfametrina y cipermetrina AC en ninfas III. Las ninfas fueron expuestas a filmes de los insecticidas y el efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro.

La **Figura 3.5.** muestra las CE 50s a 16 y 28°C. A 28°C, la deltametrina presentó la menor CE 50, y la cipermetrina la mayor. A 16°C, no hubo diferencia significativa entre las CE 50s de los cinco cianopiretroides (SIC, $P > 0.05$). Todos los insecticidas fueron significativamente más tóxicos a 16 que a 28°C (NSIC, $P < 0,05$), por lo tanto todos los coeficientes de temperatura fueron negativos. La toxicidad de alfametrina fue la más afectada por el descenso de la temperatura (su coeficiente fue - 7,8), y la de β -cipermetrina la menos afectada (su coeficiente fue - 3,8).

La **Figura 3.6.** muestra los TE 50s a 16 y 28°C de los mismos insecticidas de la figura anterior. A 28°C, la cipermetrina AC presentó el mayor TE 50. Los TE 50s de los demás insecticidas no fueron significativamente distintos unos de otros (SIC, $P > 0.05$). La cipermetrina AC tuvo el mayor TE 50 a 16°C, la alfametrina el menor. La acción de todos los insecticidas fue significativamente más rápida a 28 que a 16°C (NSIC, $P < 0.05$), por lo tanto los coeficientes de temperatura tuvieron signos positivos. El efecto de la disminución de la temperatura sobre los TE 50s fue menos importante que sobre los CE 50. Los coeficientes de temperatura variaron entre 1,4 para la alfametrina y la cipermetrina AC, y 2,1 para la cipermetrina.

Para determinar si el efecto de la temperatura sobre la toxicidad de los cianopiretroides era reversible, se hicieron tres tipos de experimentos. En los tres las ninfas fueron tratadas durante 24 horas con una concentración

subtóxica de deltametrina o β -cipermetrina sobre papel de filtro (14 ng/cm²). La temperatura fue 28°C. Después de interrumpir la exposición, las ninfas fueron mantenidas otras 24 horas a la misma temperatura, entonces se realizó lo que se describe a continuación.

En el primer experimento (**Figura 3.7.**), ninfas intoxicadas que no mostraban síntomas visibles fueron transferidas de 28 a 16°C. Al cambiar la temperatura aparecieron los síntomas de intoxicación. Se evaluó la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Cuando el cambio de temperatura se hizo 1 día después de interrumpir la exposición a los insecticidas, los síntomas de intoxicación aparecieron en pocos minutos y no hubo diferencia significativa entre los TE 50s de la deltametrina y la β -cipermetrina (SIC, $P > 0.05$). Cuando el cambio de temperatura se hizo 6 días después de interrumpir la exposición, los síntomas aparecieron en pocas horas y se manifestaron significativamente más rápido en los insectos tratados con deltametrina (NSIC, $P < 0.05$).

En el segundo experimento (**Figura 3.8.**), ninfas intoxicadas que no mostraban síntomas visibles fueron transferidas de 28 a 16°C. Dos y media o 24 horas después las ninfas fueron llevadas de nuevo a 28°C (en ambos casos, el 100% de las ninfas estaban afectadas al realizar el segundo cambio de temperatura). Los TR 50 de insectos que estuvieron 2,5 o 24 horas a 16°C no mostraron diferencia significativa (SIC, $P > 0.05$). En los dos casos, las ninfas tratadas con deltametrina se recuperaron en forma significativamente más lenta (NSIC, $P < 0.05$).

En el tercer experimento (**Figura 3.9.**), ninfas intoxicadas que no mostraban síntomas visibles fueron transferidas diariamente de 28 a 16°C durante 2 horas y entonces regresadas a 28°C. El porcentaje promedio de ninfas afectadas al cabo de esas 2 horas disminuyó en forma lineal en función del logaritmo del tiempo (deltametrina, $y = 95,5 - 113,5 x$, $r^2 = 0,97$; β -cipermetrina, $y = 54,9 - 83,8 x$, $r^2 = 0,97$).

3.2.1.1.2. *Cis*-permetrina versus deltametrina

Se evaluaron las DE 50s y los TE 50s a 16, 26 y 36°C de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas I y III. Se hizo aplicación tópica y el efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora.

La **Figura 3.10.** muestra las DE 50s a 16, 26 y 36°C de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas I. La toxicidad de la deltametrina fue significativamente mayor a 16°C que a las otras temperaturas (NSIC, $P < 0.05$). Las DE 50s de este insecticida a 26 y 36°C no fueron significativamente diferentes (SIC, $P > 0.05$). Los coeficientes de temperatura de la deltametrina fueron negativos en los intervalos 16-26 y 16-36°C; en el intervalo 26-36°C el coeficiente fue neutro (= 1).

La toxicidad de la *cis*-permetrina fue significativamente mayor a 16°C que a las otras temperaturas (NSIC, $P < 0,05$), la menor toxicidad fue a 36°C. Las DE 50s disminuyeron en forma significativa al disminuir la temperatura, por lo tanto el signo de los tres coeficientes de temperatura fue negativo.

A 26°C la toxicidad de los dos insecticidas no fue significativamente diferente (SIC, $P > 0.05$). A 16 y a 36°C la deltametrina fue significativamente más tóxica que la *cis*-permetrina (NSIC, $P < 0.05$).

La **Figura 3.11.** muestra las DE 50s a 16, 26 y 36 °C de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas III. Las DE 50s de la deltametrina a 16 y 36°C no fueron significativamente distintas (SIC, $P > 0.05$), pero la DE 50 a 26°C fue significativamente mayor que las otras dos (NSIC, $P < 0.05$). Como consecuencia, los coeficientes de temperatura fueron negativos en el rango 16-26°C y positivo en el rango 26-36°C. La DE 50 de la *cis*-permetrina no varió en el intervalo 16-26°C, pero aumentó en forma significativa en el intervalo 26-36°C (NSIC, $P < 0.05$), y los coeficientes correspondientes a ese rango y a 16-36°C tuvieron signos negativos.

Las **Figuras 3.12.** y **3.13.** muestran los TE 50s a 16, 26 y 36°C de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas I y III, respectivamente. Los TE 50s de la deltametrina en ninfas I disminuyeron en forma significativa al aumentar la temperatura (NSIC, $P < 0.05$). Los coeficientes de temperatura tuvieron entonces signo positivo. En ninfas III, los TE 50s a 16 y 36°C de deltametrina

no presentaron diferencia significativa (SIC, $P > 0.05$), pero sí fue significativamente mayor que ambos el TE 50 a 26°C (NSIC, $P < 0.05$). Los TE 50s de la *cis*-permetrina no variaron significativamente al variar la temperatura en ninguno de los dos estadios ninfales (SIC, $P > 0.05$), y los coeficientes de temperatura fueron neutros.

3.2.1.2. Discusión

Clásicamente se considera que los piretroides presentan un coeficiente negativo de temperatura. Esto significa que la toxicidad es mayor cuando la temperatura disminuye (Ruigt, 1985). Pero una cantidad de contraejemplos prueban que la temperatura puede afectar de otras maneras la toxicidad de estos insecticidas.

Diversos piretroides presentaron coeficientes negativos de temperatura en las moscas *M. domestica* (Ahn et al., 1987) y *Haematobia irritans* (Schmidt and Robertson, 1986); larvas de las mariposas *T. ni* (Sparks et al., 1982; Toth and Sparks, 1988; Toth and Sparks, 1990), *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens* (Sparks et al., 1982), y *Anthonomus grandis grandis* (Sparks et al., 1983); larvas de los escarabajos *Leptinotarsa decemlineata* (Grafius, 1986), y *Tribolium castaneum* (Watters et al., 1983); y la cucaracha *Blattella germanica* (Wadleigh et al., 1991).

Se obtuvieron coeficientes positivos de temperatura en la mosca *H. irritans* (Schmidt and Robertson, 1986); larvas de las mariposas *Achaea janata*, *Mythimna separata* y *Bombyx mori* (Yadwad and Kallapur, 1988), *S. frugiperda*, *Heliothis virescens* (Sparks et al., 1982), *Pectinophora gossypiella* (Schouest and Miller, 1988), y *T. ni* (Toth and Sparks, 1988); y larvas de los escarabajos *L. decemlineata* (Grafius, 1986), *Sitophilus oryzae* (Thaung and Collins, 1986), y *T. castaneum* (Watters et al., 1983).

Y coeficientes neutros (= 1) en la mosca *H. irritans* (Schmidt and Robertson, 1986); larvas de las mariposas *T. ni* (Toth and Sparks, 1988; Toth and Sparks, 1990), *S. frugiperda*, y *H. virescens* (Sparks et al., 1982); y larvas del escarabajo *L. decemlineata* (Grafius, 1986).

El signo y el valor absoluto de los coeficientes de temperatura de los piretroides dependen de la especie, el insecticida, el modo de aplicación y el rango de temperatura.

Los coeficientes de los isómeros *cis* y *trans* de la permetrina presentaron distintos signos y valores absolutos según se hiciera aplicación tópica o incorporación en la dieta de *T. ni* (Toth and Sparks, 1988). Lo mismo ocurrió con los coeficientes de la permetrina cuando se compararon los resultados de aplicación tópica y exposición a filmes en *H. irritans* (Schmidt and Robertson, 1986).

En *T. castaneum*, los coeficientes de la cipermetrina y el fenvalerato fueron negativos para el rango 20-30°C, y positivos para el rango 10-20°C (Watters et al., 1983). Los coeficientes de varios piretroides tuvieron distintos signos según fueran evaluados en los rangos 14-23, 23-30, ó 30-35°C en *L. decemlineata* (Grafius, 1986).

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de aparición de síntomas ha sido menos estudiado. Se encontraron coeficientes positivos de temperatura (mayor velocidad de acción a mayor temperatura) en larvas de las mariposas *A. janata*, *M. separata* y *B. mory* (Yadwad and Kallapur, 1988) y *T. ni* (Toth and Sparks, 1990)

Los datos presentados en esta Tesis confirman el comportamiento impredecible de los piretroides en función de la temperatura. En *T. infestans*, el signo y la magnitud de los coeficientes de temperatura de los piretroides estudiados varió con el rango de temperatura, el estadio ninfal y el insecticida.

Todos los procesos fisiológicos, y por extensión los toxicológicos, son influenciados por la temperatura. Se puede esperar entonces que cualquier paso de la toxicocinética y la toxicodinámica de los insecticidas esté involucrado en el efecto de la temperatura sobre la toxicidad.

En *P. americana*, a igualdad de dosis, la penetración del DDT a través de la cutícula ocurrió en mayor proporción a mayores temperaturas (Busvine, 1971). Pero la toxicidad del DDT en este insecto fue mayor a baja temperatura.

En *M. domestica*, la toxicidad y la penetración también fueron afectadas en forma inversa por la temperatura (Ahn et al., 1987). Al menos en estos casos, la penetración no pareció ser un factor crítico para el resultado final.

La velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas se incrementa, en general, al aumentar la temperatura (Lehninger, 1981). Se podría esperar entonces una correlación directa entre la actividad de enzimas activantes y coeficientes positivos, y la de enzimas desactivantes y coeficientes negativos de temperatura. En la abeja *Apis mellifera*, el efecto negativo de la temperatura sobre la toxicidad de carbamatos desapareció al inhibir la actividad de enzimas detoxicantes (Busvine, 1971). Exactamente lo contrario se observó en *M. domestica*: la inhibición de enzimas detoxicantes hizo que el coeficiente positivo se volviera neutro y en algunos casos ligeramente negativo (Fahmy and Gordon, 1965).

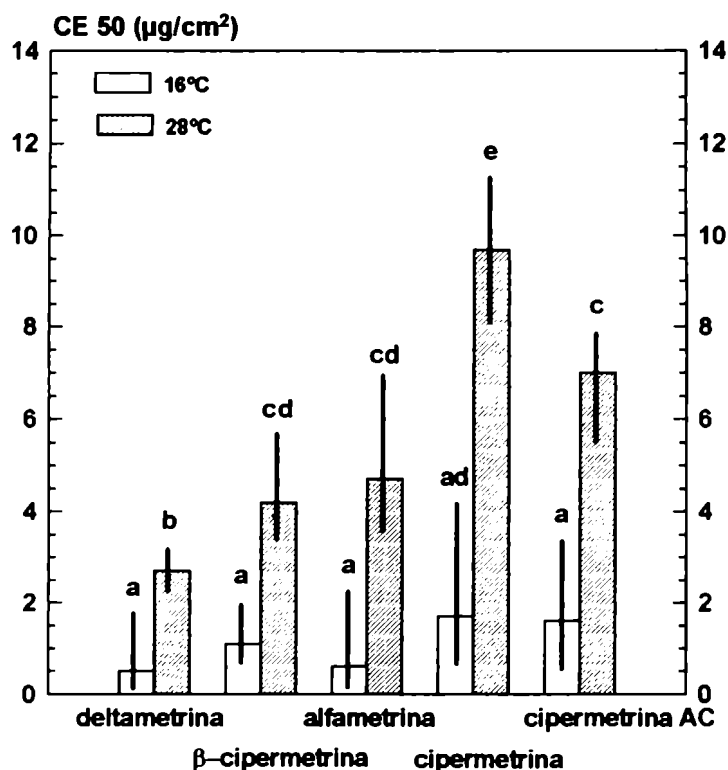
El efecto neurotóxico de los piretroides también muestra una fuerte dependencia de la temperatura. En *P. americana*, el tratamiento con aletrina produjo en los nervios cercales descargas espontáneas más prolongadas pero de menor frecuencia a 15 que a 32°C (Gammon, 1978). En *M. domestica*, la deltametrina fue más efectiva en bloquear la actividad neuromuscular y en generar descargas repetitivas a baja temperatura (Salgado et al., 1983); y la neuroactividad de la permetrina disminuyó al pasar de 15 a 30°C, y aumentó de nuevo a 35°C (Ahn et al. 1987). En axones gigantes y cordones nerviosos de *P. americana* tratados con distintos piretroides se observó actividad repetitiva por encima de 26°C, pero no por debajo; un decaimiento más lento de la depolarización a 15 que a 23°C; actividad repetitiva después de un estímulo a 32 pero no a 15°C (Miller and Adams, 1982; Ruigt, 1985).

Los resultados de los experimentos de cambio de temperatura (**Figuras 3.7. a 3.9.**) demuestran que el efecto de la temperatura sobre la toxicidad de deltametrina y β -cipermetrina en ninfas III de *T. infestans* revierte en tiempos relativamente cortos. Esto sugiere que los cambios de temperatura están alterando la interacción de las moléculas insecticidas con algún tipo de blanco molecular. Si la disminución de la toxicidad al cambiar la temperatura tuviera un origen metabólico, el fenómeno no sería reversible.

Sí puede tener una explicación metabólica la disminución del efecto de la temperatura a través del tiempo (**Figura 3.9.**). En la primera parte de esta Tesis se demostró que la toxicidad de deltametrina disminuye en función del tiempo, y que esa disminución se anula cuando se inhibe la actividad de oxidasas microsomales.

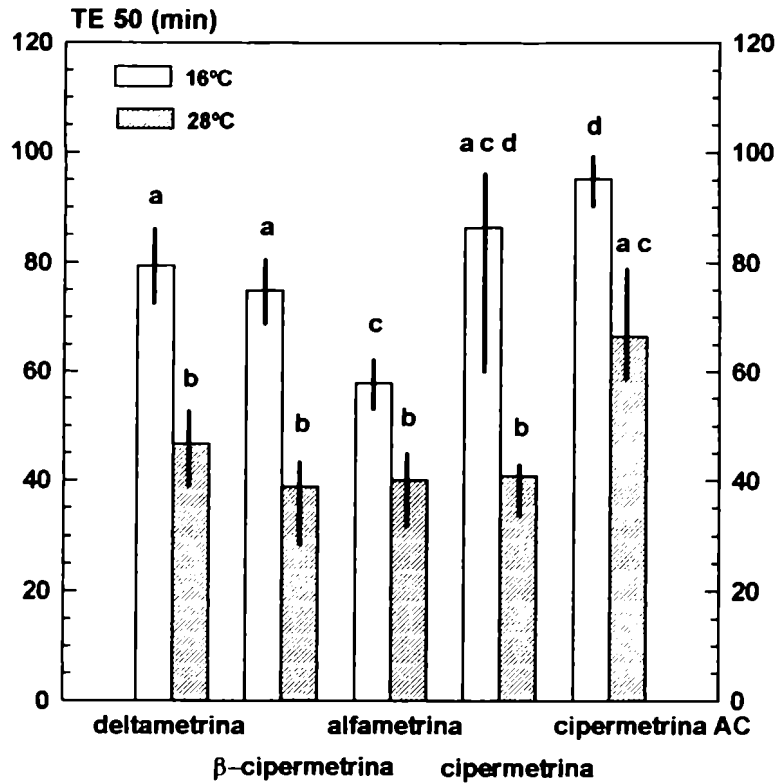
De todas maneras, no hay razones para pensar que uno sólo de los pasos toxicológicos mencionados en los párrafos anteriores sea el único responsable del efecto de la temperatura sobre la toxicidad de los piretroides. Un paso puede predominar en determinadas circunstancias, otro en otras. Y probablemente la respuesta final es el resultado de complejas interacciones.

3.2.1.3. Figuras



insecticida	coeficiente de temperatura (16-28°C)
deltametrina	- 5,4*
β-cipermetrina	- 3,8*
alfametrina	- 7,8*
cipermetrina	- 5,7*
cipermetrina AC	- 4,4*

Figura 3.5. CE 50 (24 hs) de cianopiretroides a dos temperaturas en ninfas III. Los insectos fueron expuestos a filmes sobre papel de filtro de los insecticidas. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un papel de filtro. Coeficiente de temperatura = CE 50 mayor / CE 50 menor. El signo negativo significa que CE 50 (28°C) > CE 50 (16°C). Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con un asterisco son significativamente distintos de 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes (N = 72 - 187).



insecticida	coeficiente de temperatura (16-28°C)
deltametrina	1,7*
β-cipermetrina	1,9*
alfametrina	1,4*
cipermetrina	2,1*
cipermetrina AC	1,4*

Figura 3.6. TE 50 de cianopiretroides a dos temperaturas en ninfas III. Los insectos fueron expuestos a filmes sobre papel de filtro de los insecticidas (55,5 ug/cm²). El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un papel de filtro. Coeficiente de temperatura = TE 50 mayor / TE 50 menor. Los valores positivos significan que TE 50 (28°C) < TE 50 (16°C). Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con un asterisco son significativamente distintos de 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes ($n = 10$).

