

Tesis Doctoral

Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control

Moretti, Ariadna Noelia

2015-04-14

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:

Moretti, Ariadna Noelia. (2015-04-14). Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Moretti, Ariadna Noelia. "Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-14.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre
vectores de Chagas y su posible uso como herramientas
de control**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Ariadna Noelia Moretti

Director: Dr. Raúl Adolfo Alzogaray

Director Asistente: Dra. Valeria Sfara

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Reboreda

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas
(CIPEIN-UNIDEF-CITEDEF/CONICET), Villa Martelli, Buenos Aires

Buenos Aires, abril de 2015

Fecha de defensa: 14/4/2015

"El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.

Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos" Albert Einstein

Agradecimientos

✓ A las instituciones que financiaron este trabajo, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); al Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF), espacio verde que agradezco haber tenido la oportunidad de llamar mi lugar de trabajo; a la Universidad de Buenos Aires (UBA), donde me vengo formando con mucho gusto y agradecimiento desde que terminé mis estudios secundarios y al Centro de Referencia de Vectores (Santa María de Punilla, Córdoba), que me proveyó de gran cantidad de material todo este tiempo y donde me recibieron, guiaron y asistieron para llevar a cabo ensayos de semi-campo.

✓ A todos los que compartieron conmigo los últimos cuatro años de trabajo: con mates, bizcochitos o charlas de chat; trabajando a la par con bioensayos o escribiendo; con desayunos, almuerzos, reuniones, despedidas, clases de maestría, cursos, o congresos; a los que me enriquecieron la tesis y los que me enriquecieron el corazón; a los que hablamos más, debatimos, filosofamos, hasta discutimos y a los que compartimos silencios; a los que ya se fueron, los que apenas llegan, los que siempre estuvieron... todos fueron grandes compañeros y grandes maestros.

✓ A todos los animales de los que hice uso (y abuso) durante esta tesis doctoral, parte de la compasiva naturaleza de la que somos solo un punto consciente más; con la sincera intención de, en un futuro, ser parte de algún proceso de multiplicación de vida.

✓ A todos los que insistieron, confiaron y me hicieron creer a mí también, que podía finalizar esto.

✓ A todos los que aplaudieron cada pequeño, hasta mínimo, logro, por darme impulso con su entusiasmo.

✓ A todos los que, en simultáneo, caminaron conmigo otras sendas de conocimiento y me ayudaron a poner amor en mi trabajo, fortalecer mis decisiones, tener fe, equilibrio y sobre todo, sonreír.

✓ A los seres de luz y gurús, distantes o muy cercanos, siempre presentes.

"Hay una fuerza matriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad" A. E.

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	8
Glosario.....	10
1. Introducción	
1.1. Los aceites esenciales y sus componentes.....	11
1.1.1. Características, origen y propiedades.....	11
1.1.2. Composición.....	12
1.1.3. Efectos insecticidas letales y subletales.....	16
1.1.4. Modo y sitio de acción.....	19
1.1.5. Justificación del uso de insecticidas naturales.....	21
1.2. Enfermedad de Chagas.....	25
1.2.1. Etiología y sintomatología.....	25
1.2.2. Vectores.....	25
1.2.3. Situación en América del Sur.....	29
1.2.4. Control químico en Argentina.....	32
1.2.5. Monitoreo y diagnóstico de infestación.....	34
1.3. Justificación de los objetivos elegidos.....	37
1.4. Objetivos.....	40
1.4.1. Objetivo General.....	40
1.4.2. Objetivos Específicos.....	40
2. Materiales y Métodos.....	42
2.1. Material biológico.....	42
2.2. Reactivos.....	45

2.2.1. Controles positivos.....	45
2.2.2. Monoterpenos.....	48
2.2.3. Otros.....	49
2.3. Actómetro.....	51
2.4. Bioensayos.....	54
2.4.1. Descripción de los síntomas visibles de intoxicación...	54
2.4.2. Repelencia.....	54
2.4.3. Volteo.....	57
2.4.3.1. Por exposición a superficies tratadas.....	57
2.4.3.2. Por aplicación tópica.....	58
2.4.4. Actividad locomotora.....	59
2.4.5. Expurgue.....	60
2.4.5.1. Bioensayos de laboratorio.....	60
2.4.5.2. Bioensayos de semi-campo.....	64
2.5. Resumen de los bioensayos realizados.....	67
2.6. Análisis de datos.....	68
3. Resultados.....	70
3.1. Síntomas visibles de intoxicación.....	72
3.2. Repelencia.....	75
3.2.1. 1,8-Cineol.....	75
3.2.2. Diez monoterpenos alcoholes.....	77
3.3. Volteo.....	81
3.3.1. 1,8-Cineol.....	81
3.3.1.1. Por exposición a superficies tratadas.....	81

3.3.1.2. Por aplicación tópica.....	84
3.3.2. Diez monoterpenos alcoholes.....	86
3.4. Actividad locomotora.....	88
3.4.1. 1,8-Cineol.....	88
3.4.2. Diez monoterpenosalcoholes.....	90
3.4.3. En ninfas del quinto estadio.....	95
3.5. Expurgue producido por monoterpenos en <i>T. infestans</i>.....	99
3.5.1. Expurgue en condiciones de laboratorio.....	99
3.5.2. Expurgue en condiciones de semi-campo.....	105
4. Discusión.....	108
4.1. Síntomas visibles de intoxicación.....	108
4.2. Repelencia.....	109
4.3. Volteo.....	113
4.4. Actividad locomotora.....	119
4.5. Expurgue.....	121
5. Conclusiones.....	126
6. Bibliografía.....	130
7. Anexos.....	148
7.1. Anexo 1. Ciclo de vida de triatominos.....	148
7.2. Anexo 2. Familias de plantas que biosintetizan los monoterpenos evaluados.....	150
7.3. Anexo 3. Trabajos publicados en revistas internacionales como resultado de esta tesis	152

Efectos letales y subletales de monoterpenos sobre vectores de Chagas y su posible uso como herramientas de control

El control de vectores de la Enfermedad de Chagas se realiza en Argentina mediante la aplicación de insecticidas piretroides. En las últimas décadas, la aparición del fenómeno de resistencia a los piretroides y la necesidad de identificar sustancias menos peligrosas para los humanos y el ambiente, motivaron la búsqueda de alternativas naturales para el desarrollo de nuevas herramientas de control y diagnóstico entomológico (presencia de insectos vectores en viviendas). El objetivo de esta tesis doctoral fue explorar la bioactividad de sustancias de origen natural sobre los triatomíneos vectores de la Enfermedad de Chagas *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*. Para tal fin se evaluaron los síntomas visibles de intoxicación, la repelencia, el volteo, el efecto sobre la actividad locomotora y la capacidad expurgante, de once monoterpenos componentes de aceites esenciales (el éter cíclico 1,8-cineol, también conocido como eucaliptol, y diez alcoholes).

Se describieron por primera vez en insectos los síntomas visibles de intoxicación por exposición a un monoterpeno (1,8-cineol). En ambas especies, este monoterpeno produjo síntomas similares a los que ocasionan insecticidas neurotóxicos como organofosforados y piretroides, y se registró por primera vez el fenómeno de distensión abdominal en insectos expuestos a un monoterpeno.

Se evaluó por primera vez en triatomíneos la repelencia producida por los monoterpenos de origen botánico carvacrol, (-)-carveol, 1,8-cineol, citronelol, eugenol, linalool, mentol, α -terpineol, timol y (S)-*cis*-verbenol. La mayoría de los monoterpenos mostró un buen efecto repelente, similar al de la dietiltoluamida (DEET).

La toxicidad de los once monoterpenos, aplicados como filmes sobre papel de filtro, siguió la tendencia observada por otros autores en otros insectos: fueron menos tóxicos que los insecticidas convencionales; el timol se destacó de los demás monoterpenos por su mayor toxicidad y las moléculas cíclicas fueron más tóxicas que las lineales. Cuando se aplicó en forma tópica en ninfas del primer estadio de ambas especies, el 1,8-cineol presentó una toxicidad muy baja en comparación con la de deltametrina, siguiendo también la tendencia esperable. La aplicación conjunta de BP no sinergizó la toxicidad de este monoterpeno.

Se cuantificó por primera vez el efecto de monoterpenos sobre la actividad locomotora en triatomíneos. En ambas especies, la deltametrina no resultó hiperactivante para el primer estadio (por esta razón, la deltametrina fue utilizada como control positivo) pero hiperactivó al quinto estadio (a concentraciones varios órdenes de magnitud menores que los monoterpenos). En el primer estadio de ambas especies, la mayoría de los once monoterpenos mostró efecto hiperactivante a partir de una concentración tres órdenes de magnitud superior a la del control positivo. Eugenol, 1,8-cineol, linalool,

mentol, α -terpineol y timol resultaron buenos hiperactivantes y, por tanto, fueron seleccionados para su evaluación en ninfas del quinto estadio. Linalool y mentol hiperactivaron solamente al quinto estadio de *T. infestans*; 1,8-cineol y α -terpineol, solamente al quinto estadio de *R. prolixus*.

Se evaluó por primera vez la capacidad de expurgue de monoterpenos en triatominos. Los monoterpenos que hiperactivaron a las ninfas del quinto estadio de *T. infestans* (linalool y mentol), también resultaron expurgantes. El linalool se destacó como expurgante en condiciones de laboratorio, si bien fue necesario aplicar una concentración trescientas veces mayor para obtener un tiempo equitóxico al del control positivo (tetrametrina). Al aplicar linalool y mentol, las ninfas abandonaron los refugios a una tasa aproximadamente constante a lo largo de treinta minutos. El eugenol, en cambio, presentó una dinámica de expurgue particular: en promedio cerca del 40% de las ninfas fue expurgado en menos de cuatro minutos y este valor se mantuvo constante hasta el fin del tiempo experimental. Los bioensayos de expurgue en condiciones de semi-campo, si bien preliminares, permitieron observar el fenómeno en condiciones más cercanas al futuro campo de aplicación de estos compuestos y alientan a continuar explorando la potencialidad de linalool, eugenol y sus mezclas como potenciales principios activos de un formulado expurgante.

Los resultados de esta tesis apoyan la idea de que el desarrollo de herramientas para el monitoreo y control de triatominos con monoterpenos es factible. Sería de gran valor continuar esta línea de investigación mediante el estudio de diferentes formulaciones (incluyendo el agregado de sinergistas) de los monoterpenos destacados (fundamentalmente 1,8-cineol, eugenol, linalool y timol) y los métodos de aplicación más eficaces para cada caso (repelencia, volteo o expurgue).

Palabras clave: monoterpenos, 1,8-cineol, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, repelencia, volteo, actividad locomotora, expurgue.

Lethal and sublethal effects of monoterpenes on vectors of Chagas disease and its possible use as control tools

Vector control of Chagas disease in Argentina is performed by applying pyrethroid insecticides. In recent decades, the emergence of the phenomenon of resistance to pyrethroids and the need to identify less hazardous substances for human and the environment, led to the search for natural alternatives for the development of new control and entomological diagnosis (presence of insect vectors in houses) tools. The aim of this PhD thesis was to explore the bioactivity of natural substances on the triatomines, Chagas' Disease vectors, *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. To this end, the visible symptoms of intoxication, the repellency, the knock-down, the effect on locomotor activity and the flushing-out capacity of eleven monoterpenes components of essential oils (the cyclic ether 1,8-cineole, also known as eucalyptol, and ten alcohols), were evaluated.

The visible symptoms of intoxication of insects exposed to a monoterpene (1,8-cineole) were, for the first time, described. On both species, this monoterpene produced symptoms resembling the ones caused by neurotoxic insecticides like organophosphorates and pyrethroids, and the phenomenon of abdomen distension in insects exposed to a monoterpene, was for the first time registered.

The repellency produced by the monoterpenes of botanical origin carvacrol, (-)-carveol, 1,8-cineole, citronellol, eugenol, linalool, menthol, α -terpineol, thymol y (S)-*cis*-verbenol; was for the first time evaluated. The majority of the monoterpenes showed a good repellent effect, similar to the one of diethyl toluamide (DEET).

The toxicity of the eleven monoterpenes, applied as films on filter papers, followed the tendency observed by other authors on other species: they were less toxic than conventional insecticides, thymol highlighted because of its higher toxicity and cyclic molecules were more toxic than linear ones. When applied topically on first instar nymphs of both species, 1,8-cineole presented a very low toxicity compared to the one of deltamethrin, also following the expected tendency. The joint application of BP did not synergize the toxicity of these monoterpene.

The locomotor activity of monoterpenes in triatomines was for the first time quantified. On both species, tetramethrin did not result hyperactivant for first instars (for this reason, deltamethrin was used as positive control) but hyperactivated fifth instars (at concentrations several order of magnitude lower than the ones for monoterpenes). The majority of the evaluated monoterpenes on first instar nymphs of both species showed hyperactivant effect from a concentration three orders of magnitude superior to the one of positive control. Eugenol, 1,8-cineole, linalool, menthol, α -terpineol and thymol resulted good

hyperactivants and, because of that, were chosen for evaluation on fifth instars. Linalool and menthol hyperactivated only fifth instars of *T. infestans*, 1,8-cineole and α -terpineol only fifth instars of *R. prolixus*.

The flushing-out capacity of monoterpenes on triatomines was for the first time evaluated. The monoterpenes which hyperactivated fifth instars of *T. infestans* (linalool y menthol), also showed flushing-out effect. Linalool highlighted as flushing-out agent in lab conditions, although it was necessary to apply a concentration three hundred times higher to obtain an equitoxic time to positive control (tetramethrin). Applying linalool and menthol, nymphs left their refuge at a rate aproximatly constant during thirty minutes. Eugenol, in contrast, presented a particular flushing-out dynamic: a percentage of near 40% of the nymphs was flushed-out in less than four minutes and this value kept constant till the end of the experimental time. The semi-field flushing-out bioassays, although preliminary, allowed to observe the phenomenom in conditions more close to the future field of application of these compounds and so encourage to continue exploring the potential of linalool, eugenol and their mixes as potential active ingredients of a flushing-out formulate.

The results of this thesis support the idea that the development of control and monitoring tools for triatmines with monoterpenes is feasible. It would be valuable to continue this line of research by studying different formulations (including the addition of synergists) of the highlighted monoterpenes (mainly 1,8-cineole, eugenol, linalool and thymol) and the methods of application more accurate for each case (flushing-out, repellence or knock-down).

Keywords: monoterpenes, 1,8-cineole, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, repellency, knock-down, locomotor activity, flushing-out.

Glosario

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (Argentina)

ANOVA: análisis de varianza

ANPCyT: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina)

ACh: acetilcolina

AChasa: acetilcolinesterasa

BP: butóxido de piperonilo

CABA: Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina)

CD: Coeficiente de Distribución

CDC: Centers of Disease Control and Prevention (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Estados Unidos)

CIPEIN: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (Argentina)

CL₅₀: concentración letal para el 50% de la población expuesta

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina)

DDVP: diclorvos

DEET: *N, N*-dietil-*m*-toluamida

DL₅₀: dosis letal para el 50% de la población expuesta

EE: error estándar

EPA: Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental, Estados Unidos)

FDA: Food and Drug Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos, Estados Unidos)

FIFRA: Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (Ley Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas; Estados Unidos)

GRAS: generally recognized as safe (generalmente reconocido como seguro)

IC95: intervalo de confianza del 95%

LSD: least significance difference (mínima diferencia significativa)

TE₅₀: tiempo de expurgue para el 50% de la población expuesta

TV₅₀: tiempo de volteo para el 50% de la población expuesta

TV₉₅: tiempo de volteo para el 95% de la población expuesta

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPs: organofosforados

OPS: Organización Panamericana de la Salud

PM: peso molecular

PNCh: Programa Nacional de Chagas (Argentina)

PV: presión de vapor

RUP: restricted used pesticide (pesticida de uso restringido)

"La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general, pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible para todos." A. E.

1. Introducción

1.1. Los aceites esenciales y sus componentes

1.1.1. Características, origen y propiedades

Las plantas aromáticas y sus extractos comenzaron a ser explotados con fines terapéuticos, litúrgicos, cosméticos y culinarios hace milenios (Lawless, 1995). El primer aparato destilador para su extracción se halló en el oeste de Pakistán y data del 3.000 AC. Los rituales de extracción y uso de sustancias aromáticas de origen botánico constituyen parte vital de la tradición de la mayoría de las culturas ancestrales, siendo mencionados en la literatura de Egipto (papiros, 3.000 AC; sobre los que se basaron los perfumistas griegos que a su vez inspiraron a los romanos), India (*Rig Veda*, 2.000 AC) y China (*Libro amarillo de medicina interna del Emperador*, 2.000 AC). Las grandes culturas americanas prehispánicas (incas, aztecas y mayas) también hacían uso ritual de aromáticas nativas (Lawless, 1995).

Estos compuestos aromáticos son metabolitos secundarios de las plantas terrestres que, por sus características como defensas contra patógenos y herbívoros, fueron seleccionados a través de procesos coevolutivos (Isman y Akhtar, 2007). Algunos metabolitos secundarios constituyen mezclas llamadas aceites esenciales. Son líquidos volátiles raramente coloreados, liposolubles, biosintetizados por una gran cantidad

de familias botánicas generalmente de regiones templadas o cálidas, con olores y sabores característicos (Bakkali et al. 2008) (ver Anexo 1). Su síntesis está asociada con la presencia de estructuras secretoras específicas de cada familia: tricomas glandulares, cavidades secretoras, conductos de resina; y su almacenamiento se realiza en diferentes estructuras anatómicas: flores, hojas, madera, cáscara o interior de frutos, rizomas, semillas (Regnault-Roger et al. 2012).

Algunos aceites esenciales poseen propiedades analgésicas, anestésicas, antibióticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antioxidantes, acaricidas, fungicidas, nematocidas o insecticidas (Bakkali et al. 2008).

1.1.2. Composición

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas de fenoles y terpenoides (mono [C10] y sesquiterpenos [C15] de bajo peso molecular, derivados estructurales del isopreno [Figura 1]) (Isman y Machial, 2006). Habitualmente están constituidos por 20-80 fitoquímicos: dos o tres se encuentran en concentraciones mayoritarias (20-70%) y el resto está presente en trazas (Regnault-Roger et al. 2012).

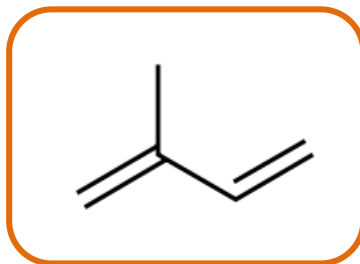
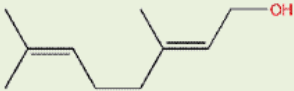
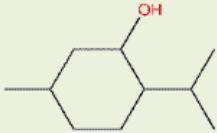
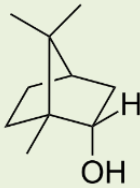
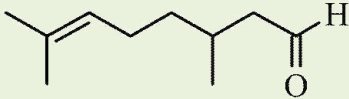
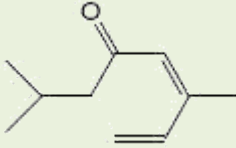
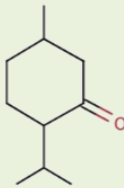



Figura 1.1. Estructura química del isopreno.

La composición de un aceite esencial depende de factores como el estado fenológico y la sanidad de la planta, la estructura anatómica de la que se extrae, el método de extracción, la época del año, la composición del suelo, las condiciones climáticas y la zona geográfica (Bakkali et al. 2008; Tripathi et al. 2009; Nerio et al. 2010; Regnault-Roger et al. 2012). También varía ampliamente entre diferentes especies de plantas, e incluso dentro de una misma especie existen los llamados “quimiotipos” (representados por compuestos mayoritarios diferentes) (Regnault-Roger et al. 2012).

Según su estructura química, los monoterpenos que componen los aceites esenciales pueden ser monocíclicos (hexaciclos saturados como el mentol, o insaturados como el carvacrol), bicíclicos (como el 1,8-cineol) o acíclicos (como el geraniol); y presentan todo tipo de grupos funcionales: además de alcoholes y éteres (como los evaluados en esta tesis), existen aldehídos (como el citronelal), cetonas (como la mentona) e hidrocarburos simples (como el pineno) (Figura 1.2.). Se caracterizan por una alta presión de vapor (Tisserand y Balacs, 2014) y su proporción en un aceite esencial depende de la temperatura, el ritmo circadiano y el estadio de la planta (Regnault-Roger et al. 2012).

Grupo funcional	Estructura	Ejemplo
Alcohol	Acíclica	 <p>Geraniol</p>
	Monocíclica	 <p>Mentol</p>
	Bicíclica	 <p>Borneol</p>
Aldehído	Acíclica	 <p>Citronelal</p>
Cetona	Acíclica	 <p>Tagetona</p>
	Monocíclica	 <p>Mentona</p>
	Bicíclica	 <p>Canfor</p>

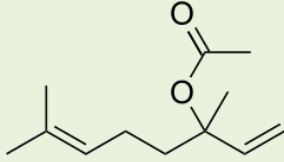
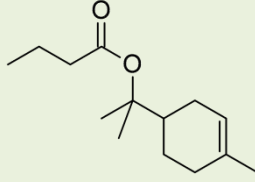
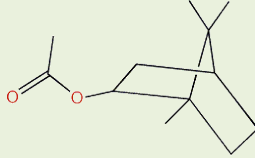
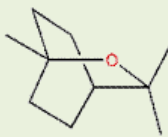
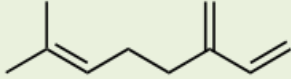
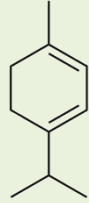
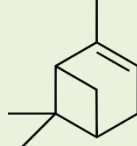
Éster	Acíclica	 Acetato de linalilo
	Monocíclica	 Acetato de terpinilo
	Bicíclica	 Acetato de isobornilo
Éter		 1,8-cineol
Sin grupos funcionales (hidrocarburos simples)	Acíclica	 Mirceno
	Monocíclica	 Terpineno
	Bicíclica	 Pineno

Figura 1.2. Clasificación de los monoterpenos según su estructura química.

1.1.3. Efectos insecticidas letales y subletales

El uso específico de extractos botánicos para el control de plagas agrícolas comenzó al menos dos milenios atrás en Egipto, India, China y Grecia. En Europa y Norteamérica, su uso documentado se extiende por más de ciento cincuenta años.

Los aceites esenciales, tradicionalmente utilizados como insecticidas en la región Mediterránea y el Sudeste Asiático, son uno de los cuatro principales tipos de compuestos botánicos usados actualmente para el control de insectos, junto al piretro, la rotenona y el aceite de nim (Isman, 2006). Algunos de estos aceites están ampliamente reconocidos como muy poco tóxicos para especies que no son plagas, así como “ambientalmente amigables”, debido a su rápida degradación ambiental (Isman, 2000).

Entre los componentes de los aceites esenciales, los monoterpenos han sido objeto de abundante investigación en las últimas décadas por su baja toxicidad en mamíferos, baja residualidad ambiental (Isman, 2000) y amplio espectro de actividad insecticida, documentada sobre coleópteros plaga de granos almacenados (Park et al. 2003, Sahaf et al. 2008), dípteros (Tarelli et al. 2009, Santos et al. 2011), cucarachas (Appel et al. 2001, Jang et al. 2005, Alzogaray et al. 2011), hormigas carpinteras (Jang et al. 2005), piojos (Tolozá et al. 2006) y triatominos (Fournet et al. 1996, Laurent et al. 1997, Abramson et al. 2007, Sfara et al. 2009).

Además de los efectos letales, también se les han registrado diversos efectos subletales en varias especies de insectos: efecto antialimentario

(Hummelbrunner e Isman, 2001, Petrakis et al. 2005), pérdida de peso (Karr et al. 1990), reducción de la supervivencia y de la tasa de oviposición (Yang et al. 2010) y reducción en las tasas de eclosión, pupación y emergencia de adultos (Zahran y Abdelgaleil, 2011).

Entre los efectos subletales de los aceites esenciales y sus componentes, la repelencia sigue siendo, desde hace décadas, un tópico de gran interés. Un repelente es una sustancia que induce, en los organismos que lo perciben, una quimiotaxis negativa; es decir, hace que se alejen de la fuente que produce el estímulo (Dethier et al. 1960). Los repelentes de artrópodos son productos químicos usados principalmente para prevenir las picaduras de organismos hematófagos (Katz et al. 2008), pero también para alejar a los insectos de productos alimenticios almacenados (Wong et al. 2005).

A mediados del siglo XX, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos desarrolló para el ejército de ese país el repelente sintético de amplio espectro *N,N*-dietil-*m*-toluamida (DEET). La amplia eficiencia de la DEET no ha sido superada por ninguno de los compuestos naturales estudiados hasta ahora, ya sea porque el efecto *per se* de estas sustancias es más débil, o porque es menos prolongado. Ocasionalmente, la DEET afecta la piel humana (inflamación, picazón, irritación) y el sistema nervioso (convulsiones, especialmente en niños) (Osimitz et al. 2010), lo cual podría deberse a su capacidad de inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa (ACh) (Corbel et al. 2009). Teniendo en cuenta estos efectos indeseados, existe una constante búsqueda de nuevos repelentes y las plantas han

probado ser un buen lugar en donde buscar (Isman, 2006-2010; Nerio et al. 2010; Sritabutra et al. 2011). En Estados Unidos está aprobada la comercialización de más de treinta productos repelentes de insectos que contienen aceites esenciales (principalmente de cedro, citronela, eucalipto, geraniol y soja) o algunos de sus componentes (Xue et al. 2007). En Argentina, el Instituto Nacional de Alimentos (una dependencia de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica), aprobó la comercialización de numerosos productos repelentes de insectos que contienen aceites esenciales de citronela, eucalipto o lavanda (ANMAT, 2012).

Otro efecto subletal de particular interés para el control de insectos de hábitos nocturnos y/o huidizos, es el fenómeno de expurgue: la salida de los insectos de su refugio como consecuencia de una hiperactivación locomotora (quinesis no direccional que solo depende de la intensidad del estímulo). Hace ya casi setenta años, en uno de los primeros ensayos de insecticidas sobre triatomíneos, se observó la inducción de movimientos erráticos e involuntarios por el tratamiento con piretro (Busvine y Barnes, 1947). Más tarde, la hiperactivación locomotora fue reconocida como el primer síntoma de intoxicación con piretroides en los insectos (Gammon et al. 1978; Miller et al. 1982; Alzogaray et al. 1997). Desde entonces, este fenómeno se ha utilizado para provocar que los insectos abandonen sus refugios con dos objetivos: a) aumentar la exposición a un insecticida más tóxico aplicado simultáneamente; b) diagnosticar el grado de infestación de las viviendas (establecer si una vivienda está infestada o no y también

evaluar la eficiencia de un tratamiento de control) (Pinchin et al. 1980; Wood et al. 1993).

1.1.4. Modo y sitio de acción

Debido a la alta volatilidad de sus componentes, la actividad insecticida de los vapores emitidos por los aceites esenciales, y por lo tanto su ingreso por las vías inhalatorias, ha recibido particular atención (Choi et al. 2003). Aceites esenciales como los de árbol de té, eucalipto, geranio, mato, mejorana, menta, naranja, lavanda, palo de rosa y poleo; y monoterpenos como anisol, eucaliptol, limoneno, linalool, mentil acetato, α -terpineol y timol, han sido reportados como efectivos insecticidas en fase vapor (Choi et al. 2003; Jang et al. 2005; Toloza et al. 2006; Lucia et al. 2009; Tarelli et al. 2009). Estas sustancias suelen ser menos efectivas que el organofosforado diclorvós (DDVP), habitualmente usado como insecticida de referencia (control positivo) (Rice y Coats, 1994a; Yi et al. 2007; Alzogaray et al. 2011).

Cuando son aplicados por contacto, es decir exponiendo los insectos a superficies tratadas o mediante aplicación tópica, la toxicidad de los aceites esenciales o de sus componentes aislados es baja comparada con la de insecticidas sintéticos (Isman, 2000; Sfara et al. 2009).

Los aceites esenciales pueden estar constituidos por docenas de sustancias; por esta razón, cabría esperar que presenten múltiples modos de acción (Grodnitzky y Coats, 2002).

Solo se han reunido evidencias acerca del modo de acción de unos pocos monoterpenos. El eugenol y el α -terpineol inhiben el receptor de octopamina en la cucaracha *Blattella germanica* (Enan, 2001) y el timol y el carvacrol inhiben el receptor de la tiramina en *Drosophila melanogaster* (Enan, 2005). La octopamina y la tiramina son aminas biogénicas exclusivas de invertebrados que cumplen el rol de la adrenalina y la noradrenalina, funcionando como neurotransmisores, neurohormonas y neuromoduladores (Klowden, 2007).

Algunos monoterpenos inhiben la actividad acetilcolinesterasa (AChasa), indispensable para el normal funcionamiento del mecanismo de transmisión nerviosa a nivel sináptico en vertebrados e invertebrados (Klowden, 2007).

El 1,8-cineol inhibe la AChasa de gorgojos (Kostyukovsky et al., 2002) y de piojos (Picollo et al. 2008), pero las concentraciones necesarias para alcanzar un alto grado de inhibición son varios órdenes de magnitud superiores que las de inhibidores clásicos de esta actividad, como los organofosforados y los carbamatos. Estos resultados sugieren que la acetilcolina, enzima responsable de la actividad AChasa, no sería el sitio de acción primario de este y otros monoterpenos que arrojaron resultados similares. También se ha sugerido que la cadena respiratoria, los canales iónicos mitocondriales y el receptor del ácido γ -aminobutírico podrían ser sitio de acción de algunos monoterpenos (Rattan, 2010).

Dado que en muchos casos las moléculas biosintetizadas por las plantas constituyen defensas físico-químicas específicas contra los insectos,

estos han ido desarrollando, en el proceso coevolutivo, mecanismos de detoxificación para una amplia gama de moléculas. A fin de comenzar a dilucidar la vía metabólica que transforma particularmente la molécula del 1,8-cineol en insectos, en esta tesis se evaluó si el butóxido de piperonilo (BP), que afecta la vía de detoxificación por oxidasas de acción múltiple ya que es inhibidor del citocromo P450, sinergiza su acción insecticida por aplicación tópica.

1.1.5. Justificación del uso de insecticidas naturales

Durante la segunda mitad del siglo veinte, el uso indiscriminado de insecticidas sintéticos (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) colaboró con la contaminación ambiental y la pérdida de biodiversidad producida por las actividades humanas. También hizo evidentes los efectos indeseados de los insecticidas sobre la salud humana (Alavanja et al. 2004; Rattner, 2009). Al mismo tiempo, el fenómeno de resistencia (capacidad de una población de insectos para tolerar dosis más altas de insecticidas que las que toleraba hasta el momento, fenómeno pre-adaptativo y heredable) comenzó a registrarse en muchas poblaciones de insectos plaga (Parakrama Karunaratne, 1998). El reconocimiento de estos problemas trajo aparejada la prohibición o la restricción en el uso de muchos de estos compuestos. Por todo lo anterior, es esencial la búsqueda de alternativas naturales y en este contexto, los aceites esenciales constituyen una valiosa opción ya que muchos de sus componentes son considerados insecticidas de riesgo mínimo de acuerdo a la sección 25(b)

del Acta Federal de Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas de los Estados Unidos (FIFRA) (Tabla 1.1.).

Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre con los insecticidas sintéticos, hasta el momento no se han reportado efectos tóxicos crónicos de importancia para ningún monoterpeno (Tisserand y Balacs, 2014).

	Toxicidad aguda (<i>DL</i> ₅₀ : g/kg de peso corporal)	Toxicidad local	Efectos mutagénicos/carcinogénicos
(-)-Carveol	Oral en ratas: 3 Dérmica en conejos: > 5	Irritante dérmico leve	No muestra
1,8-Cineol	Oral en ratas: 2,48 Dérmica en conejos: 5	Irritante y sensibilizador dérmico leve	No muestra
Carvacrol	Oral en ratas: 0,81 Dérmica en conejos: > 5	Despreciable	Podría ser genotóxico pero sólo a altas concentraciones (efecto dosis-dependiente). Se ha registrado actividad anticarcinogénica.
Citronelol	Oral en ratas: 3,45 Dérmica en conejos: 2,65	Alergénico de bajo riesgo	No muestra
Eugenol	Oral en ratas: 2,68 Bajas concentraciones son hepatoprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias mientras que a altas concentraciones los efectos se revierten	Irritante dérmico moderado	No muestra. Existen evidencias de su acción antimutagénica, antiangiogénica y anticancerígena
Geraniol	Oral en ratas: 3,6-4,8 Dérmica en conejos: > 5	Sensibilizador dérmico muy leve	No muestra. Se registran efectos antitumorales
Linalool	Oral en ratas: 2,79 Dérmica en conejos: 5,61	Despreciable	No muestra. Se demostró su actividad anticancerígena

Mentol	Oral en ratas: 3,18 Dérmica en conejos: > 5 La inhalación de líquidos mentolados puede ser peligrosa en niños.	No muestra	No muestra
α-Terpineol	Oral en ratas: 4,3 Dérmica en conejos: > 3	Despreciable	No muestra
Timol	Oral en ratas: 0,98 Dérmica en conejos: -	Despreciable	No muestra. Se registran efectos antigenotóxicos y anticancerígenos dosis-dependientes
(S)-cis-Verbenol	Oral en ratas: > 5 Dérmica en conejos: -	Irritante dérmico leve	No muestra
Organofosforados (OPs)	Oral en ratas: 0,0012-7,7 Dérmica en ratas: 0,0024-4 Intoxicación aguda: náuseas, incoordinación, dolor de cabeza, visión borrosa, sudoración, dificultad para respirar, bradicardia. Dosis muy altas: incontinencia, inconsciencia, convulsiones, muerte	Irritantes dérmicos y oculares. A concentraciones muy altas provocan quemaduras	Mutagénicos, posibles carcinogénicos humanos

Tabla 1.1. Toxicidad en mamíferos de los monoterpenos evaluados en esta tesis (Dikshith, 1991; Belsito et al. 2008; Tisserand y Balacs, 2014). Con fines comparativos, en la última fila se incluyen datos de los insecticidas organofosforados.

1.2. Enfermedad de Chagas

1.2.1. Etiología y sintomatología

La Enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una infección parasitaria conocida desde 1909, cuando fue descrita íntegramente (parásito, vector, reservorios, ciclos y enfermedad) por el médico brasileño Carlos Chagas (Argolo et al. 2007), quien la descubrió por casualidad mientras combatía la malaria en un poblado amazónico (Coutinho y Pinto Dias, 1999). El parásito que la causa es el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Tabla 1.2.).

1.2.2. Vectores

Todos los vectores de *T. cruzi* son insectos hematófagos heterópteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, un linaje restringido geográficamente a América, que probablemente haya emergido simultáneamente con la formación del continente (Stevens et al. 2011). Reciben diversos nombres populares según el país: vinchuca (desde Ecuador a Patagonia), chipo (Venezuela), pito (Colombia) y barbeiro (Brasil), entre otros. Si bien se conocen 118 especies, los principales vectores pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Pastrongylus* (Ministerio da Saúde, 2005). La mayoría de las especies descritas tienen hábitos nocturnos y permanecen durante el día agregadas en sus refugios, en estado de aquinesis (Lorenzo y Lazzari, 1998).

El desmonte llevado a cabo en los últimos siglos dio lugar a un nuevo escenario para los vectores: los nichos naturales se vieron

empobrecidos y reemplazados por nichos antrópicos. Así, esta enzootia que llevaba miles de años existiendo y evolucionando en un ciclo silvestre, se convirtió rápidamente en una antropozoonosis (Coura, 2007). La importancia de las diferentes especies como vectores depende de factores como el ecotopo preferido, la adaptación a las estructuras domésticas, el grado de antropofilia, el momento de alimentación, la capacidad dispersora y la ventana temporal entre alimentación y defecación (Coura, 2007).

T. infestans se encuentra principalmente domiciliada, persistiendo aún focos silvestres solo en Bolivia, y es el vector de Chagas más importante en Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay y Perú (Stevens et al. 2011). *R. prolixus* es el vector más importante en Colombia, Venezuela y parte de Centroamérica (Schofield, 1994). Este insecto es un modelo clásico de entomofisiología. A partir de los estudios pioneros realizados por el entomólogo y fisiólogo Vincent B. Wigglesworth (1899-1994) en la década de 1930, *R. prolixus* ha sido objeto de extensos estudios bioquímicos, moleculares, fisiológicos y de comportamiento (Wigglesworth, 1972).

La presencia de los vectores de la Enfermedad de Chagas se asocia con viviendas precarias, de adobe, con abundante oferta de potenciales refugios (grietas en el adobe, intersticios en techos contruidos con ramas), en las que suelen cohabitar personas, animales domésticos y aves de corral. El paisaje general de las áreas chagásicas está caracterizado por un patrón de pobreza, falta de desarrollo rural y/u organización política y social (Spillman et al. 2013).

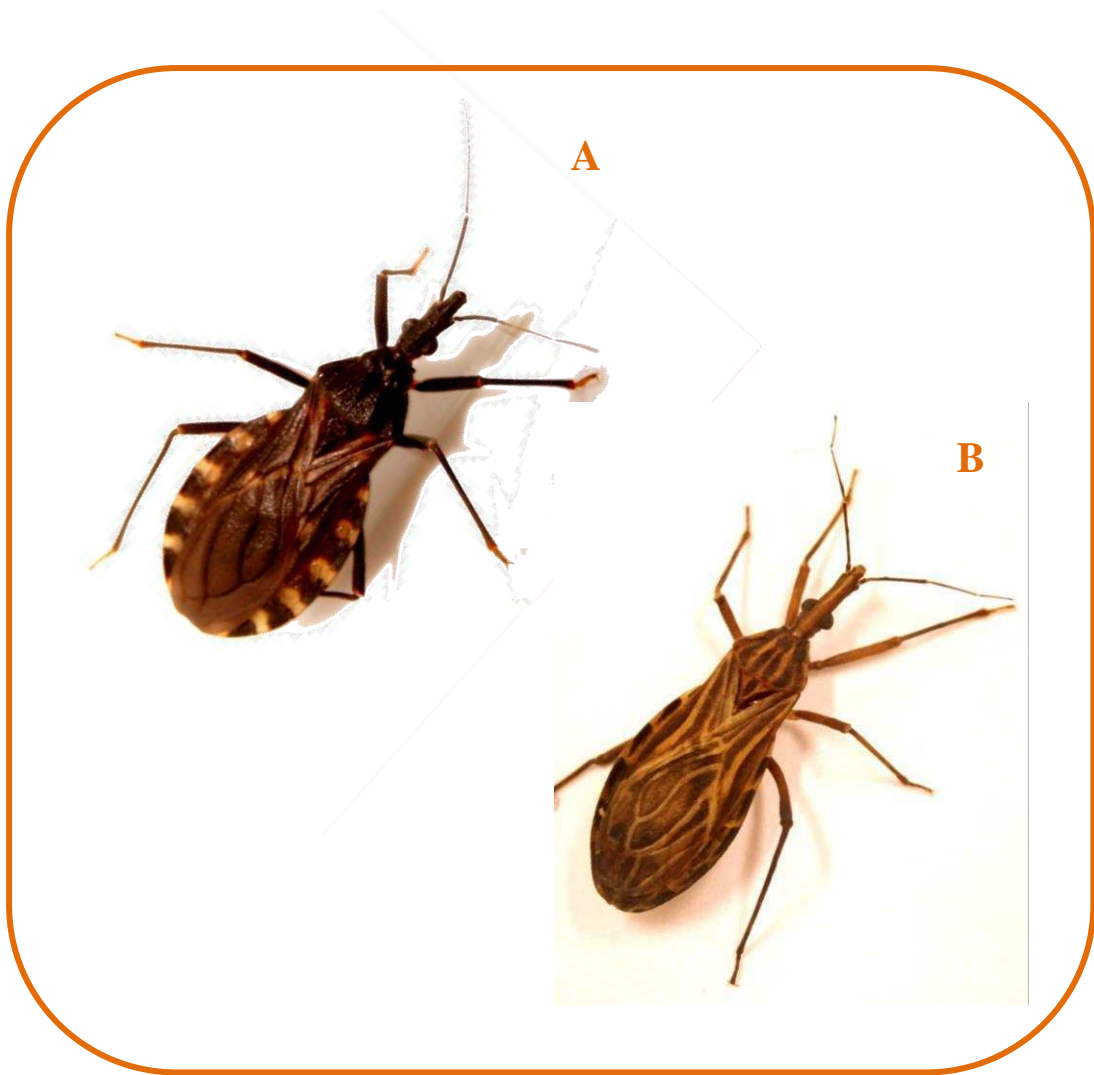


Figura 1.5. Adultos de *T. infestans* (A) y *R. prolixus* (B), vectores de la Enfermedad de Chagas evaluados en esta tesis.

Agente etiológico	Reservorios	Modo de transmisión	Síntomas
<p>Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), protozooario flagelado. En vertebrados se presenta como tripomastigota en sangre, amastigota en tejidos. En los invertebrados (insectos vectores) los tripomastigotas sanguíneos se transforman en epimastigotas, que después se diferencian en tripomastigotas metacíclicas, formas infectantes acumuladas en las heces.</p>	<p>Además de los humanos, todo tipo de mamíferos silvestres son naturalmente infectados por <i>T. cruzi</i>.</p> <p>Los más importantes epidemiológicamente son aquellos que cohabitan con los humanos: gatos, perros, ratas, chanchos, cabras, chivos, tatúes.</p> <p>Aves y reptiles, si bien hospedadores del vector, son refractarios a la infección y reciben en conjunto el nombre de reservorios.</p>	<p>Primariamente vectorial (por medio de insectos hematófagos que adquirieron el <i>T. cruzi</i> al alimentarse de mamíferos ya infectados). El insecto defeca mientras se alimenta o inmediatamente después de hacerlo. Al rascarse la picadura (o tocarse mucosas o heridas), el hospedador introduce la forma infectante del parásito en su torrente sanguíneo (la picadura en sí misma no produce infección).</p> <p>Menos frecuentemente, el Chagas se adquiere por transfusión sanguínea, de forma oral, congénita (por placenta), por manejo de animales silvestres y domésticos, a través de la ingesta de carne cruda infectada, trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio/hospitalarios y por leche materna.</p>	<p>Fase aguda: se manifiesta solo en el 1-5% de los casos, en las primeras semanas después de la picadura. Se caracteriza por signos inespecíficos: fiebre leve, anorexia, diarrea, cefalea, tos, vómitos, inflamación de los ganglios linfáticos, aumento del tamaño del bazo y el hígado y/o alteraciones cardíacas. El punto de ingreso del parásito puede presentar una importante inflamación cutánea (chagoma de inoculación o signo de Romaña cuando es ocular). Esta fase suele durar 4-8 semanas y existen medicamentos que permiten la curación si se aplican en este momento de la infección.</p> <p>Fase indeterminada: sin manifestaciones clínicas, puede durar años.</p> <p>Fase crónica: se manifiesta en aproximadamente el 30% de los pacientes, usualmente unos 10 años después de la infección inicial (aunque puede llegar a demorar hasta 30-40 años). Se caracteriza por miocardiopatías (taquicardia, bradicardia, dolores, paro cardíaco) y/o patologías del aparato digestivo (constipación, dificultad para tragar, etc.) de diferentes grados de severidad. También se pueden ver lesionados el sistema nervioso y linfático.</p> <p>Aunque siempre se consideró que los medicamentos usados durante la fase aguda no surtían efecto si se aplicaban en la fase crónica, estudios recientes parecen indicar lo contrario.</p>

Tabla 1.2. Etiología y sintomatología de la Enfermedad de Chagas (Argolo et al. 2007; CDC, 2004; Ministerio da Saúde, 2005).

1.2.3. Situación en América del Sur

El Chagas es una de las endemias más expandidas en América Latina. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que en todo el mundo, pero principalmente en América Latina, unos diez millones de personas se encuentran infectadas (Ministerio de Salud, 2014).

Se transmite localmente en Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guayana Francesa, Honduras, Méjico, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Venezuela y, ocasionalmente, Estados Unidos; coincidiendo con la distribución natural de los vectores adaptados a las viviendas humanas (CDC, 2004).

En 1991, la OMS inició la Iniciativa del Cono Sur, que logró interrumpir la transmisión en Uruguay (1997) y Chile (1999), y disminuirla considerablemente en Brasil (Moncayo, 2003). En años posteriores se iniciaron iniciativas análogas en los países andinos, en centroamérica y en los estados amazónicos de Brasil pero la transmisión aún persiste en todos ellos (Gimenez y Mitelman, 2010).



Figura 1.3. Iniciativas continentales para el control de los principales vectores de la Enfermedad de Chagas asociados al hábitat humano (Guhl, 2009).

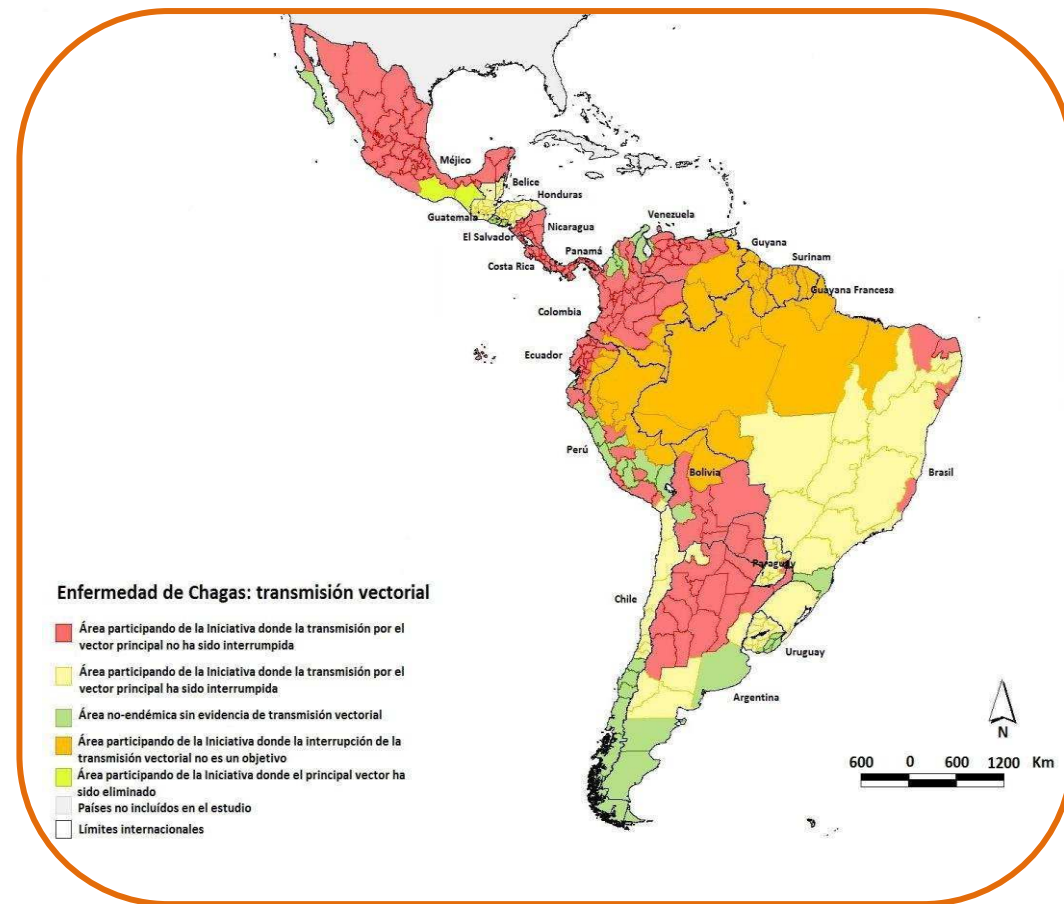


Figura 1.4. Distribución de la Enfermedad de Chagas (OPS, 2014).

La prevalencia, la incidencia y la mortalidad de la enfermedad están sujetas a fluctuaciones constantes como consecuencia del impacto de los programas de control, los flujos migratorios y los cambios en las condiciones socio-económicas de la población (Moncayo, 2003).

Se estima que en Argentina existen 2.300.000 personas infectadas (7,2 % de la población total) y 7.300.000 habitan en áreas endémicas, valores que la convierten en la mayor endemia del país (Gimenez y Mitelman, 2010). El Programa Nacional de Chagas del Ministerio de Salud de la Nación (PNCh) está integrado por veintitrés estados provinciales y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) en un área endémica (definida por la presencia de *T. infestans*) de 516.379 viviendas, mayoritariamente rurales y periurbanas. La región de mayor endemidad histórica se encuentra en el Noroeste y el Centro de Argentina, con una superficie que abarca 1.045.087 km² y comprende a trece de los diecinueve estados provinciales endémicos respecto a la presencia del vector (Spillman et al. 2013).

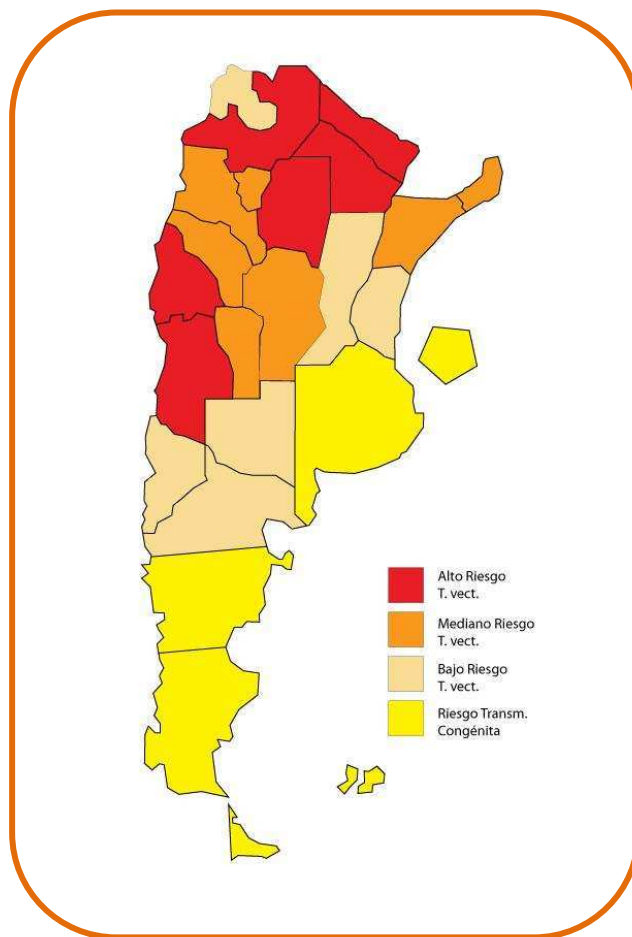


Figura 1.5. Situación de riesgo de transmisión de la Enfermedad de Chagas en Argentina (Ministerio de Salud, 2014).

1.2.4. Control químico en Argentina

Las estrategias adoptadas para concretar la interrupción de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas en América Latina se sustentan principalmente en el control de los triatomíneos vectores mediante la aplicación de formulaciones insecticidas (Zerba, 1997-1999a,b). El control se divide en dos fases: ataque y vigilancia. Durante el ataque, los equipos profesionales rocían las viviendas con formulaciones líquidas de cianopiretroides; en la vigilancia, se registra el grado de infestación domiciliar y se evalúa la eficiencia de los tratamientos aplicados.

A partir de 2000 se observó una tendencia creciente en el número de casos agudos vectoriales en el país debido a la disminución de las actividades de control del vector (la tasa anual de rociado con insecticidas bajó de 140.000 viviendas en 1994, a menos de 65.000 entre 1998 y 2008) y a la baja cobertura de las acciones sostenidas de vigilancia (menos del 40% de las viviendas del área endémica), todo esto a consecuencia de reducciones de presupuesto y de la capacidad operativa del PNCh por déficit de recursos humanos y materiales, y una gestión inadecuada (Ministerio de Salud, 2014). Otros factores que contribuyeron al recrudecimiento de la endemia fueron la crisis socioeconómica de 2001, la insuficiente atención al problema y a la promoción y la prevención en los sistemas de salud, y los cambios de gestión en los programas (Ministerio de Salud, 2014). Con el propósito de revertir esta situación y contribuir a disminuir la morbilidad y mortalidad de la enfermedad y su impacto socioeconómico, el PNCh elaboró el PNCh 2011-2016. En la elaboración de esta iniciativa participaron los respectivos programas provinciales, expertos nacionales e internacionales, sociedades científicas, organizaciones de la sociedad civil, universidades y la OPS. Actualmente, las provincias de Chaco, Formosa, Salta, Santiago del Estero, San Juan y Mendoza presentan una re-emergencia de la transmisión vectorial del Chagas debido a un aumento de la infestación domiciliaria y a una alta seroprevalencia en grupos vulnerables. Catamarca, Córdoba, Corrientes, La Rioja, San Luis y Tucumán, muestran una situación de riesgo intermedio, con un índice de re-infestación mayor al 5% en algunos departamentos, e

insuficiente cobertura de vigilancia en algunos casos. En 2012, Misiones y Santa Fe lograron certificar la interrupción de la transmisión vectorial por *T. infestans*, mientras que Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Neuquén y Río Negro la recertificaron. Buenos Aires, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego no presentan riesgo vectorial, pero las veinticuatro jurisdicciones poseen riesgo de transmisión congénita derivado de las migraciones internas e internacionales de países vecinos con elevada endemicidad (Ministerio de Salud, 2014).

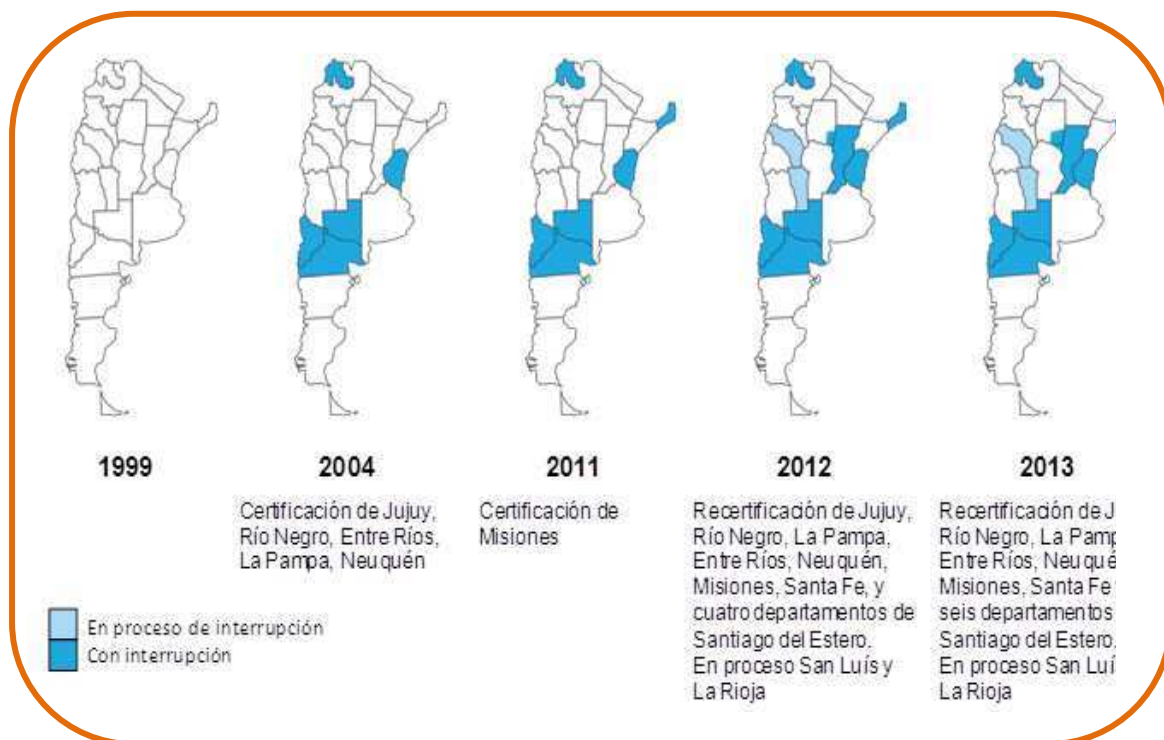


Figura 1.6. Evolución del área con interrupción de transmisión vectorial del Chagas en Argentina (Spillman et al. 2013).

1.2.5 Monitoreo y diagnóstico de infestación

Realizadas las acciones de control con insecticidas, si no existen otras medidas posteriores, la reinfestación domiciliar se produce muy rápidamente (Gürtler et al. 2007). Contar con datos precisos de abundancia y distribución de los vectores es de vital importancia para la diagramación

y actualización constante de las estrategias regionales de control. Por este motivo, los métodos de detección de triatomíneos con fines de diagnóstico son motivo permanente de estudio y búsqueda de alternativas (Gürtler et al. 1999). El método de diagnóstico comúnmente usado por el personal del PNCh es el mismo desde hace décadas: una búsqueda activa de triatomíneos durante una hora/hombre con o sin la aplicación previa de un formulado en aerosol de tetrametrina 0,2% como expurgante (Schofield, 1978; Gürtler et al. 1993; Rabinovich et al. 1995). Una vivienda se considera positiva (infestada) cuando el evaluador encuentra en ella adultos, ninfas, huevos, exuvias o rastros recientes de excrementos de triatomíneos. La acción de la tetrametrina sobre *T. infestans* fue estudiada por primera vez en el CIPEIN (Casabé et al. 1988). Es un piretroide de primera generación, de baja toxicidad en triatomíneos, pero con acción hiperactivante. Estudios realizados años más tarde, también en el CIPEIN, demostraron que el efecto hiperactivante de la tetrametrina es bajo comparado con el de otros piretroides (Alzogaray et al. 1997). Por otro lado, dado que los evaluadores entomológicos aplican en el campo cantidades subjetivas de tetrametrina, a pesar de su baja toxicidad, en algunos casos puede provocar el volteo de los insectos antes de que se produzca el expurgue (Nelson, 1988), lo cual podría llevar a subestimar la abundancia y disminuye la probabilidad de captura de individuos sanos para su posterior estudio (EPA, 2010).

La efectividad de la tetrametrina se ve limitada por la aparición en Argentina de poblaciones de *T. infestans* resistentes a los piretroides (Vassena et al. 2000; Picollo et al. 2005) que son resistentes tanto al volteo

como a la hiperactivación que producen estos insecticidas (Sfara et al. 2006).

Pinchin (1980) demostró el efecto expurgante de once piretroides sobre ninfas del quinto estadio de *P. megistus* (la kadequina fue el más efectivo); Wood et al. (1993) evaluaron, en el CIPEIN, el efecto expurgante de la tetrametrina, deltametrina y cipermetrina sobre todos los estadios de *T. infestans* y ninfas del quinto estadio de *R. prolixus*: Estudios recientes de Minoli et al. (2013) mostraron el efecto expurgante en condiciones de semi-campo de semioquímicos (ácido isobutírico, 3-pentanol y 3-metil-1-butanol) secretados por la glándula de Brindley de *T. infestans* y *R. prolixus*. La presente tesis constituye el primer registro, en condiciones de laboratorio y semi-campo, del fenómeno de expurgue provocado por componentes de aceites esenciales sobre vectores de Chagas.

1.3. Justificación de los objetivos elegidos

Las hojas y cortezas de los árboles de *Eucalyptus* sp. han sido tradicionalmente usadas en Oceanía en la preparación de remedios caseros para tratamiento de deficiencias respiratorias, condiciones febriles, problemas dermatológicos y óseos, infecciones bacterianas y parasitarias, además de su uso como desinfectante, desodorante y diurético (Lawless, 1995). Actualmente, los aceites de eucalipto, y en particular el de *E. citriodora*, ocupan los primeros lugares en la producción mundial de aceites, con un uso extensivo en las industrias farmacéutica y de perfumería (Green, 2002; Brooker y Kleinig, 2006).

En 1948, el aceite de eucalipto crudo fue registrado en Estados Unidos como insecticida y acaricida. Debido a las regulaciones de comercio y propiedad intelectual, el refinamiento y la estandarización necesaria para productos que se extraen de material de tal variabilidad natural como lo es el *Eucalyptus* (Isman, 2006) y la gran volatilidad (y por tanto menor persistencia ambiental) de sus componentes (Batish, 2008) (ver la PV del 1,8-cineol en la Tabla 2.2.), el número de productos basados en eucalipto efectivamente comercializados globalmente es reducido (Isman, 2006). Aún así, la categorización del aceite esencial de eucalipto como GRAS (generally recognized as safe: generalmente reconocido como seguro) por la autoridad de medicamentos y alimentación de los Estados Unidos de América (FDA), su clasificación como “no tóxico” y su aprobación para uso sobre la piel humana (USEPA, 1993), su aprobación

como agente saborizante en comidas (5 mg/kg) y dulces (15 mg/kg) (Council of Europe, 1992) y su uso extendido como desodorante, desinfectante y limpiador en viviendas (Coppen, 1995), juegan un rol muy importante en su aceptación popular y continúan resaltándolo como un buen candidato en la búsqueda de alternativas a los insecticidas sintéticos.

Con respecto a su uso para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, aceites esenciales conteniendo 1,8-cineol han mostrado acción antiparasitaria contra *T. cruzi* (Raposo Borges et al. 2012), pero las evaluaciones de su efecto sobre triatominos vectores son escasas. Sobre *T. infestans*, los efectos del 1,8-cineol no habían sido evaluados antes de esta tesis. Sobre *R. prolixus*, el 1,8-cineol sólo había reportado buen desempeño como fumigante sobre ninfas del primer estadio (Sfara et al. 2009).

Otros aceites esenciales y sus componentes cuentan con algunas evidencias, si bien escasas, de acción insecticida y repelencia sobre triatominos vectores de la Enfermedad de Chagas. Extractos de plantas del cerrado brasileño resultaron letales por contacto sobre ninfas del cuarto estadio de *R. milesi* (Coelho et al. 2006). Una docena de terpenos extraídos de plantas nativas de Bolivia resultaron letales, por aplicación tópica y por contacto, para huevos y ninfas del cuarto estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* (Fournet et al. 1996; Laurent et al. 1997). El aceite de canela inhibió la alimentación y, por tanto, la muda metamórfica y la supervivencia, de ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* (Abramson et al. 2007). Y, por último, el aceite de eucalipto y su principal componente mostraron ser buenos fumigantes y el geraniol y el mentil-acetato, buenos

repelentes; sobre ninfas del primer estadio de *R. prolixus* (Sfara et al. 2009).

Por otro lado, el efecto de los aceites esenciales o sus componentes sobre la actividad locomotora de los insectos fue mencionado por primera vez para *B. germanica* (Enam, 2001), cuantificado doce años después, sobre la misma especie en el CIPEIN (Alzogaray et al. 2013), y nunca antes evaluado sobre triatominos. Existen antecedentes de evaluaciones del efecto expurgante de piretroides y feromonas en *T. infestans*, pero aquí presentamos el primer estudio de la capacidad expurgante de monoterpenos en triatominos.

En base a estos antecedentes, se eligieron como objetivos de esta tesis los que se enumeran en la siguiente sección.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Explorar los efectos letales y subletales de sustancias naturales de origen vegetal sobre vectores de la Enfermedad de Chagas, en el marco de la búsqueda de candidatos para desarrollar nuevas y mejores herramientas de control vectorial y diagnóstico de infestación de viviendas.

1.4.2. Objetivos Específicos

- a. Describir los síntomas visibles de intoxicación en ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a 1,8-cineol.
- b. Evaluar la capacidad repelente de 1,8-cineol y diez monoterpenos alcoholes en el primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*
- c. Cuantificar mediante parámetros toxicológicos el efecto de volteo de los mencionados monoterpenos en el primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*
- d. Cuantificar el efecto de los monoterpenos sobre la actividad locomotora de ninfas de *T. infestans* y *R. prolixus*

e. En base a los resultados obtenidos al llevar a cabo los experimentos para alcanzar el objetivo d., seleccionar algunos monoterpenos y evaluar su capacidad expurgante en ensayos de laboratorio y semi-campo realizados con ninfas de *T. infestans*.

"Si supiese que es lo que estoy haciendo, no lo llamaría investigación, ¿verdad?" A. E.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material biológico

Desde hace más de tres décadas, el CIPEIN cuenta con colonias estables de *R. prolixus* y *T. infestans*. Éstas son mantenidas en una cámara de cría a temperatura y fotoperíodo constante (28 °C, 12:12 h L:O) y alimentadas semanalmente con palomas domésticas y/o torcazas vivas.

Para los bioensayos de esta tesis, se usaron (Figura 2.1.):

- Ninfas del primer estadio de *T. infestans*, eclosionadas en el CIPEIN de huevos provistos por el Centro de Referencia de Vectores (Santa María de Punilla, Córdoba).
- Ninfas del quinto estadio de *T. infestans* provistas por el Centro de Referencia de Vectores, mantenidas en una cámara de cría del CIPEIN.
- Ninfas del tercer y quinto estadio de *T. infestans*, provistas por el Centro de Referencia de Vectores.
- Ninfas del primer estadio de *R. prolixus*, eclosionadas de huevos puestos por adultos pertenecientes a la colonia del CIPEIN.
- Ninfas del quinto estadio de *R. prolixus*, de la colonia del CIPEIN.

Todos los insectos tienen 1-5 días de edad (desde la última muda) y no fueron alimentados durante el estadio en que se los evaluó.

Los insectos fueron manipulados con un pincel Goya N° 0-00 (CABA, Argentina), o con una pinza entomológica suave Bioequip (Shanghái, China). Se usaron individuos completamente esclerotizados (coloración marrón oscura), de tamaño uniforme: 3 x 2 y 3 x 1 mm (ninfas del primer estadio: *T. infestans* y *R. prolixus*, respectivamente); 1,7 x 0,6 y 1,4 x 0,4 cm (ninfas del quinto estadio: de *T. infestans* y *R. prolixus*, respectivamente), con comportamiento locomotor y morfología externa normal.

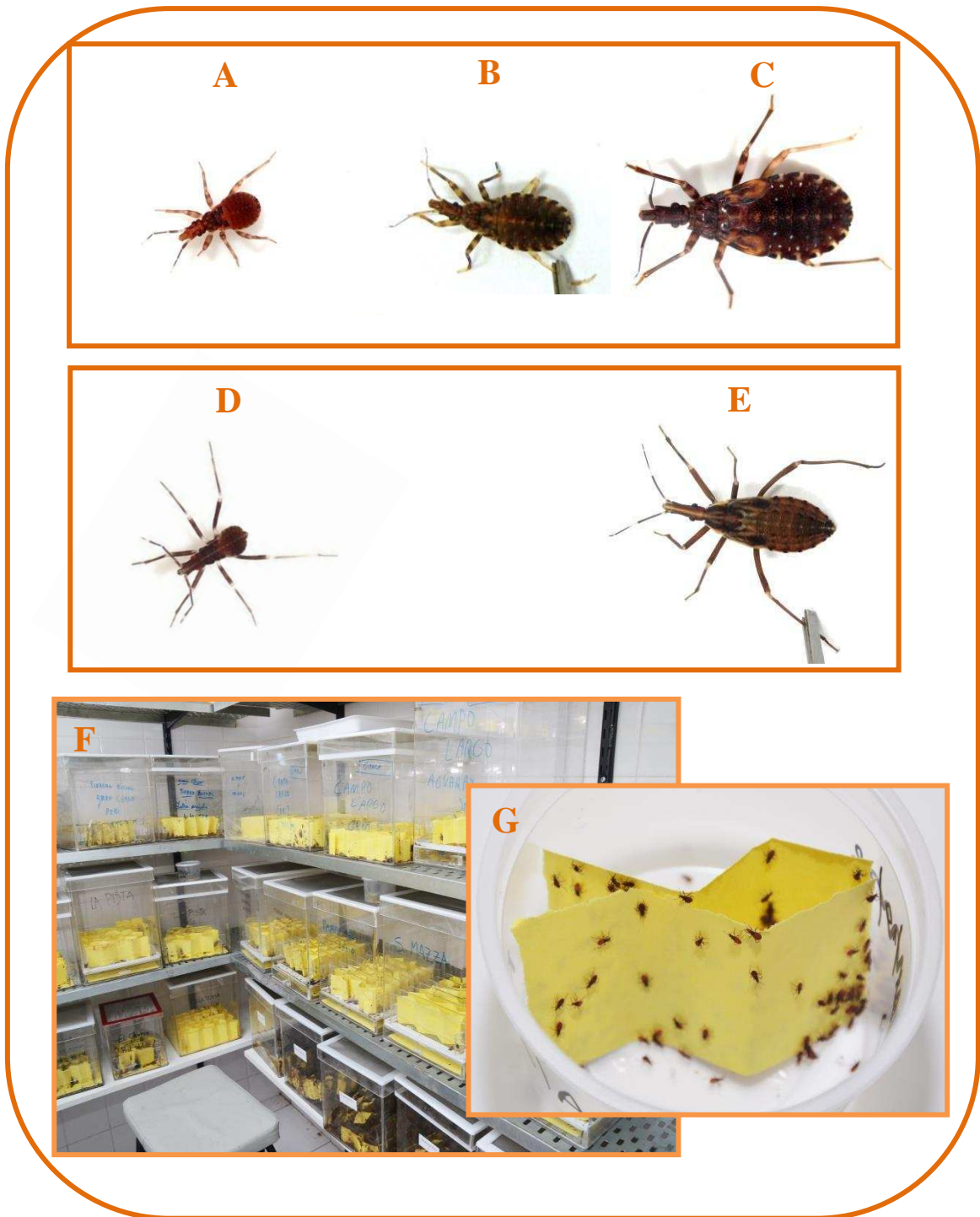


Figura 2.1. Triatominos usados en esta tesis. A) Ninfas del primer estadio de *T. infestans*; B) Ninfas del tercer estadio de *T. infestans*; C) Ninfas del quinto estadio de *T. infestans*; D) Ninfas del primer estadio de *R. prolixus*; E) Ninfas del quinto estadio de *R. prolixus*; F) Cámara de cría; G) Tarro de eclosión de huevos (con ninfas del primer estadio de *T. infestans*).