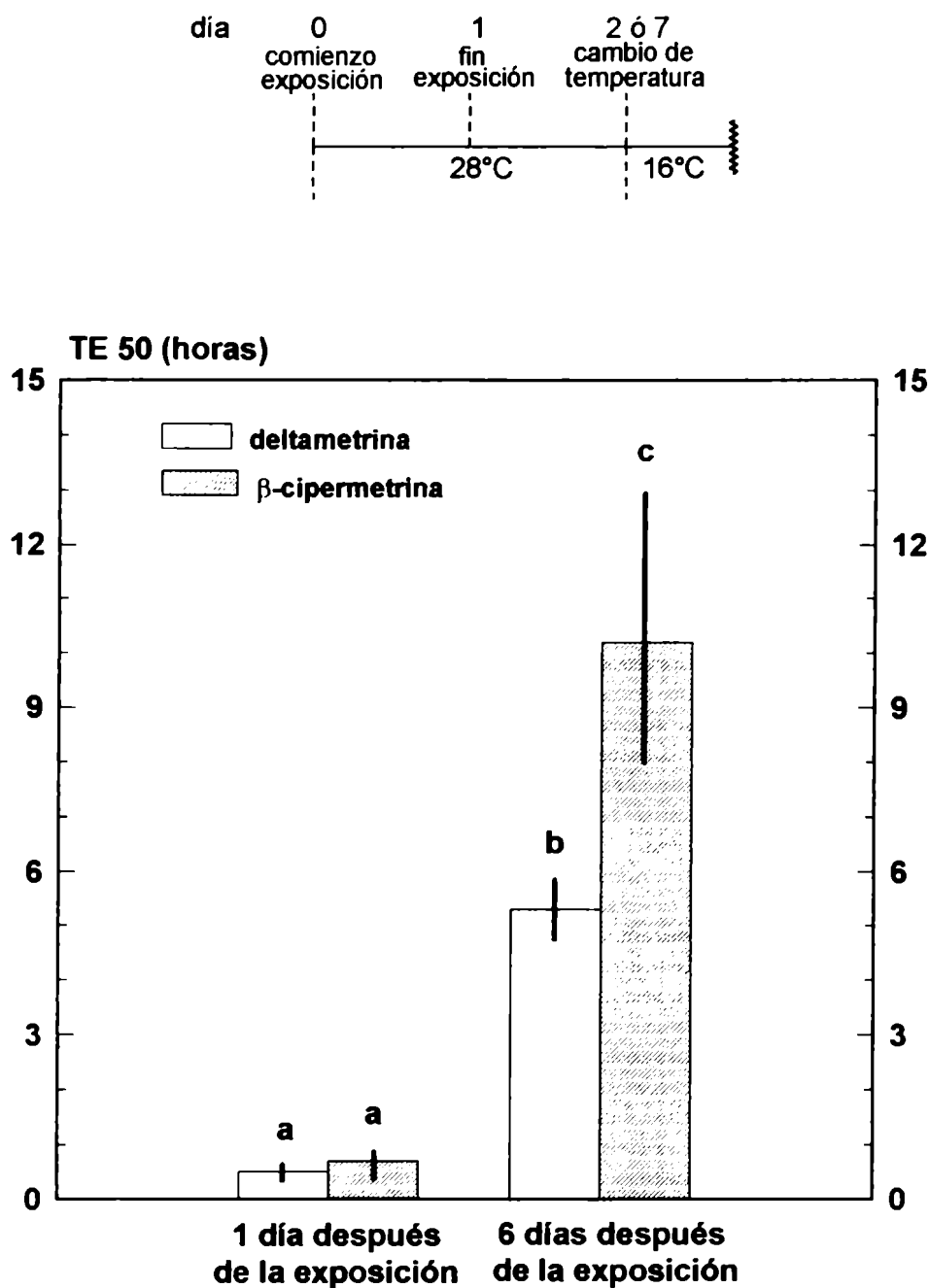


Figura 3.7. TE 50 al disminuir la temperatura ambiental en ninfas III tratadas con piretroides. Los insectos fueron expuestos a filmes sobre papel de filtro de los insecticidas (14 ng/cm^2). El esquema encima del gráfico representa el diseño experimental. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2 réplicas independientes ($n = 20$).

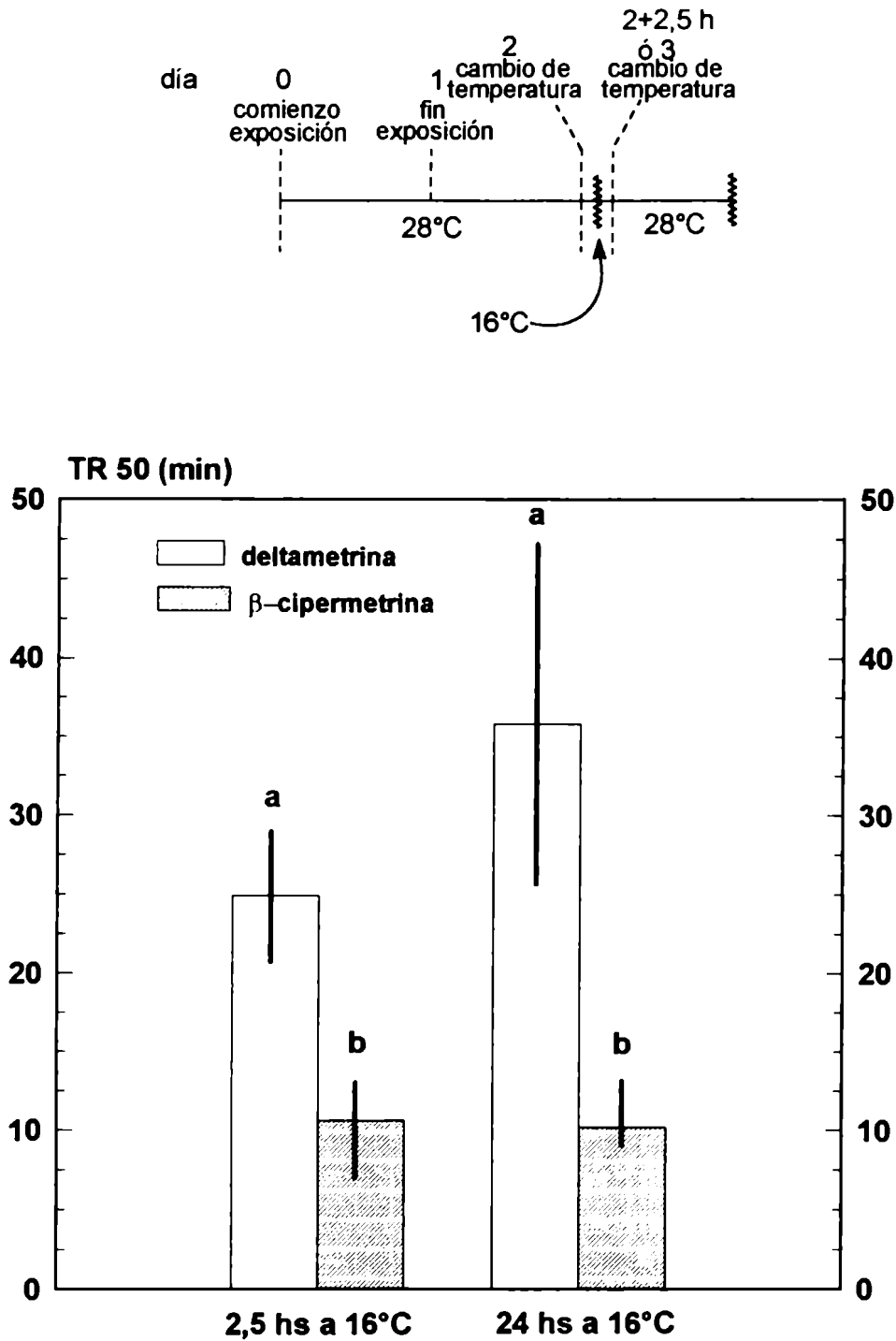


Figura 3.8. TR 50 al aumentar la temperatura ambiental de ninfas III afectadas por piretroides. Los insectos fueron expuestos a filmes sobre papel de filtro de los insecticidas (14 ng/cm^2). El esquema encima del gráfico representa el diseño experimental. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se obtuvo con los datos obtenidos en 2 réplicas independientes ($n = 20$).

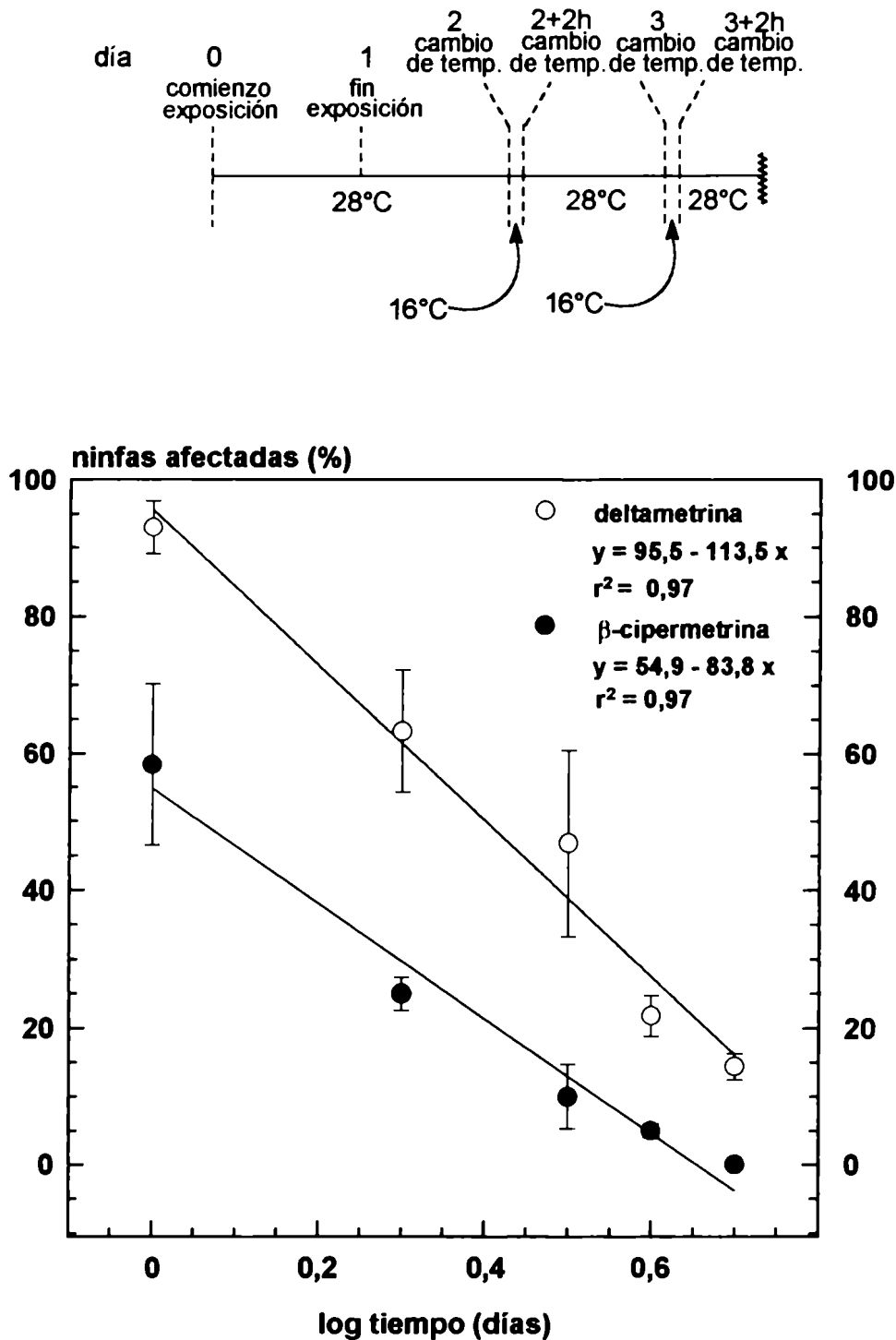
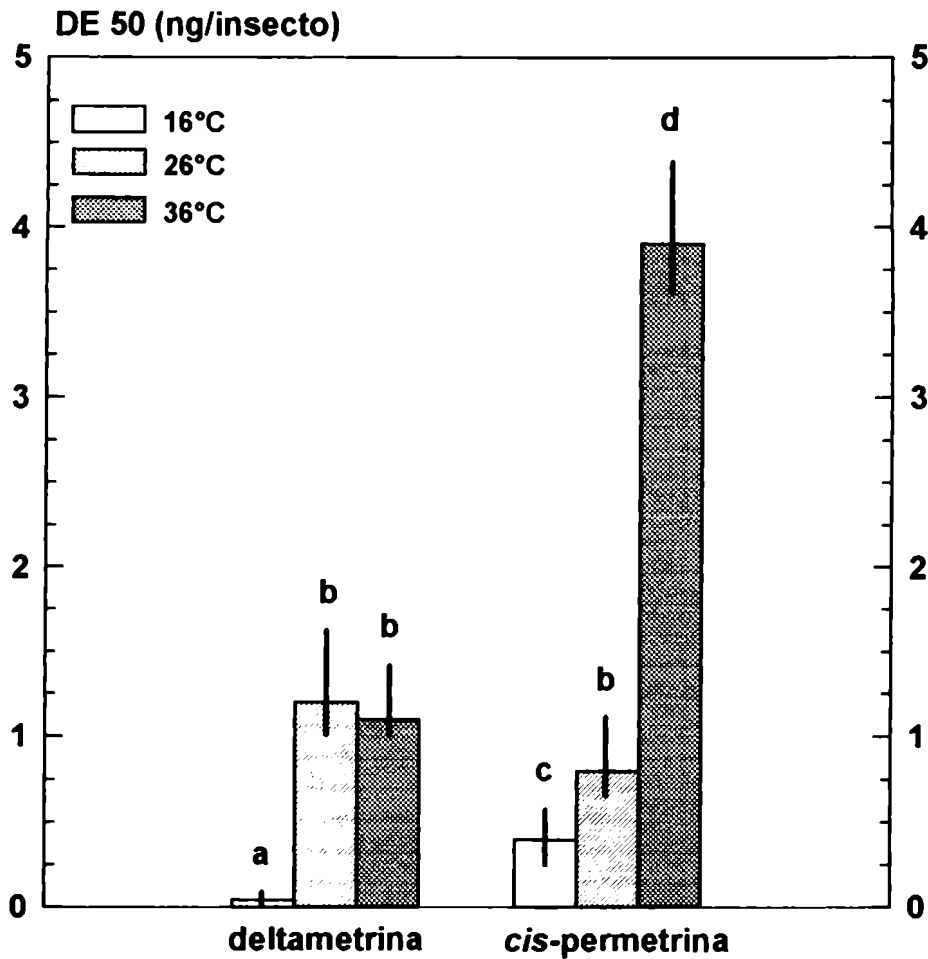
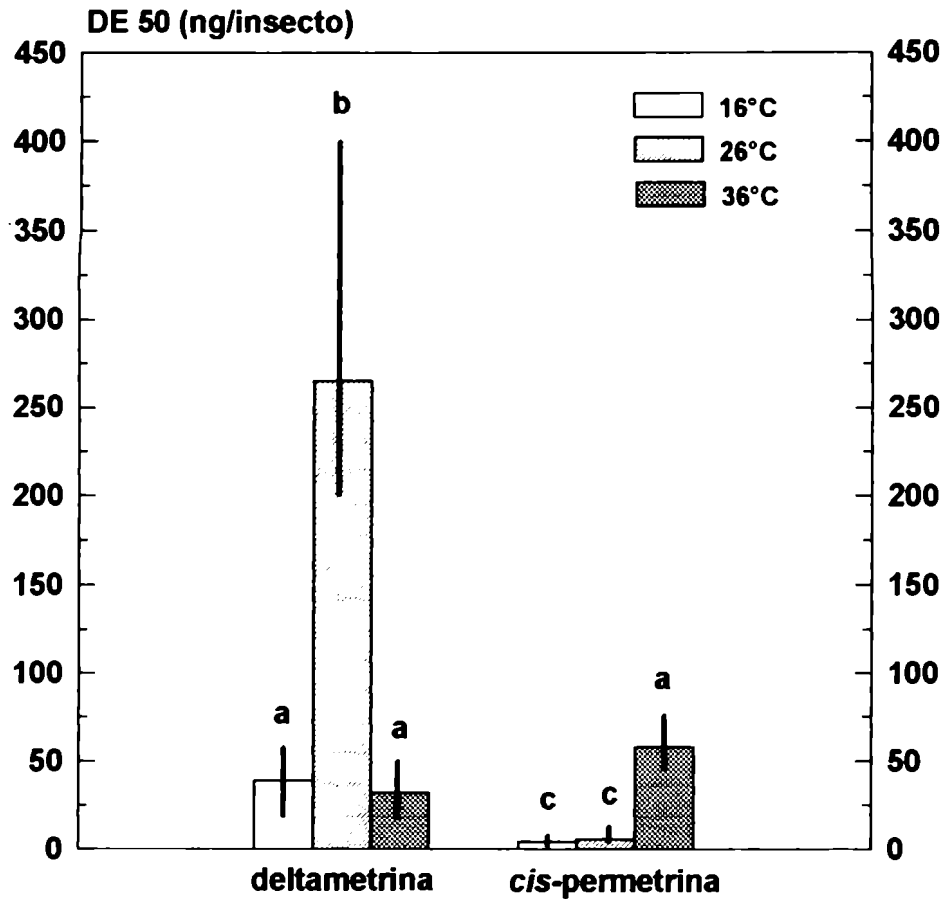


Figura 3.9. Variación del efecto de la disminución de la temperatura en función del tiempo en ninfas III tratadas con piretroides. Los insectos fueron expuestos a filmes secos sobre papel de filtro de los insecticidas (14 ng/cm^2). El esquema encima del gráfico representa el diseño experimental. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un papel de filtro de 15 cm de diámetro. Las líneas verticales representan la desviación estándar. Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2 réplicas independientes ($n = 20$).



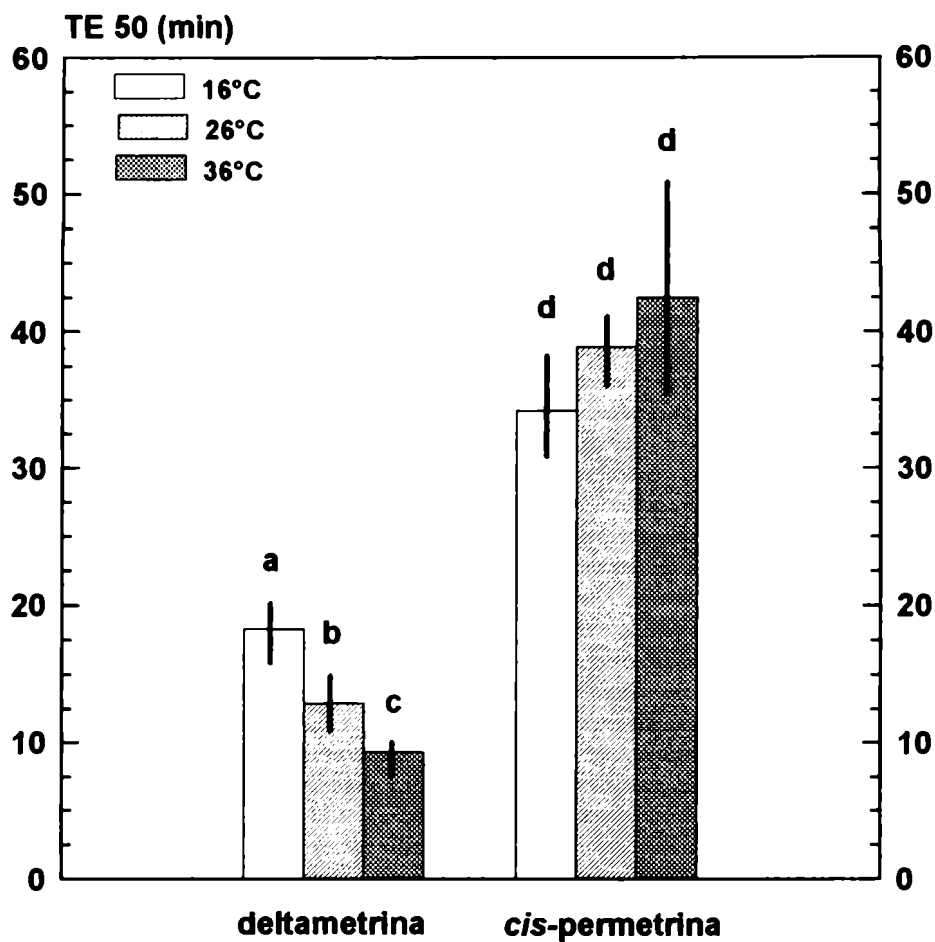
insecticida	coeficiente de temperatura		
	16-26°C	26-36°C	16-36°C
deltametrina	- 30,0*	1,1	- 27,5*
cis-permetrina	- 2,0*	- 4,9*	- 9,8*

Figura 3.10. DE 50 (24 hs) de piretroides a tres temperaturas en ninfas I. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Coeficiente de temperatura = DE 50 mayor/ DE 50 menor. Los valores positivos significan que DE 50 a la temperatura mayor < DE 50 a la temperatura menor, los negativos lo contrario. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con asteriscos son significativamente diferentes que 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes (N = 60 - 210).