2.2. Reactivos

2.2.1 Controles positivos

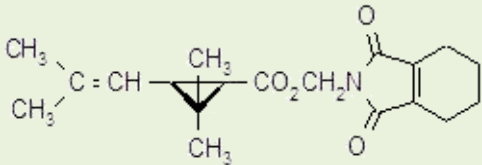
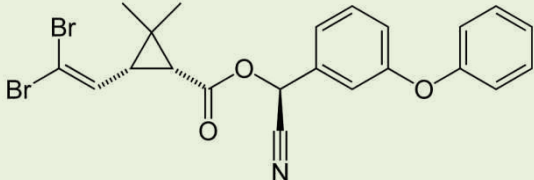
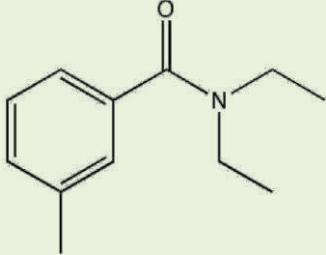
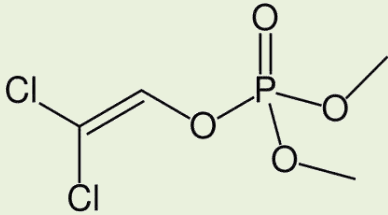
Tetrametrina (C ₁₉ H ₂₅ NO ₄)	Deltametrina (C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃)
 <p>Ciclohex-1-en-1,2-dicarboximidometil (1<i>RS</i>,3<i>RS</i>;1<i>RS</i>,3<i>SR</i>)-2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil) ciclopropanocarboxilato</p> <p>PM: 331,42; PV: 7,08E-006 mm Hg; densidad: 1,11 g/cm³</p> <p>Pureza: 92%; origen: Sumitomo Chemical Co. (Osaka, Japón)</p>	 <p>(1<i>R</i>,3<i>R</i>)-3-(2,2-Dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzilo</p> <p>PM: 505,21; PV: 1,5E-008 mm Hg; densidad: 0,5 g/cm³</p> <p>Pureza: 97%; origen: Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina)</p>
DEET (C ₁₂ H ₁₇ NO)	Diclorvós (C ₄ H ₇ Cl ₂ O ₄ P)
 <p><i>N,N</i>-Dietil-3-metilbenzamida</p> <p>PM: 191,28; PV: 0,002mm Hg; densidad: 0,998 g/cm³</p> <p>Pureza: 90%; origen: Sigma-Aldrich (Buenos Aires, Argentina)</p>	 <p>2,2-Diclorovinil dimetil fosfato</p> <p>PM: 220,98; PV: 0,0158 mm Hg; densidad: 1,55 g/cm³</p> <p>Pureza: 96,7%; origen: Chemotecnica S.A. (Buenos Aires, Argentina)</p>

Tabla 2.1. Productos sintéticos usados como controles positivos en esta tesis. PM: peso molecular; PV: presión de vapor.

Insecticidas piretroides

Tetrametrina: insecticida cianopiretroide, también conocido como neopynamin. Se utilizó como control positivo en los bioensayos de actividad locomotora y expurgue (tanto en laboratorio como en semi-campo) porque, como se indicó en la Introducción: “*el método de diagnóstico comúnmente usado por el personal del PNCh es el mismo desde hace décadas: una búsqueda activa de triatominos durante una hora/hombre con o sin la aplicación previa de un formulado en aerosol de tetrametrina 0,2% como expurgante (Schofield, 1978; Gürtler et al. 1993; Rabinovich et al. 1995)*”.

Como control positivo para los bioensayos de expurgue de laboratorio, se usó también un formulado comercial de tetrametrina (aerosol al 0,2%) facilitado por la empresa Reopen S.A. (Buenos Aires, Argentina).

Deltametrina: insecticida cianopiretroide. Por el método de síntesis, los productos comerciales contienen el isómero óptico con mayor acción insecticida (a diferencia de piretroides como permetrina y *cis*-permetrina, de los que se comercializan mezclas de isómeros). Es uno de los piretroides más efectivos para el control de vinchucas (Casabé et al. 1988). Concentraciones subletales provocan hiperactividad en ninfas del tercer estadio de *T. infestans* (Alzogaray, 1996). Por estos motivos, y teniendo en cuenta que la tetrametrina falló en hiperactivar a ninfas del primer estadio

de ambas especies (resultados preliminares de esta tesis), la deltametrina se utilizó como control positivo en los bioensayos de actividad locomotora sobre ninfas del primer estadio y en los bioensayos de volteo por aplicación tópica.

Repelente

DEET: también conocido como dietiltoluamida, es el ingrediente activo de la mayoría de los repelentes de insectos usados en el mundo (Reeder et al. 2001). Existe una gran variedad de formulados comerciales (Autan, Delphene, Detamide, Deltamid, Flypel, m-Delphene, meta-Delphene, Naugatuck Det y Off, entre otros). A mediados de la década de 1950, menos de diez años después de su invención, llegó al mercado y adquirió un éxito indiscutido debido a su alta efectividad, alta persistencia y baja toxicidad en humanos (Frances, 2007). Como se indicó en la Introducción: “*La amplia eficiencia de la DEET no ha sido superada por ninguno de los compuestos naturales estudiados hasta ahora...*”. Se ha mostrado su efectividad sobre gran cantidad de insectos hematófagos incluyendo las especies evaluadas en esta tesis: *R. prolixus* (Buescher et al. 1985; Sfara et al. 2008) y *T. infestans* (Alzogaray et al. 2001a; Sfara et al. 2006). Por estas razones, se utilizó como control positivo en los bioensayos de repelencia.

Insecticida organofosforado

Diclorvós: también conocido como DDVP y vapon. Neurotóxico de alto riesgo (muy tóxico para abejas, aves y peces), inespecífico, se absorbe por todas las vías de ingreso, alta toxicidad aguda y crónica, potenciador de otros organofosforados, cancerígeno. La EPA lo consideró por primera vez cancerígeno en 1989, en 1995 restringió muchos de sus usos (EPA, 1995) y determinó que sus efectos adversos, de alto riesgo para la salud humana, son efectos neurológicos relacionados con la inhibición de la actividad de la colinesterasa (USEPA, 2007). Se lo clasifica como “altamente tóxico” y RUP (restricted use pesticide: pesticida de uso restringido). En Argentina es clasificado como “producto muy tóxico” y la ANMAT lo ha prohibido para su uso doméstico (ANMAT, 2008).

Teniendo en cuenta su alta toxicidad tanto por contacto como por inhalación (durante décadas fue uno de los más eficaces insecticidas aplicados en fase vapor), se lo utilizó como control positivo en los bioensayos de volteo por contacto con papeles impregnados.

2.2.2. Monoterpenos

Los monoterpenos evaluados en esta tesis fueron: a) el éter cíclico 1,8-cineol, elegido por la abundante bibliografía existente sobre su capacidad insecticida (ver Introducción); b) diez monoterpenos con un grupo funcional alcohol, por utilizar como punto de partida una familia estructural particular de monoterpenos (ver Tabla 1.1 y 2.2.).

2.2.3. Otros

Otros reactivos utilizados fueron: la acetona, o propanona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$), cetona usada como solvente de todas las soluciones (inclusive en los bioensayos de semi-campo); y el butóxido de piperonilo (BP) ($\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5$), derivado semisintético del safrol, sinérgico de plaguicidas, evaluado junto al 1,8-cineol en los bioensayos de volteo por aplicación tópica.

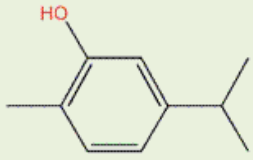
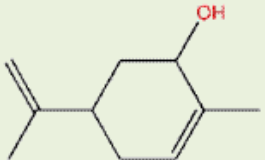
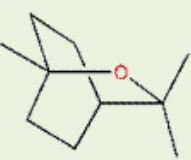
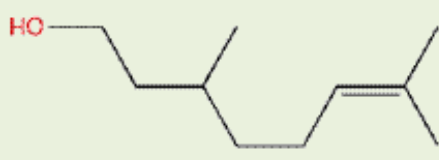
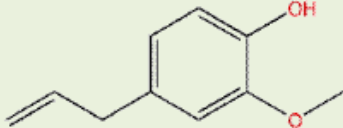
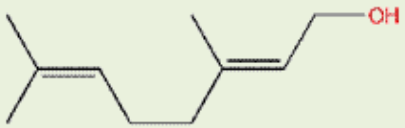
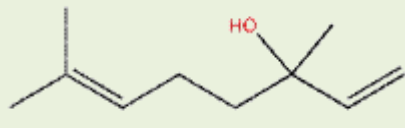
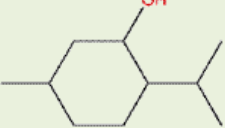
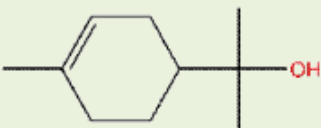
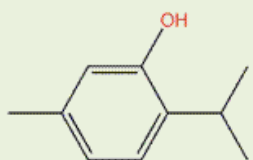
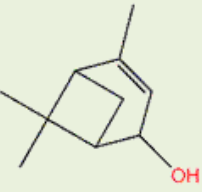
<p>Carvacrol (C₁₀H₁₄O)</p>  <p>2-Metil-5-(1-metiletil)-fenol</p> <p>PM: 150,22; PV: 0,0232 mm Hg</p>	<p>(-)-Carveol (C₁₀H₁₆O)</p>  <p>2-Metil-5-(1-metiletenil)-ciclohexen-2-ol</p> <p>PM: 156,27; PV: 0,0132 mm Hg</p>	<p>1,8-Cineol (C₁₀H₁₈O)</p>  <p>1,3,3-Trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2.]octano</p> <p>PM: 154,25; PV: 1,9 mm Hg</p>	<p>Citronelol (C₁₀H₂₀O)</p>  <p>3,7-Dimetil-6-octen-1-ol</p> <p>PM: 156,27; PV: 0,0441 mm Hg</p>
<p>Eugenol (C₁₀H₁₂O₂)</p>  <p>4-Alil-2-metoxifenol</p> <p>PM: 164,21; PV: 0,0226 mm Hg</p>	<p>Geraniol (C₁₀H₁₈O)</p>  <p>(E)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol</p> <p>PM: 154,25; PV: 0,03 mm Hg</p>	<p>Linalool (C₁₀H₁₈O)</p>  <p>2,6-Dimetil-2,7-octadien-6-ol</p> <p>PM: 154,25; PV: 0,16 mm Hg</p>	<p>Mentol (C₁₀H₂₀O)</p>  <p>2-Isopropil-5-metilciclohexanol</p> <p>PM: 156,27 PV: 0,11 mm Hg</p>
<p>α-Terpineol (C₁₀H₁₈O)</p>  <p>2-(4-Metilciclohex-3-enil)-propan-2-ol</p> <p>PM: 154,25; PV: 0,0423 mm Hg</p>	<p>Timol (C₁₀H₁₄O)</p>  <p>2-Isopropil-5-metilfenol</p> <p>PM: 150,22; PV: 0,0022 mm Hg</p>	<p>(S)-cis-Verbenol (C₁₀H₁₆O)</p>  <p><i>cis</i>-4,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol</p> <p>PM: 152,24; PV: 0,00792 mm Hg</p>	

Tabla 2.2. Monoterpenos evaluados en esta tesis. PM: peso molecular; PV: presión de vapor.

2.3. Actómetro

Para cuantificar la actividad locomotora y la repelencia se usó un circuito cerrado de video blanco y negro (VC 1910; Sanyo Electrical Co., Tokio, Japón) y un analizador de imágenes Videomex-V Columbus (Ohio, Estados Unidos). La videocámara captura la imagen de los insectos ubicados en una arena experimental (círculo de papel de filtro ubicado 10 cm por debajo de la videocámara). El analizador de imágenes convierte la señal analógica que recibe de la videocámara en datos digitales con una resolución de 256 x 192 píxeles y una velocidad de adquisición y procesamiento de 30 cuadros/segundo, e invierte los colores de la imagen. La presencia de los insectos sobre el papel de filtro es determinada por contraste visual entre sus cuerpos (que en el monitor se ven blancos [píxeles encendidos]) y el papel (que en el monitor se ven negro [píxeles apagados]) y es cuantificada a través del número de píxeles encendidos (que representa el área ocupada por la silueta del insecto). Para evitar ruido de fondo, el contraste de la imagen se graduó de tal manera que la cámara registrara únicamente el tórax y el abdomen de las ninfas. Para cuantificar el movimiento de los insectos, el Videomex-V usa el software *Multiple Zone Motion Monitor* (Monitor de Múltiples Zonas de Movimiento) que compara imágenes consecutivas capturadas por la videocámara y registra el número de píxeles que cambian de “on” (encendido) a “off” (apagado) y viceversa. La suma de píxeles que cambian de estado durante el tiempo experimental es llamada *motion* (M , movimiento). El software calcula el

número promedio de píxeles “on” durante el tiempo experimental, parámetro que representa el área promedio ocupada por los insectos, el *area* (A).

La iluminación fue provista por una lámpara de luz fría (22 watts) Luxa (Shanghái, China) ubicada en el cenit del mueble que contenía la arena experimental (a 1 m de altura). La temperatura se mantuvo a 26 ± 2 °C. Cada serie de datos fue importada y procesada en una computadora personal.

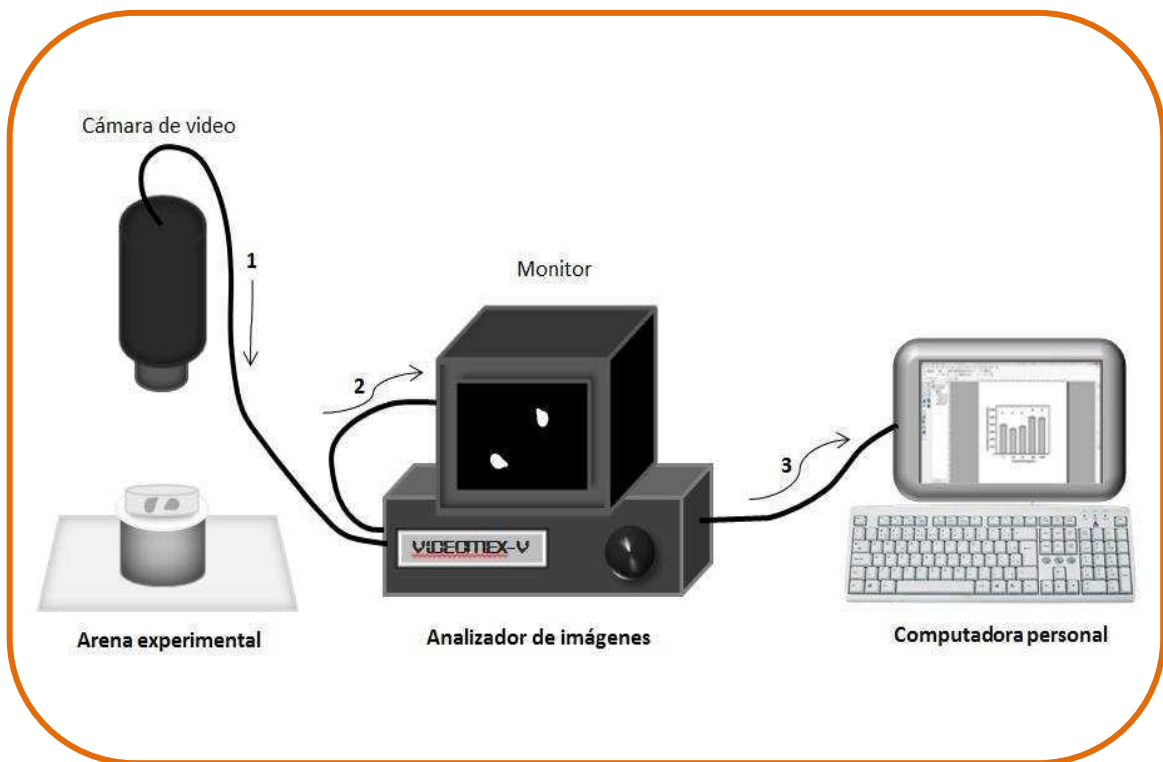


Figura 2.2. Esquema del analizador de imágenes Videomex-V.



Figura 2.3. Bioensayos de actometría. A) La arena experimental estuvo ubicada dentro de un mueble de madera cuya puerta se cerraba durante los bioensayos; en el estante inferior se encuentra el actómetro y la computadora personal). B) La cámara de video y la arena experimental. C) Monitor del actómetro (sobre él, termómetro digital para monitorear la temperatura dentro y fuera del mueble).

2.4. Bioensayos

2.4.1. Descripción de los síntomas visibles de intoxicación

Un disco de papel de filtro (4 cm de diámetro) fue impregnado con 0,09 ml de una solución de 1,8-cineol en acetona. Después de que la acetona se evaporó, el papel de filtro fue colocado en el fondo de un contenedor plástico cilíndrico (4 cm de diámetro x 4 cm de alto). Sobre el papel de filtro se colocaron diez ninfas del primer estadio de *T. infestans* o *R. prolixus* y se tapó el contenedor con una tapa plástica. Como control se colocaron diez ninfas sobre un papel de filtro tratado con acetona sola. Los cambios visibles en el comportamiento respecto del grupo control fueron considerados síntomas de intoxicación. De acuerdo a su severidad, los síntomas fueron clasificados en dos categorías: primera fase (menores a moderados) y segunda fase (severos). Estas observaciones se realizaron durante un máximo de siete horas. Se estudiaron cinco concentraciones de 1,8-cineol: 39, 390, 780, 1.950 y 3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y se realizaron seis réplicas independientes de cada bioensayo.

2.4.2. Repelencia

Se usaron círculos de papel de filtro (Hangzhou Xinxing Paper Industry and Co., Ltd., Fuyang, China; FAST) de 70 mm de diámetro. Cada círculo fue dividido en dos zonas iguales. Una mitad fue impregnada con 0,15 ml de una solución de monoterpeno en acetona; la otra, con 0,15 ml de solvente solo. Se evaluaron tres concentraciones por sustancia: 39, 390 y 3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cada bioensayo tuvo un control negativo (acetona sola en las

dos mitades). La DEET, usada como control positivo, se aplicó a 3,9; 39 y 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Después de que el solvente se evaporó, las dos mitades fueron unidas con un pedazo de cinta adhesiva, el círculo completo, con la cinta adhesiva hacia abajo, fue ubicado en la arena experimental y sobre él se apoyó un aro de vidrio transparente (2,5 cm de alto x 5,5 cm de diámetro) con la cara interna envaselinada, para delimitar la arena experimental e impedir que los insectos la abandonaran (ver Figura 2.3.). Finalmente, cuatro ninfas del primer estadio se colocaron suavemente en el centro de la arena y la medición se comenzó inmediatamente.

En ensayos preliminares, después de ajustar la imagen de video digitalizada para remover el ruido y obtener un seguimiento óptimo, al usar una sola ninfa del primer estadio se obtuvieron resultados heterogéneos (pobre repetitividad). Esto se debe a que los primeros estadios de los triatominos son muy pequeños (3 mm de largo x 1-2 mm de ancho). Por esta razón, cambios sutiles en la posición de una ninfa (por ejemplo, al ponerse en posición vertical apoyando las patas delanteras sobre el aro de vidrio) causan importantes variaciones en el área ocupada (píxeles “on” en la imagen de video). Esto altera el parámetro A , que debería mantenerse constante para una correcta estimación de la actividad locomotora (si el número de píxeles ocupado por un individuo se subestima, su cantidad de movimiento también se subestimaré). Pero se obtuvo una buena repetitividad cuando se usaron cuatro ninfas del primer estadio (su

distribución espacial sobre la arena experimental fue azarosa: no se observó agregación).

En estos bioensayos de repelencia, se programó el analizador de imágenes para que registrara los parámetros M y A en cada zona por separado. Para expresar los resultados de repelencia se calcularon valores de *Coefficiente de Distribución* (Sfara et al. 2011):

$$CD = (AT - At) / AT$$

Donde AT es el área total ocupada por las ninfas en la arena y At es el área ocupada por las ninfas en la zona tratada, ambas durante el tiempo experimental. Este coeficiente varía entre 0 y 1; 0 corresponde al caso donde la sustancia produce un máximo de atracción y 1 al caso donde produce un máximo de repelencia. El valor de 0,5 corresponde a una distribución equitativa de los insectos entre las zonas tratada y no-tratada (distribución al azar).

Todos los ensayos duraron quince minutos, consistiendo de treinta sesiones de registro de treinta segundos cada una. El diseño fue completamente aleatorizado y balanceado, con seis réplicas independientes para cada bioensayo (distintos insectos y distintas soluciones, evaluados en diferentes días).

2.4.3. Volteo

2.4.3.1. Por exposición a superficies tratadas

La exposición (por contacto e inhalación simultáneamente) fue realizada en contenedores plásticos cilíndricos con tapa (4 cm de diámetro x 4 cm de alto). La base de cada contenedor fue cubierta con un círculo de papel de filtro. El papel de filtro fue impregnado con 0,09 ml de solución de monoterpeno en acetona (39; 390; 780; 1.950 o 3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), o con acetona sola, 5-10 minutos antes de comenzar cada ensayo para que se evapore. Se consideraron volteados los insectos incapaces de mantenerse en pie (al inclinar el contenedor, los insectos no podían sujetarse al papel y caían). El número de insectos volteados fue registrado cada diez minutos. Cada réplica fue interrumpida cuando el 90% de los insectos se encontraban volteados o al cabo de siete horas de exposición (lo que ocurriera primero). Como control positivo se usó el organofosforado DDVP. Se hicieron seis réplicas independientes para cada tratamiento. Los resultados se usaron para calcular tiempos de volteo para el 50% de las ninfas expuestas (TV_{50}).

Para evaluar la recuperación del efecto de volteo, se expusieron ninfas del primer estadio de ambas especies a la concentración más alta de 1,8-cineol que mostró una toxicidad importante en los bioensayos de volteo (3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). La exposición duró: a) el TV_{50} , o b) el TV_{90} . Una vez concluida la exposición, las ninfas fueron trasladadas a contenedores limpios con papeles no tratados y se registró el número de ninfas volteadas

a las 24 y a las 48 horas. Se hicieron dos réplicas (de diez ninfas cada una) para cada tratamiento. Si existiera un fenómeno de recuperación, el número de ninfas volteadas a las 48 horas sería inferior al de las 24 horas (porque algunas de las ninfas volteadas a las 24 horas estarían recuperadas, es decir asintomáticas, a las 48 horas).

2.4.3.2. Por aplicación tópica

Se aplicaron soluciones de 1,8-cineol en acetona sobre ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*. Las ninfas fueron sostenidas por una de sus patas con una pinza de acero de precisión y punta fina Rubis 4A-SA (Stabio, Suiza). Bajo una lupa binocular Nikon SMZ-10 10x (Tokio, Japón), se aplicó 1 µl de solución acetónica de 1,8-cineol sobre la parte dorsal del cuerpo de cada ninfa. Debido a la fragilidad de este estadio ninfal, los individuos visiblemente afectados por la manipulación fueron inmediatamente descartados. Se usaron las siguientes dosis del monoterpeno: 31,125; 62,5; 93,75; 125; 187,5 y 250 µg/insecto. Cada dosis fue aplicada a un grupo de diez ninfas.

El 1,8-cineol fue aplicado solo o simultáneamente con BP, un inhibidor de la actividad del sistema del citocromo P450. A partir de los resultados obtenidos en ensayos preliminares, se decidió aplicar el BP en una dosis constante de 100 µg/insecto (esta dosis no produce síntomas visibles de intoxicación en las ninfas). Cada bioensayo incluyó un grupo control, que fue tratado con acetona sola. Como control positivo se usó el piretroide deltametrina, del cual se aplicaron las siguientes dosis: 3,125.10⁻

5 ; $6,25 \cdot 10^{-5}$; $1,25 \cdot 10^{-4}$ y $2,5 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/insecto}$ para *T. infestans*; $5 \cdot 10^{-7}$; $2,5 \cdot 10^{-6}$; $5 \cdot 10^{-6}$; $2,5 \cdot 10^{-5}$; $5 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{g/insecto}$ para *R. prolixus*.

Luego de aplicar los tratamientos, las ninfas fueron suavemente depositadas en un envase plástico transparente de 125 cc con un papel ubicado en posición vertical. El envase fue cerrado con una tela de gasa sostenida con una banda elástica y guardado en una cámara con temperatura constante.

El resultado se registró 24 y 48 horas después de la aplicación. Se consideraron volteadas las ninfas que al ser depositadas en el centro de un papel de filtro circular (15 cm de diámetro) se mantenían inmóviles (los insectos no afectados caminan rápidamente hacia el borde del papel). Los resultados se usaron para calcular valores de DL_{50} .

2.4.4. Actividad locomotora

El diseño experimental fue similar al que se usó para cuantificar la repelencia, pero con las siguientes modificaciones: a) se impregnaron círculos de papel de filtro de 70 o 110 mm de diámetro (para ninfas del primer y quinto estadio, respectivamente) con 0,3 ml de la solución a evaluar, b) se programó el analizador de imágenes para que registrara los parámetros M y A en una única zona correspondiente al arena experimental completa y c) para el caso de ninfas del quinto estadio, se utilizó una sola ninfa por bioensayo.

Se estudiaron las siguientes concentraciones subletales (elegidas mediante ensayos preliminares): 3,9; 39; 390 y 3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cada bioensayo tuvo un control negativo (solvente solo, acetona). Como controles positivos, se aplicaron: 0,0039; 0,039; 0,39 y 3,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de deltametrina y 0,039; 0,39; 3,9; 39 y 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de tetrametrina.

Los ensayos duraron treinta-diez minutos, consistiendo de sesenta-veinte sesiones de registro de sesenta-veinte segundos cada una, para ninfas del primer y quinto estadio, respectivamente.

Para cuantificar la actividad locomotora se calculó el siguiente cociente (Alzogaray et al. 1997):

$$\text{Actividad locomotora} = M/A$$

Los resultados se expresan en unidades de pixeles/área.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y balanceado, con seis réplicas independientes (distintos insectos y distintas soluciones, evaluados en diferentes días) para cada bioensayo y cuatro concentraciones seriales para cada compuesto evaluado.

2.4.5. Expurgue

2.4.5.1 Bioensayos de laboratorio

Estos bioensayos fueron llevados a cabo dentro de una cámara tipo Peet Grady construida con seis paneles de vidrio de 70 x 70 cm ($0,34 \text{ m}^3$). La iluminación fue provista por dos tubos de luz fría de 20 watts cada uno

(OSRAM, Buenos Aires, Argentina). Los tubos estaban ubicados externamente, sobre el borde superior del panel trasero de la cámara.

El panel frontal de la cámara tiene dos aberturas circulares (5 y 15 cm de diámetro) para ingresar los insectos y aplicar el tratamiento. El panel superior tiene una abertura circular (12 cm de diámetro) conectada a un extractor de aire. Durante los bioensayos, estas tres aberturas fueron cerradas herméticamente. La temperatura fue mantenida a 26 ± 2 °C.

En el piso de la cámara, equidistante de los dos paneles laterales y a 5 cm del panel posterior, se ubicó un prisma triangular de cartulina negra que actuó como refugio de las ninfas (Figura 2.4.).

Para realizar los bioensayos, se colocaron dentro del refugio diez ninfas del quinto estadio de *T. infestans* y se les permitió aclimatarse durante quince minutos. Durante ese tiempo, si se registraban casos de individuos que abandonaran el refugio, no se daba comienzo al ensayo (al día siguiente, la cámara se limpiaba y se comenzaba nuevamente con un nuevo refugio y un nuevo grupo de insectos). Luego, a través de una de las aberturas del panel frontal, se nebulizó 1 ml de monoterpeno en acetona mediante un atomizador de vidrio y usando nitrógeno comprimido (3,5-3,8 psi) como propulsor.

Se evaluaron seis monoterpenos, 1,8-cineol y aquellos cinco que en los bioensayos de actividad locomotora produjeron una hiperactivación importante en ninfas del primer estadio de *T. infestans*: eugenol, linalool, mentol, timol y α -terpineol.

Se aplicaron dos concentraciones de monoterpenos disueltos en acetona: la más alta usada en los bioensayos de actividad locomotora (500 mg/ml, equivalentes en la cámara a $1,47 \text{ g/m}^3$) y una superior (600 mg/ml, equivalentes a $1,76 \text{ g/m}^3$). Los controles negativos consistieron en la aplicación de acetona sola. Como control positivo se usó tetrametrina, aplicada a 2 mg/ml ($0,0058 \text{ g/m}^3$), que es la concentración que contienen los aerosoles usados para monitoreo, y 10 mg/ml ($0,029 \text{ g/m}^3$). También se evaluaron aerosoles comerciales de tetrametrina 0,2%, cortesía de la empresa Reopen S.A. (Buenos Aires, Argentina). En este último caso, la aplicación consistió en oprimir durante un segundo la válvula del aerosol, ya que previamente se determinó en forma experimental (pesando el aerosol antes y después de la descarga) que este procedimiento libera aproximadamente 1 ml del contenido del recipiente.

Inmediatamente después de la aplicación, se registró el número de ninfas expurgadas (es decir, las que abandonaban el refugio). Los bioensayos fueron llevados a cabo siempre por la mañana (entre las 9 y las 12 am), realizando un solo tratamiento (elegido al azar) por día. En los controles negativos se observó un 0% de expurgue.

Cuando fue posible (valores de expurgue superiores a 50%), se calcularon valores de tiempo de expurgue para el 50% de los insectos expuestos (TE_{50}).

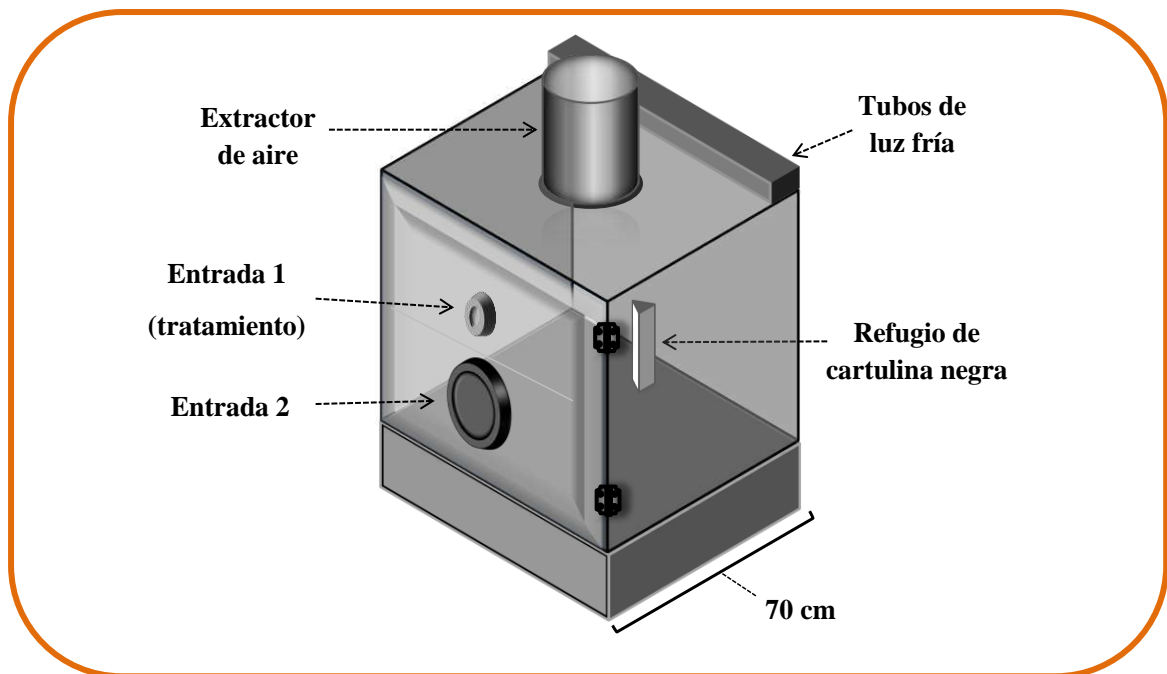


Figura 2.4. Esquema de la cámara y el refugio usados para los bioensayos de expurgue en condiciones de laboratorio.

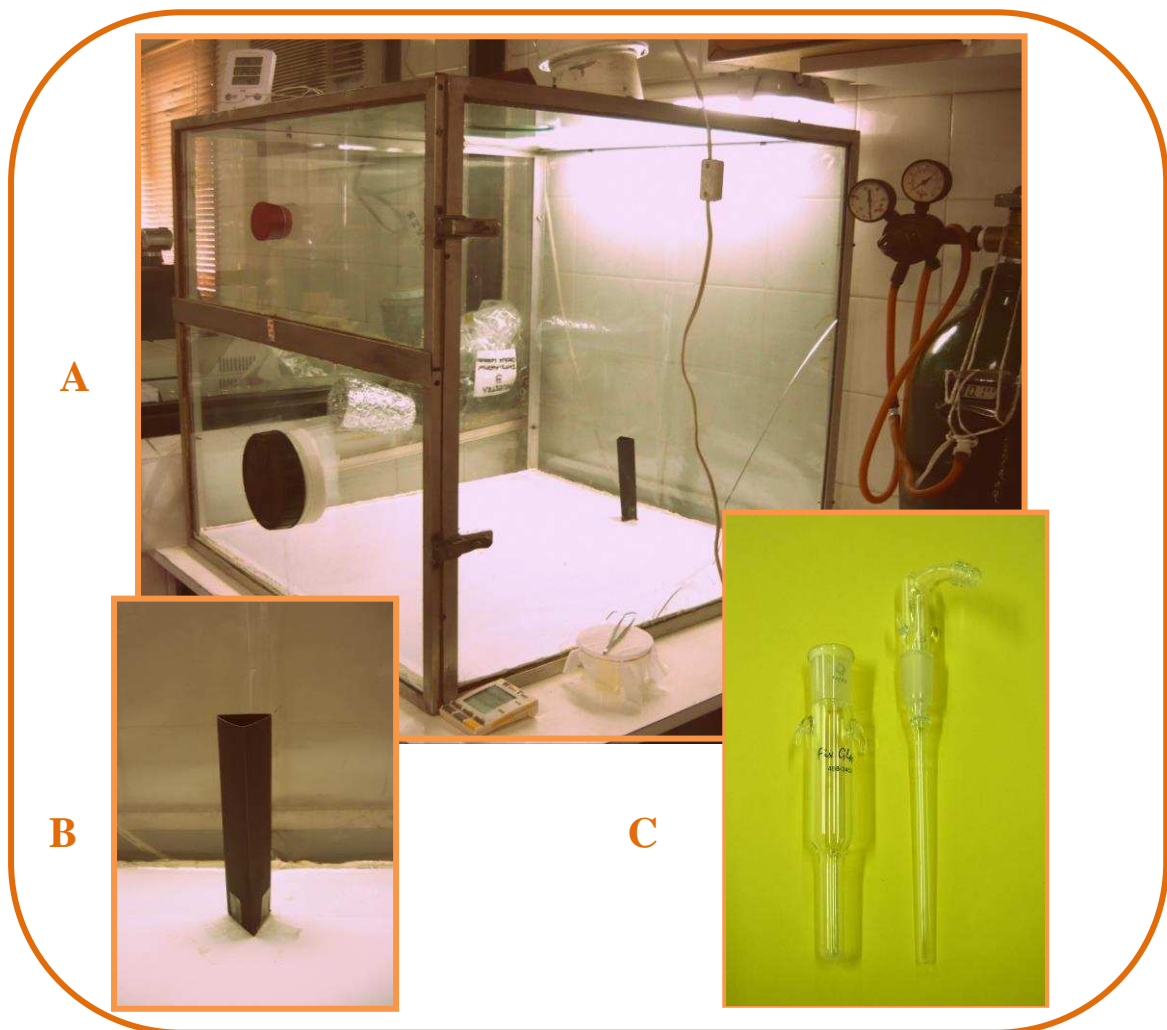


Figura 2.5. Dispositivo experimental de los bioensayos de expurgue en condiciones de laboratorio. A) Vista general; B) refugio de cartulina negra; C) atomizador de vidrio.

2.4.5.2. Bioensayos de semi-campo

Los bioensayos se llevaron a cabo durante el mes de diciembre de 2013, en un terreno perteneciente al campo experimental del Centro de Referencia de Vectores (Santa María de Punilla, Córdoba). En una parcela limitada por alambrado se construyeron paredes experimentales (0,26 m²) con ladrillos de adobe (27 cm x 13 cm x 6 cm cada uno) (Figura 2.6.). La posición de cada pared dentro de la parcela, así como la orientación cardinal de la cara tratada y el tratamiento usado en cada caso, fueron asignados al azar. Poblaciones de diez ninfas del tercer estadio y diez ninfas del quinto de *T. infestans* fueron liberadas en el centro de la parte superior de la pared. Los insectos rápidamente buscaron refugio en las grietas del material y/o los espacios entre los ladrillos. Una vez que el total de los insectos se encontró refugiado dentro, se colocó alrededor de la pared una jaula de malla metálica con marco de aluminio para evitar que se fugaran (1,5 x 1,5 x 1,5 m). La parte superior de la jaula fue cubierta con plástico para protegerla de eventuales lluvias. Los ensayos se realizaron al día siguiente.

Bajo estas condiciones se evaluaron los monoterpenos que arrojaron mejores resultados de expurgue en los bioensayos de laboratorio (linalool, eugenol y la mezcla 2:1 linalool-eugenol).

La aplicación se realizó con rociadores de perfume plásticos (La Casa de los Mil Envases S.A., Ciudad Autónoma de Buenos Aires,

Argentina; botella PET DELTA de 200 cc, 6,24 ml [SE: 0,0125] cada veinte pulsos). Con veinte pulsos, focalizados en los espacios verticales entre los ladrillos, se cubrió la superficie completa de un lado de cada pared (0,26 m²). En cada bioensayo se usó un rociador diferente.

Se aplicaron las siguientes concentraciones: 500 mg/ml (linalool y eugenol solos), 600 mg/ml (mezcla linalool [400 mg/ml]-eugenol [200 mg/ml]) y 10 mg/ml (tetrametrina) (control positivo). Las paredes controles fueron tratadas con acetona sola. Inmediatamente después de la aplicación y durante media hora se registraron todos los insectos que abandonaban sus refugios (anotando el tiempo preciso para cada individuo expurgado). Con los resultados se calcularon porcentajes de ninfas expurgadas a tiempos fijos.



Figura 2.6. A) Paredes experimentales con jaula de protección; B) pared experimental al descubierto; C) rociador plástico; D) detalle de la aplicación del tratamiento.

2.5. Resumen de los bioensayos realizados

Primera parte		
Estadio y especie	Ninfas del primer estadio de <i>T. infestans</i> y de <i>R. prolixus</i>	
Monoterpenos	1,8-cineol	Diez monoterpenos alcoholes
Bioensayos	<p>Descripción de síntomas visibles de intoxicación</p> <p>Repelencia</p> <p>Volteo por exposición a superficies tratadas</p> <p>Volteo por aplicación tópica (con y sin BP)</p> <p>Efecto sobre la actividad locomotora</p>	<p>Repelencia</p> <p>Volteo por exposición a superficies tratadas</p> <p>Efecto sobre la actividad locomotora</p>



Segunda parte	
Estadio y especie	Ninfas del quinto estadio de <i>T. infestans</i> y de <i>R. prolixus</i>
Monoterpenos	1,8-Cineol y cinco monoterpenos alcoholes que produjeron un aumento de la actividad locomotora en la Primera Parte
Bioensayos	Efecto sobre la actividad locomotora



Tercera parte	
Estadio y especie	Ninfas del quinto estadio de <i>T. infestans</i>
Monoterpenos	1,8-Cineol y cinco monoterpenos alcoholes que produjeron un aumento de la actividad locomotora en la Primera Parte
Bioensayos	Expurgue en laboratorio (monoterpenos individuales y mezclas)



Cuarta parte	
Estadio y especie	Ninfas del tercer y quinto estadio de <i>T. infestans</i>
Monoterpenos	Aquellos que produjeron un mayor expurgue en la Tercera parte
Bioensayos	Expurgue en semi-campo (monoterpenos individuales y mezclas)

2.6. Análisis de datos

Los datos de los bioensayos de repelencia y actividad locomotora y expurgue en semi-campo se ingresaron y analizaron en el software estadístico *Sigma Plot* (V.11.0.; Systat Software GmbH; 2008; Erkrath, Alemania).

Los valores de DL_{50} fueron calculados usando el software estadístico *Polo Plus* (V. 2.0.; Le Ora Software; 2002; Petaluma, Estados Unidos).

Los parámetros TV_{50} y TE_{50} fueron calculados usando el software estadístico para datos correlacionados desarrollado por Throne et al. (1995), corrido con el software *Mathematica* (V. 5.2.; Wolfram Research; 2005; Champaign, Estados Unidos).

Para evaluar el efecto del tratamiento con distintas dosis de monoterpenos sobre el CD y la actividad locomotora (M/A); así como el efecto del tratamiento sobre el porcentaje de ninfas expurgadas en semi-campo, se realizaron ANOVAs de un factor (previa corroboración del cumplimiento de normalidad y homocedacia de los datos). En los casos en que el p de la prueba resultó significativo ($< 0,05$) se realizaron comparaciones a posteriori de Fisher (Método LSD) para detectar diferencias significativas entre pares de tratamientos. En los casos en que alguno de los supuestos no se cumplió (sólo uno de ellos), se realizó un ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis por rangos). Las diferencias entre los valores de porcentaje de ninfas expurgadas fueron también analizadas mediante pruebas de T para una muestra.

En el caso en que un *CD* promedio resultó ser $1 \pm 0,01$ (máximo de repelencia), ese tratamiento no se incluyó en las comparaciones ya que la inclusión de valores sin varianza provoca el incumplimiento de la prueba de homocedacia.

Las diferencias entre los valores de TV_{50} , DL_{50} y TE_{50} , fueron consideradas significativas ($p < 0,05$) si los respectivos IC 95%, calculados por el *Mathematica* o el *Polo Plus*, no se superpusieron.



"No podemos engañar a la naturaleza, pero sí podemos ponernos de acuerdo con ella." A. E.

3. Resultados

El primer experimento se realizó para evaluar si la actividad locomotora de las ninfas del primer estadio de *T. infestans* y de *R. prolixus* varía a lo largo del día (dentro del horario laboral en que se tenía previsto llevar a cabo los bioensayos), y si es modificada por la acetona, solvente que se planeaba usar para preparar las soluciones de monoterpenos. Para la variable “momento del día” se consideraron dos tratamientos: mañana (ensayos realizados entre las 09:00 y las 12:00 horas) y tarde (entre las 13:00 y las 16:00 horas). Para la variable “solvente” se consideraron también dos tratamientos: sin solvente (papeles de filtro no tratados) y con solvente (papeles tratados con $7,8 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de acetona = 0,3 ml; este volumen es el que se aplicó de monoterpeno para los bioensayos de actividad locomotora de ninfas del primer estadio).

La actividad locomotora de las ninfas no fue afectada en forma significativa por el momento del día en que se realizaron los ensayos ni por la exposición al solvente acetona (ANOVA: *T. infestans* $F_{3,23} = 2,981$, $\mathbf{p} = 0,056$; *R. prolixus* $F_{3,23} = 0,943$, $\mathbf{p} = 0,438$). Se obtuvo el mismo resultado en ambas especies. Este experimento permitió definir el rango horario en que se llevarían a cabo los ensayos posteriores, y confirmar el uso de acetona como solvente de los monoterpenos que se deseaba estudiar.

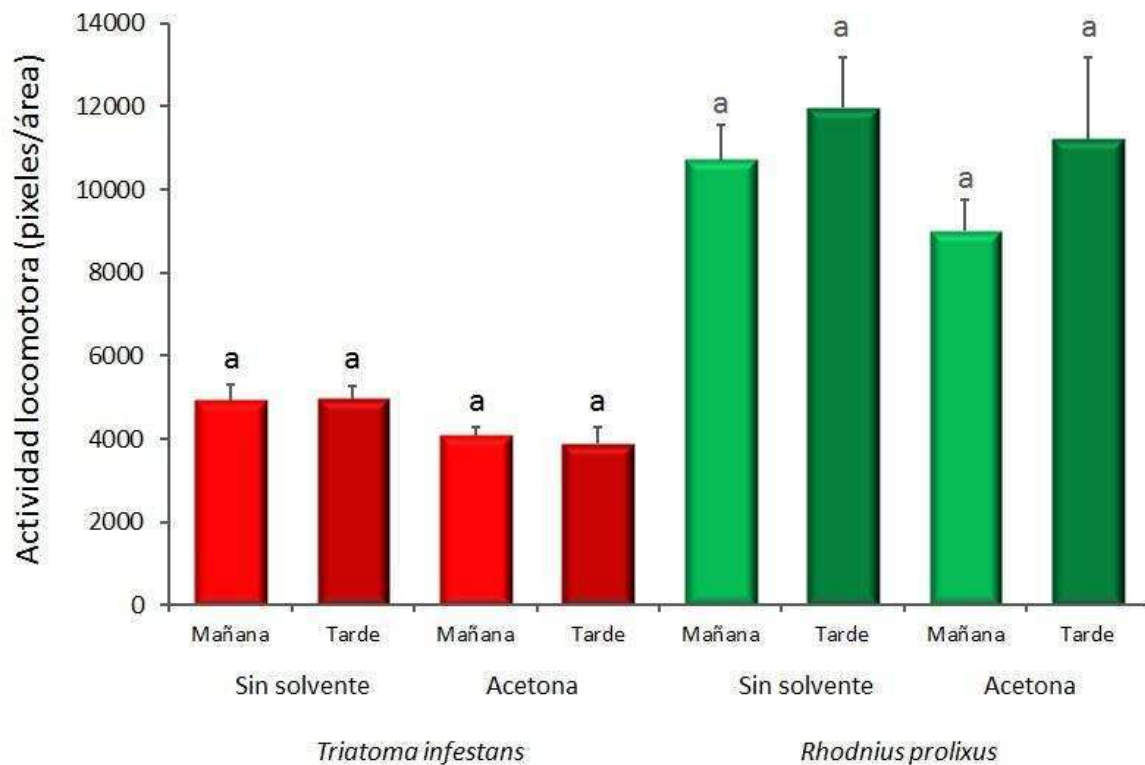


Figura 3.1. Actividad locomotora de ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas en diferentes momentos del día a papeles de filtro tratados o no con acetona. Cada barra representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Dentro de cada especie, las barras señaladas con la misma letra indican que las diferencias no son significativas ($p > 0,05$).

3.1. Síntomas visibles de intoxicación

Las ninfas expuestas a papeles de filtro tratados con 1,8-cineol (vías de ingreso por contacto e inhalatoria simultáneamente) mostraron parálisis de patas, movimientos anormales de la probóscide y de las antenas, incapacidad para retornar a la posición normal después de voltearse accidentalmente y otros síntomas que sugieren un modo de acción neurotóxico (Tabla 3.1.). Los síntomas fueron subjetivamente agrupados en dos fases: inicial (síntomas leves a moderados) y final (síntomas severos) (Tabla 3.1). Se consideraron pertenecientes a la fase inicial los síntomas que modificaban levemente la posición del cuerpo o los apéndices con respecto a los controles, y pertenecientes a la fase final los que ocasionaban cambios importantes en la posición del cuerpo o dificultaban seriamente la capacidad de caminar. No se identificaron síntomas especie-específicos ni una relación concentración-respuesta. En general, cada ninfa presentaba todos los síntomas descritos, pero a veces, alguno de los síntomas no ocurría en algún individuo, y el orden de aparición de los síntomas dentro de cada fase varió en algunas oportunidades.

La exposición a 1,8-cineol produjo en las ninfas de ambas especies una distensión abdominal que les confirió un aspecto similar al de individuos alimentados a repleción (Figura 3.2.). El porcentaje de ninfas que presentó este síntoma aumentó en forma significativa al aumentar la concentración de 1.8-cineol (Prueba de T , *T. infestans*: $t_5 = 4,365$, $\mathbf{p} = 0,007$; *R. prolixus*: $t_5 = 9,851$, $\mathbf{p} < 0,001$). Ninguno de los individuos

pertenecientes a los grupos controles presentó distensión abdominal y, como se verá más adelante, tampoco se observó distensión en las ninfas expuestas a los otros monoterpenos evaluados en esta tesis.

Fase inicial: síntomas leves a moderados	Fase final: síntomas severos
<ul style="list-style-type: none"> ● Aumento de la actividad locomotora ● Posición de reposo anormal: contacto completo de la cara ventral del cuerpo con la superficie de apoyo (en la posición de reposo normal, el cuerpo se mantiene suspendido) ● Caminata reversa o lateral ● Flexión de los flagelos antenales 90° hacia fuera ● Extensión de la proboscis (en ausencia de estímulos específicos) ● Parálisis de las patas delanteras ● Alineación frontal de las antenas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Caminata reversa con abdomen elevado o caminata normal arrastrando abdomen ● Lenta oscilación vertical del cuerpo sobre el eje antero-posterior ● Posición “mantis religiosa”: patas delanteras flexionadas debajo de tórax elevado ● Imposibilidad de retornar a la posición normal luego de voltearse accidentalmente ● Inmovilidad total

Tabla 3.1. Síntomas de intoxicación observados a simple vista en ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a 1,8-cineol.

Porcentaje de ninfas con distensión abdominal (\pm EE)		
1,8-Cineol ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	<i>T. infestans</i>	<i>R. prolixus</i>
0 (control)	0	0
390	10,0 \pm 5,2	18,3 \pm 7,5
3.900	15,0 \pm 4,3*	23,3 \pm 4,2*

Tabla 3.2. Distensión abdominal observada en ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a 1,8-cineol. Cada valor es el promedio de seis réplicas independientes. En cada columna, los valores señalados con asteriscos son significativamente diferentes que su respectivo control ($p < 0,05$).

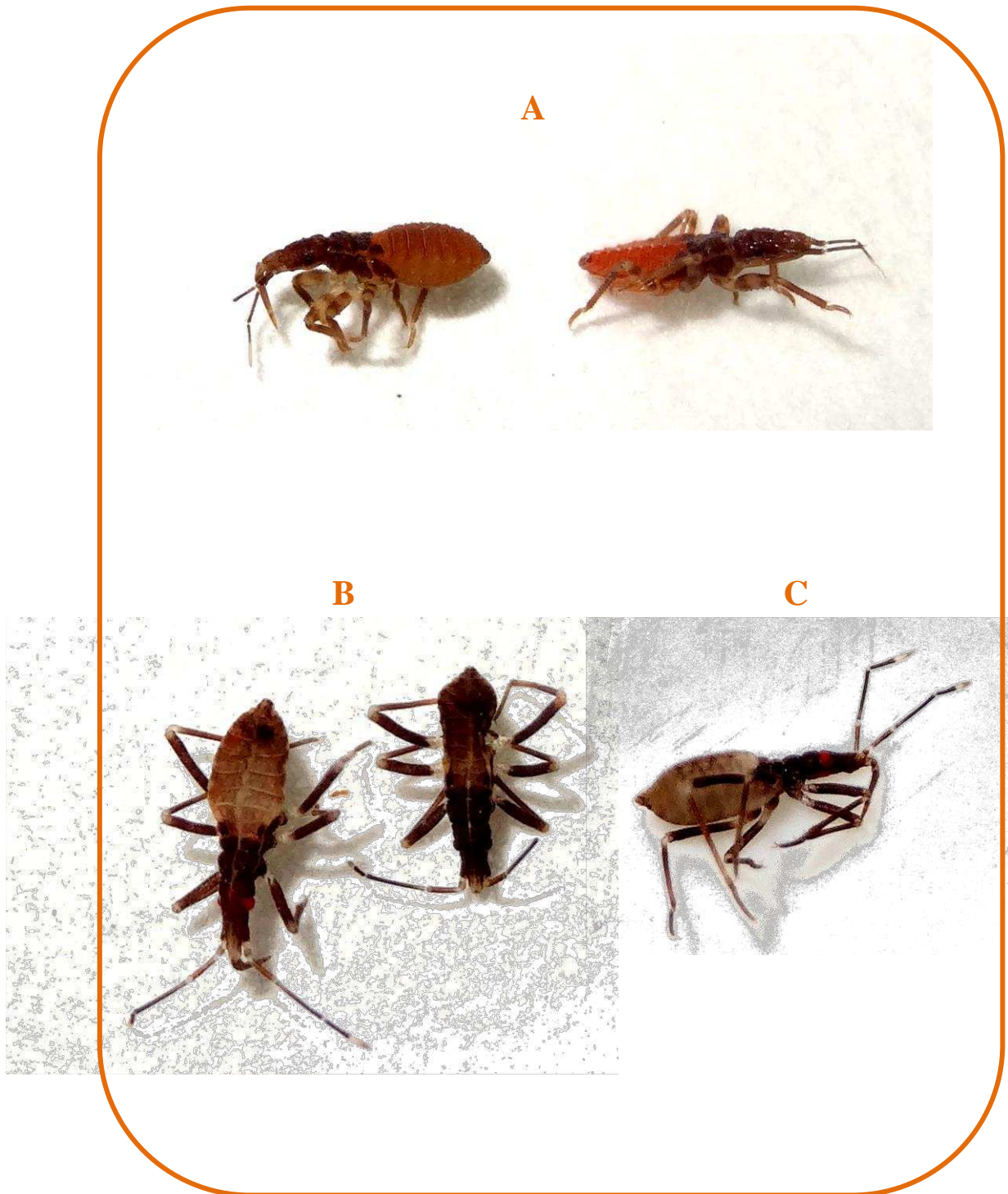


Figura 3.2. Distensión abdominal en ninfas del primer estadio expuestas a 1,8-cineol. A) Vista lateral de ninfas de *T. infestans*. El individuo de la izquierda presenta distensión abdominal; el individuo de la derecha, no (aspecto normal de una ninfa ayunada). B) Vista lateral de ninfas de *R. prolixus* con (izquierda) y sin (derecha) distensión abdominal. C) Vista lateral de una ninfa de *R. prolixus* con marcada distensión abdominal.

3.2. Repelencia

3.2.1. 1,8-Cineol

El 1,8-cineol produjo un efecto repelente en las ninfas de *T. infestans* y de *R. prolixus* (Figura 3.4). En ambos casos, solo para la mayor concentración aplicada ($3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) se obtuvieron valores de *CD* significativamente mayores que los de los controles (ANOVA: *T. infestans*, $F_{3,23} = 18,3$; *R. prolixus*, $F_{3,23} = 17,35$; prueba LSD de Fisher ambos $\mathbf{p} < 0,001$). En las dos especies, los valores de *CD* para la DEET (control positivo), fueron significativamente mayores que los de los respectivos controles a partir de $390 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (ANOVA: *T. infestans*, $F_{3,23} = 3,5$, $\mathbf{p} = 0,035$; ANOVA por rangos [Kruskal-Wallis] *R. prolixus*, $H = 16,37$, $\mathbf{p} = 0,003$).

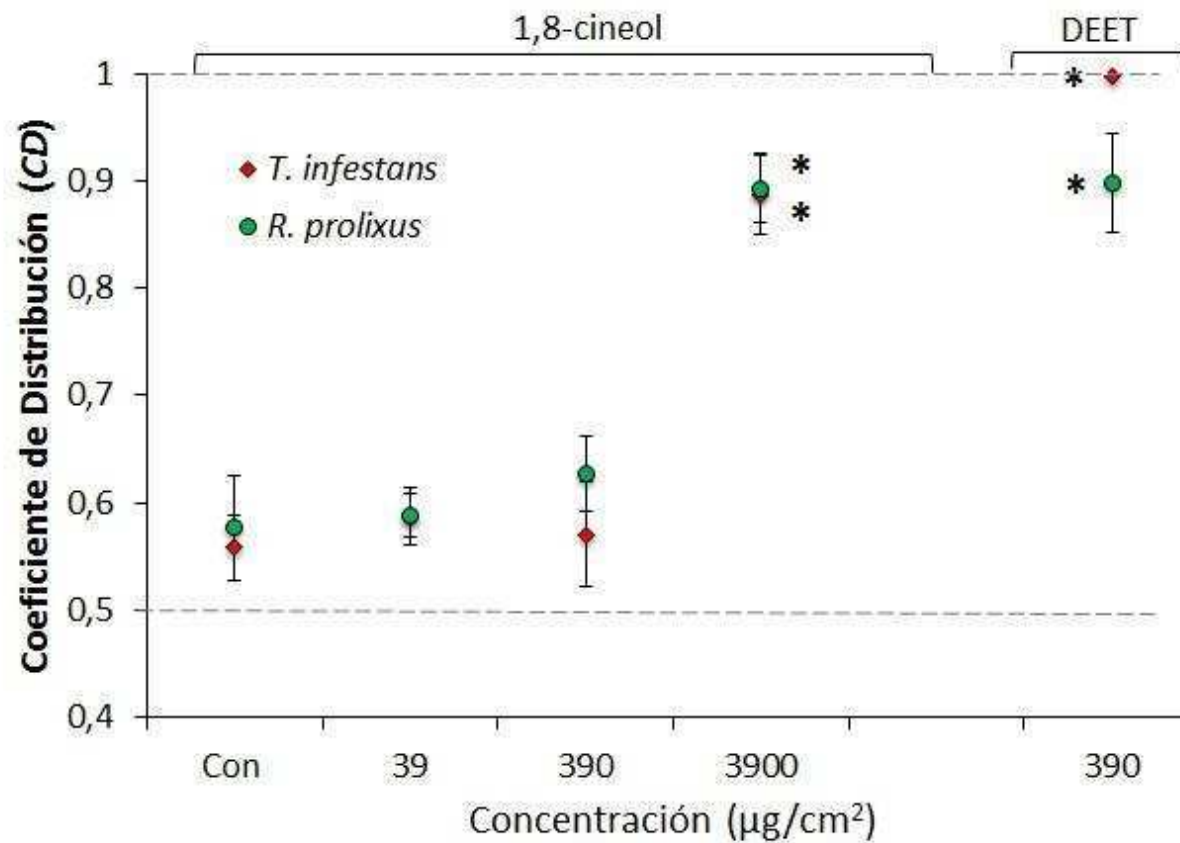


Figura 3.3. Valores de *CD* para 1,8-cineol sobre ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*. Con: control; DEET: *N,N*-dietil-m-toluamida (sólo se muestra la mínima concentración que produjo un efecto significativo: $p < 0,05$). Cada símbolo representa la media de seis réplicas independientes. Las líneas punteadas indican los valores de $CD = 0,5$ (distribución espacial azarosa) y $CD = 1$ (máximo de repelencia). Los símbolos marcados con asteriscos son significativamente diferentes del control (prueba LSD de Fisher: $p < 0,05$).

3.2.2. Diez monoterpenos alcoholes

Los valores de *CD* para ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a monoterpenos alcoholes se muestran en las Figuras 3.4. y 3.5., respectivamente. En *T. infestans*, todos los monoterpenos produjeron un fuerte efecto repelente a partir de 39 (carvacrol, geraniol y timol) o de 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La concentración más alta (3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) no pudo ser evaluada para (S)-*cis*-verbenol porque la solución necesaria para aplicarla superaba el límite de solubilidad de este monoterpeno en acetona. Las significancias de las diferencias entre los valores promedios de *CD* están indicadas en la Figura 3.4.; los resultados de los ANOVA, en la Tabla 3.3.

En *R. prolixus*, carvacrol, eugenol y geraniol produjeron repelencia desde 39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; (-)-carveol, citronelol, linalool, mentol y (S)-*cis*-verbenol, desde 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Solo la mayor concentración de α -terpineol produjo repelencia y ninguna de las concentraciones de timol ocasionó el efecto buscado. Tampoco se evaluó la concentración más alta de (S)-*cis*-verbenol por la cuestión de solubilidad antes explicada. Las significancias de las diferencias entre los valores promedios de *CD* están indicadas en la Figura 3.5.; los resultados de los ANOVA, en la Tabla 3.3.

El efecto repelente de la DEET (control positivo) se manifestó desde 39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en las dos especies. Los resultados de los ANOVA se muestran en la Tabla 3.3.

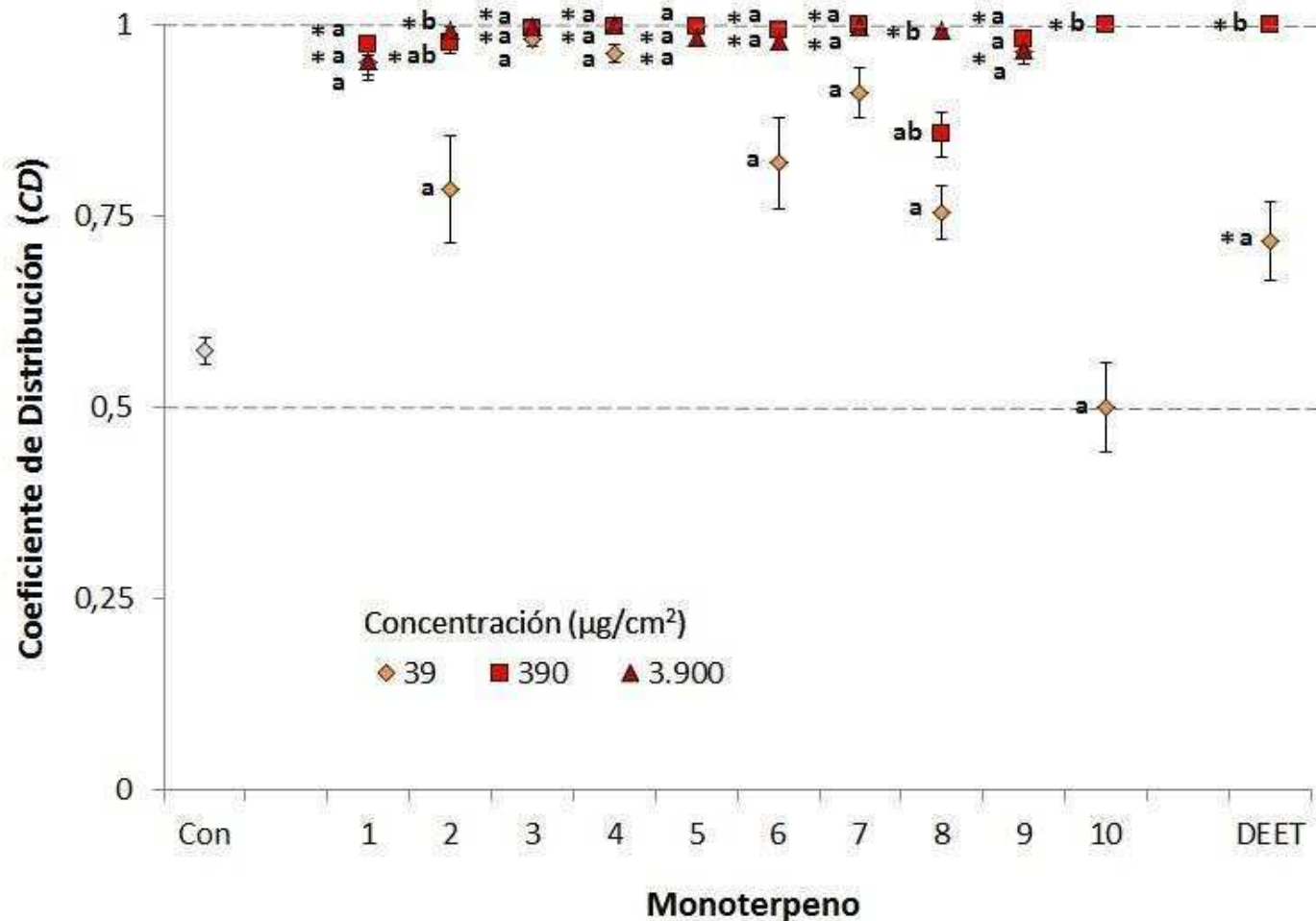


Figura 3.4. Valores de (*CD*) para ninfas del primer estadio de *T. infestans* expuestas a monoterpenos alcoholes. Con: control, DEET: *N,N*-dietil-*m*-toluamida (control positivo), 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronelol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: mentol, 8: α -terpineol, 9: timol, 10: (*S*)-*cis*-verbenol. Las líneas punteadas señalan $CD = 0,5$ (distribución espacial azarosa) y $CD = 1$ (máxima repelencia). Cada símbolo representa la media de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Dentro de cada grupo, los símbolos marcados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (prueba LSD de Fisher: $p > 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los respectivos controles (prueba LSD de Fisher: $p < 0,05$).

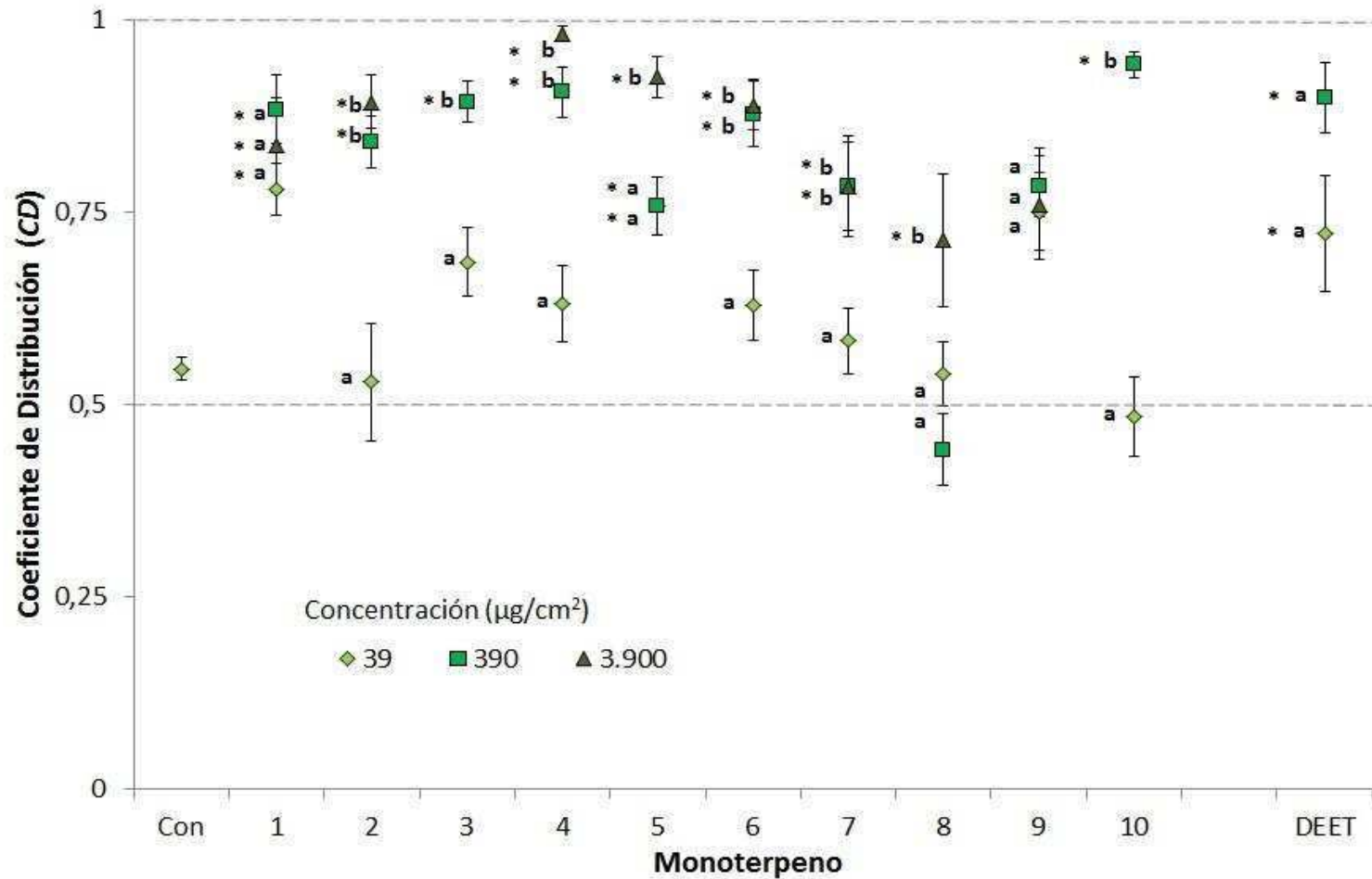


Figura 3.5. Valores de *CD* para ninfas del primer estadio de *R. prolixus* expuestas a monoterpenos alcoholes. Con: control, DEET: *N,N*-dietil-*m*-toluamida (control positivo), 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronelol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: mentol, 8: α -terpineol, 9: timol, 10: (*S*)-*cis*-verbenol. Las líneas punteadas señalan los *CD* = 0,5 (distribución espacial azarosa) y *CD* = 1 (máxima repelencia). Cada símbolo representa la media de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Dentro de cada grupo, los símbolos marcados con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (prueba LSD de Fisher, $p > 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los respectivos controles (prueba LSD de Fisher: $p < 0,05$).

	<i>T. infestans</i>			<i>R. prolixus</i>		
	H	gl	p	F	gl	p
Carvacrol	13,664	3, 23	0,003	8,475	3, 23	< 0,001
(-)-Carveol	17,973	3, 23	< 0,001	24,716	3, 23	< 0,001
Citronelol	14,392	3, 23	0,002	11,662	3, 23	< 0,001
Eugenol	19,036	3, 23	< 0,001	50,232	3, 23	< 0,001
Geraniol	13,365	3, 23	0,004	28,717	3, 23	< 0,001
Linalool	18,007	3, 23	< 0,001	12,14	3, 23	< 0,001
Mentol	18,496	3, 23	< 0,001	4,548	3, 23	0,014
α -Terpineol	19,207	3, 23	< 0,001	5,389	3, 23	0,007
Timol	13,72	3, 23	0,003	1,486	3, 23	0,249
(S)- <i>cis</i> -Verbenol	11,392	2, 17	0,003	40,238	2, 17	< 0,001
				H	gl	p
DEET	3,497	3, 23	0,035	5,967	4	0,113

Tabla 3.3. Resultados de los ANOVA para los bioensayos de repelencia de ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*.

3.3. Volteo

3.3.1. 1,8-Cineol

3.3.1.1. Por exposición a superficies tratadas

Las Figuras 3.6. y 3.7. muestran los valores de TV_{50} obtenidos en ninfas de *T. infestans* y *R. prolixus*, respectivamente, expuestas a papeles de filtro tratados con distintas concentraciones de 1,8 cineol (exposición por contacto e inhalación simultáneamente). En *T. infestans*, el TV_{50} varió entre 59,4 y 239,5 minutos; en *R. prolixus*, entre 42,6 y 167,5 minutos. En general, la toxicidad aumentó al aumentar la concentración de 1,8-cineol y fue similar en las dos especies. El TV_{50} para la menor concentración en *R. prolixus* no se pudo calcular porque al cabo de siete horas de observación, el volteo fue menor que el 50%.