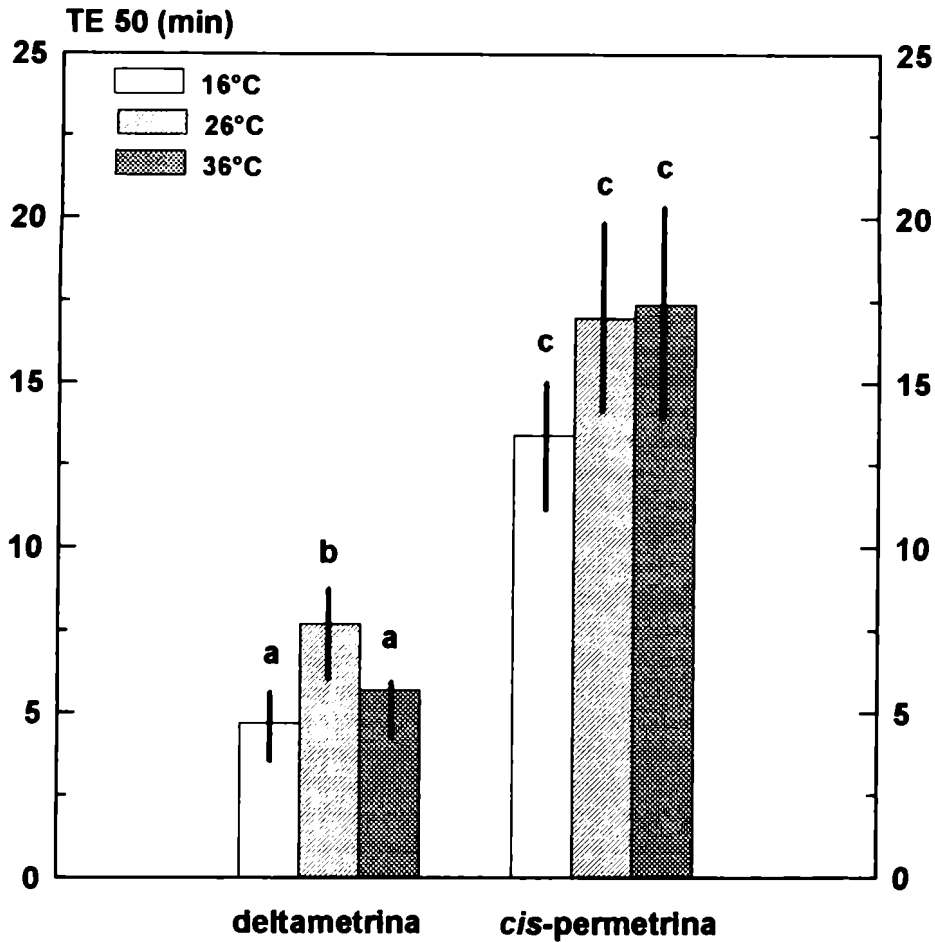
insecticida	coeficiente de temperatura		
	16-26°C	26-36°C	16-36°C
deltametrina	- 6,8*	8,2*	1,2
cis-permetrina	- 1,3	- 10,0*	- 13,1*

Figura 3.11. DE 50 (24 hs) de piretroides a tres temperaturas en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Coeficiente de temperatura = DE 50 mayor / DE 50 menor. Los valores positivos significan que DE 50 a la temperatura mayor < DE 50 a la temperatura menor, los negativos lo contrario. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con asteriscos son significativamente diferentes que 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes (N = 80 - 132).



insecticida	coeficiente de temperatura		
	16-26°C	26-36°C	16-36°C
deltametrina	1,4*	1,4*	2,0*
cis-permetrina	- 1,1	- 1,1	- 1,2

Figura 3.12. TE 50 de piretroides a tres temperaturas en ninfas I. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen ($0,1 \mu\text{g}/\text{insecto}$). El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Coeficiente de temperatura = TE 50 mayor / TE 50 menor. Los valores positivos significan que TE 50 a la temperatura mayor < TE 50 a la temperatura menor, los negativos lo contrario. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con asteriscos son significativamente diferentes que 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes ($n = 10$).



insecticida	coeficiente de temperatura		
	16-26°C	26-36°C	16-36°C
deltametrina	-1,6*	0,7*	-1,2
cis-permetrina	-1,3	-1,0	-1,3

Figura 3.13. TE 50 de piretroides a tres temperaturas en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen (20 µg/insecto). El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Coeficiente de temperatura = TE 50 mayor / TE 50 menor. Los valores positivos significan que TE 50 a la temperatura mayor < TE 50 a la temperatura menor, los negativos lo contrario. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con un asterisco son significativamente diferentes que 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes ($n = 10$).

3. 2. 2. Composición de isómeros

3.2.2.1. Resultados

Se evaluó la toxicidad separada y conjunta de los isómeros *cis* y *trans* de permetrina en ninfas I y III. Se realizó aplicación tópica abdominal y el efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora.

En ninfas I el isómero *cis* puro fue 2,9 veces más tóxico que el *trans* puro (**Figura 3.14.**). La diferencia entre los respectivos valores de DE 50 fue significativa (NSIC, $P < 0,05$). Se determinaron los Coeficientes de Interacción (Ci) para 4 mezclas de isómeros, y ninguno fue significativamente distinto que 1,0 (Prueba t para una muestra, d.f.= 2, $P > 0,05$). Este resultado indica que la mezcla se comportó en forma aditiva (ausencia de interacción).

En ninfas III el isómero *cis* puro fue 24,8 veces más tóxico que el isómero *trans* puro (**Figura 3.15.**). La diferencia entre los valores de DE 50 fue significativa (NSIC, $P < 0,05$). Se obtuvieron las DE 50s para 4 mezclas de isómeros y se calcularon los respectivos Ci. Los Ci de todas las mezclas fueron significativamente mayores que 1,0 (Prueba t para una muestra, g. l. = 2, $P < 0,05$). Esto significa que los isómeros actuaron en forma antagónica.

La **Figura 3.16.** muestra los valores de DE 50 de *cis*- y *trans*-permetrina a 16 y 36°C en ninfas I. A 16°C el isómero *cis* fue 1,3 veces más tóxico que el *trans*, pero no hubo diferencia significativa entre las DE 50s (SIC, $P > 0,05$). A 36°C el isómero *cis* fue 1,8 veces más tóxico que el *trans*, y las DE 50s fueron significativamente distintas (NSIC, $P < 0,05$). La DE 50 de *trans*-permetrina disminuyó significativamente al disminuir la temperatura (NSIC, $P < 0,05$), y los coeficientes de temperatura tuvieron signo negativo.

La **Figura 3.17.** muestra los valores de DE 50 de *cis*- y *trans*-permetrina a 16 y 36°C en ninfas III. A 16°C el isómero *cis* fue 33,3 veces más tóxico, y las DE 50s fueron significativamente diferentes (NSIC, $P < 0,05$). A 36°C el isómero *cis* fue 1,9 veces más tóxico, pero las DE 50s no fueron significativamente diferentes (SIC, $P > 0,05$). La DE 50 de *trans*-permetrina no

varió significativamente con la temperatura (SIC, $P > 0,05$), y los coeficientes de temperatura fueron neutros ($= 1$).

Para investigar una posible relación entre el metabolismo detoxicante y las toxicidades diferenciales de los isómeros puros, éstos fueron aplicados en ninfas previamente tratadas con los sinergistas butóxido de piperonilo (inhibidor de la actividad de oxidasas microsomales) o trifenilfosfato (inhibidor de la actividad de esterasas). Las ninfas estuvieron expuestas durante 24 hs a filmes de los sinergistas sobre papel de filtro ($0,7 \text{ mg/cm}^2$).

En ninfas I (**Figura 3.18.**) el pretratamiento con butóxido de piperonilo redujo en forma significativa la DE 50 de la *cis*-permetrina (NSIC, $P < 0,05$), pero no cambió en forma significativa la DE 50 de la *trans*-permetrina (SIC, $P > 0,05$). El pretratamiento con trifenilfosfato tuvo el efecto opuesto: redujo significativamente la DE 50 de la *trans*-permetrina (NSIC, $P < 0,05$), pero no cambió en forma significativa la DE 50 de la *cis*-permetrina (SIC, $P > 0,05$). Estos resultados sugieren que en las ninfas I la actividad de oxidasas microsomales estaría involucrada en el metabolismo del isómero *cis*, y la actividad de esterasas en el metabolismo del isómero *trans*.

En ninfas III (**Figura 3.19.**) los pretratamientos con butóxido de piperonilo y trifenilfosfato no produjeron cambios significativos en las DE 50 de los isómeros (SIC, $P > 0,05$). Estos resultados sugieren que las actividades de oxidasas microsomales y de esterasas no son relevantes en el metabolismo de los isómeros de permetrina.

3.2.2.2. Discusión

Los efectos resultantes de la aplicación simultánea de dos o más sustancias son llamados interacciones (Wilkinson, 1976). Si el efecto combinado de dos sustancias es mayor que la suma de los efectos individuales, se trata de sinergismo. Si el efecto combinado es menor que la suma de los efectos individuales, es antagonismo. La aditividad es el caso en que el efecto conjunto es igual a la suma de los efectos individuales, es decir cuando no hay

interacción. A veces se reserva el término sinergismo para el caso en que una de las sustancias no es tóxica en la dosis usada, pero aumenta la toxicidad de otra; y se usa potenciación cuando las dos sustancias son tóxicas en las dosis usadas (Busvine, 1971). Otras veces, los términos sinergismo y potenciación son usados en forma exactamente opuesta a la mencionada (Klaassen and Eaton, 1991). Hay quien ha llegado a proponer 16 categorías para describir las posibles interacciones entre dos sustancias (hay una revisión del tema en Busvine, 1971). En esta Tesis se usa el término sinergismo para nombrar el aumento de toxicidad de una sustancia producido por una dosis no tóxica de otra. Se habría usado el término potenciación para nombrar el aumento de toxicidad de una sustancia producido por una dosis tóxica de otra, pero no se presentan casos de potenciación. Los términos antagonismo y aditividad se usa en el mismo sentido en que todos los autores parecen estar de acuerdo: cuando el efecto combinado de las sustancias es menor que la suma de los efectos individuales y ausencia de interacción, respectivamente.

Como resultado de los métodos de síntesis, muchos piretroides de uso comercial son una mezcla de isómeros ópticos y geométricos (ver el **Recuadro 1.1.**). Algunos isómeros tienen actividad insecticida, otros no (Naumann, 1990). La tendencia general entre los isómeros geométricos es que la configuración *cis* es más tóxica que la *trans* (Naumann, 1990).

La toxicidad comparada de los isómeros *cis* y *trans* de la permetrina fue estudiada en larvas de las mariposas *Pseudoplusia includens* y *H. virescens* (Dowd and Sparks, 1988; Naumann, 1990); y *T. ni* (Toth and Sparks, 1988); la mosca *M. domestica*; el mosquito *Culex quinquefasciatus quinquefasciatus*; y la cucaracha *B. germanica*) (Ruigt, 1985; Naumann, 1990). En estos insectos el isómero *cis* fue entre 1,7 y 7,1 veces más tóxico que el *trans*. Los resultados presentados aquí (**Figuras 3.14.** y **3.15.**) coinciden con los antecedentes citados: en ninfas I y III de *T. infestans* el isómero *cis* fue más tóxico que el *trans*. Pero en ninfas III la diferencia en la toxicidad de los isómeros fue inesperadamente alta.

Se conocen casos donde la diferencia en las toxicidades de los isómeros *cis* y *trans* de la permetrina tiene una explicación metabólica. La tasa de metabolismo de *trans*-permetrina fue mayor que la de *cis*-permetrina en *M. domestica* (Shono et al. 1979), *S. littoralis* y *T. ni* (Ishaaya and Casida, 1983), y *P. includens* y *H. virescens* (Dowd and Sparks, 1988).

Inhibidores de actividades enzimáticas detoxicantes inhibieron la degradación de *trans*-permetrina *in vivo* en *S. littoralis* y *T. ni* (Ishaaya and Casida, 1983) e *in vitro* en homogenatos de *P. includens* (Dowd and Sparks, 1987). Los experimentos con sinergistas (**Figuras 3.18 y 3.19.**) revelaron que en ninfas I de *T. infestans* la actividad de oxidasas microsomales esterasas tiene relevancia en el metabolismo de *cis*-permetrina, y la actividad de esterasas en el metabolismo de *trans*-permetrina. En ninfas III la toxicidad de los isómeros no fue modificado por el tratamiento con sinergistas. Este sinergismo diferencial en distintos estadios ninfales puede deberse a variaciones en los títulos de enzimas detoxicantes a lo largo del desarrollo. Se encontró este tipo de variaciones en la actividad hidrolítica hacia *trans*-permetrina en *P. includens* (Dowd and Sparks, 1984), y hacia permetrina en *S. frugiperda* (Yu, 1983).

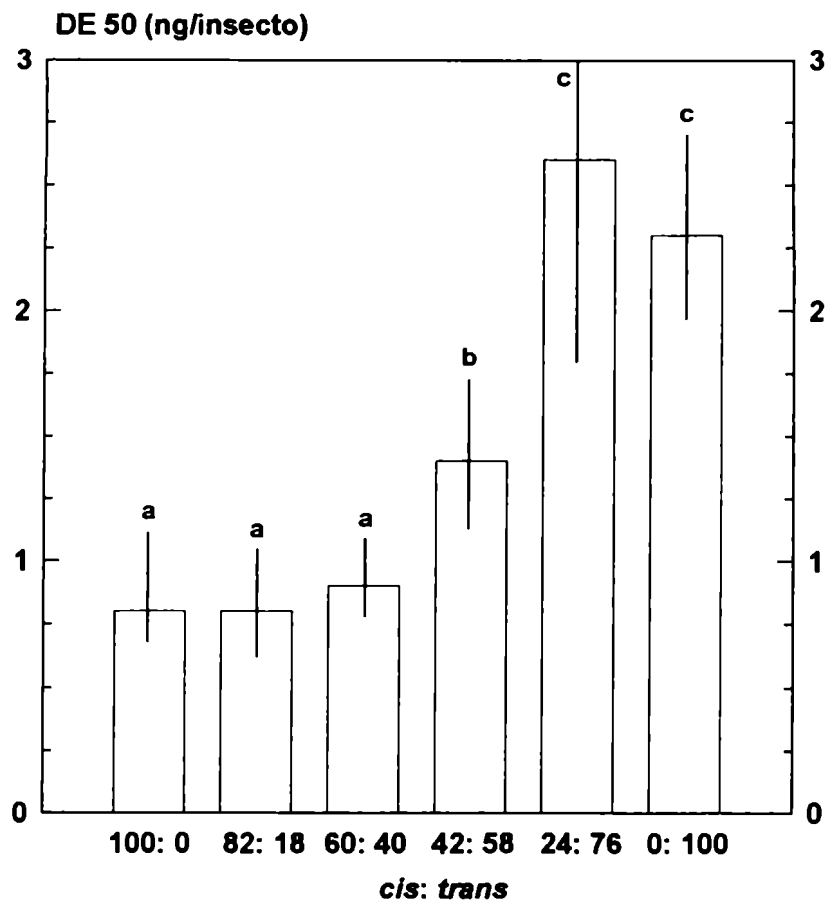
La ausencia de sinergismo en ninfas III sugiere que la actividad de esterasas y de oxidasas microsomales no es importante en el metabolismo de los isómeros de permetrina. Otras vías metabólicas, no inhibibles por los sinergistas usados, e incluso otros pasos toxicocinéticos pueden ser responsables de la toxicidad diferencial de estos insecticidas.

El análisis de las DE 50s de las mezclas de *cis*- y *trans*-permetrina (**Figuras 3.14. y 3.15.**) indicó aditividad en ninfas I, y antagonismo en ninfas III. En este último estadio, la relativamente baja toxicidad del isómero *trans* y el efecto antagonístico de la aplicación conjunta enmascaran la alta toxicidad del isómero *cis*. Como se mostró antes (**Figura 3.4.**), la *cis*-permetrina tiene en ninfas III una toxicidad comparable a la de deltametrina. Este resultado es inusual: los cianopiretroides (como deltametrina) suelen ser más tóxicos que los no ciano (como la *cis*-permetrina) (Elliot et al., 1974; Ruigt, 1985). Además,

deltametrina es uno de los piretroides más efectivos en vinchuca (Casabé et al., 1988).

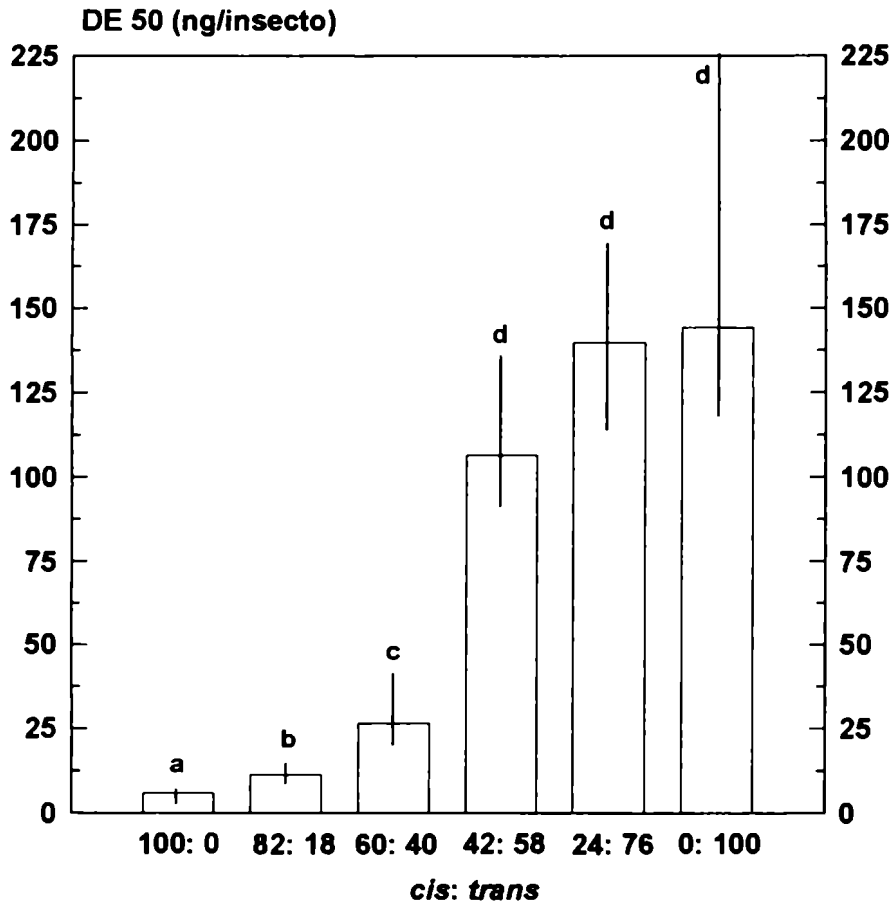
Cuáles son los isómeros de los piretroides con baja toxicidad y qué tipo de interacciones ocurren en las mezclas son datos que deberían ser tenidos en cuenta al programar el uso de insecticidas. Cuando se dispone de este conocimiento es posible por ejemplo evitar la aplicación inútil de moléculas sin actividad o que disminuyen la toxicidad de otras.

3.2.2.3. Figuras



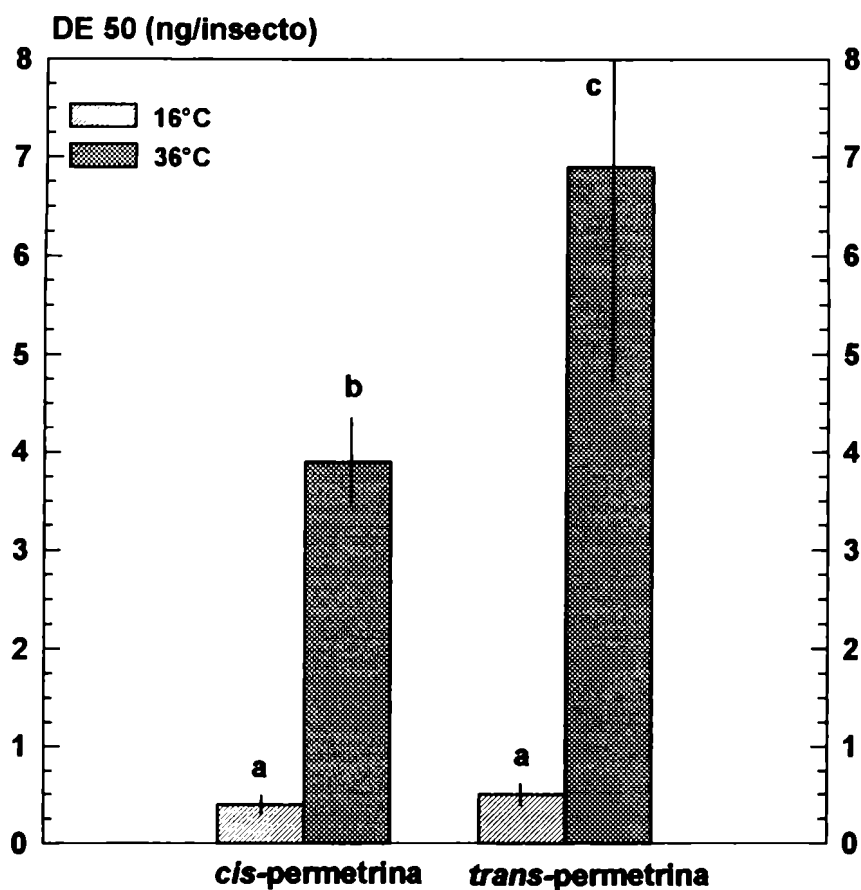
cis: trans	coeficiente de interacción (promedio \pm DE)
82: 18	0,9 \pm 0,1
60: 40	0,9 \pm 0,2
42: 58	1,0 \pm 0,1
24: 76	2,0 \pm 1,3

Figura 3.14. DE 50 (24 hs) a 26°C de isómeros de permetrina puros y mezclados en ninfas I. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Ningún coeficiente es significativamente distinto que 1,0 (= ausencia de interacción) (Prueba de t para una muestra, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes (N = 69 - 140).



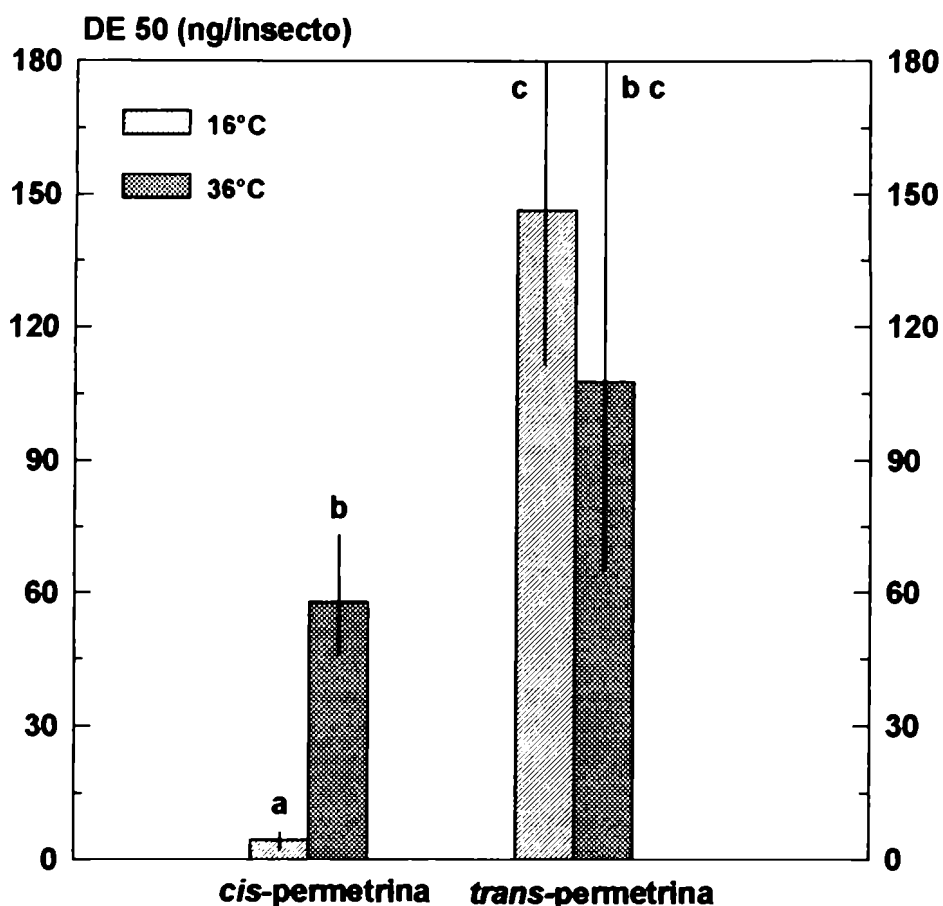
cis: trans	coeficiente de interacción (promedio \pm DE)
82: 18	1,7 \pm 0,1*
60: 40	3,0 \pm 0,6*
42: 58	8,7 \pm 1,1*
24: 76	8,8 \pm 1,0*

Figura 3.15. DE 50 (24 hs) a 26°C de isómeros de permetrina puros y mezclados en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con un asterisco son significativamente distintos que 1,0 (coeficiente de interacción $> 1,0$ significa antagonismo) (Prueba t para una muestra, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes (59 - 121).



rango de temperatura (°C)	coeficiente de temperatura para <i>trans</i> -permetrina
16-26	- 4,6*
26-36	- 3,0*
16-36	-13,8*

Figura 3. 16. DE 50 (24 hs) de *cis*- y *trans*-permetrina a 16 y 36°C en ninfas I. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Coeficiente de temperatura = DE 50 mayor / DE 50 menor. El signo negativo significa que la DE 50 a la mayor temperatura > DE 50 a la menor temperatura. Los coeficientes para los rangos 16-26°C y 26-36°C se calcularon con datos de la Figura 3.14. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Los coeficientes señalados con asteriscos son significativamente diferentes que 1,0 (NSIC, $P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes (N = 101 - 210).



rango de temperatura (°C)	coeficiente de temperatura para <i>trans</i> -permetrina
16-26	1,0
26-36	1,3
16-36	1,4

Figura 3.17. DE 50 de *cis*- y *trans*-permetrina a 16 y 36°C en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Coeficiente de temperatura = DE 50 mayor / DE 50 menor. El signo positivo significa que la DE 50 a la mayor temperatura < DE 50 a la menor temperatura. Los coeficientes para los rangos 16-26°C y 26-36°C se calcularon con datos de la Figura 3.15. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Ningún Coeficiente de Temperatura fue significativamente distinto que 1,0 (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes (N = 101 - 124).

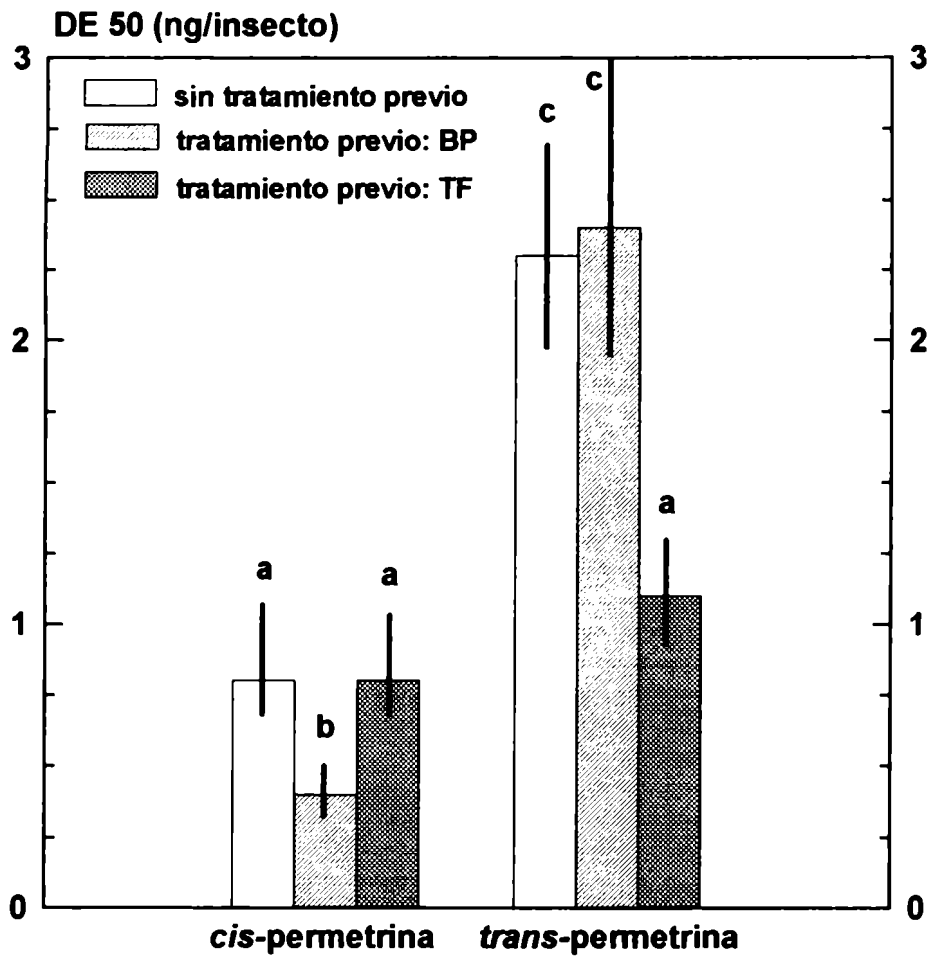


Figura 3.18. DE 50 (24 hs) de isómeros de permetrina con y sin sinergistas en ninfas I. Los insectos fueron expuestos durante 24 horas a filmes sobre papel de filtro de los sinergistas ($0,7 \text{ mg/cm}^2$). Entonces se hizo aplicación tópica de los insecticidas en el lado ventral del abdomen. BP: butóxido de piperonilo; TF: trifenilfosfato. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes (N = 50 - 80).

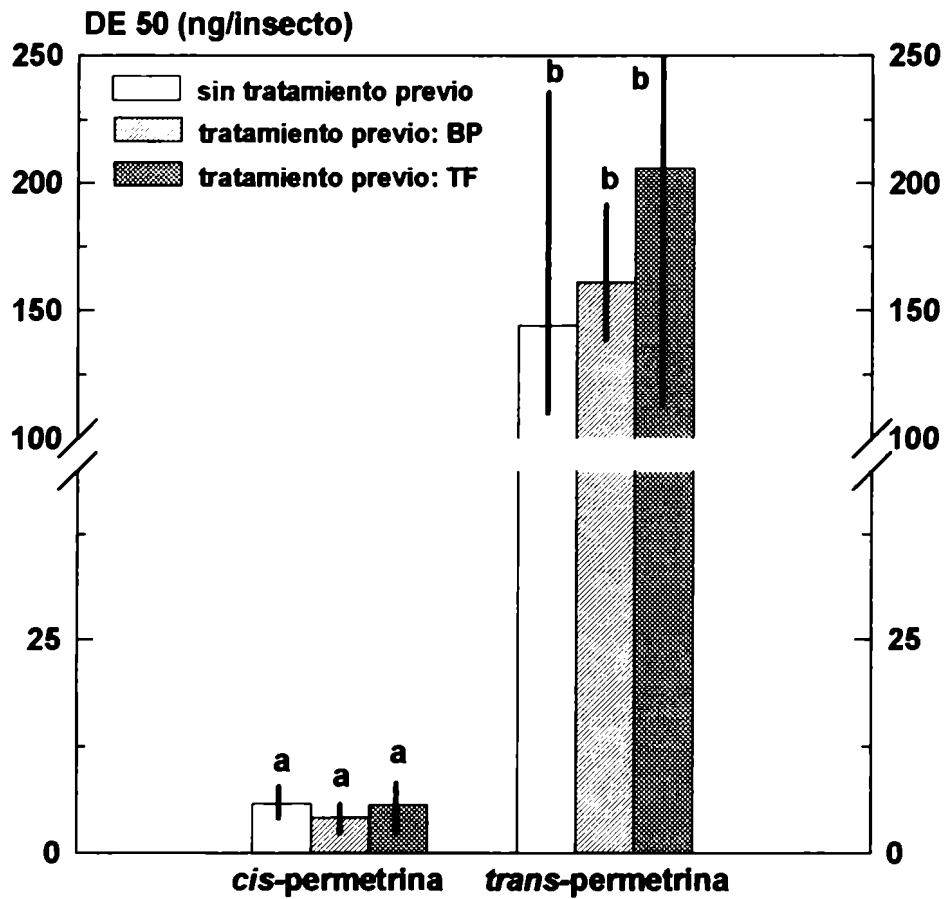


Figura 3.19. DE 50 (24 hs) de isómeros de permetrina con y sin sinergistas en ninfas III. Los insectos fueron expuestos durante 24 horas a filmes sobre papel de filtro de los sinergistas ($0,7 \text{ mg/cm}^2$). Entonces se hizo aplicación tópica de los insecticidas en el lado ventral del abdomen. BP: butóxido de piperonilo; TF: trifenilfosfato. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes ($N = 64 - 145$).

3. 2. 3. Edad y estado alimentario

3.2.3.1. Resultados

Se determinaron las DE 50s de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas I de distintas edades y estados nutricionales. Se hizo aplicación tópica y el efecto evaluado fue la ausencia de actividad locomotora.

La **Figura 3.20.a.** muestra los valores de DE 50s para deltametrina. No hubo diferencia significativa entre las DE 50s de ninfas ayunadas de 7 y 21 días de edad (SIC, $P > 0,05$), pero la DE 50 de ninfas ayunadas de 1 día de edad fue significativamente menor que ambas (NSIC, $P < 0,05$). Las ninfas de 21 días de edad alimentadas 1 hora antes del tratamiento fueron significativamente más susceptibles que las alimentadas 7 días antes (NSIC, $P < 0,05$). A una misma edad (21 días), las ninfas ayunadas fueron significativamente más susceptibles que las alimentadas 7 días antes (NSIC, $P < 0,05$), pero su DE 50 no fue significativamente diferente que la de las ninfas alimentadas 1 hora antes (SIC, $P > 0,05$). El perfil de toxicidad se mantuvo al expresar los datos en ng/mg.

La **Figura 3.20.b.** muestra los valores de DE 50 para *cis*-permetrina. No hubo diferencia significativa entre las DE 50s en ninfas ayunadas de 1 y 21 días de edad (SIC, $P > 0,05$), pero la DE 50 de ninfas ayunadas de 7 días de edad fue significativamente mayor que ambas (NSIC, $P < 0,05$). Igual que para deltametrina, las ninfas de 21 días de edad alimentadas 1 hora antes del tratamiento fueron significativamente más susceptibles que las alimentadas 7 días antes (NSIC, $P < 0,05$). A una misma edad (21 días), las ninfas ayunadas fueron significativamente más susceptibles que las alimentadas (NSIC, $P < 0,05$). El perfil de toxicidad se mantuvo al expresar los datos en ng/mg.

3.2.3.2. Discusión

Las diferencias en la toxicidad de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas I de distintas edades y estados nutricionales pueden ser atribuidas a variaciones en la actividad de enzimas detoxicantes y a las características de la cutícula.

La variación de la actividad de oxidasas microsomales en función de la edad y el desarrollo fue demostrada en varias especies de insectos (revisión del tema en Agosin, 1985). En ninfas V de *T. infestans* de distintas edades se encontró una correlación entre la variación de la toxicidad del malatión y la actividad de enzimas detoxicantes (Wood et al., 1993). En el último estadio larval de la mariposa *P. includens* la actividad de esterases que hidrolizaban *trans*-permetrina varió en función de la edad, distintos tejidos mostraron distintos patrones de variación y los valores de DL 50 a distintos tiempos reflejaron los cambios en la actividad hidrolítica (Dowd and Sparks, 1984).

Durante la ingesta la cutícula de los insectos hematófagos se modifica química y físicamente, y adquiere propiedades elásticas que permiten su estiramiento (Hackman and Goldberg, 1987). La cutícula abdominal de ninfas V de *R. prolixus* se adelgazó considerablemente como consecuencia del estiramiento, y su peso seco se modifica en función del tiempo posterior a la ingesta (Hillerton, 1978). No se demostró con exactitud la naturaleza de los cambios químicos que acompañan el estiramiento, pero se sugirieron variaciones en el pH (Reynolds, 1975) y en el grado de hidratación (Maddrell, 1966). Se encontró que la velocidad de penetración de los insecticidas depende de la composición y las propiedades físicas del integumento (Ebeling, 1974; Fontán and Zerba, 1987).

La relación entre toxicidad y estado nutricional de la *cis*-permetrina presentada aquí, fue similar a la encontrada para el DDT en ninfas II de *T. infestans* (Fontán and Zerba, 1992). En ese trabajo se demostró que la velocidad de penetración del DDT era mucho más lenta en ninfas ayunadas que en ninfas alimentadas 1 hora antes, y que este aumento en la velocidad de

penetración estaba correlacionado con un aumento de la actividad insecticida. La mayor permeabilidad al DDT en las ninfas alimentadas fue atribuida a los cambios que cuticulares que acompañan el estiramiento.

Varios autores encontraron que los insectos son más susceptibles a la acción de los insecticidas inmediatamente después de la muda, y más tolerantes inmediatamente antes (Busvine, 1971). Estas diferencias en la toxicidad fueron atribuidas a cambios en el grosor de la cutícula. En el presente trabajo las ninfas de *T. infestans* de un día de edad fueron las más susceptibles a los dos piretroides. Veinticuatro horas después de la eclosión la esclerotización de la cutícula es todavía incompleta en este estadio ninfal, a juzgar por su coloración. La cutícula semiesclerotizada puede ser una barrera más fácilmente penetrable para los insecticidas que la cutícula totalmente esclerotizada.

La alta tolerancia de las ninfas alimentadas 7 días antes puede estar relacionada con los cambios fisiológicos previos a la muda (Agrell and Lundquist, 1973; Gilbert and King, 1973). Las ninfas I de *T. infestans* comienzan a mudar unos 11 días después de la ingesta (Alzogaray, datos no publicados). La nueva cutícula en formación puede constituir además una barrera mecánica al ingreso de los insecticidas.

Los valores de DE 50s pueden ser expresados por unidad anatómica (por ejemplo ng/insecto) o por unidad de peso corporal (por ejemplo ng/mg). En general se considera que ambas formas de expresión son aproximadamente equivalentes (Klaassen and Eaton, 1991), pero esto depende de la homogeneidad del peso corporal (Busvine, 1971). Los resultados de la **Figura 3.20** indican que en ninfas III de *T. infestans* el perfil de toxicidad de deltametrina y cis-permetrina fue el mismo expresando los datos en ng/insecto y ng/mg.

3.2.3.2. Figuras

(a)

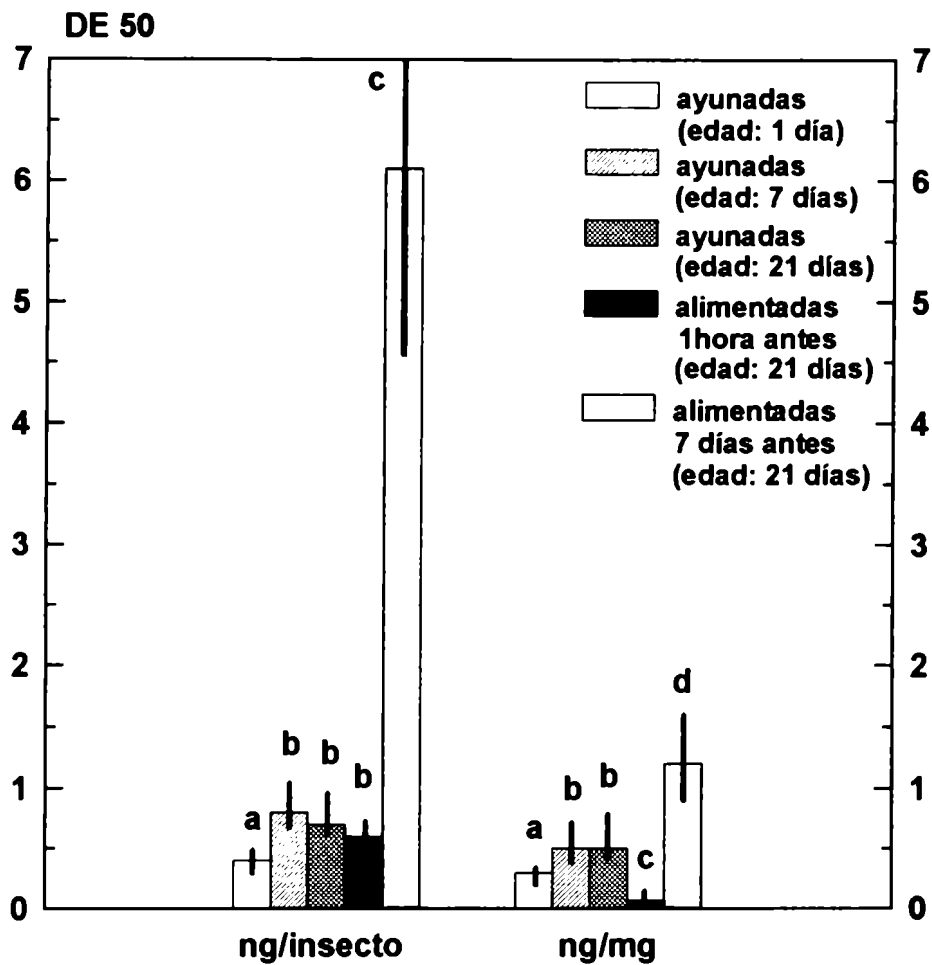


Figura 3.20. DE 50 (24 hs) de piretroides en ninfas I de distintas edades y estados alimentarios. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen de (a) deltametrina o (b) *cis*-permetrina. El efecto evaluado fue ausencia de actividad locomotora. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Dentro de cada grupo, las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 2-3 réplicas independientes (N = 46 - 142).