Los valores de TV_{50} para el DDVP (control positivo) variaron entre 3,9 y 4,6 para *T. infestans*, y entre 3,6 y 3,9 minutos para *R. prolixus*; o sea que no mostró una variación importante al aumentar la concentración. Este organofosforado fue entre uno y dos órdenes de magnitud más tóxico que el monoterpeno en ambas especies. Las diferencias entre los valores de TV_{50} para una misma concentración de monoterpenos y DDVP son significativamente diferentes en todos los casos (basado en que los IC95 no se superponen; $p < 0,05$).

En ningún caso se observó recuperación del volteo (el número de ninfas volteadas a las 48 h nunca fue inferior al de las 24 h, datos no presentados).

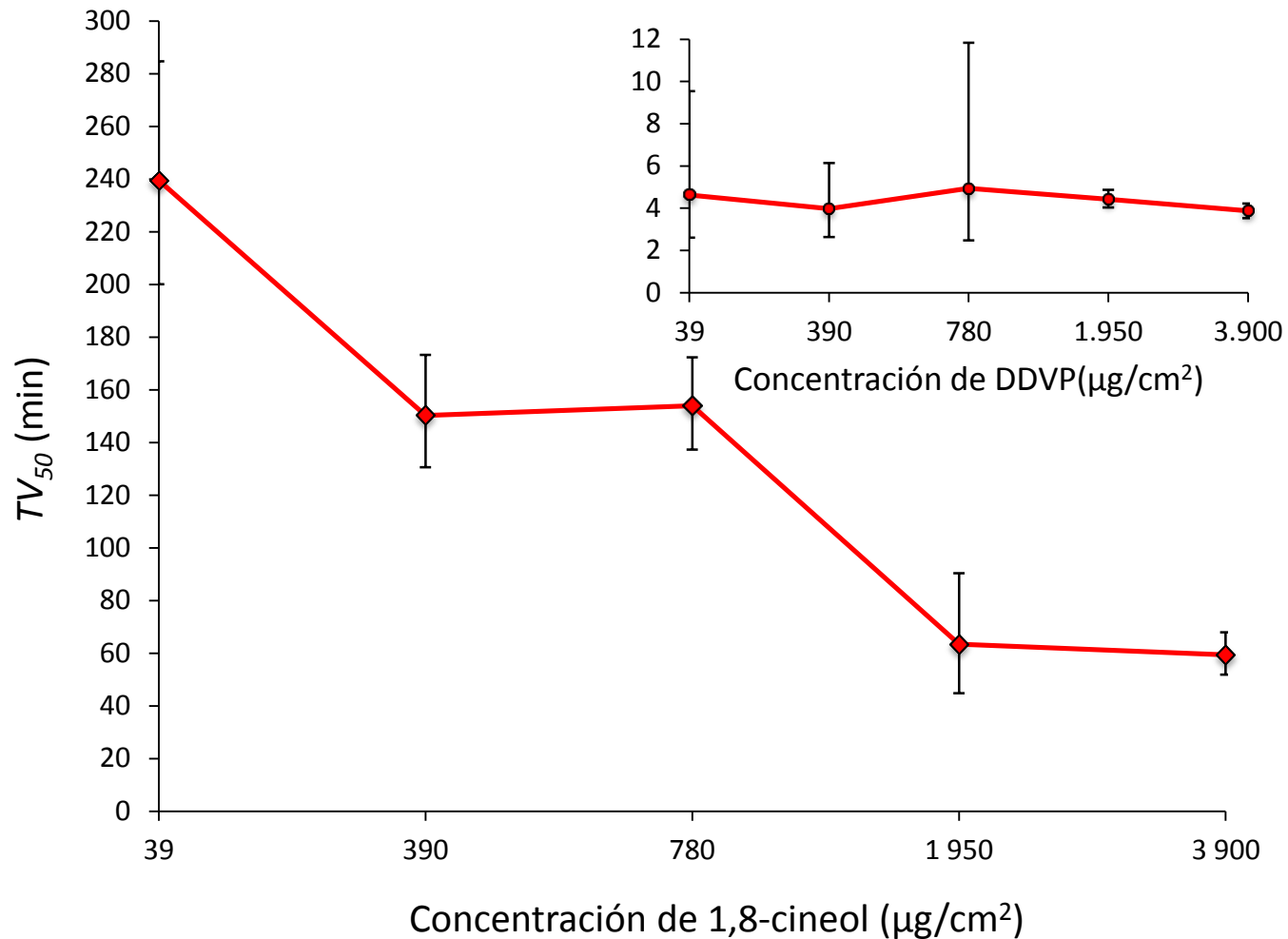


Figura 3.6. Valores de TV_{50} obtenidos en ninfas del primer estadio de *T. infestans* expuestas a 1,8-cineol. Cada símbolo representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los IC95. Los gráficos pequeños muestran los valores de TV_{50} para el DDVP (control positivo). Todos los valores de TV_{50} para el 1,8-cineol son significativamente diferentes del control positivo (basado en que los IC95 no se superponen).

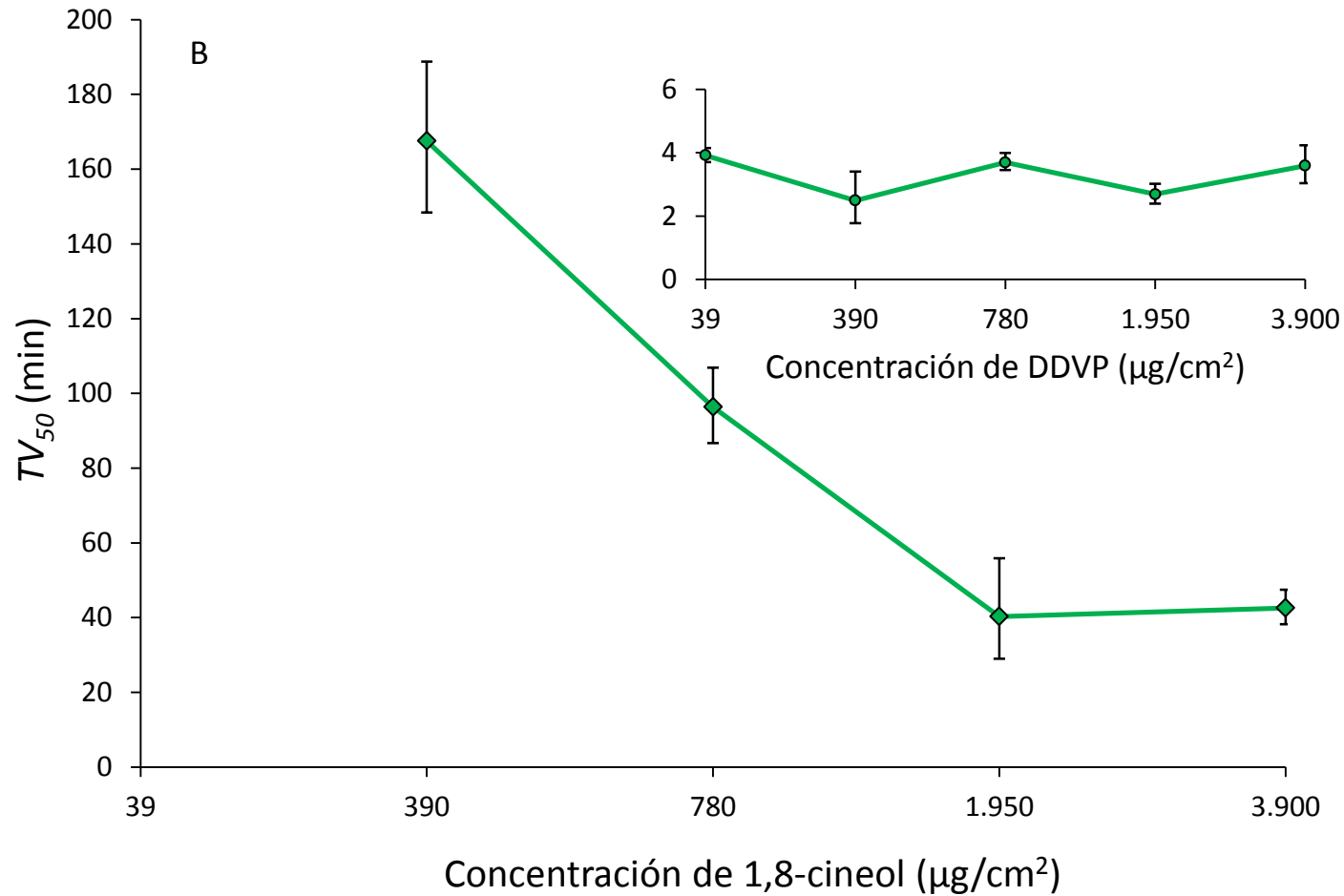


Figura 3.7. Valores de TV_{50} obtenidos en ninfas del primer estadio de *R. prolixus* expuestas a 1,8-cineol. Cada símbolo representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los IC95. Los gráficos pequeños muestran los valores de TV_{50} para el DDVP (control positivo). Todos los valores de TV_{50} para el 1,8-cineol son significativamente diferentes del control negativo (basado en que los IC95 no se superponen).

3.3.1.2. Por aplicación tópica

Cuando el 1,8-cineol se aplicó en forma tópica, se obtuvo una DL_{50} de 121,64 $\mu\text{g/insecto}$ en *T. infestans*, y de 81,42 en *R. prolixus* (Tabla 3.4.). La diferencia entre los dos valores no es significativa (basado en que los IC_{95} se superponen, $p > 0,05$).

La aplicación simultánea de BP no modificó en forma significativa la toxicidad del monoterpeno (basado en que los IC_{95} de las respectivas DL_{50} se superponen: $p > 0,05$). En ambas especies, deltametrina fue siete órdenes de magnitud más tóxica que el monoterpeno.

	<i>T. infestans</i>				<i>R. prolixus</i>			
	<i>n</i>	Pendiente (EE)	DL_{50} $\mu\text{g/insecto}$ (IC 95%)	χ^2	<i>n</i>	Pendiente (EE)	DL_{50} $\mu\text{g/insecto}$ (IC 95%)	χ^2
1,8-Cineol	4	3,5 (0,47)	121,64 (72,8 - 192,91)	14,24	4	4,08 (0,505)	81,42 (43,29 - 125,77)	15,89
1,8-Cineol + BP (100 mg/ml)	3	2,21 (0,47)	137,35 (103,37 - 206,17)	0,39	3	2,12 (0,42)	85,77 (62,82 - 114,93)	1,2
Deltametrina	4	1,12 (0,34)	$2,352 \times 10^{-5}$ ($3,31 \times 10^{-6}$ - $4,252 \times 10^{-5}$)	1,984	3	1,412 (0,23)	$2,2 \times 10^{-6}$ ($5,727 \times 10^{-7}$ - $4,741 \times 10^{-6}$)	5,95

Tabla 3.4. Valores de DL_{50} para ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* tratadas en forma tópica con 1,8-cineol. *n*, número de réplicas por experimento.

3.3.2. Diez monoterpenos alcoholes

Los valores de TV_{50} para ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a papeles de filtro impregnados con monoterpenos alcoholes (exposición por contacto e inhalación simultáneamente) se muestran en la Tabla 3.5. En *T. infestans*, los monoterpenos alcoholes presentaron el siguiente orden de toxicidad creciente (valores de TV_{50} en minutos): α -terpineol (298,9) < eugenol (221,3) < carvacrol (164,2) < linalool (154,9) < timol (96,7).

En *R. prolixus*, el orden creciente de toxicidad fue: geraniol (213,7) < α -terpineol (164,5) < linalool (124,2) < carvacrol (111,6) < eugenol (89,8) < timol (78,9). Al cabo de siete horas de exposición, (-)-carveol, citronelol, y mentol (en ambas especies) y geraniol (en *T. infestans*) produjeron menos de 50% de volteo; por esta razón, no fue posible calcular los valores de TV_{50} para estos monoterpenos.

El DDVP (control positivo) fue más tóxico que cualquier monoterpeno en ambas especies, con un TV_{50} de 3,9 minutos en *T. infestans* y 3,6 minutos en *R. prolixus*. (S)-Cis-verbenol no fue evaluado en ninguna de las especies, porque la solución necesaria para lograr la concentración deseada excedía su límite de solubilidad en acetona.

En ningún caso ocurrió la distensión abdominal observada en ninfas expuestas a 1,8-cineol (ver sección 3.1.1.).

<i>T. infestans</i>						<i>R. prolixus</i>				
	n	Pendiente (EE)	TV ₅₀ min (IC95)	TV ₉₅ min (IC95)	χ ²	n	Pendiente (EE)	TV ₅₀ min (IC95)	TV ₉₅ min (IC95)	χ ²
Timol	6	3,9 (0,4)	96,7a (78,2-120,4)	255,4 a (191,6-401,4)	26,6	6	6,2 (0,64)	78,9 a (67,3-92,7)	145 a (118,5-204,0)	16,2
Linalool	6	6,0 (0,61)	154,9 b (140,1-171,5)	292,1 a (253,7-354,7)	15,8	6	5,6 (0,58)	124,2 b (102,5-151,8)	244,0 ab (191,1-379,5)	30,0
Carvacrol	6	5,6 (0,60)	164,2 b (147,5-183,0)	321,0 a (275,5-397,3)	21,0	6	6,2 (0,61)	111,6 b (101,3-123,0)	205,4 a (179,9-245,7)	16,3
Eugenol	6	3,6 (0,40)	221,3 c (187,2-263,7)	631,9 b (491,7-904)	35,1	6	4,0 (0,46)	89,8 ab (65,8-124,7)	233,6 ab (158,4-541,4)	37,4
α-Terpineol	6	6,7 (0,75)	289,8 c (253,1-334,3)	508,6 b (422,3-703,5)	37,9	6	4,0 (0,45)	164,5 c (129,4-213,19)	427,4 bc (305,8-783,4)	41,4
Geraniol	6	-	-	-	-	6	2,5 (0,31)	213,7 c (132,6-392,6)	963,7 c (489,0-4.919,9)	73,2
(-)-Carveol	6	-	-	-	-	6	-	-	-	-
Citronelol	6	-	-	-	-	6	-	-	-	-
Mentol	6	-	-	-	-	6	-	-	-	-
DDVP	6	6,8 (0,7)	3,9 d (3,5-4,2)	6,8 c (6-8)	6,1	6	7,2 (0,7)	3,6 d (3,0-4,2)	6,1 d (5-8,8)	18,8

Tabla 3.5. Valores de TV para ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a monoterpenos alcoholes (ingreso por contacto e inhalación simultáneamente). n, número de réplicas por tratamiento. En las celdas con un guión, los valores de TV₅₀ o TV₉₅ no fueron calculados porque menos del 50% de las ninfas estaban volteadas al cabo de siete horas de exposición. Los compuestos están ordenados por su orden de toxicidad creciente en *T. infestans*. Dentro de una columna, los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$).

3.4. Actividad locomotora

3.4.1. 1,8-Cineol

La exposición de las ninfas a papeles de filtro tratados con 1,8-cineol produjo un aumento de la actividad locomotora (Figura 3.8.). Solo sobre *T. infestans*, para la mayor de las cuatro concentraciones aplicadas (3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), hubo un aumento significativo de la actividad locomotora respecto al control (ANOVA no-paramétrico, Kruskal-Wallis: H_5 , prueba de Dunn: $\mathbf{p} = 0,001$) (Figura 3.8.). El control positivo (deltametrina) aumentó significativamente la actividad locomotora a partir de 0,39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en *T. infestans*, y a partir de 0,039 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en *R. prolixus* (ANOVA: *T. infestans*: $F_{4,29} = 3,04$; prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} = 0,036$; *R. prolixus*: $F_{4,29} = 3.47$; prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} = 0,022$).

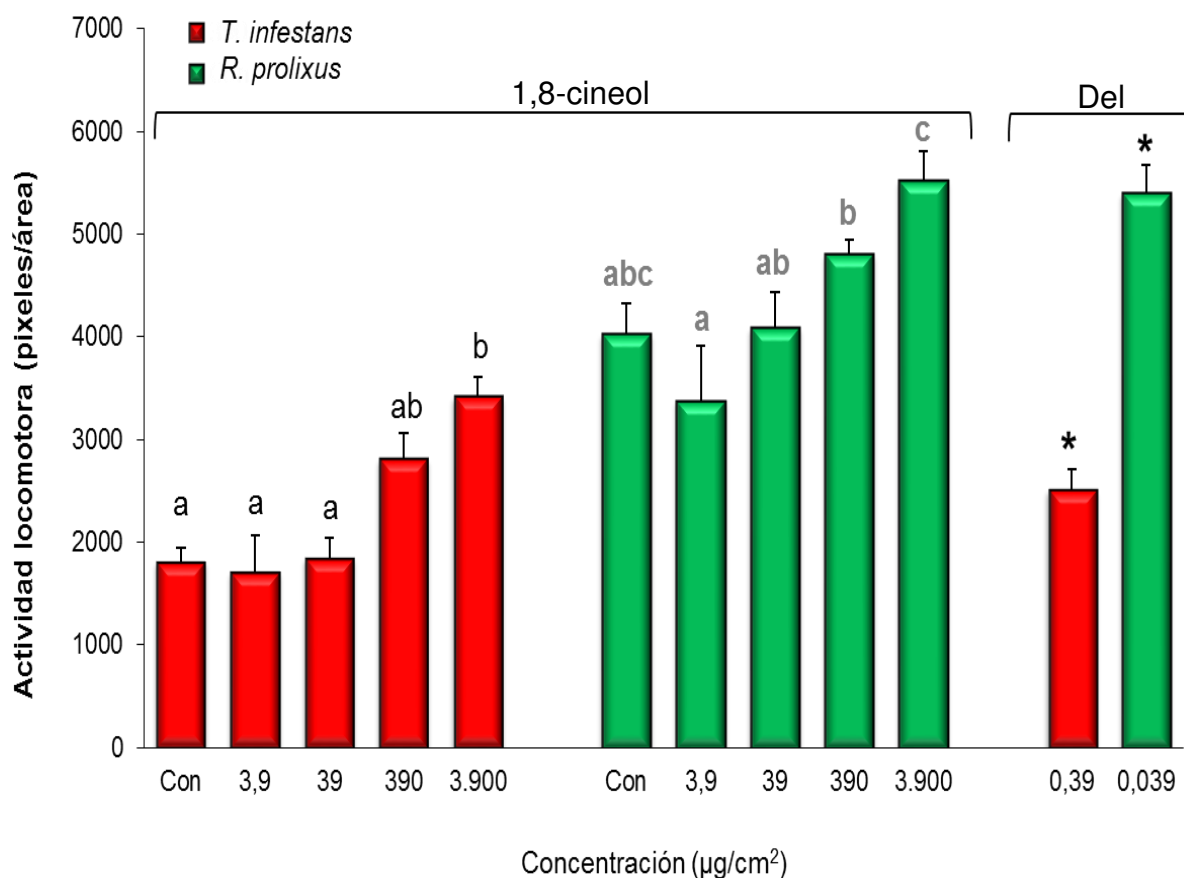


Figura 3.8. Actividad locomotora de ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a papeles de filtro tratados con diferentes concentraciones de 1,8-cineol. Con: control, Del: deltametrina (solo se muestran las mínimas concentraciones que produjeron un aumento significativo de la actividad locomotora: $p < 0,05$). Cada barra representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Dentro de cada especie, las barras señaladas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los correspondientes controles ($p < 0,05$).

3.4.2. Diez monoterpenos alcoholes

Cuando fueron aplicados mediante papeles de filtro impregnados (exposición por contacto e inhalación simultáneamente), la mayoría de los monoterpenos alcoholes aumentó la actividad locomotora de las ninfas de *T. infestans* y *R. prolixus* (Figuras 3.9. y 3.10., respectivamente).

En *T. infestans*, en general, la mínima concentración que produjo hiperactivación fue $390 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 3.9.). La única excepción fue el (S)-*cis*-verbenol, ya que $390 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de esta sustancia no hiperactivaron a las ninfas (no se pudo usar una concentración de $3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ como en los otros casos porque la solución necesaria para aplicarla superaba el límite de solubilidad de este monoterpeno en acetona). Deltametrina (control positivo) hiperactivó a partir de $0,39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las significancias de las diferencias entre los valores promedios están indicadas en la Figura 3.9., y todos los parámetros estadísticos están detallados en la Tabla 3.6.

En *R. prolixus*, carvacrol fue el monoterpeno de mayor acción hiperactivante; su efecto se manifestó a partir de $39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 3.10.). Mentol, timol y eugenol fueron los hiperactivantes más débiles: la acción de los dos primeros se manifestó solamente a $3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, mientras que ninguna de las concentraciones de eugenol modificó la actividad locomotora. Los seis monoterpenos restantes aumentaron la actividad locomotora a partir de $390 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (no se pudo evaluar la concentración de $3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de citronelol porque provocó síntomas visibles de intoxicación antes de finalizar el tiempo experimental de estos bioensayos; como se mencionó antes, tampoco se usó la mayor concentración de (S)-

cis-verbenol a causa de su menor solubilidad en acetona). Deltametrina (control positivo) aumentó la actividad locomotora de las ninfas a partir de 0,39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Las significancias de las diferencias entre los valores promedios de actividad locomotora están indicadas en la Figura 3.10., y todos los parámetros estadísticos están detallados en la Tabla 3.6.

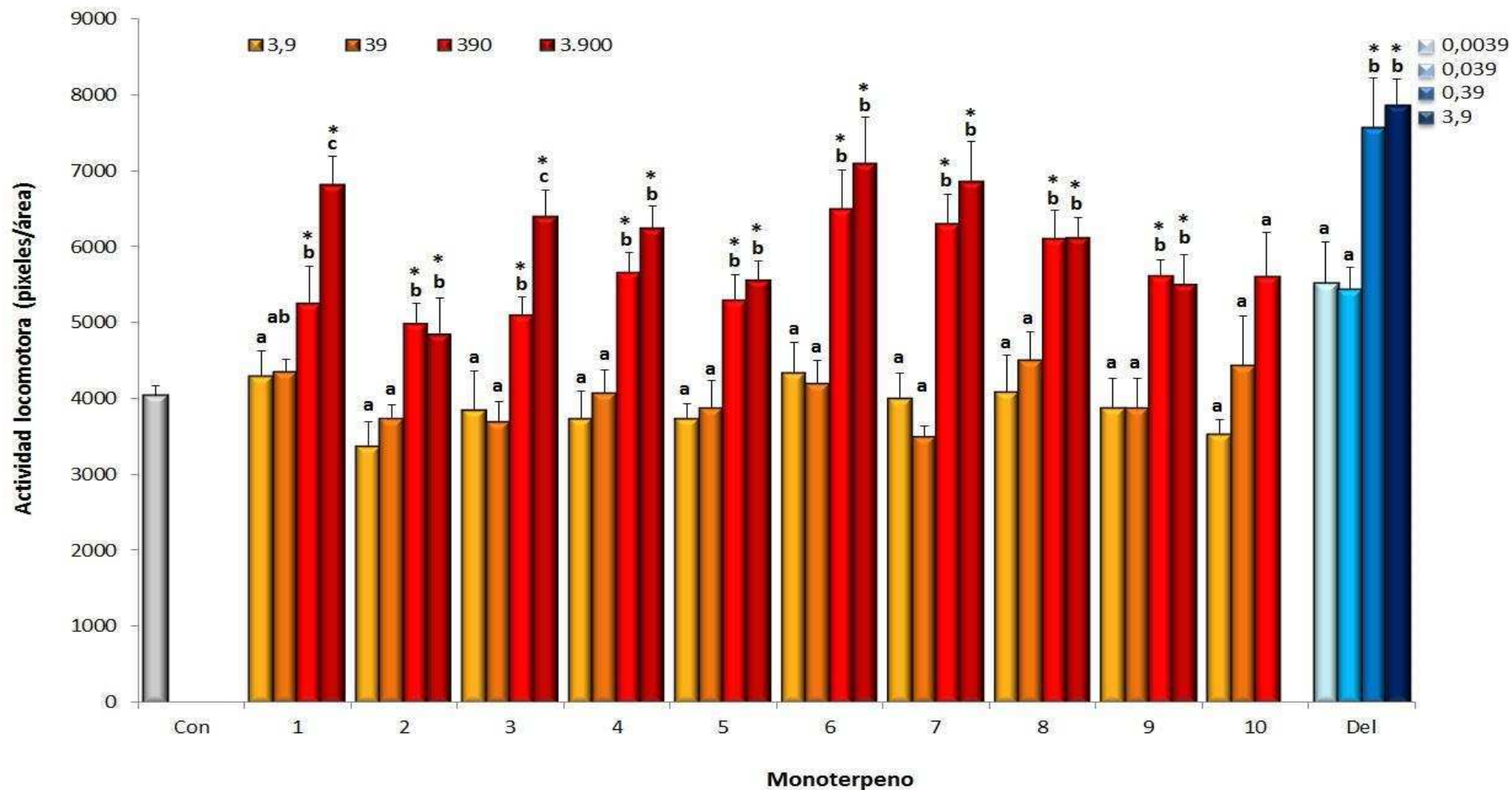


Figura 3.9. Actividad locomotora de ninfas del primer estadio de *T. infestans* expuestas a diferentes concentraciones ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de monoterpenos alcoholes. Con: control; Del: deltametrina (control positivo). 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronelol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: mentol, 8: α -terpineol, 9: timol, 10: (S)-*cis*-verbenol. Cada barra representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Dentro de cada grupo, las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes (prueba LSD de Fisher: $p > 0,05$). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al control (prueba LSD de Fisher: $p < 0,05$).

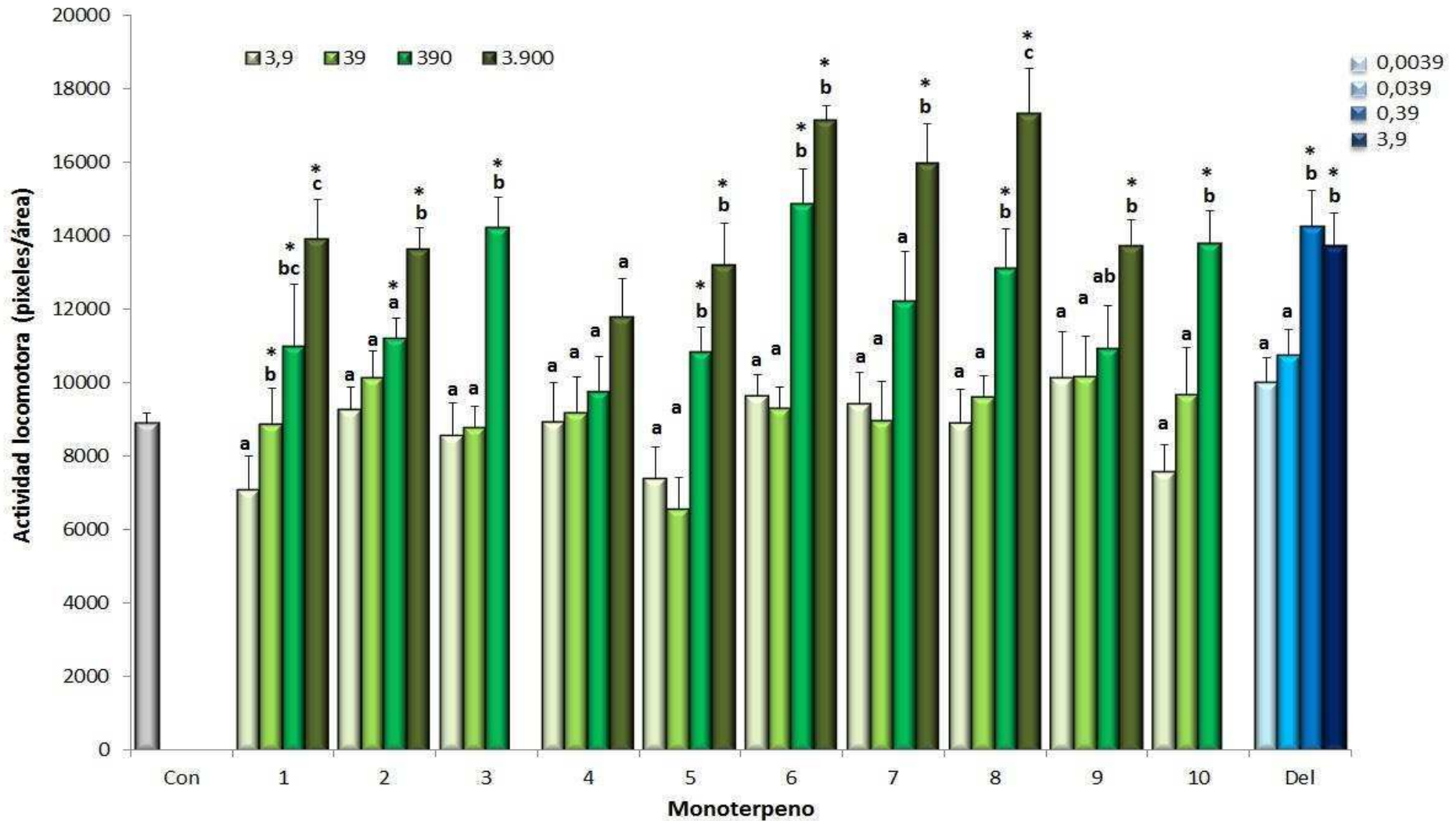


Figura 3.10. Actividad locomotora de ninfas del primer estadio de *R. prolixus* expuestas a diferentes concentraciones ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de monoterpenos alcoholes. Con: control; Del: deltametrina (control positivo). 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronelol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: mentol, 8: α -terpineol, 9: timol, 10: (S)-*cis*-verbenol. Cada barra representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Dentro de cada grupo, las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí (prueba LSD de Fisher: $p > 0,05$). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al control (prueba LSD de Fisher: $p < 0,05$).

	<i>T. infestans</i>			<i>R. prolixus</i>		
	F	gl	p	F	gl	p
Carvacrol	12,273	4, 29	< 0,001	4,809	4, 29	0,005
(-)-Carveol	5,389	4, 29	0,003	9,447	4, 29	< 0,001
Citronelol	11,268	4, 29	< 0,001	24,31	4, 29	< 0,001
Eugenol	13,454	4, 29	< 0,001	1,864	4, 29	0,148
Geraniol	9,66	4, 29	< 0,001	12,27	4, 29	< 0,001
Linalool	10,43	4, 29	< 0,001	20,545	4, 29	< 0,001
Mentol	15,022	4, 29	< 0,001	5,89	4, 29	0,002
α -Terpineol	6,65	4, 29	< 0,001	14,852	4, 29	< 0,001
Timol	7,351	4, 29	< 0,001	3,821	4, 29	0,015
(S)- <i>cis</i> -Verbenol	1,818	3, 23	0,176	7,396	3, 23	0,002
Deltametrina	8,478	4, 25	< 0,001	8,938	4, 24	< 0,001

Tabla 3.6. Resultados de los ANOVA para los bioensayos de actividad locomotora de ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*. Se realizaron las comparaciones mediante pruebas LSD de Fisher.

3.4.3. En ninfas del quinto estadio

En las secciones previas se presentaron los resultados de ensayos donde, entre otras cosas, se evaluaron los efectos de varios monoterpenos sobre la actividad locomotora de ninfas del primer estadio de *T. infestans* y *R. prolixus*. Entre esos monoterpenos, se eligieron algunos de los que produjeron un mayor efecto para averiguar si también resultan buenos hiperactivantes en otro estadio de los triatominos estudiados (teniendo en cuenta que, en los ensayos preliminares, la tetrametrina, un reconocido hiperactivante de vinchucas, no modificó la actividad locomotora de las ninfas del primer estadio). Los monoterpenos elegidos fueron 1,8-cineol, α -terpineol, eugenol, linalool, mentol y timol.

De los seis monoterpenos evaluados en esta parte del trabajo, solo linalool y mentol produjeron hiperactividad en ninfas del quinto estadio de *T. infestans* (Figura 3.11.). La mínima concentración de linalool que aumentó significativamente la actividad locomotora de las ninfas fue $390 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F_{4,66} = 10,188$, prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} < 0,001$); mientras que la mínima concentración de mentol fue $3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F_{4,66} = 4,125$, prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} = 0,005$). La tetrametrina (control positivo) produjo una hiperactividad significativa a partir de $3,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F_{5,72} = 7,972$, prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} < 0,001$).

Solo tres de los monoterpenos evaluados hiperactivaron a las ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* (Figura 3.12.). Eugenol aumentó

significativamente la actividad locomotora a partir de $390 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F_{4,30} = 4,338$, prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} = 0,008$); 1,8-cineol y α -terpineol lo hicieron solo cuando se aplicó una concentración de a $3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($F_{4,30} = 7,084$, prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} < 0,001$; $F_{4,30} = 3,395$, $\mathbf{p} = 0,023$, respectivamente). Todas las concentraciones evaluadas de tetrametrina produjeron un efecto hiperactivante significativo ($F_{5,36} = 4,999$, prueba LSD de Fisher $\mathbf{p} = 0,002$).