(b)

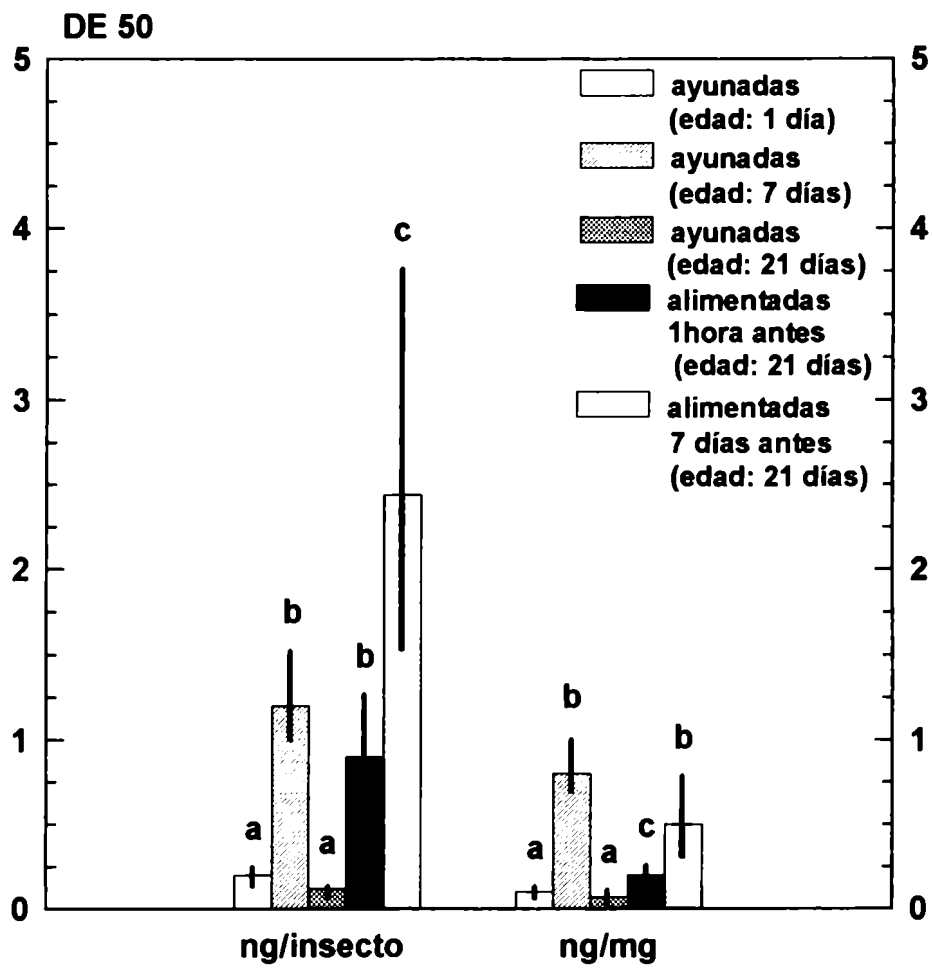


Figura 3.20. (Continuación)

3. 2. 4. Dosis y lugar de aplicación

3.2.4.1. Resultados

Se evaluaron los TE 50s de distintas dosis de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas I, y los TE 50s de una misma dosis (20 ng/insecto) aplicada en distintos lugares del cuerpo. En ambos casos se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen, y el efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro.

La **Figura 3.21.** muestra la variación de los TE 50s en función de la dosis. Se usaron dosis comprendidas en el rango 2 - 1.000 ng/insecto. Los TE 50s de deltametrina fueron significativamente menores que los de *cis*-permetrina en todas las dosis aplicadas (NSIC, $P < 0,05$), y dejaron de disminuir en forma significativa a partir de los 20 ng/insecto. El TE 50 de *cis*-permetrina decreció en todo el rango de dosis estudiado.

Los resultados de la **Figura 3.22** demuestran que el TE 50 depende del lugar de aplicación. El efecto tóxico se manifestó significativamente más rápido cuando los insecticidas fueron aplicados en el tórax (entre el segundo y el tercer par de patas) que cuando fueron aplicados en los últimos terguitos (NSIC, $P < 0,05$). En los dos lugares, la deltametrina actuó unas dos veces más rápido que la *cis*-permetrina.

3.2.4.2. Discusión

En **3.1. Síntomas de intoxicación** se demostró que las DE 50s de deltametrina y *cis*-permetrina no presentaron diferencia significativas para el efecto incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro (**Figura 3.4.**). Las diferencias en los TE 50s de estos dos piretroides deben originarse entonces en diferencias en los pasos toxicocinéticos. Los datos presentados son insuficientes para determinar en cuál o cuáles pasos toxicocinéticos radican

esas diferencias (penetración, distribución, acumulación, acceso al blanco, metabolismo).

T. infestans tiene dos ganglios en el tórax y ninguno en el abdomen (Insausti, 1994). De los ganglios torácicos parten los nervios cuyas ramificaciones inervan los músculos de las patas. La aplicación de los insecticidas en el lado ventral del tórax, es decir sobre los nervios que inervan los músculos locomotores, tuvo un efecto más rápido que la aplicación en el extremo dorsal del abdomen. La interpretación más simple del efecto del sitio de aplicación sobre los TE 50s es que cuánto más lejos del sitio de acción son aplicados los insecticidas, más tardan en manifestarse los efectos tóxicos. Todavía no está claro si el efecto sobre el sistema nervioso central es el responsable del volteo, pero sí está ampliamente demostrada la acción de los piretroides sobre el sistema nervioso central de los insectos (hay revisiones en Ruigt, 1985; Naumann, 1990). En sistema nervioso aislado de cucaracha (*P. americana*) bastó una concentración 0,1 nM de piretrina I para causar una violenta actividad espontánea en el sexto ganglio abdominal (Burt and Goodchild, 1971). Efectos sobre el cordón nervioso se manifestaron con concentraciones al menos 3 órdenes de magnitud mayores. Se encontró una correlación entre el efecto a nivel ganglionar y los síntomas de intoxicación. Otros trabajos sugirieron que el cordón nervioso no es un sitio crítico para la acción de piretroides (Burt and Goodchild, 1974; Gammon, 1978).

La variación de los TE 50s en función del lugar de aplicación puede tener una explicación más compleja y diferentes pasos de la toxicocinética pueden estar influenciando estos cambios. En **3.3. Efecto sobre la actividad locomotora** se discutirán otros aspectos de este tema.

3.2.4.3. Figuras

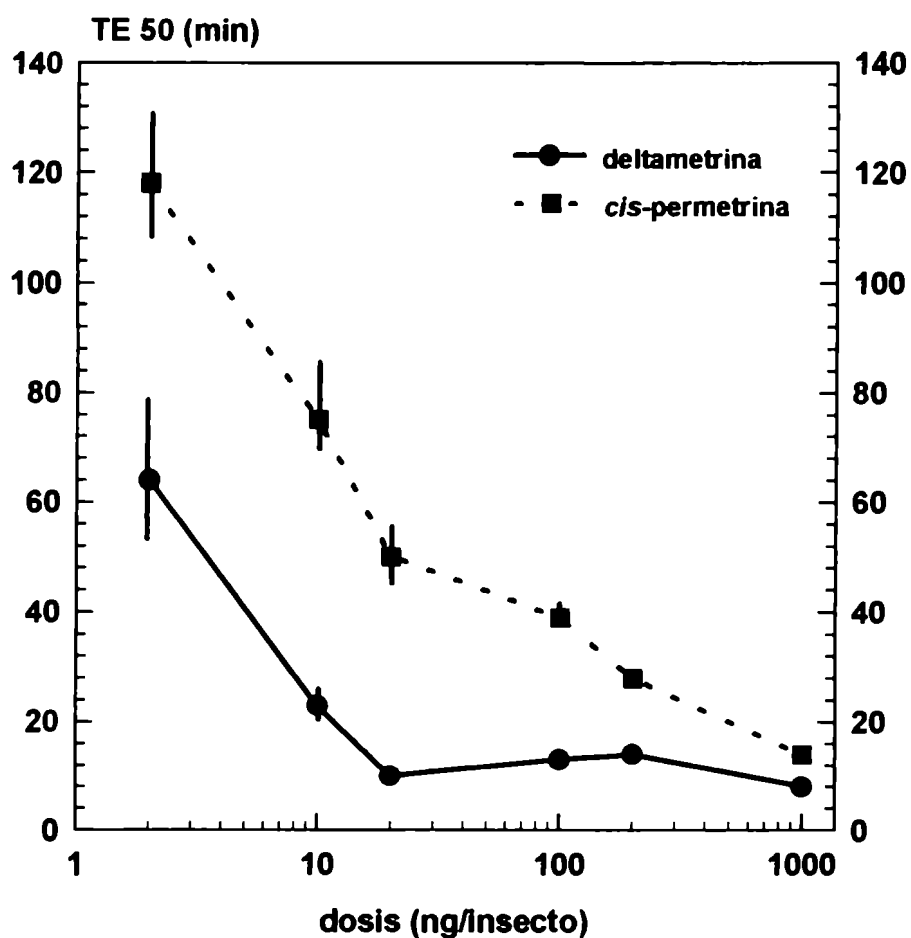


Figura 3.21. Variación del TE 50 en función de la dosis en ninfas I. Se hizo aplicación tópica en el lado ventral del abdomen. El efecto evaluado fue incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Se consideran significativamente distintos los valores cuyos intervalos de confianza no se superponen ($P < 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 3 réplicas independientes ($n = 10$).

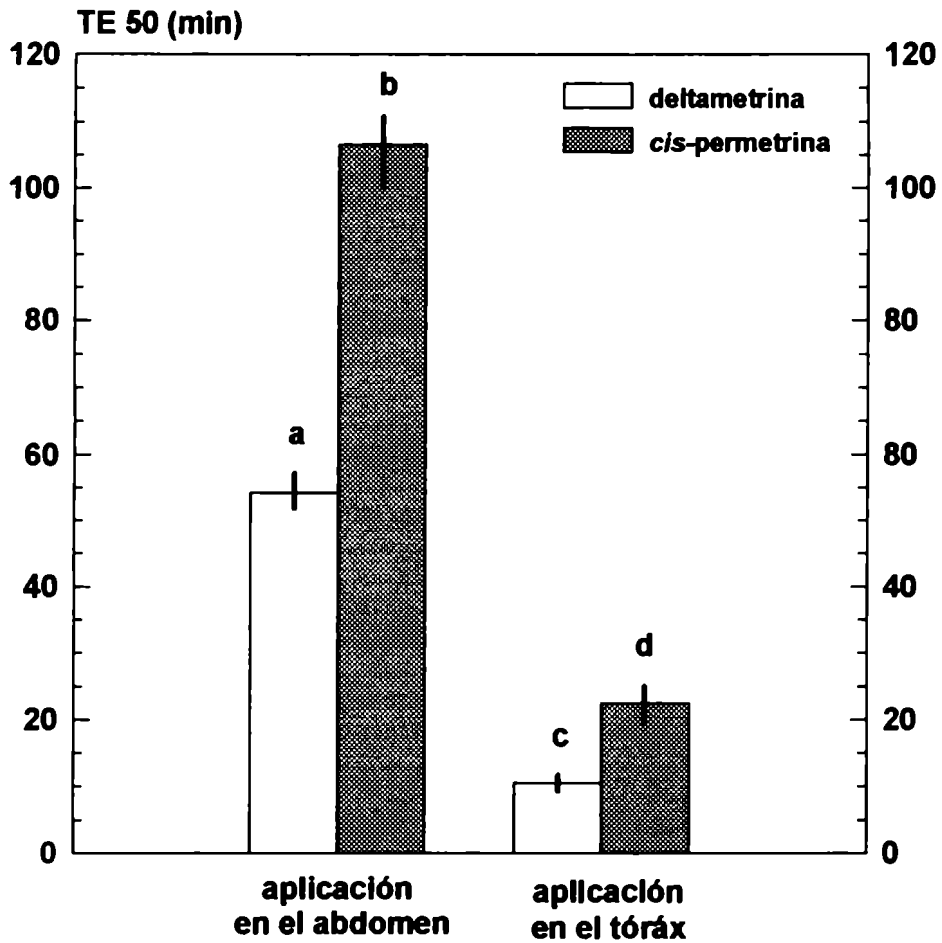


Figura 3. 22. TE 50 de piretroides aplicados en el abdomen y en el tórax de ninfas III. Se hizo aplicación tópica (20 ng/insecto) sobre los últimos terguitos o en el lado ventral del tórax (entre el primer y el segundo par de patas). El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza del 95%. Las barras señaladas con las mismas letras no presentan diferencia significativa (SIC, $P > 0,05$). Cada valor se calculó con los datos obtenidos en 4 réplicas independientes ($n = 5$).

3. 3. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

3. 3. 1. Resultados

Se evaluó con un analizador de imágenes el efecto de deltametrina y *cis*-permetrina sobre la actividad locomotora de ninfas III. Se estudiaron las influencias del modo de aplicación de los insecticidas, el pretratamiento con *N*-etilmaleimida y la temperatura sobre dicho efecto.

La **Figura 3.23.** muestra cómo la actividad locomotora de ninfas expuestas a filmes de piretroides aumentó en forma lineal en función del logaritmo de la concentración (deltametrina, $y = 2210,7 + 1280,7 x$, $r^2 = 0,92$; *cis*-permetrina, $y = - 498,7 + 1479,4 x$, $r^2 = 0,99$). La **Tabla 3.4.** muestra la toxicidad para cada insecticida de las concentraciones usadas para construir las rectas de regresión. Concentraciones subtóxicas de los dos piretroides aumentaron la actividad locomotora de las ninfas en forma significativa (Prueba de Duncan, $P < 0,05$).

Cuando se hizo aplicación tópica de los piretroides en el extremo dorsal del abdomen de las ninfas (**Figura 3.24.a.**), la deltametrina produjo un aumento significativo de la actividad locomotora (Anova; $F = 4,3$; g. l. = 3, 16; $P < 0,05$), pero al intentar estimar una recta de regresión se encontró que su pendiente no era significativamente distinta de cero (Anova; $F = 69,0$; g. l. = 1, 2; $P > 0,05$). La actividad locomotora no fue afectada en forma significativa por dosis subtóxicas de deltametrina (Prueba de Duncan, $P > 0,05$) (**Tabla 3.5.**). Ninguna de las dosis de *cis*-permetrina aplicadas afectó significativamente la actividad locomotora (**Figura 3.24.a.**) (Anova, $F = 2,8$; g. l. = 3, 19; $P > 0,05$).

Cuando se hizo aplicación tópica en la cabeza de las ninfas (**Figura 3.24.b.**), hubo diferencia significativa entre los efectos de los distintos tratamientos (Anova; $F = 7,2$; g. l. = 2, 12; $P < 0,01$), y ambos piretroides aumentaron en forma significativa la actividad locomotora (la misma dosis de *cis*-permetrina aplicada en el extremo dorsal del abdomen de las ninfas no había modificado significativamente dicha actividad).

La **Figura 3.25.** muestra cómo el pretratamiento tópico con N-etilmaleimida (20 µg/insecto) modificó el efecto de los piretroides sobre la actividad locomotora. En los insectos pretratados con N-etilmaleimida, ninguno de los dos piretroides produjo cambios significativos en la actividad locomotora (Anova; $F = 1,3$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$). Las mismas concentraciones de cada insecticida produjeron un efecto significativo en los insectos pretratados con acetona sola (Anova; $F = 14,0$; g. l. = 2, 12; $P < 0,001$).

La **Figura 3.26.** muestra el efecto de los piretroides sobre la actividad locomotora a dos temperaturas. A 16°C ninguno de los insecticidas afectó significativamente la actividad locomotora (Anova; $F = 0,7$; g. l. = 2, 9; $P > 0,05$); a 36°C ambos la afectaron en forma significativa (Anova; $F = 20,8$; g. l. = 2, 9; $P < 0,0005$).

3. 3.2. Discusión

En **3.1. Síntomas de intoxicación** se mencionó el aumento de la actividad locomotora (hiperactividad) como el primer síntoma de la intoxicación con piretroides en insectos. Este efecto es responsable del fenómeno de expurgue, es decir la capacidad de hacer que los insectos abandonen sus refugios (Pinchin et al., 1980; Wood et al., 1993). El expurgue tiene al menos dos usos prácticos: (a) la aplicación simultánea de una sustancia expurgante y una sustancia tóxica, para que los insectos abandonen sus refugios y se expongan a la acción insecticida (en el caso de los piretroides, una misma sustancia puede cumplir las dos funciones) (Gualtieri et al., 1985); (b) como herramienta para muestrear poblaciones de insectos antes y después de un tratamiento insecticida, y así evaluar la eficacia del tratamiento (WHO, 1991; Oliveira Filho, 1994).

Los resultados de las **Figuras 3.23 y 3.24.** indican que la hiperactividad producida por deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas III de *T. infestans* fue

mayor cuando se hizo exposición a filme que cuando se hizo aplicación tópica; y la aplicación tópica en la cabeza produjo un efecto mayor que la aplicación tópica en el extremo del abdomen. Como se discutió previamente (**3.2.4. Dosis y lugar de aplicación.**) la variación de la toxicidad en función del lugar de aplicación puede estar reflejando la distancia al sitio de acción.

Estudios de comportamiento, electrofisiología y bioquímica demostraron que los grupos sulfhidrilos intervienen en los mecanismos de quimiorrecepción de los insectos. En estos trabajos, distintos reactivos de sulfhidrilos (N-etilmaleimida, *p*-cloromercuribenzoato, azoester, ácido iodoacético, 1,4-ditiotreitol) bloquearon los comportamientos alimentario en insectos hematófagos (Galun et al., 1969) y en la mosca *Boettchenisca peregrina* (Koyama and Kurihara, 1971), y el de agregación en la cucaracha *B. germanica* (Koyama and Kurihara, 1971), disparados por estímulos químicos; inhibieron las respuestas electrofisiológicas en quimiorreceptores de antenas de las mariposas *B. mory* y *Antheraea pernyi* (Villet, 1974) y de boca de la mosca *B. peregrina* (Shimada et al. 1972); y compitieron por quimiorreceptores antenales de quinonas de la cucaracha *P. americana* (Norris et al., 1971; Singer et al., 1975). En *T. infestans* se obtuvo evidencia de efectos antialimentario y anticópula producidos por el tratamiento con N-etilmaleimida (Picollo et al., 1993). Estos efectos fueron atribuidos a un bloqueo de la quimiorrecepción.

En este trabajo se encontró que la N-etilmaleimida inhibe la hiperactividad producida por los piretroides (**Figura 3.25.**). Este resultado apoya la posibilidad de que la hiperactividad inducida por deltametrina y *cis*-permetrina está asociada con un mecanismo de quimiorrecepción.

Los órganos sensoriales son muy susceptibles a la acción de los piretroides (Ruigt, 1985). Se encontró que diversos piretroides generaron potenciales de acción en el nervio crural de la langosta *Schistocerca gregaria*, no asociados con actividad muscular (Clements and May, 1977). La actividad nerviosa no se manifestó en individuos a los que previamente se les extirpó el

órgano cordotonal (el mayor órgano sensorial en las patas de la langosta). Se observó actividad repetitiva provocada por piretroides en quimiorreceptores de la mosca *Phormia regina* (Holan et al., 1978). La tetrametrina, en la baja concentración de 0,3 pM, causó actividad repetitiva en el nervio sensorial cercal de la cucaracha *P. americana* (Gammon et al., 1981). En experimentos con cucarachas *P. americana* vivas y libres, tratadas con aletrina, se estudiaron simultáneamente los síntomas de intoxicación y los efectos neurotóxicos (Gammon, 1978). Durante la fase de excitación se detectó actividad aferente espontánea en el nervio cercal, pero no en el cordón nervioso abdominal ni en nervios cercales eferentes. Estos resultados hicieron pensar que el aumento de la actividad locomotora inducido por el piretroide podía ser consecuencia de un efecto sobre el sistema nervioso periférico. Podía estar ocurriendo por ejemplo un bloqueo de la innervación eferente (inhibitoria).

El efecto de la temperatura sobre la acción de los piretroides se discutió en la **3.2.1. Temperatura**. Con respecto a la quimiorrecepción, la respuesta electrofisiológica de quimiorreceptores bucales de mosca (*P. regina*) disminuyó hasta un 80% cuando la temperatura descendió de 28 a 12°C (Uehara and Morita, 1972). En *Drosophila melanogaster* el comportamiento alimentario mediado por quimiorreceptores tarsales disminuyó al disminuir la temperatura (Napolitano et al., 1986).

Una misma concentración de los piretroides estudiados produjo hiperactividad en ninfas III de *T. infestans* a 26 y 36°C, pero no a 16°C (**Figura 3. 26.**). Este efecto de la temperatura es opuesto al efecto sobre otros síntomas de intoxicación presentados en esta Tesis. En las **Figuras 3.5.** y **3.11.** se observa que deltametrina y *cis*-permetrina fueron significativamente más tóxicas a 16 que a 26°C en ninfas III. Estos resultados sugieren que los mecanismos responsables de la hiperactividad y la incoordinación son distintos. Esta es una cuestión que todavía no fue resuelta. Se propuso que el volteo resulta de un exceso de estimulación producido por las piretrinas y sus

derivados sintéticos sobre los nervios sensoriales superficiales (Camougis, 1973; Clements and May, 1977; Gammon, 1981). Esto interrumpiría el flujo de información hacia el sistema nervioso central y los insectos intoxicados serían incapaces de coordinar los movimientos de las patas. Sin embargo, otros autores no encontraron efectos neurotóxicos en células sensoriales, y propusieron que el sitio primario de acción para el volteo es el sistema nervioso central (Ruigt, 1985).

Los datos obtenidos son evidencias indirectas de una posible interacción entre los piretroides y el sistema nervioso periférico a nivel de quimiorreceptores. Habría que realizar experimentos de electrofisiología para obtener una evidencia más contundente.

3. 3.3. Figuras y Tablas

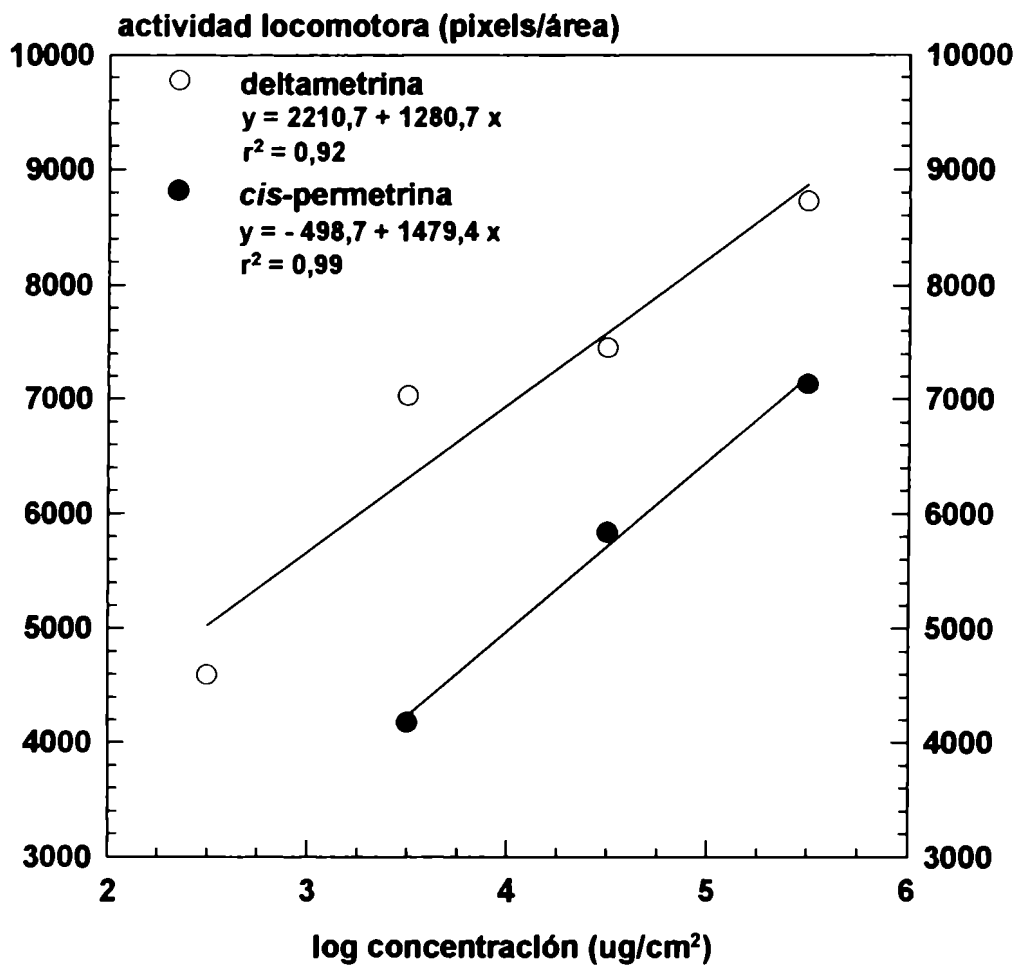


Figura 3.23. Efecto de la exposición a filmes de piretroides sobre la actividad locomotora en ninfas III. Los insectos fueron expuestos a filmes de piretroides sobre papel de filtro. La actividad locomotora se midió durante 30 minutos a partir del momento en que comenzó la exposición. Actividad locomotora = P/A ; donde P es el número de pixels que cambiaron de estado durante la sesión (de apagado a encendido y viceversa), y A es el promedio de pixels encendidos durante la sesión (área). Cada valor representa el promedio de 5 réplicas independientes ($n = 5$).

concentración ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% de ninfas afectadas (promedio \pm DE)	
	deltametrina	cis-permetrina
0,14	0*	0*
1,4	0	0*
14,0	0	8,0 \pm 11,0
140,0	92,0 \pm 11,0	100

Tabla 3.4. Toxicidad de las concentraciones de piretroides usadas para evaluar el efecto sobre la actividad locomotora en ninfas III. Estos resultados se evaluaron en los mismos insectos usados en los experimentos de medición de la actividad locomotora, 24 horas después de la aplicación de los insecticidas. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Los asteriscos indican concentraciones que no afectaron significativamente la actividad locomotora de las ninfas (Prueba de Duncan, $P > 0,05$). Cada valor es el promedio de 5 réplicas independientes ($n = 5$).

(a)

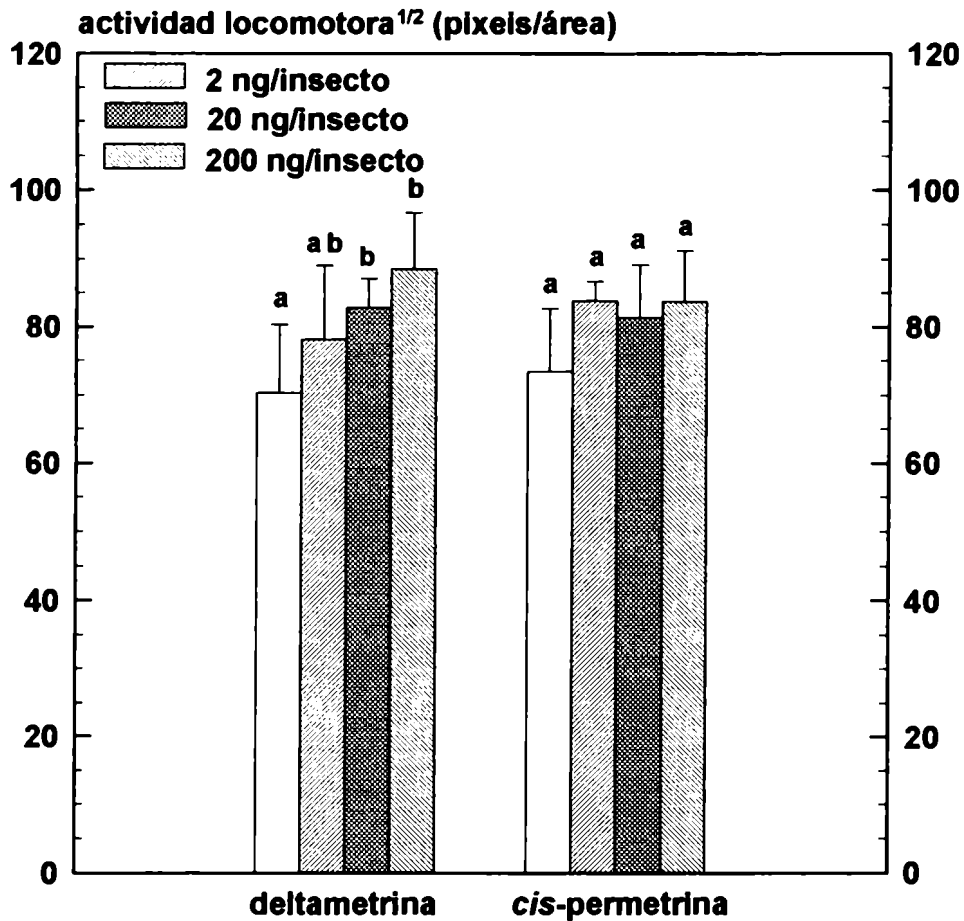


Figura 3.24. Efecto de la aplicación tópica de piretroides sobre la actividad locomotora en ninfas III. Se hizo aplicación tópica en (a) el extremo dorsal del abdomen (2-200 ng/insecto), y (b) el lado dorsal de la cabeza (20 ng/insecto). La actividad locomotora se midió durante los (a) 30 ó (b) 15 minutos posteriores a la aplicación. Actividad locomotora = P/A ; donde P es el número de pixels que cambiaron de estado durante la sesión (de encendido a apagado y viceversa), y A es el promedio de pixels encendido durante la sesión (área). En (a), dentro de cada insecticida, las barras señaladas con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $P > 0,05$); en (b) las barras señaladas con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Duncan, $P > 0,05$). Cada valor es el promedio de 5 réplicas independientes \pm DE ($n = 5$).

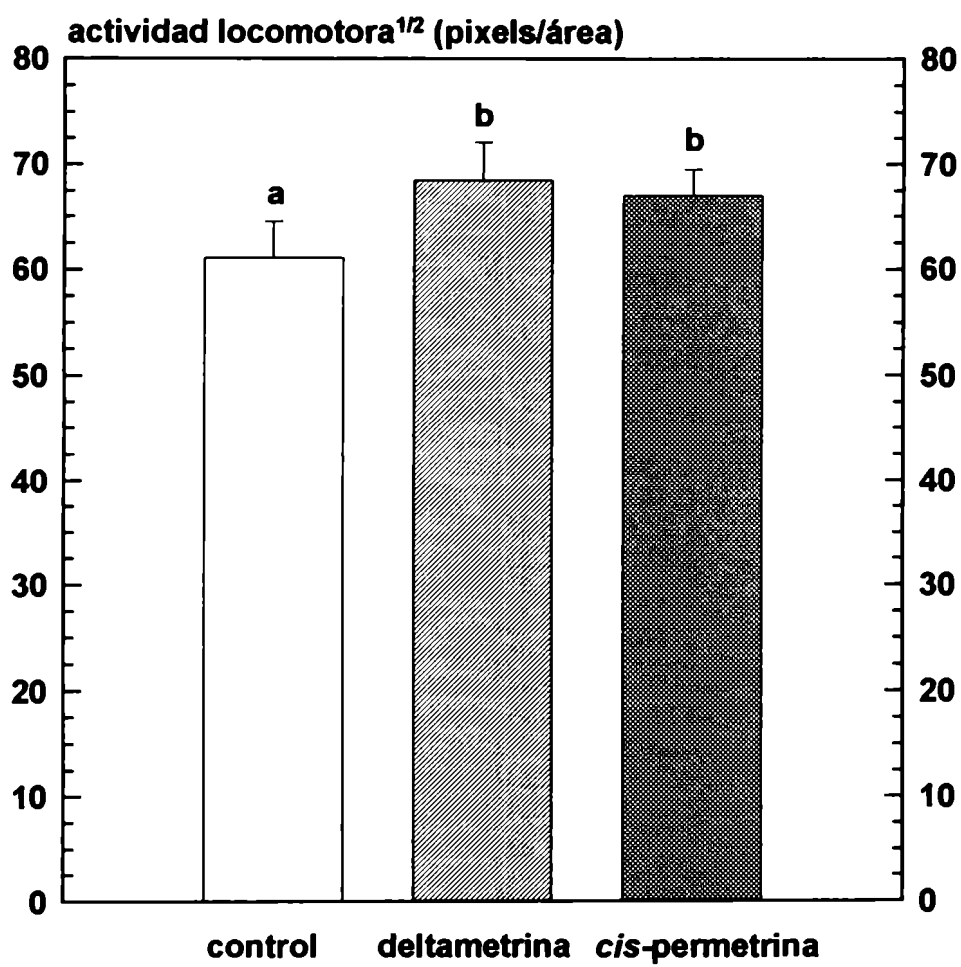
(b)

Figura 3. 24. Continuación.

dosis (ng/insecto)	% de ninfas afectadas (promedio \pm DE)	
	deltametrina	cis-permetrina
2	10,0 \pm 24,7*	0*
20	80,0 \pm 14,1	100*
200	100	100*

Tabla 3.5. Toxicidad de las dosis de piretroides usadas para evaluar el efecto sobre la actividad locomotora en ninfas III. Estos resultados se evaluaron en los mismos insectos usados en los experimentos de medición de la actividad locomotora, 24 horas después de la aplicación de los insecticidas. El efecto evaluado fue la incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro. Los asteriscos indican dosis que no afectaron significativamente la actividad locomotora de las ninfas (Prueba de Duncan, $P > 0,05$). Cada valor es el promedio de 5 réplicas independientes ($n = 5$).

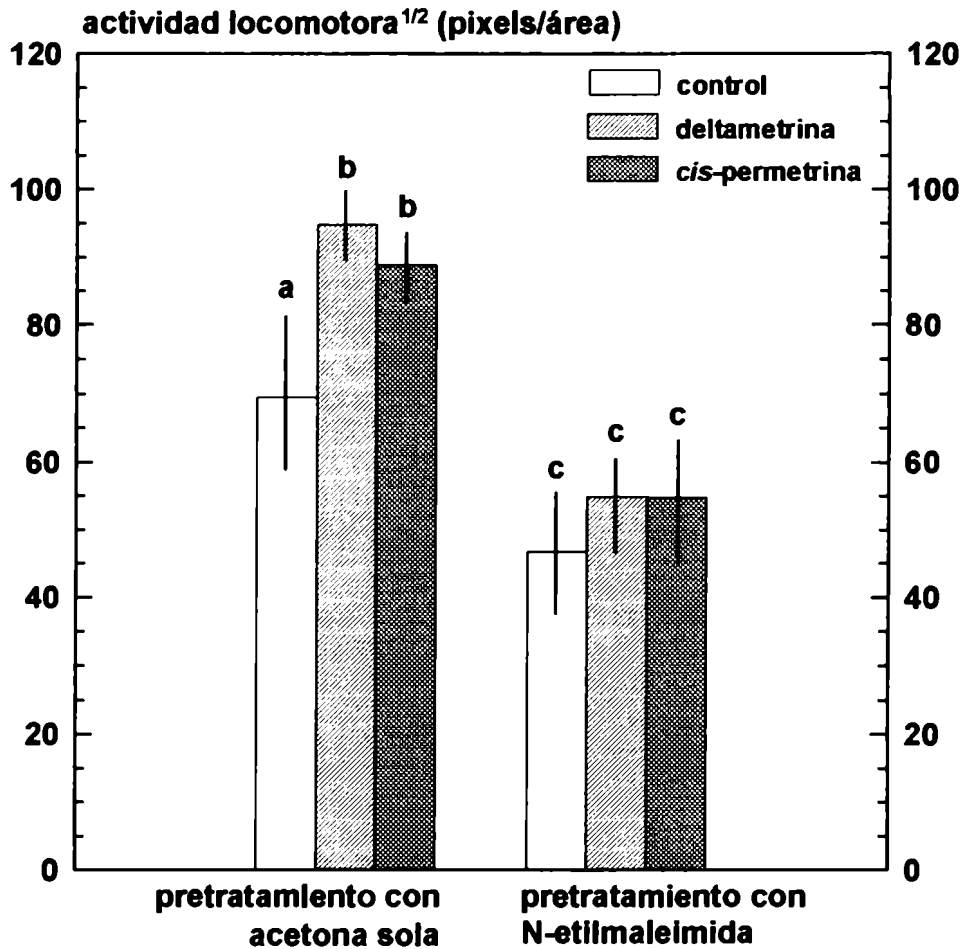


Figura 3.25. Efecto de piretroides sobre la actividad locomotora en ninfas III tratadas con N-etilmaleimida. Se hizo aplicación tópica de N-etilmaleimida (20 $\mu\text{g}/\text{insecto}$) sobre el lado dorsal del tórax 5 minutos antes de la exposición a los insecticidas. Los insectos fueron expuestos a filmes de piretroides sobre papel de filtro (14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La actividad locomotora se midió durante los 30 minutos posteriores al comienzo de la exposición. Actividad locomotora = P/A ; donde P es el número de pixels que cambiaron de estado durante la sesión (de apagado a encendido y viceversa), y A es el promedio de pixels encendidos durante la sesión (área). Dentro de cada pretratamiento, las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (Prueba de Duncan, $P > 0,05$). Cada valor representa el promedio de 4 réplicas independientes \pm DE ($n = 5$).

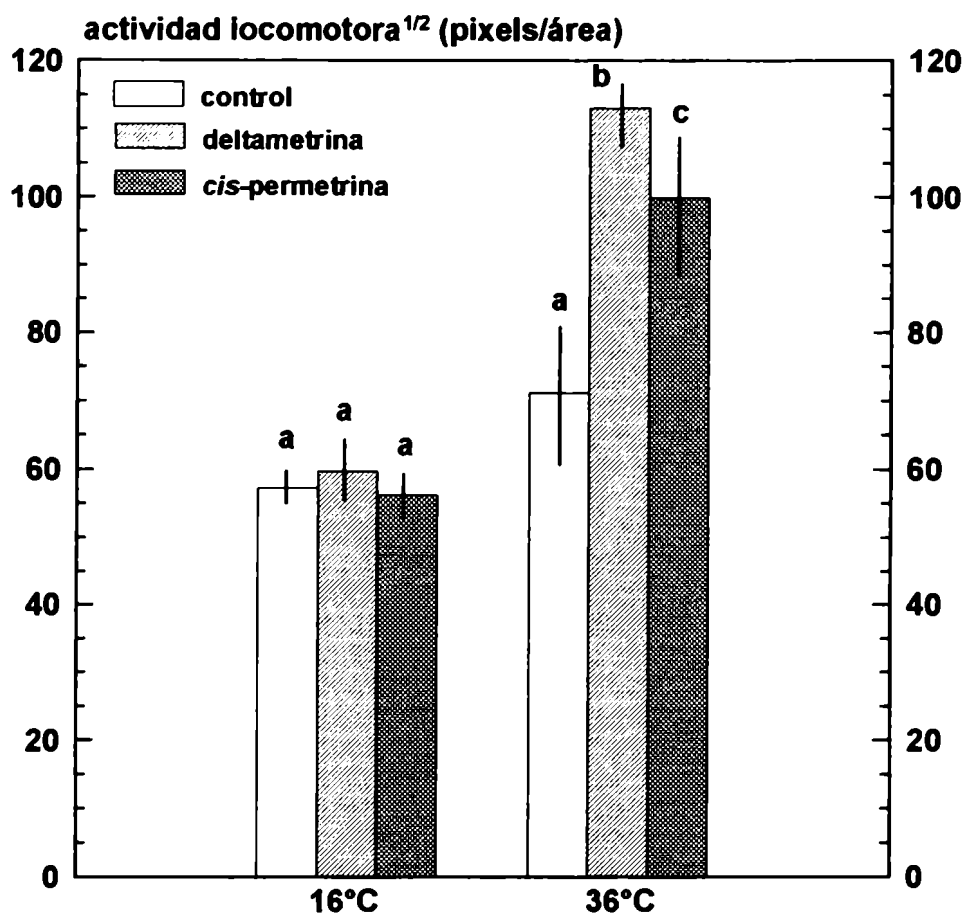


Figura 3.26. Efecto de piretroides sobre la actividad locomotora en ninfas III a 16 y 36°C. Los insectos fueron expuestos a filmes de piretroides sobre papel de filtro (14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La actividad locomotora se midió durante los 30 minutos posteriores al comienzo de la exposición. Actividad locomotora = P/A ; donde P es el número de pixels que cambiaron de estado durante la sesión (de apagado a encendido y viceversa), y A es el promedio de pixels encendidos durante la sesión (área). Dentro de cada temperatura, las barras señaladas con la misma letra no presentan diferencia significativa (Prueba de Duncan, $P > 0,05$). Cada valor representa el promedio de 4 réplicas independientes \pm DE ($n = 5$).