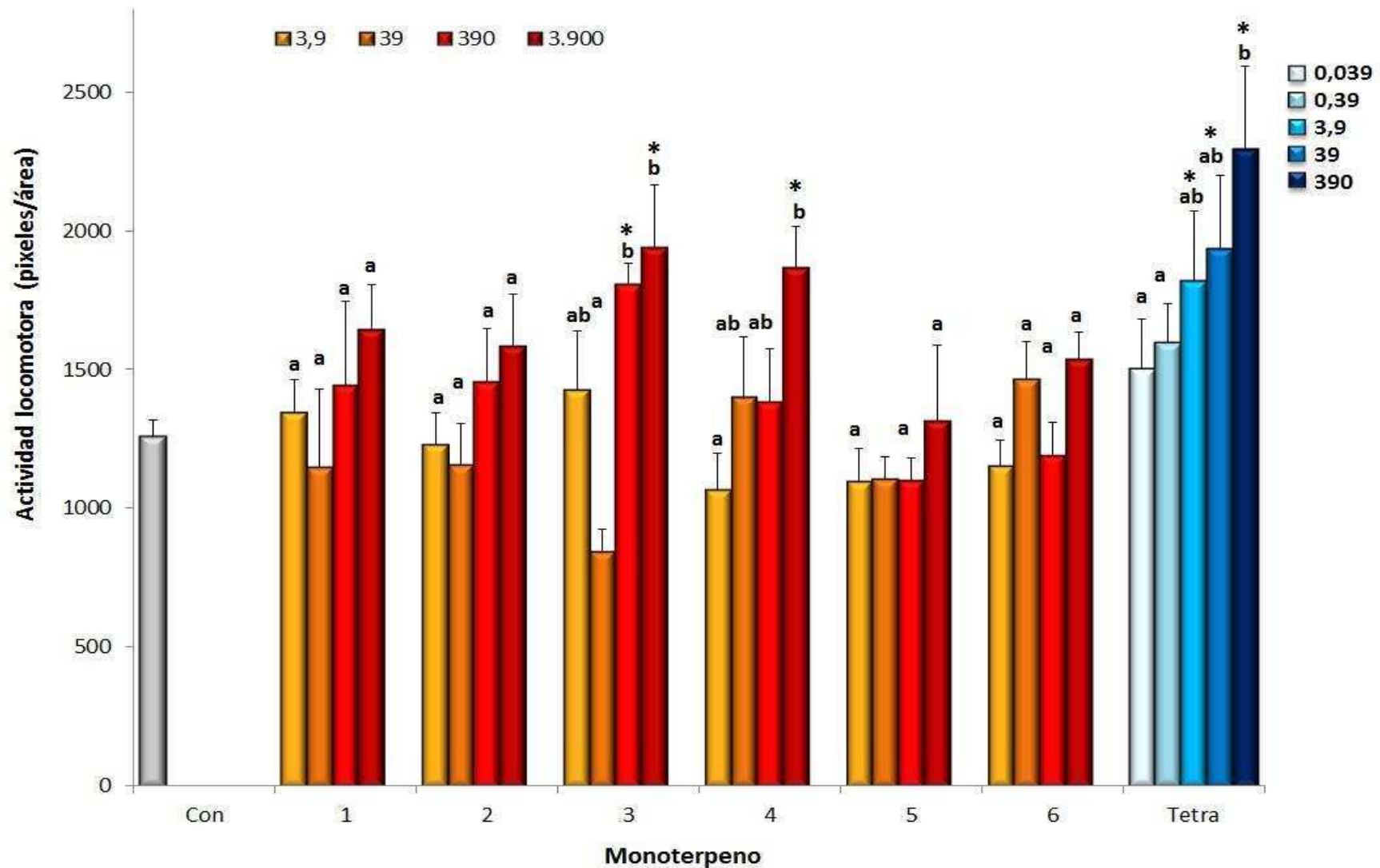


Figura 3.11. Actividad locomotora de ninfas del quinto estadio de *T. infestans* expuestas a diferentes concentraciones ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de 1,8-cineol y cinco monoterpenos alcoholes. Con: control; Tetra: tetrametrina (control positivo); 1: 1,8-cineol; 2: eugenol; 3: linalool; 4: mentol; 5: α -terpineol; 6: timol. Cada barra representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Las barras marcadas con asteriscos indican diferencia significativa respecto al control (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

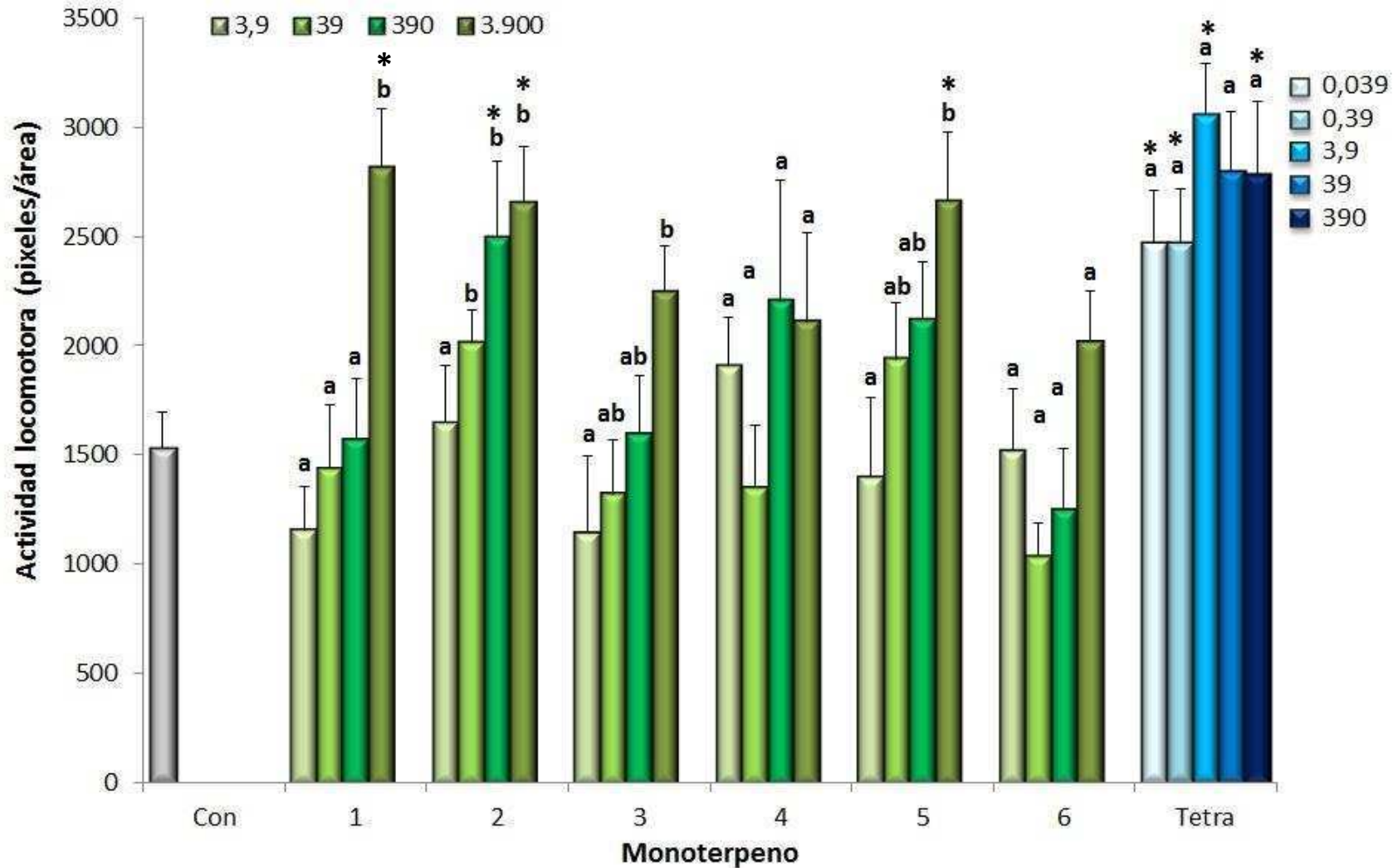


Figura 3.12. Actividad locomotora de ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* expuestas a diferentes concentraciones ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de 1,8-cineol y cinco monoterpenos alcoholes. Con: control; Tetra: tetrametrina (control positivo); 1: 1,8-cineol, 2: eugenol, 3: linalool, 4: mentol, 5: α -terpineol, 6: timol. Cada barra representa el promedio de seis réplicas independientes. Las líneas verticales son los EE. Las barras marcadas con asteriscos indican diferencia significativa respecto al control (prueba LSD de Fisher, $p < 0,05$).

3.5. Expurgue producido por monoterpenos en *T. infestans*

Una vez evaluado en ninfas del quinto estadio de *T. infestans* el efecto de los seis monoterpenos elegidos (sección 3.4.3.), se procedió a estudiar su capacidad de expurgue en condiciones de laboratorio. A partir de los resultados obtenidos, se eligieron dos monoterpenos que fueron usados luego para realizar experimentos en condiciones de semi-campo.

3.5.1. Expurgue en condiciones de laboratorio

La Figura 3.13. muestra el expurgue registrado durante la media hora siguiente a la aplicación de los tratamientos; en la Tabla 3.7 se detallan los respectivos valores de TE_{50} .

Comparados con la tetrametrina (control positivo), los monoterpenos produjeron un débil expurgue. El linalool fue el mejor expurgante, con un TE_{50} de 16,67 minutos que no fue significativamente diferente del TE_{50} de tetrametrina 0,2% (8,29 minutos) (basado en que los IC95 se superponen; $p > 0,05$). De esta manera, se necesitó una concentración de linalool 245 veces mayor que la del piretroide para obtener un tiempo equitópico.

El TE_{50} de mentol, 42,98 minutos, fue significativamente mayor que el de tetrametrina. 1,8-Cineol, α -terpineol, timol y eugenol expurgaron menos del 40% de las ninfas durante el tiempo experimental predeterminado, de modo que no fue posible calcular sus respectivos valores de TE_{50} .

No hubo diferencias significativas entre los TE_{50} de la tetrametrina 0,2% en acetona y del aerosol comercial usado por los agentes sanitarios del Servicio Nacional de Chagas (basado en que los IC95 se superponen: $p > 0,05$).

Cuando se aplicaron linalool, mentol o tetrametrina en sus dos formas, las ninfas abandonaron el refugio a una tasa aproximadamente constante a lo largo del tiempo experimental (Figura 3.13.). Al aplicar 1,8-cineol, α -terpineol o timol, una o unas pocas ninfas abandonaron el refugio después de transcurridos diez o más minutos de iniciado el tratamiento. La dinámica del eugenol fue diferente: expurgó en promedio al 40% de las ninfas en los primeros cuatro minutos y a partir de ese momento ya no observaron ninfas abandonando el refugio.

Linalool y mentol presentaron el mayor efecto expurgante, con valores de TE_{50} de 16,67 y 42,98 minutos, respectivamente. Linalool fue el único que produjo un expurgue similar a la menor concentración de tetrametrina (control positivo) (pero la concentración del monoterpeno que arrojó este resultado fue muy superior a la del piretroide).

En base a estos resultados, se evaluó el expurgue producido por distintas concentraciones de linalool y eugenol, aplicados en forma independiente y mezclados. El propósito de estos ensayos fue explorar la combinación del efecto inmediato del eugenol con la capacidad expurgante del linalool (Tabla 3.8.). Los TE_{50} para linalool disminuyeron al aumentar

la concentración aplicada. Todas las concentraciones de eugenol produjeron expurgue, pero nunca superaron el 50%.

De las mezclas evaluadas, solo los resultados obtenidos para la combinación linalool-eugenol 2:1 (1,76 g/m³) permitieron calcular un TE_{50} (40,73 minutos). Este valor fue significativamente mayor que el del linalool solo (1,76 g/m³): 8,48 minutos (basado en que los IC95 no se superponen, $p < 0,05$). Esta mezcla y sus componentes puros fueron elegidos para los experimentos en condiciones de semi-campo, cuyos resultados se presentan en la siguiente sección.

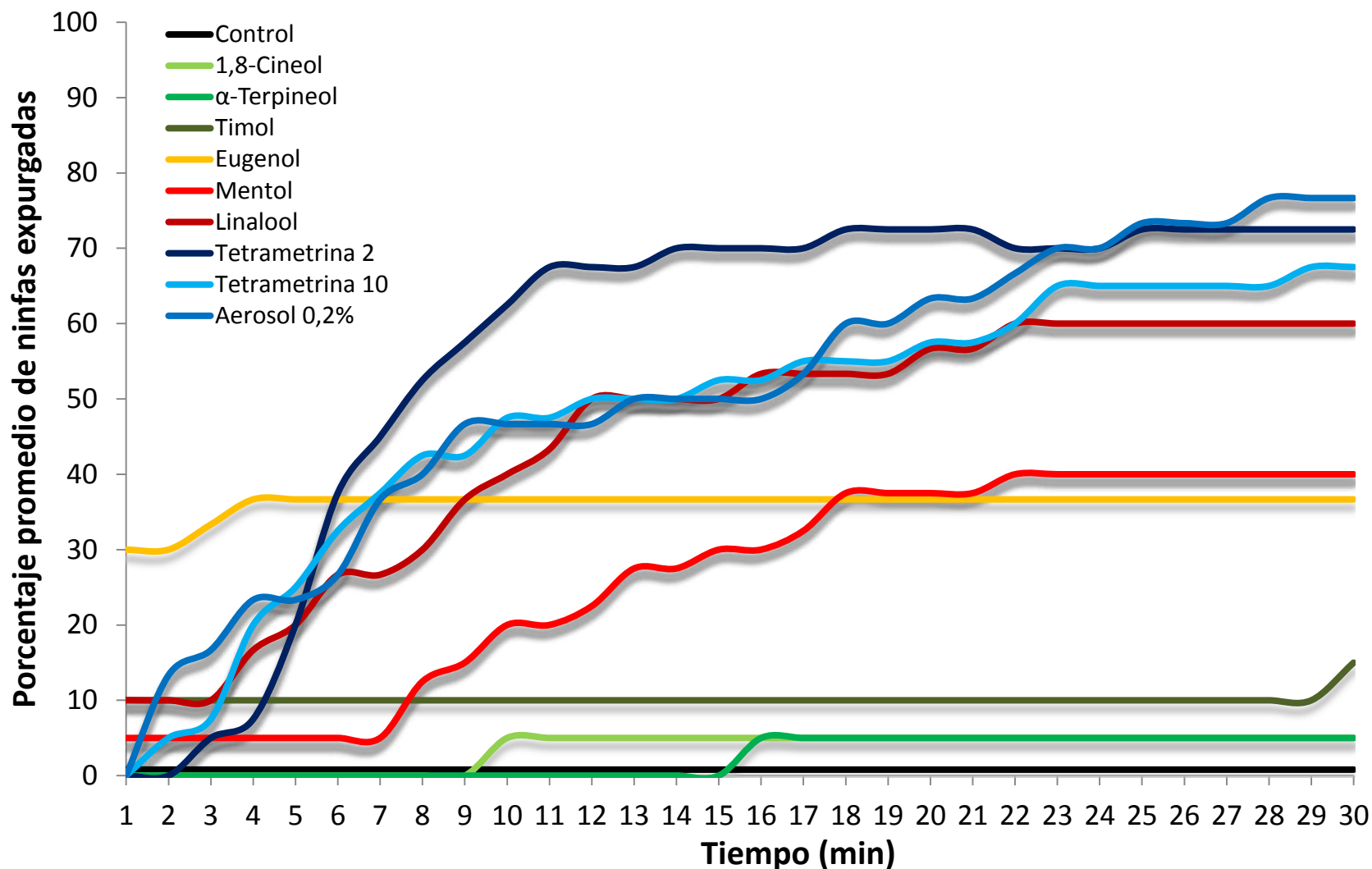


Figura 3.13. Porcentaje promedio de ninfas del quinto estadio de *T. infestans* expurgadas en condiciones de laboratorio por exposición a 1,8-cineol y cinco monoterpenos alcoholes ($1,47 \text{ g/m}^3$). Se aplicaron dos concentraciones de tetrametrina (control positivo): $0,006$ (tetrametrina 2) y $0,03$ (tetrametrina 10) g/m^3 . Los valores graficados son promedios de 2-5 réplicas.

	Concentración (g/m ³)	n	Pendiente (EE)	TE ₅₀ min (IC95)	χ ²
Linalool	1,47	3	1,47 (0,38)	16,67 ab (8,63-39,98)	0,8
Mentol	1,47	4	1,33 (0,24)	42,98 b (23,97-87,09)	4,96
Eugenol	1,47	3	-	NC	-
1,8-Cineol	1,47	2	-	NC	-
α-Terpineol	1,47	2	-	NC	-
Timol	1,47	2	-	NC	-
Tetrametrina 2	0,006	4	3,23 (0,58)	8,29 a (6,48-10,9)	6,41
Tetrametrina 10	0,03	4	1,31 (0,24)	15,37 ab (8,49-31,08)	18,58
Aerosol comercial de tetrametrina (Reopen, 0,2 %)	aprox. 0,006	6	1,65 (0,47)	12,71 ab (5,59-29,36)	4,9

Tabla 3.7. Valores de TE₅₀ para ninfas del quinto estadio de *T. infestans* expuestas a monoterpenos a una dosis de 1,47 g/m³. n, número de réplicas; NC, no calculado. Los valores señalados con una misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

	Concentración (g/m ³)	n	Pendiente (EE)	TE ₅₀ min (IC95)	χ ²
Linalool 100	0,29	4	1,62 (0,4)	38,35 b (22,18-112,71)	3,03
Linalool 300	0,88	3	2,33 (0,55)	18,56 ab (12,44-33,57)	1,43
Linalool 600	1,76	3	1,93 (0,41)	8,48 a (5,27-15,5)	6,66
Eugenol 100	0,29	3	-	NC	-
Eugenol 300	0,88	6	-	NC	-
Eugenol 600	1,76	5	-	NC	-
Linalool:eugenol 1:1 500	1,47	4	-	NC	-
Linalool:eugenol 4:1 500	1,47	1	-	NC	-
Linalool:eugenol 1:1 600	1,76	3	-	NC	-
Linalool:eugenol 2:1 600	1,76	3	1,02 (0,3)	40,73 b (21,65-87,84)	0,56

Tabla 3.8. Valores de TE_{50} para ninfas del quinto estadio de *T. infestans* expuestas a distintas dosis de los monoterpenos que arrojaron resultados más interesantes y a mezclas de ellos. n, número de réplicas; NC, no calculado. Los valores señalados con una misma letra no presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.5.2. Expurgue en condiciones de semi-campo

Tanto linalool como eugenol, aplicados independientemente a una concentración final de 12 g/m² o en una mezcla linalool-eugenol 2:1 a 14,4 g/m², permitieron registrar cualitativamente un efecto hiperactivante y expurgante en las ninfas del tercer y quinto estadio de *T. infestans* en condiciones de semi-campo. Se realizó una observación directa de muchas ninfas que padecieron una hiperactivación locomotora sin llegar a salir, o apenas asomando de sus refugios. La Figura 3.15. muestra la dinámica temporal del efecto para cada tratamiento. Puede verse que lo registrado en condiciones de laboratorio para estos mismos tratamientos se replica cualitativamente (comparar con la Figura 3.13.). La Figura 3.14. muestra los valores de porcentaje total (ninfas del tercer y quinto estadio analizadas conjuntamente) de ninfas expurgadas. El ANOVA no arrojó diferencias significativas entre los monoterpenos, y mostró un efecto significativamente mayor para el control positivo (prueba LSD de Fisher, $F_{3,14} = 4,215$; $p = 0,033$). En este análisis no se pudo incluir el control negativo (acetona sola) ya que este tratamiento no provocó expurgue (0% de ninfas expurgadas en todas las réplicas y por lo tanto el promedio no posee varianza). Por otro lado se compararon todos los tratamientos entre sí (de a pares) mediante pruebas *T* de una muestra. Este análisis reveló que la mezcla linalool-eugenol 2:1 y la tetrametrina fueron significativamente distintas del control negativo (mezcla: $t_3 = 4,741$, $p = 0,005$; tetrametrina: $t = 4,801$, $p = 0,009$) y no significativamente diferentes entre sí ($t_4 = -2,294$, $p = 0,083$).

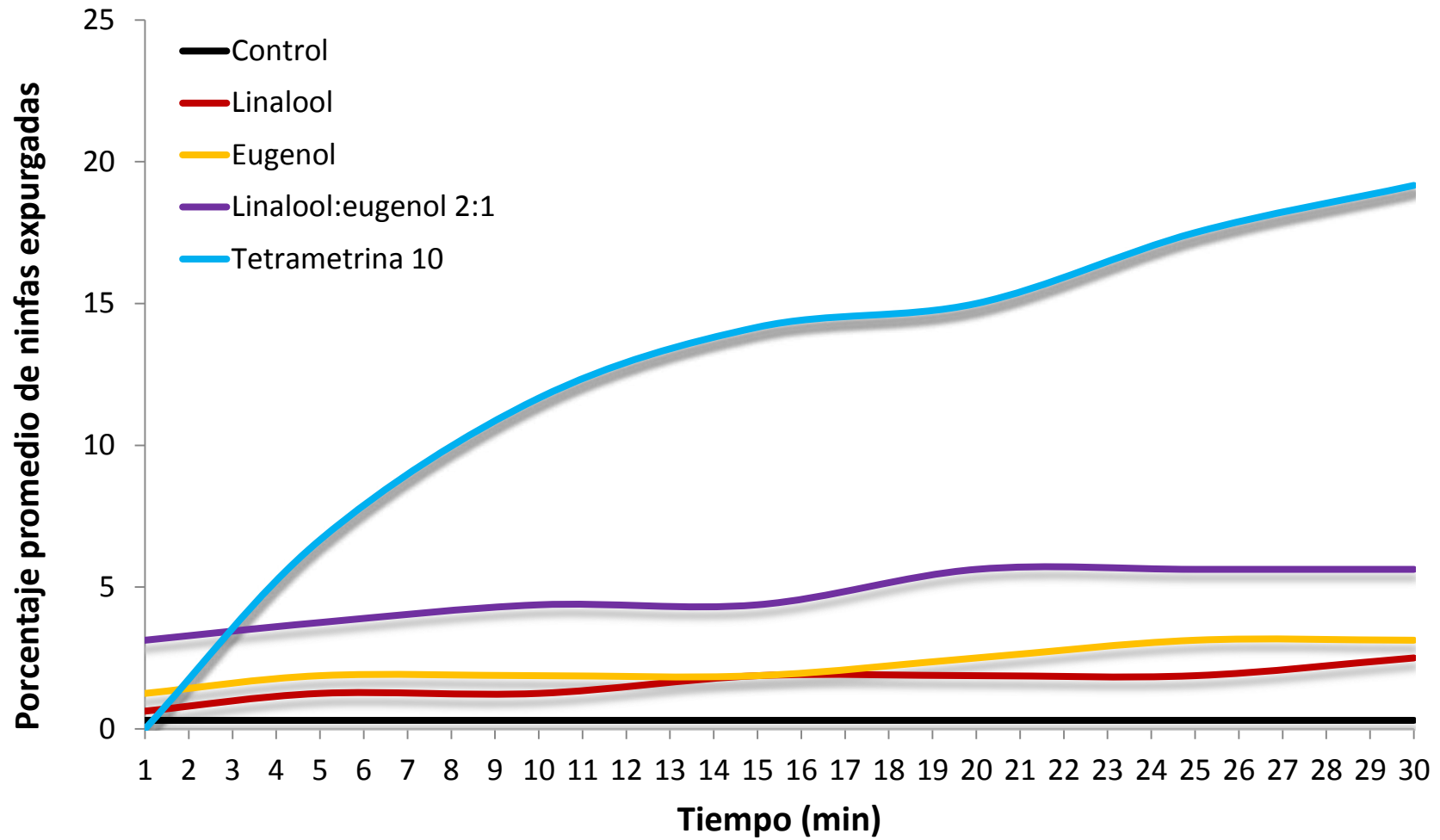


Figura 3.14. Porcentaje promedio de ninfas del tercer y del quinto estadio de *T. infestans* expurgadas en condiciones de semi-campo por exposición a linalool, eugenol o una mezcla de ambos. Tetra 10: 0,03 g/m³ de tetrametrina. Los valores graficados son promedios de 2-5 réplicas.

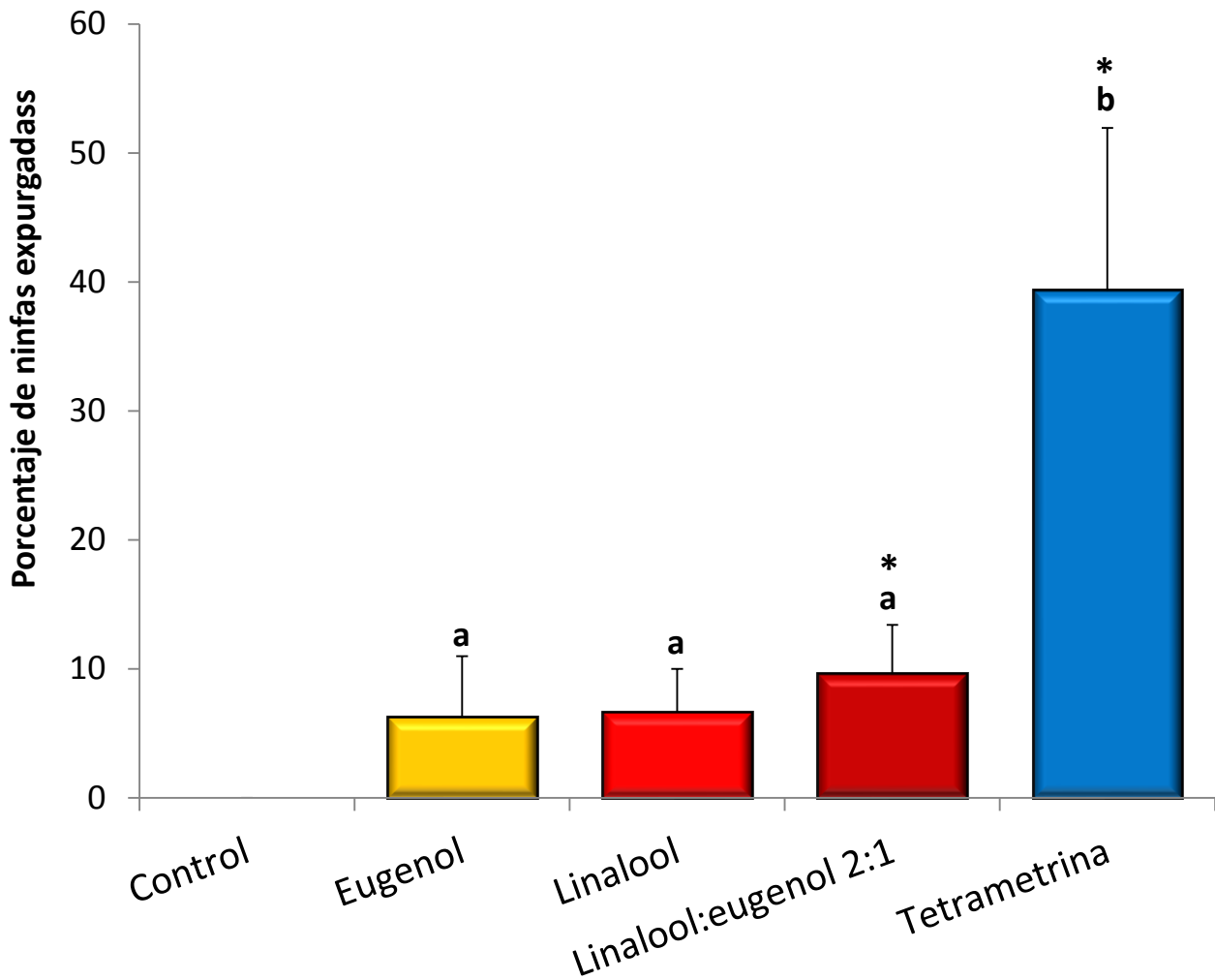


Figura 3.15. Porcentaje de ninfas de *T. infestans* expurgadas por exposición a monoterpenos en condiciones de semi-campo. Las barras representan el promedio de tres-cinco réplicas. Las barras señaladas con letras iguales no son significativamente distintas entre sí (prueba LSD de Fisher, $p > 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (pruebas de *T* independientes: $p < 0,05$).

"Ninguna cantidad de experimentación puede probar definitivamente que tengo razón; pero un solo experimento puede probar que estoy equivocado". A. E.

4. Discusión

4.1. Síntomas de intoxicación con 1,8-cineol

En esta tesis se describen por primera vez de forma detallada los síntomas visibles de intoxicación en insectos expuestos a un monoterpeno. Los síntomas que se manifestaron en las ninfas de *T. infestans* y *R. prolixus* expuestas a 1,8-cineol son similares a los que producen insecticidas neurotóxicos como los organofosforados (Wood et al. 1982) y los piretroides (Alzogaray et al. 1997): temblores, incoordinación, extensión de la proboscis en ausencia de fagoestimulantes y parálisis de las patas, entre otros; y, en condiciones avanzadas de intoxicación, imposibilidad de caminar, seguida de inmovilidad total. Estos síntomas sugieren que el sitio de acción primario del 1,8-cineol se encuentra en el sistema nervioso de los insectos.

Mientras realizábamos este registro, resultó notable la aparición de distensión abdominal en algunas ninfas intoxicadas. La distensión ocurrió en ausencia de fagoestimulantes, y se manifestó en las dos especies evaluadas pero no en los controles.

Los insectos hematófagos pueden ingerir varias veces su peso en sangre. Esto es posible porque su cutícula puede extenderse rápidamente para acomodar grandes ingestas. A medida que el intestino de *R. prolixus* se llena de sangre, la superficie abdominal se cuadruplica y la cutícula se

afina (Orchard et al. 1988). Este fenómeno, llamado plasticización, ocurre en respuesta a estímulos sensoriales relacionados con la alimentación (Melcón et al. 2005) y está bajo control del sistema nervioso central (Chapman, 1998). En ausencia de estímulos alimentarios, la distensión abdominal fue reportada para ninfas de *T. infestans* intoxicadas con el piretroide *cis*-permetrina (Alzogaray, 1996). Sin embargo, ninguno de los monoterpenos alcoholes evaluados en esta tesis provocó distensión del abdomen.

¿Cuál es el mecanismo específico que causa la distensión abdominal? El contenido de los abdómenes distendidos ¿es gaseoso o líquido?; la acumulación de este contenido ¿se debe a procesos fisiológicos internos o a la succión del aire ambiental? Para empezar a responder estas preguntas se podría extraer e identificar el contenido abdominal de ninfas que muestren la distensión durante la exposición al 1,8-cineol.

4.2. Repelencia

Los efectos repelentes de los aceites esenciales o sus componentes han sido evaluados principalmente en mosquitos (ver una revisión en Rehman et al. 2014). En menor proporción, existen estudios realizados con piojos (Tolosa et al. 2006), cucarachas (Yeom et al. 2013; Ferrero et al. 2007), plagas de productos almacenados (Caballero-Gallardo et al. 2014; Pandey et al. 2014; Soledade de Lira et al. 2015), triatominos (Sfara et al. 2009; Terriquez et al. 2013), moscas (Callander y James, 2012) y ácaros (Fernandes Soares et al. 2010).

La tendencia observada en estos trabajos es que la actividad repelente de los aceites esenciales y sus componentes es menor que la de la DEET, pero existen excepciones. Por ejemplo, de treinta y cinco monoterpenos evaluados en *Anopheles gambiae*, siete mostraron una repelencia similar a la de la DEET (Omolo et al. 2004).

En particular, los monoterpenos alcoholes evaluados en esta tesis ya habían mostrado repelencia en diversas especies de mosquitos y flebótomos (Ansari et al. 2000; Choi et al. 2001; Kumar et al. 2011; Omolo et al. 2004; Odalo et al. 2005; Müller et al. 2008-2009; Qualls y Xue, 2009; Weldon et al. 2010; You et al. 2015). Geraniol también había mostrado repelencia contra pulgas (Tunón et al. 2006) y ninfas del quinto estadio de *R. prolixus* (Sfara et al. 2009); mentol y timol contra *Pediculus humanus capitis* (Tolosa et al. 2006) y α -terpineol contra *Tribolium castaneum* (García et al. 2005).

Esta tesis constituye el primer reporte de repelencia sobre vectores de Chagas para carvacrol, (-)-carveol, 1,8-cineol, citronelol, eugenol, linalool, mentol, α -terpineol, timol y (S)-*cis*-verbenol.

El 1,8-cineol resultó un buen repelente de mosquitos (Batish et al. 2008). Aquí encontramos que en ninfas del primer estadio de *T. infestans* y de *R. prolixus* fue solo diez veces menos efectivo que la DEET. Si bien este es un buen resultado, es una efectividad menor que la hallada para la mayoría de los monoterpenos alcoholes evaluados en estas mismas especies.

En *T. infestans*, el 80% de los monoterpenos alcoholes evaluados presentaron una acción repelente similar a la de la DEET. Un resultado similar produjeron carvacrol, eugenol y geraniol en *R. prolixus*.

El uso de repelentes como medida de protección contra la picadura de triatominos no es una costumbre extendida. Esto se podría deber a la falta de estudios y demostraciones de su eficacia para este fin, con lo cual esta tesis constituiría un paso en esta dirección (evaluaciones en otros estadios y especies, con otras metodologías, serían de vital importancia). Otro factor que complica el uso de repelentes contra vinchucas podría ser la dificultad de imponer en ambientes calurosos y comunidades de escasos recursos (características de las áreas donde el Chagas es endémico) el uso de productos comerciales para aplicación dérmica, que deben adquirirse frecuentemente y se pierden rápidamente lavados por la sudoración.

Varios autores han evaluado la repelencia de la DEET y otras sustancias naturales y sintéticas en vectores de Chagas (Buescher et al. 1985; Fournet et al. 1996; Valladares et al. 1999; Alzogarát et al. 2001a; Kroeger et al. 2003; Coelho et al. 2006; Ferrero et al. 2006; Abramson et al. 2007; Mello et al. 2007; Sfara et al. 2009; López et al. 2011; Pohlit et al. 2011; Gomes y Favero, 2013; Avelar-Freitas et al. 2012; Terriquez et al. 2013). Por otra parte, dos importantes instituciones internacionales, la OMS y el CDC, recomiendan el uso de repelentes para evitar contraer la enfermedad (OMS, 2015; CDC, 2015).

Los repelentes podrían ser útiles como medida de protección personal para evitar el Chagas en algunas circunstancias: protección de

viajeros, agentes sanitarios, jornaleros que viven en zonas endémicas solo parte del año. Para residentes en zonas endémicas, es decir expuestos a las vinchucas en forma permanente, se podrían prever usos que no impliquen el tratamiento de la piel humana; por ejemplo impregnación de ropas y de mosquiteros (esta última opción ha sido considerada por la OMS). Luego de llevar a cabo experiencias de campo muy exitosas con mosquiteros impregnados, en viviendas infestadas con vinchucas de Colombia y Venezuela, Kroeger et al. (2003) afirmaron que la reducción o eliminación de los vectores de Chagas podría potencialmente alcanzarse en áreas infestadas con *R. prolixus* y *R. robustus*.

El uso de mosquiteros es habitual en países africanos y asiáticos, pero no en América. Su implementación en el continente americano podría ser muy útil desde un punto de vista sanitario, si se tiene en cuenta que en regiones donde el Chagas es endémico existen otros vectores de enfermedades (mosquitos y moscas hematófagas). La impregnación de mosquiteros con repelentes de amplio espectro podría proveer protección general contra varios insectos que amenazan la salud humana.

Hasta donde hemos podido averiguar, el geraniol es el único de los monoterpenos evaluados en esta tesis que se comercializa como repelente de insectos hematófagos (en varios países, principalmente como componente de velas) (Chen y Viljoen, 2010). En los demás casos, para establecer posibles aplicaciones prácticas de nuestros resultados se requieren investigación y evaluaciones más detalladas acerca de aspectos

biológicos (efectos sobre organismos que no son plagas), químicos (formulación), y sanitarios (reacciones adversas en seres humanos).

La efectiva acción repelente de algunos de esos monoterpenos nos hace pensar que vale la pena investigar la existencia de mezclas sinérgicas (constituidas por distintos monoterpenos o por monoterpenos y repelentes sintéticos), como paso previo al desarrollo de formulaciones.

4.3 Volteo

Un repaso de los abundantes trabajos publicados en los últimos años que evaluaron la acción insecticida de los aceites esenciales y sus componentes indica que, en general, los monoterpenos son mucho menos tóxicos que los insecticidas convencionales, ya sean de contacto (organofosforados, piretroides) o fumigantes (fosfina, bromuro de etilo, DDVP) (Rice y Coats, 1994a-b; Rajendran y Sriranjini, 2008; Lucia et al. 2009; Alzogaray et al. 2011).

Los valores de CL_{50} de 22 monoterpenos variaron entre 2 y $> 2,500 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ en *Musca domestica*, mientras que para el DDVP fue de $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Rice y Coats, 1994a). En el mismo estudio, una tendencia similar se observó sobre *T. castaneum*. En este insecto, los monoterpenos fueron entre 9 y $> 175,6$ menos tóxicos que el DDVP. Pero hubo algunas excepciones: la pulegona mostró la misma toxicidad que el DDVP y la 1-fenchona resultó sólo 1,3 veces menos tóxica.