3. 4. EFECTOS SUBLETALES

3. 4.2. Resultados

Se evaluó el efecto de concentraciones subletales de deltametrina y *cis*-permetrina sobre la ingesta, la muda y la mortalidad de ninfas I y III. Los insectos estuvieron expuestos durante 40 días a filmes secos de los piretroides (14 ng/cm^2).

La **Tabla 3.6.** muestra los resultados en ninfas I. Ninguno de los piretroides tuvo efectos significativos sobre la relación peso preingesta/ peso posingesta (Anova; $F = 1,5$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$), el porcentaje promedio de ninfas que no se alimentaron (Anova; $F = 0,7$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$), ni el porcentaje promedio de mortalidad (Anova; $F = 0,2$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$). Hubo diferencia significativa entre los tratamientos en el porcentaje promedio de insectos mudados (Anova; $F = 10,3$; g. l. = 2, 12; $P < 0,05$). La deltametrina produjo una disminución significativa en dicho porcentaje (Prueba de Duncan, $P < 0,05$), la *cis*-permetrina no lo afectó significativamente (Prueba de Duncan, $P > 0,05$).

La **Tabla 3.7.** muestra los resultados en ninfas III. Ninguno de los piretroides tuvo efectos significativos sobre la relación peso preingesta/ peso posingesta (Anova; $F = 2,1$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$), el porcentaje promedio de ninfas que no se alimentaron (Anova; $F = 0,4$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$), el porcentaje promedio de mortalidad (Anova; $F = 1,2$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$), ni el porcentaje promedio de muda (Anova; $F = 0,1$; g. l. = 2, 12; $P > 0,05$).

3. 4.3. Discusión

Las estrategias de control de plagas se basan en la aplicación de dosis letales de insecticidas. La aplicación incorrecta, la cobertura incompleta debido a la existencia de refugios y otros lugares a donde no llegan los insecticidas, la degradación ambiental y la reinfestación pueden provocar la exposición de los

insectos a dosis subletales. El término subletal se usa comunmente para referirse a una cantidad de insecticida insuficiente para matar. Aquí lo estamos usando en un sentido amplio para mencionar dosis que no producen síntomas visibles de intoxicación.

Algunos efectos subletales conocidos de piretroides en insectos son inhibición de la alimentación (Ruscoe, 1977; Tan, 1981; Kumar and Chapman, 1984; Armstrong and Bonner, 1985; Iftner et al., 1986) y del aumento de peso (Ishaaya et al., 1983); prolongación de los períodos larval (Tan, 1981) y pupal (Kumar and Chapman, 1984); alteración de la tasa reproductiva (Kumar and Chapman, 1984; Hodges and Meik, 1985; Jackson and Wilkins, 1985); aumento o disminución de distintas actividades enzimáticas (Saleem and Shakoori, 1985; Bounias et al., 1985; Saleem and Shakoori, 1986), alteración de las concentraciones en hemolinfa de azúcares, hormonas y lípidos (Bounias et al. 1985; Saleem and Shakoori, 1986), repelencia (Ruscoe, 1977; Kumar and Chapman, 1984; Hodges and Meik, 1986); e inhibición de la comunicación química (Linn and Roelofs, 1984; Haynes and Baker, 1985; Moore, 1988).

Se propusieron tres mecanismos posibles para explicar los efectos subletales de los insecticidas (Croft, 1990): (a) efectos directos sobre el sistema nervioso, (b) efectos indirectos causados por perturbaciones en el sistema hormonal con la consiguiente alteración de los títulos de secreciones endocrinas (c) efectos directos sobre blancos no neurológicos, por ejemplo relacionados con la síntesis de proteínas. Es probable que estos tres tipos de efectos contribuyan al resultado final.

Los efectos subletales complementan la actividad insecticida de los piretroides y pueden dar un control superior al esperado en base a los valores de DE 50 obtenidos en laboratorio (Ruscoe, 1977). Una disminución de la proporción de insectos que mudan, como el que se presenta aquí en ninfas I de *T. infestans*, puede mejorar el control de las poblaciones tratadas.

3. 4.3. Tablas

tratamiento	peso_preingesta peso posingesta	% insectos que no comieron (promedio \pm DE)	% insectos que mudaron (promedio \pm DE)	% mortalidad (promedio \pm DE)
control	6,6 \pm 0,7	10,0 \pm 7,1	73,0 \pm 4,5	14,0 \pm 7,4
deltametrina	6,1 \pm 0,7	11,0 \pm 6,5	49,6 \pm 14,2*	13,0 \pm 5,6
cis-permetrina	6,2 \pm 0,4	6,0 \pm 8,2	77,0 \pm 9,7	11,0 \pm 8,9

Tabla 3.6. Ingesta, muda y mortalidad en ninfas I tratadas con concentraciones subletales de piretroides. Los insectos fueron expuestos a filmes de los insecticidas (14 ng/cm²) durante 40 días. Al cuarto día de exposición fueron alimentados sobre paloma. El valor señalado con un asterisco es significativamente diferente del control (Prueba de Duncan, $P > 0,05$). Cada valor es el promedio de 5 réplicas independientes ($n = 20$).

tratamiento	peso preingesta peso posingesta	% insectos que no comieron (promedio ± DE)	% insectos que mudaron (promedio ± DE)	% mortalidad (promedio ± DE)
control	6,0 ± 0,8	15,4 ± 12,9	74,4 ± 17,6	0
deltametrina	6,7 ± 0,8	9,8 ± 13,6	78,6 ± 20,7	3,2 ± 4,4
cis-permetrina	6,8 ± 0,7	8,4 ± 11,1	78,4 ± 12,7	1,4 ± 3,3

Tabla 3.7. Ingesta, muda y mortalidad en ninfas III tratadas con concentraciones subletales de piretroides. Los insectos fueron expuestos a filmes de los insecticidas (14 ng/cm²) durante 40 días. Al cuarto día de exposición fueron alimentados sobre paloma. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los grupos control y tratados (Prueba de Duncan y Prueba t para una muestra, $P > 0,05$). Cada valor es el promedio de 5 réplicas independientes (n = 15).

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados aquí indican que

1. Las DE 50s de deltametrina y *cis*-permetrina en ninfas III de *T. infestans* variaron en función del tiempo, pero en ningún momento fueron significativamente diferentes. Los mínimos valores de DE 50s se manifestaron 24 horas después de la aplicación de los insecticidas.
2. En ninfas III tratadas con cualquiera de los dos piretroides se manifestó el fenómeno de recuperación del volteo. Esta recuperación fue inhibida con la aplicación simultánea de butóxido de piperonilo.
3. En general, los TE 50s de deltametrina fueron menores que los de *cis*-permetrina para los efectos (a) incapacidad de abandonar un disco de papel de filtro, (b) ausencia de actividad locomotora. Esto fue así en distintos estadios ninfales, a distintas temperaturas y en un amplio rango de dosis. Cuando se hizo aplicación tópica en el extremo abdominal de las ninfas, los TE 50s de ambos piretroides fueron mayores que cuando la aplicación se hizo en el tórax.
4. Sólo el tratamiento con *cis*-permetrina produjo el síntoma de inflamamiento abdominal.
5. La temperatura tuvo un efecto importante sobre las CE 50s y DE 50s de los piretroides estudiados. En general la toxicidad aumentó al disminuir la

- temperatura; pero hubo excepciones que dependieron del insecticida, el estadio ninfal y el rango de temperatura.
6. El efecto de la temperatura sobre los TE 50s de los piretroides estudiados fue poco importante. En general la velocidad de acción aumentó al disminuir la temperatura; pero hubo excepciones que dependieron del insecticida, el estadio ninfal y el rango de temperatura.
 7. Ninfas III intoxicadas con deltametrina o β -cipermetrina sin síntomas visibles se incoordinaron al descender la temperatura, y ninfas incoordinadas dejaron de mostrar síntomas visibles al aumentar la temperatura. El primero de estos fenómenos disminuyó en función del tiempo después de la aplicación de los insecticidas.
 8. En ninfas I, el isómero *cis* de la permetrina fue más tóxico que el isómero *trans* a 26 y 36°C, e igual de tóxico a 16°C. El pretratamiento con butóxido de piperonilo synergizó la toxicidad de *cis*-permetrina pero no la de *trans*-permetrina. El pretratamiento con trifenilfosfato tuvo el efecto opuesto. La mezcla de los dos isómeros produjo un efecto de aditividad (ausencia de interacción). En ninfas III, el isómero *cis* de la permetrina fue más tóxico que el isómero *trans* a 16 y 26°C, e igual de tóxico a 36°C. Los pretratamientos con butóxido de piperonilo o trifenilfosfato no modificaron las DE 50s. La mezcla de los dos isómeros produjo un efecto de antagonismo.
 9. En experimentos con ninfas I de distintas edades y estados alimentarios, resultaron en general más sensibles los individuos de 1 día de edad, y más tolerantes los alimentados 7 días antes.
 10. Ambos piretroides produjeron hiperactividad locomotora en ninfas III. Este efecto estuvo influenciado por el modo y el lugar de aplicación de los insecticidas. La hiperactividad fue inhibida por el pretratamiento con N-etilmaleimida y por el descenso de la temperatura.

11. Ninguno de los dos insecticidas tuvo efectos subletales sobre la ingesta y la mortalidad de ninfas I y III. Sólo deltametrina produjo una disminución en la cantidad de ninfas I mudadas.

Las propiedades toxicológicas de la *cis*-permetrina la convierten en una herramienta potencial para el control de la vinchuca. En la Introducción se mencionó que existe la posibilidad de producir este piretroide en Argentina. Una de las premisas que impulsó nuestros objetivos fue que Latinoamérica debe desarrollar la tecnología necesaria para resolver sus problemas locales. Esperamos que este trabajo sea el punto de partida de logros exitosos en el área del desarrollo de nuevas estrategias para el control de vectores de la Enfermedad de Chagas.

Los resultados presentados aquí nos hacen plantear un montón de preguntas. ¿Cuáles son los mecanismos involucrados en la hiperactividad, el volteo y la muerte?, ¿o se trata de un único mecanismo?; las variaciones de temperatura ¿afectan principalmente la toxicocinética o la toxicodinámica?; ¿qué causa la toxicidad diferencial de los isómeros de permetrina?, ¿a qué nivel ocurre el antagonismo entre los isómeros?; ¿dónde se encuentran los blancos moleculares cuya interacción con los piretroides genera la hiperactividad locomotora?. Cada una de estos interrogantes es un importante desafío. Alguien dijo una vez que sólo puede hacer la pregunta correcta quien conoce buena parte de la respuesta. En los días por venir intentaremos obtener resultados que ayuden a comprender y replantear mejor estas cuestiones.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. E., and T. A. Miller. 1980. Neural and behavioral correlates of pyrethroid and DDT-type poisoning in the house fly, *Musca domestica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13: 137-147.
- Agosin, M. 1985. Role of microsomal oxidations in insecticide degradation. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.); *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Vol. 12, pp. 647-712. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Agosin, M.; A. Morello, and N. Scaramelli. 1964. Partial Characterization of the in vivo metabolites of DDT-C¹⁴ in *Triatoma infestans*. *J. Econ. Entomol.* 57: 974-977.
- Agosin, M.; N. Scaramelli; L. Gil, and M. E. Letelier. 1969. Some properties of the microsomal system metabolizing DDT in *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29: 785-793.
- Agrell, Y. P. S., and A. M. Lundquist. 1973. Physiological and biochemical changes during insect development. In: M. Rockstein (Ed.), *The physiology of insecta*, vol. 1, pp. 159-247. Academic Press, New York, USA.
- Ahmad, M. and A. R. McCaffery. 1988. Resistance to insecticides in a thailand strain of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 81: 45-48.
- Ahn, Y. J.; T. Shono, and J-I. Fukami. 1987. Effect of temperature on pyrethroid action to *kdr*-type house fly adults. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 28: 301-307.
- Alworth, W. L. 1980. *Estereoquímica y su aplicación en Bioquímica*. Alhambra, Barcelona, España.
- Anónimo. 1988. Pyrethroid insecticides in public health. *Parasitol. Today*, 4: 60-61.
- Armstrong, K. F. , and A. B. Bonner. 1985. Investigation of a permethrin-induced antifeeding effect in *Drosophila melanogaster*: an ethological approach. *Pestic. Sci.* 16: 641-650.
- Barthel, W. F. 1973. Toxicity of pyrethrum and its constituents to mammals. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 123-142. Academic Press, New York, USA.
- Benoit, M.; P. Bruneau, and C. Meinard. 1985. Comparative activity of tralomethrin and deltamethrin on *Periplaneta americana*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 26: 284-291.

- Berenbaum, M. 1986. Postingestive effects of phytochemicals on insects: on Paracelsus and plant products. In: J. R. Miller and T. A. Miller (Eds.); *Insect-plant interactions*, pp. 121-153. Springer-Verlag, New York, USA.
- Bounias, M.; N. Dujin, and D. S. Popeskovic. 1985. Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia and the gut alkaline phosphatases of honeybees. *Pestic. Biochem. Physiol.* 24: 149-160.
- Briggs, G. G.; M. Elliot; A. W. Farnham; N. F. Janes; P. H. Needham; D. A. Pulman, and S. R. Young. 1976. Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. VIII. Relation of polarity with activity in pyrethroids. *Pestic. Sci.* 7: 236-240.
- Brodie, B. B. and R. P. Maickel. 1962. Comparative biochemistry of drug metabolism. *Proc. First Internat. Pharmacol. Meet.*, vol.6, pp. 299-324. Pergamon Pres, New York, USA.
- Brooks, G. T. 1976. Penetration and distribution of insecticides. In: C. F. Wilkinson (Ed.); *Insecticide biochemistry and physiology*, pp. 3-58. Plenum Press, New York, USA.
- Burt, P. E., and R. E. Goodchild. 1971. The site of action of pyrethrin I in the nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. *Entomol. Exp. Appl.* 14: 179-189.
- Burt, P. E., and R. E. Goodchild. 1974. Knockdown by pyrethroids: its role in the intoxication process. *Pestic. Sci.* 5: 625-633.
- Busvine, J. R. 1971. A critical review of the techniques for testing insecticides. Commonwealth Agricultural Bureaux, London, UK.
- Camougis, G. 1973. Mode of action of pyrethrum on arthropod nerves. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 211-222. Academic Press, New York, USA.
- Carlomagno, M.; E. Cura; A. C. Pérez y E. Segura. Informe sobre Chagas. *Ciencia Hoy*, 1: 36-44.
- Carter, S. W. 1989. A review of the use of synthetic pyrethroids in public health and vector pest control. *Pestic. Sci.* 27: 361-374.
- Casabé, N.; F. Melgar; E. J. Wood, and E. N. Zerba. 1988. Insecticidal activity of pyrethroids against *Triatoma infestans*. *Insect Sci. Applic.*, 9: 233-236.
- Casabé, N and E. N. Zerba. 1981, Esterases of *Triatoma infestans* and its relationship with the metabolism of organophosphorus insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68: 255-258.
- Casida, J. E. 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Perspect.*, 34: 189-202.
- Chen, J. S.; C. J. Lee, M. G. Yao, and C. N. Sun. 1985. Effects of pyrethroids on knockdown and lack of coordination responses of susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 78: 1198-1202.

- Chilton, M-D; M. Koziel; T. C. Currier, and B. J. Mifflin. 1993. Bt maize for control of european corn borer. In: R. D. Lumsden and J. L. Vaughn (Eds.); Pest management: biologically based technologies, pp. 370-380. American Chemical Society, Washington, USA.
- Chou, J., and T.-C Chou. 1987. Dose-effect analysis with microcomputers. Elsevier, Cambridge, UK.
- Clements, A. N., and T. E. May. 1977. The actions of pyrethroids upon the peripheral nervous system and associated organs in the locust. Pestic. Sci. 8: 661-680.
- Coats, J. R. 1990. Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. Environ. Health Perspec., 87: 255-262.
- Croft, B. A. 1990. Arthropod biological control agents and pesticides. Wiley, New York, USA.
- Dauterman, W. C. 1983. Role of hydrolases and glutathione S-transferases in insecticide resistance. In: G. P Georghiou and T. Saito (Eds.); Pesticide resistance to Pesticides: challenges and prospects, pp. 229-247. Plenum Press, New York, USA.
- Dauterman, W. C. 1985. Insect metabolism: extramicrosomal. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.); Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology; Vol. 12, pp. 713-730. Pergamon Press, Oxford, UK.
- de Licastro, S. A.; E. N. Zerba; E. Wood, and M. I. P. de Villar. 1982. The insecticidal and anticholinesterase activities of 0,0-diethyl-0,4-(2,2-disubstituted vinyl) phenylphosphates and phosphorothioates. Pestic. Sci., 13:505-512.
- Demoute, J.-P. 1989. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. Pestic. Sci., 27: 375-386.
- Dent, D. 1991. Insect pest management. Cab, Wallingford, UK.
- Devonshire, A. L. 1989. Insecticide resistance in *Myzus persicae*: from field to gene and back again. Pestic. Sci., 26: 375-382.
- Dowd, P. F., and T. C. Sparks. 1984. Developmental changes in *trans*-permethrin and α -naphthyl acetate ester hydrolysis during the last larval instar of *Pseudoplusia includens*. Pestic. Biochem. Physiol. 21: 275-282.
- Dowd, P. F., and T. C. Sparks. 1987. Inhibition of *trans*-permethrin hydrolysis in *Pseudoplusia includens* (Walkers) and use of inhibitors as pyrethroid synergists. Pestic. Biochem. Physiol. 27: 237-245.
- Dowd, P. F. and T. C. Sparks. 1988. Relative toxicity and ester hydrolysis of pyrethroids in the soybean looper and Tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 81: 1014-1018.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple *F* tests. Biometrics 11: 1-42.

- Gammon, D. W.; M. A. Brown, and J. E. Casida. 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* 15: 181-191.
- Ebeling, W. 1974. Permeability of insect cuticle. In: M. Rockstein (Ed.); *The physiology of insecta*, vol. 6, pp. 271-343.
- Ecobichon, D. J. 1991. Toxic effects of pesticides. In: M. O. Amdur, J. Doull and C. D. Klaassen (Eds.); *Casarett and Doull's toxicology*, pp. 565-622. Pergamon Press, New York, USA.
- Elliot, M. 1989. The pyrethroids: early discovery, recent advances and the future. *Pest. Sci.*, 27: 337-351.
- Elliot, M.; A. C. Famham; N. F. Janes; P. H. Needham, and B. C. Pearson. 1967. 5-Benzyl-3-furylmethyl chrysanthemate: a new potent insecticide. *Nature*, 213: 493-494.
- Elliot, M.; A. C. Famham; N. F. Janes; P. H. Needham, and D. A. Pulman. 1974. Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature*, 248: 71-711.
- Elliot, M.; A. C. Famham; P. H. Needham; D. A. Pulman, and J. H. Stevenson. 1973. A photostable pyrethroid. *Nature*, 246: 169-170.
- Elliot, M.; N. F. Janes; E. C. Kimmel, and J. E. Casida. 1972. Metabolic fate of pyrethrin II and allethrin orally to rats. *J. Agr. Food Chem.*, 20: 300-313.
- Eto, M. 1974. *Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry*. CRC Press, Ohio, USA.
- Fahmy, M. A., and H. T. Gordon. 1965. Selective synergism of carbamate insecticides on house flies by aryloxyalkylamines. *J. Econ. Entomol.*, 58: 451-455.
- Finney, D. J. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University Press, New York, USA.
- Fontán, A. and E. N. Zerba. 1984. Integumental esteratic activity in *Triatoma infestans* and its contribution to the degradation of organophosphorus insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79: 183-188.
- Fontán, A. and E. N. Zerba. 1987. Mode of entry of insecticides in *Triatoma infestans*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 4: 313-323.
- Fontán, A. and E. N. Zerba. 1992. Influence of the nutritional state of *T. infestans* over the insecticidal activity of DDT. *Comp. Biochem. Physiol* 101C: 589-591.
- Galun, R.; E. M. Kosower, and N. S. Kosower. 1969. Effect of Methyl Phenyl diazenecarboxylate (Azoester) on the feeding behaviour of blood sucking invertebrates. *Nature* 224: 181-182.
- Gammon, D. W. 1978. Neural Effects of Allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta americana*: an investigation using defined doses at 15 and 32°C. *Pestic. Sci.* 9: 79-91.