El timol y la pulegona se cuentan entre los monoterpenos más tóxicos para los insectos. Las DL_{50} del timol en machos adultos, hembras grávidas y ninfas medianas de la cucaracha alemana son 70; 120 y 60

$\mu\text{g/insecto}$, respectivamente (Phillips, 2009). En la mosca doméstica y en el gusano defoliador *Spodoptera litura*, las DL_{50} del timol son 29,0 y 25,4 $\mu\text{g/insecto}$, respectivamente; mientras que las de la pulegona en estos mismos insectos son 39,0 y 51,6 $\mu\text{g/insecto}$, respectivamente (Lee et al. 1997; Hummelbrunner e Isman, 2001). Para la mayoría de los demás monoterpenos, las DL_{50} varían entre decenas y centenas de microgramos por individuo (Isman y Machial, 2006). En contraste, las DL_{50} en mosca doméstica de piretroides como cipermetrina y deltametrina están en el orden de nanogramos por insecto (Elliot, 1989).

En nuestros ensayos de exposición de ninfas del primer estadio a papeles de filtro impregnados, distintas concentraciones de 1,8-cineol resultaron entre diez y cincuenta veces menos tóxicas que iguales concentraciones de DDVP. La toxicidad de los monoterpenos alcoholes, aplicados en una sola concentración, fue entre veinte y setenta veces menor que la del DDVP.

También se observaron diferencias al comparar la toxicidad de diferentes monoterpenos en una misma especie, pero fueron considerablemente menores que las diferencias con el DDVP. En las dos especies, timol ejerció su efecto entre 1,6 y 2,7 veces más rápido que aquellos monoterpenos para los cuales fue posible calcular valores de TV_{50} ; y fue mucho más tóxico para los que produjeron menos de un 50% de volteo al cabo de siete horas de exposición.

En la cucaracha alemana, los monoterpenos lineales son menos tóxicos que los cíclicos (Phillips, 2009). Esta toxicidad diferencial ha sido

atribuida a que las moléculas cíclicas tienen una baja tasa de degradación metabólica. En esta tesis usamos tres monoterpenos lineales: citronelol, geraniol y linalool. Todos fueron los de más lenta acción insecticida en *R. prolixus*; y los dos primeros fueron también los más lentos en *T. infestans*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de exposición a papeles impregnados, en las dos especies de triatomíneos estudiadas, los monoterpenos de nuestro trabajo siguen la tendencia observada por otros autores en otros insectos: la toxicidad general es menor que la de los insecticidas convencionales; el timol se destaca de los demás monoterpenos por su mayor toxicidad y las moléculas cíclicas son más tóxicas que las lineales. La única excepción a esta última tendencia fue el linalool en *T. infestans*, que resultó más tóxico que los monoterpenos cíclicos carvacrol, eugenol y α -terpineol. Alguna particularidad de la toxicocinética en esta especie, podría ser la causa de esta excepción.

Jang et al. 2005 evaluaron la toxicidad fumigante de cuarenta y uno monoterpenos usando la misma técnica que en esta tesis (en recipientes cerrados con papeles impregnados) sobre *B. germanica* y señalaron que el grado de saturación, el tipo de grupos funcionales, la hidrofobicidad y la PV parecerían jugar un rol en la determinación de la toxicidad de cada monoterpeno. A pesar de que hay abundante evidencia de que el sistema respiratorio es una importante vía de ingreso de los monoterpenos en los insectos, estos autores no pudieron relacionar la toxicidad con la PV de las sustancias evaluadas.

En nuestro trabajo, las ninfas estuvieron expuestas a papeles impregnados, de modo que los monoterpenos ingresaron a sus organismos por dos vías simultáneas: cuticular e inhalatoria. La lipofilidad de los insecticidas ejerce una importante influencia en la tasa de ingreso, mientras que la PV determina en gran medida la acción insecticida de sustancias volátiles (Brooks, 1973). Sin embargo, no encontramos correlaciones significativas entre los valores de TV_{50} y los coeficientes de partición octanol-agua o la PV de los monoterpenos alcoholes (análisis no presentados).

Esta ausencia de correlaciones encuentra una posible explicación si se considera que los parámetros toxicológicos (como el TV_{50}) reflejan el resultado final de la interacción insecto-insecticida. Esta interacción comprende procesos toxicocinéticos (ingreso al organismo, distribución, almacenamiento, metabolismo y excreción) y toxicodinámicos (interacción de las moléculas insecticidas con sus sitios de acción). Una sustancia puede ser muy volátil y acceder fácilmente al sistema respiratorio, también puede presentar una lipofilidad óptima que le otorgue una alta tasa de ingreso al organismo a través de la cutícula; pero su acción insecticida podría ser débil si en los insectos tratados existe una elevada actividad enzimática que la metaboliza rápidamente antes de que interactúe con su sitio de acción.

Cuando fue aplicado en forma tópica, el 1,8-cineol fue cinco millones de veces menos tóxico que deltametrina en *T. infestans* y treinta seis millones de veces menos tóxico en *R. prolixus*. A primera vista, estas cifras pueden resultar sorprendentes, pero no son descabelladas si se tiene

en cuenta que deltametrina es uno de los insecticidas más tóxicos en uso (Ruigt, 1985) y que la toxicidad por contacto de los monoterpenos es débil (Isman y Machial, 2006; Phillips, 2009). La aplicación simultánea del inhibidor del sistema enzimático del citocromo P450 no modificó la toxicidad del 1,8-cineol en ninguna de las dos especies.

En conejos, el 1,8-cineol es metabolizado a diversos alcoholes y cetonas como el $2\alpha/\beta$ -hidroxi-1,8-cineol, el $3\alpha/\beta$ -hidroxi-1,8-cineol y el 3-oxo-1,8-cineol (Miyazawa et al. 1989); y en marsupiales, como la zarigüeya australiana y los koalas, es degradado a diversos ácidos cineólicos, dihidroxicineoles y ácidos hidroxicineoles (la dieta de estos animales incluye la corteza u hojas de eucalipto) (Boyle et al. 2000-2001; Pass et al. 2001; Carman et al. 1994).

El metabolismo del 1,8-cineol se investigó en microsomas de hígados de ratas y de humanos, y en células de insectos que coexpresan enzimas del citocromo P450 y la NAPH-P450 reductasa de humanos. En estos ensayos se halló que el monoterpeno se oxida principalmente a 2α -hidroxi-1,8-cineol y a 3α -hidroxi-1,8-cineol. Esto llevó a sugerir que en ratas y humanos el 1,8-cineol es substrato para las enzimas del sistema del citocromo P450 (Miyazawa et al. 2001; Duisken et al. 2005).

La ausencia de sinergismo al inhibir el sistema P450 en nuestros ensayos se podría deber a que las oxidasas microsomales de función mixta no son la principal vía detoxificante del monoterpeno en las dos especies estudiadas. Pero como la actividad de las enzimas detoxificantes varía a lo largo del ciclo de vida de los insectos (Yu, 2008), otra posible explicación

es que el título de oxidadas microsomales de función mixta durante el primer estadio sea tan bajo que no modifica sustancialmente la toxicidad del 1,8-cineol.

El volteo, una parálisis rápida y reversible, es un síntoma de intoxicación característico de los piretroides (Clements y May, 1977). En moscas domésticas tratadas con piretro (Sawicki y Thain, 1962) y en *T. infestans* expuestas a deltametrina o *cis*-permetrina (Alzogaray et al, 1997), la recuperación del volteo se inhibió cuando los insecticidas fueron aplicados simultáneamente con BP. Estos resultados sugieren que la recuperación del volteo se debe a la degradación de los piretroides catalizada por el sistema P450.

En nuestros ensayos, las ninfas no se recuperaron de los efectos tóxicos causados por el 1,8-cineol. Si bien se usó una sola dosis alta y habría que confirmar que tampoco ocurre recuperación cuando se aplican dosis menores, este resultado es coherente con las evidencias discutidas antes sobre la aparente ausencia de metabolismo catalizado por el sistema P450.

De acuerdo con los resultados discutidos en esta sección, creemos que los efectos del timol en ambas especies y del eugenol en *R. prolixus* justifican continuar evaluando el posible uso de estos monoterpenos como herramientas de control de triatominos.

4.4 Actividad locomotora

La actividad locomotora es un rasgo complejo, implicado directa o indirectamente en casi todas las actividades de los insectos y regulado por mecanismos neurofisiológicos (Wigglesworth, 1972). No es fácil de definir *per se* y es frecuentemente confundida con la locomoción: oscilaciones neurales básicas que controlan la caminata y comportamientos reflejos (Martin, 2004).

El primer síntoma visible en insectos intoxicados con DDT o piretroides es un aumento de la actividad locomotora (hiperactividad) (Gammon, 1978; Toth y Sparks, 1990; Alzogaray et al. 1997). En ninfas del tercer estadio de *R. prolixus* expuestas a una superficie tratada con piretroides, la actividad locomotora aumentó en forma lineal en función de la concentración de insecticida (Alzogaray et al. 1997; Alzogaray y Zerba, 2001b).

La hiperactividad fue observada como un síntoma de toxicidad de monoterpenos componentes de aceites esenciales sobre *Periplaneta americana*, aunque no fue cuantificada (Enam, 2001). También se reportó para el mentil acetato sobre *B. germanica* (Alzogaray et al. 2013).

En el ámbito del control de plagas, la hiperactividad inducida por insecticidas tiene una aplicación práctica, porque provoca que los triatomíneos abandonen su refugio y puedan ser visualizados. En las viviendas rurales argentinas, los agentes sanitarios aplican tetrametrina en aerosol para establecer si el lugar está infestado con vinchucas (ver sección 1.2.5.).

De acuerdo con los resultados presentados en la sección 3.1.3., el 1,8-cineol produjo un débil efecto hiperactivante. El efecto de los monoterpenos alcoholes sobre la actividad locomotora fue variable (sección 3.2.1.).

Al comparar los efectos sobre la actividad locomotora en ninfas del primer y del quinto estadio de *T. infestans*, se hace evidente la existencia de un efecto hiperactivante diferencial (Tabla 4.1.). Solo linalool produjo hiperactividad a partir de 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en ambas especies, mientras que los cinco restantes fueron considerablemente más efectivos en el primer estadio que en el quinto.

	Mínima concentración que produjo hiperactividad* ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	Primer estadio	Quinto estadio
1,8-Cineol	3.900	NO
Eugenol	390	NO
Linalool	390	390
Mentol	390	3.900
α -Terpineol	390	NO
Timol	390	NO

Tabla 4.1. Resumen del efecto de seis monoterpenos sobre la actividad locomotora en dos estadios ninfales de *T. infestans*. *, se evaluaron cuatro concentraciones de monoterpenos (3,9; 39; 390 y 3.900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). NO, la máxima concentración aplicada no produjo hiperactividad.

Estas diferencias podrían ser consecuencia de diferencias anatómicas y fisiológicas entre ambos estadios. Las ninfas del primer estadio de *T. infestans* miden 3,5 mm y, en estado de ayuno, pesan 1 mg. Las del quinto

estadio, en cambio, miden 17 mm y pesan alrededor de 90 mg. Todos los individuos usados en nuestros ensayos estaban ayunados, pero el primer estadio nunca realizó ingestas, mientras que el quinto estaba ayunado desde la última muda, pero había realizado las varias ingestas indispensables para alcanzar esa etapa de su ciclo de vida. El tamaño corporal, la edad y el estado nutricional son factores que influyen la toxicidad (Ballantyne et al. 2000). Estos factores podrían ser la causa de aquellos casos en que la hiperactividad fue mayor en el primer estadio que en el quinto.

4.5 Expurgue

Desde hace décadas, el diagnóstico del grado de infestación domiciliar con triatominos se lleva a cabo por dos metodologías. La primera, pasiva, consiste en la colocación de trampas y la evaluación posterior de la captura de insectos o presencia de rastros. La segunda, activa, consiste en la búsqueda manual por parte de personal entrenado de insectos y rastros (con aplicación previa o no de agentes expurgantes) (Schofield, 1978; Gürtler et al. 1993; Rabinovich et al. 1995). La manual, más rápida, se utiliza para evaluar el resultado de tratamientos insecticidas.

El primer agente expurgante fue el piretro, aplicado en programas de control en Brasil (Pinchin et al. 1980). Actualmente, el único que se utiliza es el piretroide tetrametrina, a pesar de que su toxicidad no permite la captura de individuos sanos para su posterior estudio (EPA, 2010), y de que

su acción se ve limitada por la existencia de poblaciones de *T. infestans* resistentes a los piretroides (Vassena et al. 2000; Picollo et al. 2005). En algunas de estas poblaciones se comprobó la resistencia a la hiperactivación (Sfara et al. 2006). Como el aumento de la actividad locomotora es un síntoma de intoxicación, es probable que todos los individuos resistentes a los piretroides sean resistentes a este síntoma en particular. Estas razones impulsaron los experimentos de efecto sobre la actividad locomotora y expurgue realizados en esta tesis.

En las condiciones experimentales en que se llevaron a cabo los ensayos de expurgue en laboratorio, solo linalool y mentol produjeron un expurgue cuantificable mediante el parámetro TV_{50} . La concentración de las soluciones de linalool y mentol usadas para expurgue fue la máxima aplicada en los ensayos de actividad locomotora en ninfas del quinto estadio ($3.900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

La hiperactividad es una quinesis no direccional, así que cabe esperar que si un insecto se encuentra oculto en un refugio, un aumento de su actividad locomotora implicará una alta probabilidad de que lo abandone. Esta hipótesis se vio confirmada por nuestros experimentos, ya que los dos únicos monoterpenos que hiperactivaron al quinto estadio de *T. infestans* (linalool y mentol) fueron también los únicos que produjeron un importante efecto de expurgue. Las concentraciones más altas de 1,8-cineol, eugenol, α -terpineol y timol aumentaron ligeramente la actividad locomotora de las ninfas, pero las diferencias con los respectivos controles no fueron

significativas ($p > 0,05$) (Tabla 3.1.). En forma concordante, estos cuatro monoterpenos produjeron un débil expurgue que no permitió calcular valores de TE_{50} .

La particular dinámica del efecto expurgante del eugenol abre nuevos interrogantes: ¿está relacionada con características fisicoquímicas (¿cuáles?) de la molécula que influyen su distribución en el volumen de la cámara/refugio, su modo de ingreso al insecto, su distribución, su modo/sitio de acción? Identificar la causa de esta característica podría ayudar a explotar mejor el efecto expurgante de este monoterpeno.

Los bioensayos de semi-campo, aunque deben ser considerados preliminares por sus características, permitieron contar con un primer acercamiento a los efectos en condiciones menos controladas de los dos compuestos que se destacaron en laboratorio. Linalool y eugenol aplicados en forma independiente o conjunta (mezcla 2:1) dieron un resultado positivo (en el sentido de que en los tres casos se observó expurgue, mientras que ninguna ninfa, en ninguna réplica, abandonó los refugios cuando se aplicó el solvente solo). También permitió confirmar la eficacia expurgante de la mezcla. Para contar con datos más precisos y confiables que indiquen el camino a seguir para futuras aplicaciones en condiciones de campo, sería de gran valor contar con un número mayor de réplicas y de tratamientos, así como un mejoramiento de la metodología de aplicación.

Las altas concentraciones de estos monoterpenos necesarias para producir expurgue implican un desafío de formulación. Habría que realizar

evaluaciones con un aerosol que contenga apropiados coadyuvantes (sería prioritario reemplazar la acetona usada en nuestros ensayos por un vehículo no orgánico, para disminuir al máximo los riesgos toxicológicos asociados al uso de solventes orgánicos).

Linalool y eugenol son productos de origen natural presentes en numerosos productos comerciales. A la luz de los resultados obtenidos en esta parte de la tesis, consideramos que ambos tienen potencial para ser ingredientes activos de herramientas de diagnóstico de infestación domiciliaria con triatominos.

El linalool es una de las fragancias más comunes en la naturaleza. Está presente en más de doscientos aceites esenciales comerciales y al menos en cuarenta de ellos su concentración es igual o superior al 10%. También es ampliamente usado como componente principal de fragancias. En Estados Unidos, un estudio epidemiológico lo encontró presente en el 61% de 59 productos domésticos y ocupacionales (Rastogi et al. 2001).

El eugenol es una fragancia clasificada como alérgena por la Comisión Europea (European Commission, 2011). En Estados Unidos, si está presente en un producto cosmético lavable en más de 100 ppm (0,01%), o permanente, en más de 10 ppm (0,001%); debe ser declarado en la lista de ingredientes (Tisserand y Balacs, 2014). Ambos, linalool y eugenol, han sido clasificados como alérgenos débiles, solo provocando sensibilización cuando están presentes al 3% o más (Kimber et al. 2003).

Algunos de los aceites esenciales que cuentan al eugenol y/o al linalool entre sus componentes principales son el de bay-rum (*Pimenta*

racemosa), el bálsamo del Canadá (*Abies balsamea*), el de jengibre del Canadá (*Asarum canadense*), el de ylang-ylang o cananga (*Cananga odorata*), el de canela (*Cinnamomum verum*); el de siempreviva del monte (*Helichrysum angustifolium*), el de mayorana (*Origanum majorana*) y el de albahaca (*Ocimum basilicum*) (Lawless, 1995).

Luego de estos resultados, consideramos que el eugenol y el linalool tienen gran potencial para ser ingredientes activos de herramientas de diagnóstico de infestación domiciliaria con triatomíneos. Estos resultados justifican continuar la línea de investigación profundizando en la formulación así como en el mejoramiento de los métodos de aplicación y la evaluación de mezclas con repelentes y/o insecticidas.



"Lo único que interfiere con mi aprendizaje es mi educación" A. E.

5. Conclusiones

✓ Síntomas de intoxicación con 1,8-cineol

- Se describieron por primera vez en insectos los síntomas visibles de intoxicación por exposición a un monoterpeno (1,8-cineol).
- El 1,8-cineol produjo síntomas similares a los que se observan en insectos expuestos a insecticidas neurotóxicos como organofosforados y piretroides.
- Se registró por primera vez el fenómeno de distensión abdominal en insectos expuestos a un monoterpeno.

✓ Repelencia

- Se evaluó por primera vez en triatominos la repelencia producida por los monoterpenos de origen botánico carvacrol, (-)-carveol, 1,8-cineol, citronelol, eugenol, linalool, mentol, α -terpineol, timol y (S)-*cis*-verbenol.
- La mayoría de los monoterpenos mostró un buen efecto repelente, similar al de la DEET. Estos resultados justifican continuar investigando el potencial repelente mediante evaluaciones en otros estadios de estas y otras especies de vectores de Chagas, ensayos de mezclas con repelentes naturales o sintéticos y formulaciones de liberación lenta que permitan mejorar los efectos descritos en esta tesis.

✓ Volteo

- Los resultados obtenidos en los ensayos de volteo por exposición a papeles impregnados con monoterpenos siguen las tendencias observadas por otros autores en otros insectos: la toxicidad es menor que la de los insecticidas convencionales; el timol se destaca de los demás monoterpenos por su mayor toxicidad y las moléculas cíclicas son más tóxicas que las lineales.

- No se encontró correlación entre el TV_{50} y la PV o el $K_{o/a}$ de los monoterpenos.

- Cuando se aplicó en forma tópica en ninfas del primer estadio de ambas especies, el 1,8-cineol presentó una toxicidad muy baja en comparación con deltametrina. Este resultado sigue otra tendencia de los monoterpenos al ser aplicados de esta manera: muy baja toxicidad por contacto. La aplicación conjunta de BP no synergizó la toxicidad del monoterpeno.

✓ Actividad locomotora

- Se cuantificó por primera vez en triatominos el efecto sobre la actividad locomotora de monoterpenos.

- La tetrametrina no resultó hiperactivante para el primer estadio de las dos especies, por lo que la deltametrina fue utilizada como control positivo.

- La mayoría de los once monoterpenos evaluados en ninfas del primer estadio de ambas especies mostró efecto hiperactivante a partir de una concentración tres órdenes de magnitud superior a la del control positivo (deltametrina). Eugenol, 1,8-cineol, linalool, mentol, α -terpineol y timol resultaron buenos hiperactivantes y, por tanto, fueron seleccionados para su evaluación en ninfas del quinto estadio.

- Linalool y mentol hiperactivaron solamente al quinto estadio de *T. infestans*; 1,8-cineol y α -terpineol hiperactivaron solamente al quinto estadio de *R. prolixus*. Tetrametrina hiperactivó a las ninfas de ambas especies (a concentraciones varios órdenes de magnitud menores que los monoterpenos).

✓ Expurgue

- ✓ Se evaluó por primera vez en triatominos la capacidad de expurgue de monoterpenos.

- Los monoterpenos que hiperactivaron a las ninfas del quinto estadio de *T. infestans* (linalool y mentol) también resultaron buenos expurgantes.

- El linalool se destacó como expurgante en condiciones de laboratorio, si bien fue necesario aplicar una concentración trescientas veces mayor para obtener un tiempo equitóxico al del control positivo (tetrametrina).

- Al aplicar linalool y mentol, las ninfas abandonaron los refugios a una tasa aproximadamente constante a lo largo de treinta minutos. El eugenol, en cambio, presentó una dinámica de expurgue particular: en promedio cerca del 40% de las ninfas fue expurgado en menos de cuatro minutos y este valor se mantuvo constante hasta el fin de los bioensayos.

- Los bioensayos de expurgue en condiciones de semi-campo, si bien preliminares, permitieron observar el fenómeno en condiciones más cercanas al futuro campo de aplicación de estos compuestos y alientan a continuar explorando la potencialidad de linalool, eugenol y sus mezclas como potenciales principios activos de un formulado expurgante.

"Lo importante es no dejar de hacerse preguntas." A. E.

6. Bibliografía

- **Abramson, C.I.; Aldana E. y Sulbaran, E. 2007.** Exposure to citral, cinnamon and ruda disrupts the life cycle of a vector of Chagas Disease. *American Journal of Environmental Sciences* 3: 7-8.
- **Alavanja, M.C.; Hopping, J.A. y Kamel, F. 2004.** Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annual Review of Public Health* 25: 155-197.
- **Alzogaray, R.A. 1996.** Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en *Triatoma infestans* (Klug). Trabajo final de tesis Doctoral para optar por el título de Dr. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- **Alzogaray, R.; Fontán, A. y Zerba, E. 1997.** Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35: 323-333.
- **Alzogaray, R.A.; Fontán, A. y Zerba, E.N. 2000a.** Repellency of DEET to nymphs of *Triatoma infestans*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 6-10.
- **Alzogaray, R.A. y Zerba, E.N. 2001a.** Behavioral response of fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to pyrethroids. *Acta Tropica* 78: 51-57.
- **Alzogaray, R.A. y Zerba, E.N. 2001b.** Third instar nymphs of *Rhodnius prolixus* exposed to α -cyanopyrethroids: from hyperactivity to death. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 46: 119-126.
- **Alzogaray, R.A.; Lucia, A.; Zerba, E.N. y Masuh, H. 2011.** Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. *Journal of Economical Entomology* 104: 595-600.
- **Alzogaray, R.A.; Sfara, V.; Moretti, A.N. y Zerba, E.N. 2013.** Behavioural and toxicological responses of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to monoterpenes. *European Journal of Entomology* 110: 247-252.

- **ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2008.** Productos domisanitarios, Disposición 2659/2008.
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/retiros/mayo/Disposicion_ANMAT_2659-2008.pdf
(último acceso: 7 de febrero de 2015):

- **ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2012.** Registro de repelentes de insectos inscriptos actualizado al 8/06/2012:
http://www.anmat.gov.ar/listados/Listado_repelentes_jun_2012.pdf (último acceso: noviembre de 2014).

- **Ansari, M.A.; Vasudevan, P; Tandon, M. y Razdan, R.K. 2000.** Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresource Technology* 71: 267-271.

- **Appel, A.G.; Gehret, M.J. y Tanley, M.J. 2001.** Repellency and toxicity of mint oil to American and German Cockroaches (Dictyoptera: Blattidae and Blattellidae). *Journal of Agricultural and Urban Entomology* 18: 149-156.

- **Argolo, A.M.; Felix, M.; Pacheco, R. y Costa, J. 2007.** Doença de Chagas e seus principais vetores no Brazil, Volumen I. 1ª edición. 64 pp. Ed: Imperial Novo Milênio, Rio de Janeiro, Brasil.

- **Avelar-Freitas, B.A.; Dias, J.V.L.; Tibães, G.G.; Rocha, C.A.; Bahia-Oliveira, G-H.; Graef, C.F.F. y Pires, H.H.R. 2012.** *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23: 366-369.

- **Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Adomar, M. 2008.** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.

- **Ballantyne, B.; Marrs, T. y Syversen, T. 2000.** General and applied toxicology. Volumen I. 2ª edición. 610 pp. Eds: Ballantyne, B.; Marrs, T. y Syversen, T. Ed: Macmillan Reference. Londres, Reino Unido.

- **Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kohli, R.K. y Kaur, S. 2008.** Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Foreste Ecology and Management* 256: 2166-2174.

- **Belsito, D.; Bickers, D.; Bruze, M.; Calow, P.; Greim, H.; Hanifin, J.M; Rogers, A.E.; Saurat, J.H.; Sipes, I.G. y Tagami, H. 2008.** A toxicologic and dermatologic assessment of cyclic

and non-cyclic terpene alcohols when used as fragrance ingredients. Food and Chemical Toxicology 46: S1-S71.

- **Boyle, R.; McLean, S. y Davies, N.W. 2000.** Biotransformation of 1,8-cineole in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Xenobiotica* 30: 915-932.
- **Boyle, R.; McLean, S.; Foley, W.; Davies, N.W.; Peacock, E.J. y Moore, B. 2001.** Metabolites of dietary 1,8-cineole in the male koala (*Phascolarctos cinereus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology* 129: 385-395.
- **Brooker, M.I.H y Kleinig, D.A. 2006.** Field guide to *Eucalyptus*, Volumen I: Southeastern-Australia. 3^{ra} edición. 356 pp. Ed: Blooming Books. Melbourne, Australia.
- **Brooks, G. T. 1973.** Penetration and distribution of insecticides. En: *Insecticide biochemistry and physiology*: pp 3-53. Eds: Wilkinson, C.F. Ed: Plenum Press, New York. Nueva York, Estados Unidos.
- **Buescher, M.D.; Rutledge, L.; Wirtz, R.A. y Nelson, J.H. 1985.** Laboratory repellent tests against *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 22: 49-53.
- **Busvine, J.R. y Barnes, S. 1947.** Observations on mortality among insects exposed to dry insecticidal films. *Bulletin of Entomological Research* 38: 81-80.
- **Caballero-Gallardo, K.; Pino-Benitez, N.; Pajaro-Castro, N.; Stashenko, E. y Olivero-Verbel, J. 2014.** Plants cultivated in Choco, Colombia, as source of repellents against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17: 753-759.
- **Callander, J.T. y James, P.J. 2012.** Insecticidal and repellent effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil against *Lucilia cuprina*. *Veterinary Parasitology* 184: 271-278.
- **Carman, R.M. y Rayner, A.C. 1994.** 2 α ,4-Dihydroxy-1,8-cineole. A new possum urinary metabolite. *Australian Journal of Chemistry* 47: 2087-2097.
- **Casabé, N.; Melgar, E.; Wood, E. y Zerba, E. 1988.** Insecticidal activity of pyrethroids against *Triatoma infestans*. *Insect Science and its Applications* 9: 233-236.

- **CDC. Center of Disease Controls and Prevention. 2015.** http://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html (último acceso: marzo de 2015).
- **CDC. Center of Disease Controls and Prevention. 2004.** Fact Sheet for the general public: Chagas Disease. Department of Health and Human Services: Division of Parasitic Division. Atlanta, Estados Unidos.
- **Chapman, R.F. 1998.** The insects. Structure and function. 4^{ta} edición. 770 pp. Ed: Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- **Chen, W. y Viljoen, A.M. 2010.** Geraniol: a review of a commercially important fragrance material. South African Journal of Botany 76: 643-651.
- **Choi, W.I.; Lee, E.H.; Choi, B.R.; Park, H.M. y Ahn, Y.J. 2003.** Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economical Entomology 96: 1479-1484.
- **Choi, W.S.; Park, B.S.; Ku, S.K. y Lee, S.E. 2001.** Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. Journal of the American Mosquito Control Association 18: 348-351.
- **Clements, A.N. y May, T.E. 1977.** The actions of pyrethroids upon peripheral nervous system and associated organs in the locust. Pesticide Science 8: 661-680.
- **Coelho, A.A.M.; de Paula, J.E. y Spíndola, L.S. 2006.** Insecticidal activity on cerrado plants extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Garvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. Neotropical Entomology 35: 133-138.
- **Corbel, V.; Stankiewicz, M.; Pennetier, C.; Fournier, D.; Stojan, J.; Girard, E.; Dimitrov, M.; Molgo, J.; Hougard, J-M. y Lapied, B. 2009.** Evidence of inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous system by the insect repellent deet. BMC Biology 7: 47-57.
- **Coppen, J.J.W. 1995.** Flavours and fragrances of plant origin. Non-wood Forest Products # 1, 101 pp. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia.

- **Council of Europe. 1992.** Chemically-defined flavouring substances. En: Flavouring substances and natural sources of substances (“Blue Book”), Volumen I. 4^{ta} edición. Strasbourg, Francia.
- **Coura, J.R. 2007.** Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102: 113-122.
- **Coutinho, M. y Pinto Dias, J.C. 1999.** A descoberta na doença de Chagas. Cadernos de Ciência & Tecnologia 16: 11-51.
- **Dethier, V.G.; Browne, L.B. y Smith, C.N. 1960.** The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. Journal of Economic Entomology 53: 134-136.
- **Dikshith, T.S.S. 1991.** Toxicology of pesticides in animals. 255 pp. Ed: Diskshith, T.S.S. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- **Duisken, M.; Sandner, F.; Blömeke, B. y Hollender, J. 2005.** Metabolism of 1,8-cineole by human cytochrome P450 enzymes: Identification of a new hydroxylated metabolite. Biochimica et Biophysica Acta 1722: 304-311.
- **Elliot, M. 1989.** The pyrethroids: early discovery, recent advances and the future. Pest Science 27: 337-351.
- **Enan, E.E. 2001.** Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 130: 325–337.
- **Enan, E.E. 2005.** Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35: 309-321.
- **EPA. Environmental Protection Agency. 1995.** Dichlorvos (DDVP): Delection of certain uses and directions. Federal Register 60 (75), Notices: 19580-19581.
- **EPA. Environmental Protection Agency. 2010.** Registration eligibility decision (RED) document for tetramethrin.
<http://www.epa.gov/opp00001/reregistration/REDS/tetramethrin-revised-red.pdf> (último acceso: enero de 2015).

- **European Commission.** 2011. Opinion on fragrance allergens in cosmetic products. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_073.pdf (último acceso: marzo de 2015).
- **Fernandes Soares, S.; Ferreira Borges, L.M.; de Sousa Braga, R.; Lopes Ferreira, L.; Braz Louly, C.C.; Tresvenzol, L.M.F.; de Paula, J.R. y Ferri, P.H. 2010.** Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Veterinary Parasitology* 167: 67-73.
- **Ferrero, A.; González, J. y Chopa, C. 2006.** Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia* 77: 381-383.
- **Ferrero, A. Sánchez Chopa, C.; Werdin González, J.O. y Alzogaray, R.A. 2007.** Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. *Fitoterapia* 78: 311-314.
- **Frances, S.P. 2007.** Efficacy and safety of repellents containing DEET. 311-326 pp. En: *Insect repellents. Principles, methods, and uses*. Eds: Debboun, M.; Frances, S.P. y Strickman, D. CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- **Fournet, A.; Rojas de Arias, A.; Charles, B. y Bruneton, J. 1996.** Chemicals constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 145-149.
- **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. *Pesticide Science* 9: 79-81.
- **García, M.; Donadel, O.J.; Ardanaz, C.E.; Tonn, C.E. y Sosa, M.E. 2005.** Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science* 61: 612-618.
- **Gimenez, L. y Mitelman, J.E. 2010.** Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Iberoamérica. http://www.intramed.net/sitios/libro_chagas/situacion.pdf (último acceso: diciembre de 2014).

- **Ghul, F. 2009.** Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomédica* 20: 228-234.
- **Gomes, S.P. y Favero, S. 2013.** Assessment of the insecticidal potential of *Eucalyptus urograndis* essential oil against *Rhodnius neglectus* Lent (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology* 42: 431-435.
- **Gorla, D.; Ponce, C.; Dujardin, J. y Schofield, C. 2010.** Control strategies against Triatominae. En: *American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research*: pp 233–245. Eds: Telleria, J. y Tibayrenc, M. Ed: Elsevier, Burlington, Estados Unidos.
- **Green, C. 2002.** Export development of essential oils and spices by Cambodia. International Trade Center, Ginebra, Suiza.
- **Grodniczky, J.A. y Coats, J.R. 2002.** QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4576-4580.
- **Gürtler, R.E.; Schweigmann, N.J.; Cécere, M.C.; Chuit, R. y Wisnivesky-Colli, C. 1993.** Comparison of two sampling methods for domestic populations of *Triatoma infestans* in north-west Argentina. *Medical and Veterinary Entomology* 7: 238-242.
- **Gürtler, R.E.; Cécere, M.C.; Canale, D.M.; Castañera, M.B.; Chuit, R. y Cohen, J.E. 1999.** Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas' disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Tropica* 72: 213-34.
- **Gürtler, R.E.; Kitron, U.; Cécere, M.C.; Segura, E.L. y Cohen, J.E. 2007.** Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 16194-16199.
- **Hummelbrunner, L.A. e Isman, M.B. 2001.** Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoids essential oil compounds on the tobacco cutworm *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 715-720.
- **Isman, M.B. 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.

- **Isman, M.B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 45-66.
- **Isman, M.B. 2010.** Botanical insecticides, deterrents, repellents and oils. En: *Industrial Crops and Uses*: pp 433-445. Eds: Singh, B.P. Fort Valley State University, Fort Valley, Estados Unidos.
- **Isman, M.B. y Akhtar, Y. 2007.** Plant natural products as a source for developing environmentally acceptable insecticides. En: *Insecticides Design Using Advanced Technologies*: pp 235-248. Eds: Ishaaya I.; Nauen, R. y Horowitz, A.R. Springer, Berlin, Alemania.
- **Isman, M.B. y Machial C.M. 2006.** Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. En: *Naturally Occurring Bioactive Compounds*: pp 29-44. Eds: Rai, M. y Carpinella, M.C. Elsevier, B.V., Amsterdam, Países Bajos:
- **Jang, Y.S.; Yang, Y.C.; Choi, D.S. y Ahn, Y.J. 2005.** Vapor phase toxicity of marjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7892-7898.
- **Karr, L.L.; Drewes, C.D. y Coats, J.R. 1990.** Toxic effects of d-limonene in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 175-186.
- **Katz, T.; Miller, J. y Hebert, A. 2008.** Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58: 865-871.
- **Kimber, I.; Basketter, D.A.; Butler, M.; Gamer, A.; Garrigue, J.L.; Gerberick, G.F.; Newsome, C.; Steiling, W. y Vohr, H.W. 2003.** Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1799-1809.
- **Klowden, M.J. 2007.** Physiological systems in insects: 688 pp. Academic Press, Elsevier, Idaho, Estados Unidos.
- **Kostyukovsky, M.; Rafaeli, A.; Gileadi, C.; Demchenko, N. y Shaaya, E. 2002.** Activation of octopaminergic receptors by essential oils constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58: 1101-1106.