- Gammon, D. W.; M. A. Brown, and J. E. Casida. 1981. Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* 15: 181-191.
- Gasser, C. S., and R. T. Fraley. 1992. Cultivos transgénicos. *Investigación y Ciencia* 191: 64-70.
- Gerolt, P. 1983. Insecticides: their routes of entry, mechanism of transport and mode of action. *Biol. Rev.*, 58: 233-274.
- Gilbert, L. Y., and King, D. S. 1973. Physiology of growth and development: endocrine aspects. In: M. Rockstein (de.), *The physiology of insecta*, vol. 1, pp. 249-370. Academic Press, New York, USA.
- Grafius, E. 1986. Effects of temperature on pyrethroid toxicity to colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, 79: 588-591.
- Gualtieri, J. M.; M. Nelson, and J. A. Cichero. 1985. Presente y perspectiva del control químico. En: R. U. Carcavallo; J. E. Rabinovich, y R. J. Tonn; *Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas*, pág. 319-329. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Servicio Nacional de Chagas y Ministerio de Salud y Acción Social de la República Argentina; Buenos Aires, Argentina
- Gualtieri, J. M.; C. H. Ríos; J. A. Cichero; R. Váez, and R. U. Carcavallo. 1984. Ensayo de campo con decametrina en su formulación líquido emulsionable y floable en el control del *Triatoma infestans* en la provincia de Córdoba. *Chagas*, 1: 17-20.
- Hackman, R. H., and Goldberg, M. 1987. Comparative study of some expanding cuticles: the relation between composition, structure and function. *J. Insect Physiol.* 33: 39-50.
- Hayes, W. J. 1975 *Toxicology of pesticides*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Haynes, K. F., and T. C. Baker. 1985. Sublethal effects of permethrin on the chemical communication system of the pink bollworm moth, *Pectinophora gossypiella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2: 283-293.
- Head, S. W. 1973. Composition of pyrethrum extract and analysis of pyrethrins. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 25-53. Academic Press, New York, USA.
- Hill, I. R. 1989. Aquatic organisms and pyrethroids. *Pestic. Sci.*, 27: 429-458.
- Hillerton, J. E. 1978. Changes in the structure and composition of the extensible cuticle of *Rhodnius prolixus* through the 5th larval instar. *J. Insect Physiol.* 24: 399-412.
- Hirano, M. 1989. Characteristics of pyrethroids for insect pest control in agriculture. *Pestic. Sci.*, 27: 353-360.
- Hodges, R., and J. Meik. 1986. Lethal and sublethal effects of permethrin on Tanzanian strains of *Tribolium castaneum* (Herbst), *Gnatocerus maxillosus* (F.),

Sitophilus oryzae (L.) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Insect Sci. Applic. 7: 533-537.

- Hodgson, E., and L. G. Tate. 1976. Cytochrome P450 interactions. In: C. F. Wilkinson (Ed.); Insecticide biochemistry and physiology, pp. 115-148. Plenum Press, New York, USA.
- Holan, G.; D. F. O'Keefe; C. Virgona, and R. Walser. 1978. Structural and biological link between pyrethroids and DDT in new insecticides. Nature, 272: 734-736.
- Iftner, D. C.; F. R. Hall, and M. M. Sturm. 1986. Effects of residues of fenvalerate and permethrin on the feeding behavior of *Tetranychus urticae* (Koch). Pestic. Sci. 17: 242-248.
- Inglesfield, C. 1989. Pyrethroids and terrestrial non-target organisms. Pestic. Sci., 27: 387-429.
- Insausti, T. 1994. Nervous system of *T. infestans*. J. Morphol. 221: 343-359.
- Ishaaya, I., and J. Casida. 1983. Pyrethroid detoxification and synergism in insects. In: J. Miyamoto and P. C. Kearmye (Eds.); Pesticide chemistry, human welfare and the environment; vol. 3, pp. 307-310. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Ishaaya, I.; A. Elsner; K. R. Simon Ascher, and J. Casida. 1983. Synthetic pyrethroids: toxicity and synergism on dietary exposure of *Tribolium castaneum* (Herbst) larvae. Pestic. Sci. 14: 367-372.
- Jacoby, W. B. 1980. Detoxication enzymes. In: W. B. Jacoby (Ed.); Enzymatic basis of detoxication, pp. 1-6. Academic Press, New York, USA.
- Jackson, A. E. M., and R. M. Wilkins. 1985. The effect of sub-lethal dosages of the synthetic pyrethroid fenvalerate on the reproductive rate of the aphid *Myzus persicae*. Pestic. Sci. 16: 364-368.
- Klaassen, C. D., and D. L. Eaton. 1991. Principles of toxicology. In: M. O. Amdur, J. Doull and C. D. Klaassen (Eds.); Casarett and Doull's toxicology, pp. 565-622. Pergamon Press, New York, USA.
- Klassen, W. 1995. World Food Security up to 2010 and the global pesticide situation. In: N. N. Ragsdale; P. C. Kearney, and J. R. Plimmer; Eighth international congress of pesticide chemistry; pp. 1-32. American Chemical Society, Washington, USA.
- Koyama, N., and K. Kurihara. 1971. Modification by chemical reagents of proteins in the gustatory and olfactory organs of the fleshfly and cockroach. J. Insect Physiol. 17: 2435-2440.
- Kumar, K., and R. B. Chapman. 1984. Sublethal effects of insecticides on the diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). Pestic. Sci. 15: 344-352.
- Lehninger, A. L. 1981. Bioquímica. Omega, Barcelona, España.

- Linn, C. E., Jr., and W. L. Roelofs. 1984. Sublethal effects of neuroactive compounds on pheromone response thresholds in male oriental fruit moths. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1: 331-344.
- Lund, A. E. 1985. Insecticides effects on the nervous system. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.); *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Vol. 12, pp. 203-216. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Maddrell, S. H. P. 1966. Nervous control of the mechanical properties of the abdominal wall at feeding in *Rhodnius*. *J. Exp. Biol.* 44: 59-68.
- Maddrell, S. H. P., and J. E. Casida. 1971. Mechanism of insecticide-induced diuresis in *Rhodnius*. *Nature.* 231: 55-56.
- Malkenson, N. C. de; E. J. Wood, and E. N. Zerba. 1984. Isolation and characterization of an esterase of *Triatoma infestans* with a critical role in the degradation of organophosphorus esters. *Insect Biochem.*, 14: 481-486.
- Matsumura, F. 1975. *Toxicology of insecticides*. Plenum Press, New York, USA.
- McLaughlin, G. A. 1973. History of pyrethrum. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 3-15. Academic Press, New York, USA.
- Metcalf, R. L. 1975. Pest management strategies for the control of insects affecting man and domestic animals. In: R. L. Metcalf and W. H. Luckman (Eds.); *Introduction to Insect pest management*, pp. 529-564. Wiley, New York, USA.
- Metcalf, R. L. 1989. Insect resistance to insecticides. *Pestic. Sci.*, 26: 333-358.
- Miller, T. A., and M. E. Adams. 1982. Mode of action of pyrethroids. In: J. R. Coats (Ed.); *Insecticide mode of action*, pp. 3-27. Academic Press, New York, USA.
- Moncayo, A. 1993. Chagas disease. In: World Health Organization (Ed.); *Tropical disease research, Progress 1991-1992*; pp. 67-75. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Moore, R. F. 1988. Inhibition of chemical communication between male and female bollworms (Lepidoptera: Noctuidae) by sublethal amounts of permethrin. *J. Econ. Entomol.* 81: 78-82.
- Mrak, E. M. 1973. Advantages and disadvantages of pyrethrum. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 307-311. Academic Press, New York, USA.
- Nakatsugawa, T. and M. A. Morelli. 1976. Microsomal oxidation and insecticide metabolism. In: C. F. Wilkinson (Ed.); *Insecticide biochemistry and physiology*, pp. 61-114. Plenum Press, New York, USA.
- Napolitano, L.M.; S. C. Ford, and L. Tompkins. 1986. The effects of developmental and experimental temperature on responses of *Drosophila melanogaster* adults to sucrose. *J. Insect Physiol.* 11: 937-940.

- Naumann, K. 1990. Synthetic pyrethroid insecticide. In: W. S. Bowers, W. Ebing, D. Martin and R Wegler (Eds.); Chemistry of plant protection, Vol. 4. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Norris, D. M.; S. M. Ferkovich; J. E. Baker; J. M. Rozental, and T. K. Borg. 1971. Energy transduction in quinone inhibition of insect feeding. *J. Insect Physiol.* 17: 85-97.
- Oliveira Filho, A. M. 1994. Techniques for the entomological evaluation of the control of chagas disease vectors. *Acta Toxicol. Argentina* 2: 52- 55.
- Oppenhoorth, F. J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.); *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; Vol. 12, pp. 731-773. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Osborne, M. P., and D. R. Pipper. 1992. Mechanisms of *kdr* and *super-kdr* resistance. In: C. A. Mullin and J. G. Scott (Eds.); *Molecular mechanisms of insecticide resistance*, pp. 71-89. American Chemistry Society, Washington, USA.
- Pauron, D.; M. Amichot, and J-B. Berge. 1992. Voltage-dependent sodium channels in susceptible and pyrethroid-resistant *Drosophila* strains. In: I. Denholm; A. L. Devonshire, and D. W. Hollomon; *Resistance 91, Achievements and developments in combating pesticide resistance*, pp. 228-239. Elsevier, London, UK.
- Picollo, M. Y.; E. Seccacini; C. Vassena, and E. Zerba. 1993. Feeding and mating deterrence by sulphhydryl reagents in *Triatoma infestans*. *Acta Tropica* 52: 297-307.
- Pillmore, R. E. 1973. Toxicity of pyrethrum to fish and wildlife. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 143-165. Academic Press, New York, USA.
- Pinchin, R.; A. M. de Oliveira Filho, and A. C. B. Pereira. 1980. The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Pastrongilus megistus*, a vector of Chagas's disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 691-694.
- Repetto, M. 1988. *Toxicología fundamental. Científico-médica*, Madrid, España.
- Reynolds, S. E. 1975. The mechanism of plasticization of the abdominal cuticle in *Rhodnius*. *J. Exp. Biol.* 62: 81-98.
- Ruigt, G. S. F. 1985. Pyrethroids. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.); *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; vol. 12, pp 183-262. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Ruscoe, C. N. E. 1977. The new NRDC pyrethroids as agricultural insecticides. *Pestic. Sci.* 8: 236-242.
- Saleem, M. A., and A. R. Shakoori. 1985. Effects of permethrin and deltamethrin on some biochemical components of *Tribolium castaneum* larvae. *Pakistan J. Zool.* 17: 321-328.
- Saleem, M. A., and A. R. Shakoori. 1986. Biochemical effects of sublethal doses of cypermethrin on the sixth-instar larvae of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 27: 101-105.

- Salgado, V. L.; S. N. Irving, and T. A. Miller. 1983. The importance of nerve terminal depolarization in pyrethroid poisoning of insects. *Pestic. Biochem. Physiol.* 20: 169-182.
- Sawicki, R. M. 1962. Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house fly. III. Knock-down and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. *J. Sci. Food Agric.* 13: 283-292.
- Schmidt, C. D., and J. L. Robertson. 1986. Effects of treatment technique on response of horn flies (Diptera: Muscidae) to permethrin at different temperatures. *J. Econ. Entomol.*, 79: 684-687.
- Schofield, C. J. 1994. *Triatominae, biología y control*. Eurocommunica, Sussex, UK.
- Schouest, L. P., Jr., and T. A. Miller. 1988. Factors influencing pyrethroid toxicity in pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae): implications for resistance management. 81: 431-436.
- Scott, J. G.; and G. P. Georghiu. 1984. Influence of temperature on knockdown, toxicity, and resistance to pyrethroids in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 21: 53-62.
- Shimada, Y.; A. Shiraishi; H. Kijima, and H. Morita. 1972. Effects of sulphydryl reagents on the labellar sugar receptor of the fleshfly. *J. Insect Physiol.* 18: 1845-1855.
- Shono, T; K. Ohsawa, and J. Casida. 1979. Metabolism of *trans*- and *cis*-permethrin, *trans*- and *cis*-cypermethrin, and decamethrin by microsomal enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 316-325.
- Singer, G.; J. M. Rozental, and D. M. Norris. 1975. Sulphydryl groups and the quinone receptor in insect olfaction and gustation. *Nature* 256: 222-223.
- Sipes, I. G. and A. J. Gandolfi. 1991. Biotransformation of toxicants. In: M. O. Amdur, J. Doull and C. D. Klaassen (Eds.); *Casarett and Doull's toxicology*, pp. 88-126. Pergamon Press, New York, USA.
- Sívori, J. L. 1993. Regulación de la glutatión S-transferasa de *Triatoma infestans* y su importancia en el proceso de intoxicación por insecticidas organofosforados. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Soderlund, D. M.; J. R. Sanborn, and P. W. Lee. 1983. Metabolism of pyrethrins and pyrethroids in insects. In: D. H. Hutson and T. R. Roberts (Eds.); *Progress in pesticide biochemistry and toxicology*, vol. 3, pp. 401-435. Wiley, New York, USA.
- Sokal, R. R., and F. J. Rohlf. 1981. *Biometry*. Freeman, San Francisco, USA.
- Sparks, T. C.; Pavloff, A. M.; R. L. Rose, and D. F. Clower. 1983. Temperature-toxicity relationship of pyrethroids on *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:

- Noctuidae) and *Anthonomus grandis grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). J. Econ. Entomol., 76: 243-246.
- Sparks, T. C.; Shour, M. H.; and E. G. Wellemeyer. 1982. Temperature-toxicity relationships of pyrethroids on three lepidopterans. J. Econ. Entomol., 75: 643-646.
 - Tabashnik, B. E.; N. L. Cushing, and M. W. Johnson. 1987. Diamond moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation and cross resistance. J. Econ. Entomol. 80: 1091-1099.
 - Tan, K. -H. 1981. Antifeeding effect of cypermethrin and permethrin at sub-lethal levels against *Pieris brassicae* larvae. Pestic. Sci. 12: 619-626.
 - Tan, K. -H. 1982. Irritation response to temperature after sub-lethal action of pyrethroids against cabbage white caterpillars *Pieris Brassicae*. Entomol. Exp. Appl. 32: 151-154.
 - Terriere, L. C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. Ann. Rev. Entomol., 29: 71-88.
 - Thaug, M., and P. J. Collins. 1986. Joint effects of temperature and insecticides on mortality and fecundity of *Sitophilus oryzae* (coleoptera: Curculionidae) in wheat and maize. J. Econ. Entomol., 79: 909-914.
 - Toth, Jr; S. J., and T. C. Sparks. 1988. Influence of treatment technique on the temperature-toxicity relationships of *cis*- and *trans*-permethrin in the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 81: 115-118.
 - Toth, Jr; S. J., and Sparks, T. C. 1990. Effect of temperature on toxicity and knockdown activity of *cis*-permethrin, esfenvalerate, and λ -cyalothrin in the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol., 83: 342-346.
 - Uchitel, D. P. 1990. GraphPad Instat 2.0. GraphPad Software, Irvine, USA.
 - Udagawa, T; S. Numata; K. Oda; S. Shiraishi; K. Kodaka, and K. Nakatani. 1985. A new type of synthetic pyrethroid insecticide. In: N. F. Janes (Ed.); Recent advances in the chemistry of insect control, pp 192-204. Royal Society of Chemistry, Dorchester, UK.
 - Uehara, S., and H. Morita. 1972 The effects of temperature on the labellar chemoreceptors of the blowfly. J. Gen. Physiol. 59: 213-226.
 - Vijverberg, H. P. M. and J. van den Bercken. 1990. Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. Critical Rev. Toxicol., 21: 105-126.
 - Villar, M. I. P. de; E. J. Wood; E. N. Zerba; S. A. de Licastro, and N. Casabé. 1980. Cholinesterase and eserine resistant esterases in the developing embryo of *Triatoma infestans* and its role as targets for inhibition in the ovicide action of parathion. Comp. Biochem. Physiol. 67: 55-59.
 - Villet, R. H. 1974. Involvement of amino and sulphhydryl groups in olfactory transduction in silkmoths. Nature 248: 707-709.

- Wadleigh, R. W.; P. G. Koehler; H. K. Preisler; R. S. Patterson, and J. L. Robertson. 1991. Effect of temperature on the toxicities of ten pyrethroids to german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, 84: 1433-1436.
- Wallace, G.; N. Casabé; E. Wood, and E. Zerba. 1988. Assay of pyrethroid-hydrolysing esterases using (1,R)-*cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylates as substrates. *Xenobiotica*, 18: 351-355.
- Watters, F. L.; N. D. G. White, and D. Coté. 1983. Effect of temperature on toxicity and persistence of three pyrethroid insecticides applied to fir plywood for the control of the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.*, 76: 11-16.
- Welling, W. 1979. Toxicodynamics of the insecticidal action: an introduction. *Pestic. Sci.*, 10: 540-546.
- Welling, W. and G. D. Paterson. 1985. Toxicodynamics of insecticides. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (Eds.); *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*; vol. 12, pp. 603-645. Pergamon Press, Oxford, UK.
- [WHO] World Health Organization. 1991. Control of Chagas disease, Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilkinson, C. F. 1976. Insecticide interactions. In: C. F. Wilkinson (Ed.); *Insecticide biochemistry and physiology*, pp. 605-647. Plenum Press, New York, USA.
- Williams, C. H. 1973. Tests for possible teratogenics, carcinogenics, mutagenics and allergenic effects of pyrethrum. In: J. E. Casida (Ed.); *Pyrethrum*, pp. 167-176. Academic Press, New York, USA.
- Wood, E. J.; M. I. P. de Villar, and E. N. Zerba. 1985. Role of a microsomal carboxylesterase in reducing the action of malathion in eggs of *Triatoma infestans*. *Pest. Biochem. Physiol.*, 23: 24-32.
- Wood, E.; S. A. de Licastro, N. Casabé, J. Sívori, and E. Zerba. 1993. Evaluation of the flushing-out activity of pyrethroids on *Triatoma infestans*. *Insect Sci. Applic.* 14: 651-655.
- Wood, E. J.; E. N. Zerba; M. I. Picollo y N. Casabé. 1992. TIP: formulado de insecticidas no contaminante y de alta seguridad para el control de vinchucas. Resúmenes del VIII Congreso Argentino de Toxicología, p. 84. Buenos Aires, Argentina.
- Wood, E. J.; M. I. Picollo de Villar, y E. N. Zerba. 1993. Comparación entre la variación de la capacidad detoxificante y la diferente susceptibilidad al insecticida malatión entre ninfas V de distinta edad de *T. infestans*. *An. Asoc. Quím. Argent.* 81: 153-162.
- Yadwad, V. B., and V. L. Kallapur. 1988. Influence of temperature on knock-down and mortality to fenitrothion in the three lepidopteran species of insects. *Insect Sci. Applic.*, 9: 531-534.

- Yu, S. J. 1983. Age variation in insecticide susceptibility and detoxification capacity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol. 76: 219-222.
- Zerba, E. 1988. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. Parasitol. Today 4: 53-57.
- Zerba, E. N. 1989. Chemical control of Chagas Disease Vectors. Biomed. Environ. Sci. 2:24-29.
- Zerba, E. 1995. Fumigant canister and other novel insecticide formulations. Public Health 12: 62-68.
- Zerba, E. N.; F. Melgar, and E. J. Wood. 1982. Sublethal effect of lindane in vapor phase on the respiratory activity of *Triatoma infestans* (Hemiptera) as a cause of synergism in fumigants. Abstracts of the Fifth international congress of pesticide chemistry (IUPAC), Iva-11. Kyoto, Japan.
- Zerba, E. N.; F. Melgar; G. Wallace; E. Wood; S. A. de Licastro, y M. I. P. de Villar. 1988. Nuevas formulaciones fumígenas para el control de vectores de la enfermedad de Chagas. Chagas, 5: 2-7.