- **Kroeger, A.; Villegas, E.; Ordoñez-González, J.; Pabon, E. y Scorza, J.V. 2003.** Prevention of the transmission of Chagas disease with pyrethroid-impregnated materials. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 68: 307-311.
- **Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A. y Satya, S. 2011.** Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. Industrial Crops and Products 34: 802-817.
- **Laurent, D., Vilaseca, L.A.; Chantraine, J.M.; Ballivian, C.; Saavedra, G. e Ibáñez, R. 1997.** Insecticidal activity of essential oils on *Triatoma infestans*. Phytotherapy Research 2: 285-290.
- **Lawless, J. 1995.** The illustrated encyclopedia of essential oils. 256 pp. Ed: Element Books, Londres, Reino Unido.
- **Lee, S.; Tsao, R.; Peterson, C. y Coats, J.R. 1997.** Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and housefly (Diptera: Muscidae). Journal of Economical Entomology 90: 883-892.
- **López, B.; López, M.; Aragón, L.; Tereschuk, M.; Slaris, A.; Feresin, G.; Zygadlo, J. y Tapia, A. 2011.** Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* L. species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiederman and *Triatoma infestans* Klug. Journal of Agronomy and Food Chemistry 59: 5286-5292.
- **Lorenzo, M.G. y Lazzari, C.R. 1998.** Activity pattern in relation to refuge exploitation and feeding in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Acta Tropica 70: 163-170.
- **Lucia, A.; Licastro, S.; Zerba, E.; González Audino, P. y Masuh, H. 2009.** Sensitivity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essentials oils. Bioresource Technology 100: 6083-6087.
- **Martin, J-R. 2004.** A portrait of locomotor behavior in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. Behavioural Processes 67: 207-219.

- **Melcón, M.L.; Lazzari, C.R. y Manrique, G. 2005.** Repeated plasticization and recovery of cuticular stiffness in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* in the feeding context. *Journal of Insect Physiology* 51:989-993.
- **Mello, C.; Uzeda, C.; Bernardino, M.; Mendonça-Lopes, D.; Kelecom, A.; Fevereiro, P.; Guerra, M.; Oliveira, A.; Rocha, L. y Gonzalez, M. 2007.** Effects of the essential oil obtained from *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) on the development of *Rhodnius prolixus* nymphae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 514-520.
- **Miller, T.A. y Adams, M.E. 1982.** Mode of action of pyrethroids. En: *Insecticide Mode of Action*: pp 3-27. Ed: Coats, J.R. Academic Press, Nueva York, Estados Unidos.
- **Ministerio de Salud de la Nación. 2014.** Programa Nacional de Chagas: Diagnóstico de Situación. <http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/institucional/diagnostico> (último acceso: 21 de noviembre de 2014).
- **Ministerio da Saúde. 2005.** Doença de Chagas. En: *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 6ta edição. Capítulo 6: 282-196 pp. Fundação Nacional da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiologia. Brasilia, Brasil.
- **Minoli, S.; Palottini, F.; Crespo, J.G. y Manrique, G. 2013.** Dislodgment effect of natural semiochemicals released by disturbed triatomines: a possible alternative monitoring tool. *Journal of Vector Ecology* 38: 353-360.
- **Miyazawa, M.; Kameoka, H.; Morinaga, K.; Negoro, K. y Mura, N. 1989.** Hydroxycineole: four new metabolites of 1,8-cineole in rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 222-226.
- **Miyazawa, M.; Shindo, M. y Shimada, T. 2001.** Oxidation of 1,8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from *Eucalyptus polybractea*, by cytochrome P450 3A enzymes in rat and human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 29: 200-205.

- **Moncayo, A. 2003.** Chagas' disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 577-591.

- **Müller, G.C.; Junnila, A.; Kravchenko, V.D.; Revay, E.E.; Butler, J. y Schlein, Y. 2008.** Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. *Journal of the American Mosquito Control Association* 24: 150-153.

- **Müller, G.C., Junnila, A.; Butler, J.; Kravchenko, V.D.; Revay, E.E.; Weiss, R.W. y Schlein, Y. 2009.** Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* 34: 2-8.

- **Nelson, M. 1988.** Development of improved methodologies and indicators for monitoring and evaluation of Chagas' disease vector control operations. Reunión de OMS/OPS, Panamá, 28/09 al 02/10 de 1987. *Revista Argentina de Microbiología* 20: 91-95.

- **Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J. y Stashenko, E. 2010.** Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology* 101: 372-378.

- **Odalo, J.O.; Omolo, M.O.; Malebo, H.; Angira, J.; Njeru, P.M.; Niedege, I.O. y Hassanali, A. 2005.** Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. *Acta Tropica* 95: 210-218.

- **Omolo, M.O.; Okinyo, D.; Niedege, I.O.; Lwande, W. y Hassanali, A. 2004.** Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* 65: 2797-2802.

- **OMS. Organización Mundial de la Salud. 2015.**
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> (último acceso: marzo de 2015).

- **OPS. Organización Panamericana de la Salud. 2014.**
http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=article&id=78:enfermedad-chagas&Itemid=232 (último acceso: enero de 2015).

- **Orchard, I.; Lange, A.B. y Barrett, F.M. 1988.** Serotonergic supply to the epidermis 420 of *Rhodnius prolixus*: evidence for serotonin as the plasticizing factor. *Journal of Insect Physiology* 34: 873-879.
- **Osimitz, T.G.; Murphy, J.V.; Fell, L.A. y Page B. 2010.** Adverse events associated with the use of insect repellents containing *N,N*-diethyl-m-toluamide (DEET). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56: 93-99.
- **Pandey, A.K.; Singh, P.; Palni, U.T. y Tripathi, N.N. 2014.** *In vivo* evaluation of two essential oil based botanical formulations (EOBBFs) for the use against stored product pathogens and pests, *Aspergillus* species and *Callosobruchus* species (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 59: 285-291.
- **Parakrama Karunaratne, S.H.P. 1998.** Insecticide resistance in insects: a review. *Ceylan Journal of Science* 25: 72-99.
- **Park, I.K.; Lee, S.G.; Choi, D.H.; Park, J.D. y Ahn, Y.J. 2003.** Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtuse* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Products Research* 39: 375-384.
- **Pass, G.J.; McLean, S.; Stupans, I. y Davies, N. 2001.** Microsomal metabolism of the terpene 1,8-cineole in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), koala (*Phascolarctos cinereus*), rat and human. *Xenobiotica* 31: 205-221.
- **Petrakis, P.V.; Roussis, V.; Papadimitriou, D.; Vagias, C. y Tsitsimpikou, C. 2005.** The effect of terpenoids extracts from 15 pine species on the feeding behavioral sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. *Behavioral Processes* 69: 303-322.
- **Phillips, A.K. 2009.** Toxicity and repellency of essential oils to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Tesis presentada para optar por el título de Magíster en Ciencia de la Facultad de Graduados de la Universidad de Auburn. Auburn, Estados Unidos.

- **Picollo, M.I.; Vassena, C.; Santo Orihuela, P.; Barrios, S.; Zaidemberg, M. y Zerba, E. 2005.** High resistance to pyrethroid insecticides associated to the ineffectiveness of field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from the north of Argentina. Journal of Medical Entomology 42: 637-642.
- **Picollo, M.I.; Toloza, A.C.; Mougabure-Cueto, G.; Zygadlo, J. y Zerba, E.N. 2008.** Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. Fitoterapia 79: 271-278.
- **Pinchin, R.; de Oliveira Filho, A.M y Pereira, A.C.B. 1980.** The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Panstrongilus megistus*, a vector of Chagas' disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 75: 691-694.
- **Pohlit, A.M.; Ribeiro Rezende, A.; Lopes Baldin, E.L.; Peporine Lopes, N. y Ferreira de Andrade Neto, V. 2011.** Plant extracts, isolated phytochemicals, and plant-derived agents which are lethal to arthropod vectors of human tropical diseases – A review. Planta Medica 77: 618-630.
- **Qualls, W.A. y Xue, R.D. 2009.** Field evaluation of three botanical repellents against *Psorophora ferox*, *Aedes atlanticus*, and *Aedes mitchellae*. Journal of American Mosquito Control Association 25: 379-381.
- **Rabinovich, J.E.; Gürtler, R.E.; Leal, J. y Piñero, D.F. 1995.** Density estimates of the domestic vector of Chagas disease, *Rhodnius prolixus* Ståhl (Hemiptera, Reduviidae), in rural houses in Venezuela. Bulletin of the World Health Organization 73: 347-357.
- **Rajendran, S. y Sriranjini, V. 2008.** Plant products as fumigants for stored-product insect control. Journal of Stored Products Research 43: 126-135.
- **Raposo Borges, A.; Aires, J.R., Higino, TM.; de Medeiros, Md; Citó, A.M.; Lopes, J.A. y de Figueiredo, R.C. 2012.** Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. Experimental Parasitology 132: 123-128.
- **Rastogi, S.C.; Heydorn, S.; Johansen, J.D. y Basketter, D.A. 2001.** Fragrance chemicals in domestic and occupational products. Contact Dermatitis 45: 221-225.

- **Rattan, S.R. 2010.** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* 29: 913-920.
- **Rattner, B.A. 2009.** Diagnosis of anticholinesterase poisoning in birds: Effects of environmental temperature and underfeeding on cholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1: 329-335.
- **Reeder, N.L.; Ganz, P.J.; Carlson, J.R. y Saunders, C.W. 2001.** Isolation of a DEET-insensitive mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Economical Entomology* 94: 1584-1588.
- **Regnault-Roger, C.; Vincent, C. y Arnason, L. 2012.** Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology* 57: 405-424.
- **Rehman, J.U.; Ali, A. y Khan, I.A. 2014.** Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: a review. *Fitoterapia* 95: 65-74.
- **Rice, P.J. y Coats, J.R. 1994a.** Insecticidal properties of several monoterpenoids to house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economical Entomology* 87: 1172-1179.
- **Rice, P.J. y Coats, J.R. 1994b.** Insecticidal properties of monoterpenoids derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pesticide Science* 41: 195-202.
- **Ruigt, G.S. 1985.** Pyrethroids. En: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (12): pp 183-262. Eds: Kerkut, G.A. y Gilbert, L.I. Ed: Pergamon Press. Oxford, Reino Unido.
- **Sahaf, B.Z.; Moharramipour, S. y Meshkatsadat, M.H. 2008.** Fumigant toxicity of essential oils from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 11: 175-179.
- **Sawicki, R.M. y Thain, E.M. 1962.** Insecticidal activity of pyrethrum extract and its knock-down activities of the four constituents. *Pest Management Science* 58: 268-276.

- **Santos, S.R.L.; Melo, M.A.; Cardoso, A.V.; Santos, R.L.C.; de Sousa, D.P. y Cavalcanti, S.C.H. 2011.** Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes argypti* Linn. Chemosphere 84: 150-153.
- **Schofield, C.J. 1978.** A comparison of sampling techniques for domestic populations of Triatominae. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72: 449-455.
- **Schofield, C.J. 1994.** Triatominae. Biology and control. 80 pp. Ed: Eurocomunica Publications. West Sussex, Reino Unido.
- **Sfara, V.; Zerba, E. y Alzogaray, R.A. 2006.** Toxicity of pyrethroids and repellence of diethyltoluamide in two deltamethrin resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug 1834 (Hemiptera: Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 89-94.
- **Sfara, V.; Zerba, E.N. y Alzogaray, R.A. 2008.** Decrease in DEET repellency caused by nitric oxide in *Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 67: 1-8.
- **Sfara, V.; Zerba, E.N. y Alzogaray, R.A. 2009.** Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. Journal of Medical Entomology 46: 511-515.
- **Sfara, V.; Mougabure Cueto, G.; Zerba, E.N. y Alzogaray, R.A. 2011.** Adaptation to the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. Journal of Insect Physiology 57: 1431-1436.
- **Soledade de Lira, C.; Viana Pontual, E.; Pereira de Albuquerque, L.; Mesquita Paiva, L.; Guedes Paiva, P.M.; Vargas de Oliveira, J.; Napoleão, T.H. y Ferraz Navarro, D.M.D.A. 2015.** Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). Crop Protection 71: 95-100.
- **Spillman, C.; Burrone, S. y Coto, H. 2013.** Análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina: avances en el control, 2012. Revista Argentina de la Salud Pública 4: 40-44.
- **Sritabutra, D.; Soonwera, M.; Waltanachanobon, S. y Pongjai, S. 2011.** Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* (Peyton & Harrion). Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1: 124-128.

- **Stevens, L; Dorn, P.L.; Schmidt, J.O.; Klotz, J.H.; Lucero, D. y Klotz, S.A. 2011.** Kissing bugs: vectors of Chagas. En: *Advances in Parasitology* 75 (8): 169-192 pp. Eds: Weiss, LM; Tanowitz, HB; Kirchhoff, LV; Elsevier, Academic Press, Londres, Reino Unido.

- **Tarelli, G.; Zerba, E.N. y Alzogaray, R.A. 2009.** Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economical Entomology* 102: 1383-1388.

- **Terriquez, J.A.; Klotz, S.A.; Meister, E.A.; Klotz, J.H. y Schmidt, J.O. 2013.** Repellency of DEET, picaridin, and three essential oils to *Triatoma rubida* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology* 50: 664-667.

- **Throne, J.E., Weaver, D.K.; Chew, V. y Baker, J.E. 1995.** Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economical Entomology* 88: 1510-1512.

- **Tisserand, R. y Balacs, T. 2014.** Essential oil safety. A guide for health care professionals. 2nd edition. 784 pp. Eds: Williamson, E.M. Ed: Elsevier, Academic Press, Londres, Reino Unido.

- **Toloza, A.C.; Zygadlo, J.; Mougabure-Cueto, G.; Biurrun, F.; Zerba, E. y Picollo, M.I. 2006.** Fumigant and repellent properties of essential oils and components compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *Journal of Medical Entomology* 43: 889-895.

- **Toth, S.J. y Sparks, T.C. 1990.** Effect of temperature on toxicity and knockdown activity of *cis*-permethrin, esfenvalerate, and lambda-cyhalothrin in the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economical Entomology* 83: 342-346.

- **Tripanthi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M. y Bhattacharya, P.R. 2009.** A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 1:52-63.

- **Tunón, H.; Thorshell, W.; Mikiver, A. y Malander, I. 2006.** Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*. *Fitoterapia* 77: 257-261.
- **USEPA. United States Environment Protection Agency. 1993.** R.E.D. FACTS. Flower and Vegetable Oils. <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/4097fact.pdf> (último acceso: diciembre de 2014).
- **USEPA. United States Environment Protection Agency. 2007.** Dichlorvos, TEACH chemical summary. http://www.epa.gov/teach/chem_summ/dichlorvos_summary.pdf (último acceso: 7 de febrero de 2015).
- **Valladares, G.; Ferreyra, D. y Palacios, S. 1999.** Effects of Argentine *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts on *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Fitoterapia* 70: 421-424.
- **Vassena, C; Picollo, M.I.; Zerba, E. 2000.** Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 51-55.
- **Weldon, P.J.; Carroll, J.F. y Kramer, M. 2010.** Anointing chemicals and hematophagous arthropods: responses by ticks and mosquitoes to *Citrus* (Rutaceae) peel exudates and monoterpene components. *Journal of Chemical Ecology* 37: 348-359.
- **Wigglesworth, V.B. 1972.** The principles of insect physiology. 7^{ma} edición. 827 pp. Ed: Chapman and Hall. Londres, Reino Unido.
- **Wong, K.K.Y.; Signal, F.A.; Campion, S.H. y Motion, R.L. 2005.** Citronella as an insect repellent in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4633-4636.
- **Wood, E.J.; Picollo de Villar, M.I.; Melgar, F. y Zerba, E.N. 1982.** Mode of action of organophosphorus insecticides in *T. infestans*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 70: 801-814.
- **Wood, E.; de Licastro, S.A.; Casabé, N.; Sívori, J. y Zerba, E. 1993.** Evaluation of the flushing-out activity of pyrethroids on *Triatoma infestans*. *Insect Science and its Application* 14: 651-655.

- **Xue, R.; Ali, A. y Debboun, M. 2007.** Commercially available insect repellents and criteria for their use. En: Insect repellents: pp 405-415. Eds: Debboun, M.; Frances, S. y Strickman, D. Ed: CRC Press. Londres, Reino Unido.
- **Yeom, H-J.; Kang, J.; Kim, S-W. y Park, I-K. 2013.** Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. Pesticide Biochemistry and Physiology 107: 200-206.
- **Yi, C-G.; Kwon, M.; Hieu, T.T.; Jang, Y-S. y Ahn, Y-J. 2007.** Fumigant toxicity of plant essential oils to *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) and *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: Braconidae). Journal of Asia-Pacific Entomology 10: 157-163.
- **Yang, N.W.; Li, A.L.; Wan, F.H.; Liu, W.X. y Johnson, D. 2010.** Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. Crop Protection 29: 1200-1207.
- **You, C.; Guo, S.; Zhang, W.; Yang, K.; Geng, Z.; Du, S.; Wang, C. y Deng, Z. 2015.** Identification of repellent and insecticidal constituents from *Artemisia mongolica* essential oil against *Lasioderma serricorne*. Journal of Chemistry, ID: 549057, en prensa.
- **Yu, S.J. 2008.** The toxicology and biochemistry of pesticides. 276 pp. Ed: CRC Press. Boca Raton, Estados Unidos.
- **Zahran, H.E.D.M. y Abdelgaleil, S.A.M. 2011.** Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Journal of Asia-Pacific Entomology 14: 46-51.
- **Zerba, E. 1997.** Evolución del control químico de los insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. Anuario de la Sociedad Científica Argentina 227: 35-39.
- **Zerba, E. 1999a.** Past and present of Chagas vector control and future needs. Documento WHO/CDC/WHOPES/GCDPP/99.1., Ginebra, Suiza.
- **Zerba, E. 1999b.** Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas' Disease vectors. Medicina 59: 41-46.

7. Anexos

7.1. Ciclo de vida de triatominos

Los triatominos son insectos hemimetábolos con cinco estadios ninfales morfológicamente similares al adulto (Figura 7.1). La principal diferencia entre ninfas y adultos es que solo estos últimos poseen alas y genitales. Ambos sexos y todos los estadios inmaduros son hematófagos obligados que se alimentan de sangre de vertebrados. El primer estadio ninfal toma su primera ingesta de sangre dos o tres días después de la eclosión (Stevens, 2011).

El ciclo de vida de los triatominos puede extenderse varios meses en áreas tropicales con temperaturas cálidas y abundante oferta de alimento. En regiones donde las estaciones frías pueden ser más prolongadas, suele haber una sola generación por año (Stevens, 2011). Los adultos pueden llegar a vivir dos años (Gorla et al. 2010).

Las hembras se aparean con múltiples machos y pueden poner cientos de huevos, dependiendo de condiciones como la densidad poblacional, la disponibilidad de hospedadores y la estación (Gorla et al. 2010).



Figura 7.1. Ciclo de vida del triatomino *T. infestans* (Ministerio de Salud, 2014).

7.2. Anexo 2. Familias de plantas que biosintetizan los

monoterpenos evaluados esta tesis

(www.pherobase.com, último acceso: diciembre de 2014):

- **Carvacrol:**

Araceae (1 sp.), Orchidaceae (154 spp.), Asteraceae (1 sp.), Caryophyllaceae (3 spp.), Primulaceae (1 sp.), Lamiaceae (33 spp.), Lauraceae (1 sp.), Cupressaceae (1 sp.).

- **Carveol:**

Nyctaginaceae (20 spp.), Annonaceae (6 spp.).

- **1,8-Cineol:**

Araceae (12 spp.), Arecaceae (37 spp.), Amaryllidaceae (13 spp.), Orchidaceae (353 spp.), Asteraceae (8 spp.), Brassicaceae (3 spp.), Winteraceae (1 sp.), Caryophyllaceae (14 spp.), Cucurbitaceae (2 spp.), Caprifoliaceae (1 sp.), Dipsacaceae (2 spp.), Valerianaceae (1 sp.), Actinidiaceae (1 spp.), Lecythidaceae (12 spp.), Polemoniaceae (1 sp.), Polemoniaceae (1 sp.), Apocynaceae (7 spp.), Gentianaceae (2 spp.), Rubiaceae (1 sp.), Geraniaceae (1 sp.), Bignoniaceae (3 spp.), Lamiaceae (16 spp.), Oleaceae (1 sp.), Calycanthaceae (2 spp.), Lauraceae (6 spp.), Annonaceae (7 spp.), Magnoliaceae (18 spp.), Euphorbiaceae (1 sp.), Salicaceae (3 spp.), Violaceae (1 sp.), Malvaceae (2 spp.), Bromeliaceae (2 spp.), Nelumbonaceae (2 spp.), Moraceae (13 spp.), Rosaceae (4 spp.), Meliaceae (1 sp.), Rutaceae (3 spp.), Sapindaceae (1 sp.), Solanaceae (17 spp.), Zingiberaceae (1 sp.).

- **Citronelol:**

Araceae (17 spp.), Orchidaceae (330 spp.), Ruscaceae (1 sp.), Cactaceae (19 spp.), Commelianaceae (1 sp.), Caprifoliaceae (1 sp.), Ericaceae (4 spp.), Lecythidaceae, (12 spp.), Myrsinaceae (3 spp.), Fabaceae (1 sp.), Gentianaceae (1 sp.), Rubiaceae (3 spp.), Oleaceae (4 spp.), Cupressaceae (4 spp.), Berberidaceae (1 sp.), Ranunculaceae (5 spp.), Rosaceae (10 spp.), Rutaceae (3 spp.), Solanaceae (2 spp.).

- **Eugenol:**

Araceae (19 spp.), Arecaceae (23 spp.), Hyacinthaceae (2 spp.), Orchidaceae (328 spp.), Asteraceae (2 spp.), Winteraceae (1 spp.), Caryophyllaceae (3 spp.), Nyctaginaceae (20 spp.), Caprifoliaceae (1 sp.), Lecythidaceae (13 spp.), Polemoniaceae (2 spp.), Sapotaceae (1 sp.), Theophrastaceae (7 spp.), Fabaceae (2 spp.), Apocynaceae (1 sp.), Rubiaceae (5 spp.), Acanthaceae (1 sp.), Oleaceae (3 spp.), Lauraceae (1 sp.), Magnoliaceae (10 spp.), Passifloraceae (1 sp.), Rhizophoraceae (3 spp.), Malvaceae (2 spp.), Onagraceae (2 spp.), Rhamnaceae (1 sp.), Rosaceae (5 spp.), Solanaceae (7 spp.), Clusiaceae (3 spp.), Zingiberaceae (1 sp.).

- **Geraniol:**

Araceae (19 spp.), Arecaceae (22 spp.), Amaryllidaceae (1 sp.), Iridaceae (1 sp.), Orchidaceae (299 spp.), Ruscaceae (1 sp.), Brassicaceae (1 sp.), Cactaceae (18 spp.), Caprifoliaceae (1 sp.), Dipsacaceae (1 sp.), Ericaceae (4 spp.), Lecythidaceae (13 spp.), Myrsinaceae (3 spp.), Fabaceae (3 spp.), Gentianaceae (1 sp.), Rubiaceae (2 spp.), Lamiaceae (3 spp.), Oleaceae (5 spp.), Scrophulariaceae (1 sp.), Verbenaceae (1 spp.), Magnoliaceae (20 spp.), Passifloraceae (2 spp.), Malvaceae (3 spp.), Thymelaeaceae (1 sp.), Cupressaceae (1 sp.), Berberidaceae (1 sp.),

Ranunculaceae (6 spp.), Rosaceae (11 spp.), Rutaceae (3 spp.), Sapindaceae (1 sp.), Solanaceae (4 spp.), Clusiaceae (1 sp.), Hypericaceae (1 sp.), Vitaceae (1 sp.), Zingiberaceae (1 sp.).

- **Linalool:**

Araceae (8 spp.), Apiaceae (8 spp.), Umbelliferae (1 sp.), Arecaceae (38 spp.), Alliaceae (1 sp.), Amaryllidaceae (15 spp.), Hemerocallidaceae (1 sp.), Hyacinthaceae (1 sp.), Iridaceae (1 sp.), Orchidaceae (384 spp.), Ruscaceae (1 sp.), Asteraceae (8 spp.), Brassicaceae (9 spp.), Caricaceae (1 spp.), Winteraceae (9 spp.), Cactaceae (20 spp.), Caryophyllaceae (18 spp.), Nyctaginaceae (20 spp.), Commelianaceae (1 sp.), Cucurbitaceae (3 spp.), Zamiaceae (4 spp.), Caprifoliaceae (2 spp.), Dipsacaceae (2 spp.), Valerianaceae (1 sp.), Lecythidaceae (13 spp.), Myrsinaceae (3 spp.), Polemoniaceae (4 spp.), Primulaceae (1 sp.), Sapotaceae (1 sp.), Theophrastaceae (7 spp.), Fabaceae (13 spp.), Apocynaceae (8 spp.), Gentianaceae (2 spp.), Rubiaceae (6 spp.), Lamiaceae (20 spp.), Oleaceae (14 spp.), Verbenaceae (3 spp.), Calycanthaceae (2 spp.), Lauraceae (2 spp.), Annonaceae (1 sp.), Magnoliaceae (24 spp.), Passifloraceae (1 sp.), Rhizophoraceae (3 spp.), Salicaceae (3 spp.), Violaceae (1 spp.), Bombacaceae (1 sp.), Malvaceae (6 spp.), Thymelaeaceae (1 spp.), Combretaceae (1 sp.), Lythraceae (2 spp.), Onagraceae (7 spp.), Cupressaceae (3 spp.), Nelumbonaceae (2 spp.), Berberidaceae (2 spp.), Fumariaceae (1 spp.), Ranunculaceae (11 spp.), Rhamnaceae (1 sp.), Moraceae (19 spp.), Rosaceae (15 spp.), Rutaceae (4 spp.), Simaroubaceae (1 sp.), Solanaceae (15 spp.), Hypericaceae (7 spp.), Vitaceae (1 sp.), Zingiberaceae (1 sp.).

- **Mentol:**

Orchidaceae (154 spp.), Myrsinaceae (3 spp.), Gentianaceae (1 sp.), Lamiaceae (4 spp.), Oleaceae (4 spp.), Lauraceae (1 sp.), Magnoliaceae (10 spp.), Cupressaceae (2 spp.), Rosaceae (1 sp.).

- **α -Terpineol:**

Araceae (7 spp.), Arecaceae (22 spp.), Agavaceae (1 sp.), Amaryllidaceae (1 sp.), Iridaceae (1 sp.), Orchidaceae (269 spp.), Asteraceae (4 spp.), Brassicaceae (1 sp.), Caricaceae (1 sp.), Winteraceae (2 spp.), Cactaceae (18 spp.), Caryophyllaceae (18 spp.), Cucurbitaceae (2 spp.), Zamiaceae (4 spp.), Caprifoliaceae (1 sp.), Dipsacaceae (2 spp.), Ericaceae (4 spp.), Lecythidaceae (12 spp.), Myrsinaceae (3 spp.), Theophrastaceae (7 spp.), Fabaceae (3 spp.), Lamiaceae (3 spp.), Oleaceae (7 spp.), Calycanthaceae (2 spp.), Lauraceae (4 spp.), Magnoliaceae (20 spp.), Violaceae (1 spp.), Cupressaceae (10 spp.), Nelumbonaceae (2 spp.), Berberidaceae (1 sp.), Fumariaceae (6 spp.), Rhamnaceae (1 sp.), Moraceae (1 sp.), Rosaceae (1 sp.), Rutaceae (1 sp.), Solanaceae (12 spp.), Clusiaceae (2 spp.), Hypericaceae (8 spp.), Zingiberaceae (1 sp.).

- **Timol:**

Araceae (1 sp.), Orchidaceae (154 spp.), Asteraceae (1 sp.), Lamiaceae (13 spp.), Oleaceae (2 spp.), Lauraceae (1 sp.), Rosaceae (1 spp.), Clusiaceae (1 sp.).

- **(S)-cis-Verbenol:**

Orchidaceae (154 spp.), Cupressaceae (1 sp.).

7.3. Anexo 3. Trabajos publicados en revistas internacionales

como resultado de esta tesis

Behavioral and Toxicological Responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 Monoterpene Alcohols

A. N. MORETTI,¹ E. N. ZERBA,^{1,2} AND RAÚL A. ALZOGARAY^{1,2,3}

J. Med. Entomol. 50(5): 1046–1054 (2013); DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME12248>

ABSTRACT The effect on locomotor activity, the repellency, and the knock-down produced by 10 monoterpene alcohols were evaluated on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*, vectors of Chagas disease. A video tracking technique was used to evaluate locomotor activity and repellency by exposure to papers impregnated with monoterpenes. Eugenol on *R. prolixus* and (S)-*cis*-verbenol on *T. infestans* did not modify the locomotor activity. The remaining monoterpenes produced hyperactivity on both species, although the concentration required was at least a 1,000 times higher than that of deltamethrin (positive control). Carvacrol, eugenol, and geraniol resulted as repellent as *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (positive control) for both species. A similar result was observed for almost every monoterpene on *T. infestans*. Knock-down effect was evaluated by exposing the nymphs in closed recipients. The order of increasing toxicity on *R. prolixus* was (KT₅₀ values in min): geraniol (213.7) < α -terpineol (164.5) < linalool (124.2) < carvacrol (111.6) < eugenol (89.8) < thymol (78.9), and on *T. infestans*: α -terpineol (289.8) < eugenol (221.3) < carvacrol (164.2) < linalool (154.9) < thymol (96.7). All monoterpenes were less toxic than the positive control, dichlorvos (3.6 min for *R. prolixus* and 3.9 min for *T. infestans*). After 7 h of exposure, (-)-carveol, citronellol, and menthol (on both species) and geraniol (on *T. infestans*) produced <50% of knock-down. After these results, it is worthwhile to explore more deeply the potential of these compounds as tools for controlling Chagas disease vectors.

KEY WORDS *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, locomotor activity, repellency, knock-down

The use of conventional synthetic insecticides (i.e., organophosphorus, carbamates, and pyrethroids) is questioned because of the many associated environmental and health risks (Isman 2006). Therefore, a significant commercial opportunity and a renewed interest in natural low-impact alternatives have been created (Isman 2000, 2010). Although the use of plant derivatives against pests has been known for millennia, just four groups of botanical insecticides are in commercial use today: pyrethrum, neem, rotenone, and essential oils (Isman 2006). The latter, traditionally used in the Mediterranean region and Southeast of Asia, are composed of highly complex mixtures of monoterpenes, phenols, and sesquiterpenes. They are widely indicated as both safe to nontarget organisms and environmentally friendly (Isman 2000). Essential oils are obtained especially from foliage of Myrtaceae and Lamiaceae families and examples include eucalyptol, the major constituent of oils from rosemary and eucalyptus; eugenol from clove oil; thymol from gar-

den thyme; and menthol from various species of mint (Isman 2006, 2010). Within the components of essential oils, monoterpenes have a broad spectrum of insecticidal activity on stored grain Coleoptera (Park et al. 2003, Sahaf et al. 2008), Diptera (Tarelli et al. 2009, Santos et al. 2011), American and German cockroaches (Appel et al. 2001, Jang et al. 2005, Alzogaray et al. 2011), carpenter ants (Jang et al. 2005), human lice (Tolozza et al. 2008), and triatomines (Fournet et al. 1996, Laurent et al. 1997, Abramson et al. 2007, Sfera et al. 2009).

In addition to lethal effects, there are several sublethal effects of monoterpenes on insects extensively documented: feeding deterrence (Hummelbrunner and Isman 2001, Petrakis et al. 2005), reduction in survival and oviposition rate (Yang et al. 2010), and reduction in hatchability, pupation, and adult emergence (Zahran and Abdelgaleil 2011). Repellency has been a hot topic of research for decades. The wide efficiency afforded by the synthetic insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) has not yet been overcome by any natural compound. However, concerns with the safety of DEET and other synthetic repellents, especially to children, have resulted in the identification of several plant oils or their components as natural alternatives, despite the limited duration of

¹ Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN/UNIDEF-CONICET), J.B. de La Salle 4397, (1603) Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (UNSAM), San Martín, Buenos Aires, Argentina.

³ Corresponding author, e-mail: ralzogaray@hotmail.com.

their effects (Isman 2006, 2010; Nerio et al 2010; Srita-butra et al. 2011).

Chagas is a Latin American disease caused by the protozoon *Trypanosoma cruzi* (Chagas), which is vectorized by triatomines. It is the most severe parasitic disease of the American continent (Organización Panamericana de la Salud [OPS] 2006). In Argentina, it is estimated that there are 2,300,000 infected people (7.2% of total population) and 7,300,000 people are exposed in endemic areas, turning it into the main endemic in this country (Gimenez and Mitelman 2010). *Rhodnius prolixus* (Stål), a classic model of insect physiology, is the most important vector in Central America, Colombia, and Venezuela, whereas *Triatoma infestans* (Klug) is its main vector in Argentina.

In addition, and taking into account the onset in Argentina of populations of *T. infestans* resistant to pyrethroids (Vassena et al. 2000, Picollo et al. 2005), the search for natural substances that could replace these insecticides in the Chagas vectors' control constitutes a primary goal. Cinnamon oil affected molting and, therefore, survival on *R. prolixus* (Abramson et al. 2007); eucalyptol showed good performance as a fumigant; and geraniol and menthyl acetate presented an important repellent effect (Sfara et al. 2009). Several terpenes of essential oils extracted from Bolivian plants showed ovicidal and larvicidal effects on *T. infestans* (Fournet et al. 1996, Laurent et al. 1997).

Botanical monoterpenes present a wide variety of chemical structures. In general, they can be grouped into alcohols, aldehydes, ketones, acids, esters, hydrocarbons, and others (Jang et al. 2005). As a first step to explore the potential of the monoterpenes as new tools for controlling the vectors of Chagas disease, the aim of the current study was to evaluate the effect on locomotor activity, and the repellency and the knock-down produced by 10 monoterpene alcohols on *R. prolixus* and *T. infestans*.

Materials and Methods

Biological Material. First-instar nymphs of *R. prolixus* and *T. infestans*, 1–5-d-old starved since the eclosion, were used in all the experiments. The former emerged from a stable colony reared at the Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina), the latter from eggs provided by the Servicio Nacional de Chagas de Argentina (Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina).

Chemicals. Monoterpenes (carvacrol, (-)-carveol, citronellol, eugenol, geraniol, linalool, menthol, α -terpineol, thymol, and (S)-*cis*-verbenol) and DEET were bought from Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina). Deltamethrin and dichlorvos were a donation from Chemotecnica S.A. (Spegazzini, Argentina). Acetone was bought from Merck (Darmstadt, Germany).

Recording Equipment. A video camera black and white closed-circuit (VC 1910; Sanyo Electrical Co., Tokyo, Japan) and an image analyzer (Videomex V, Columbus, OH) were used to evaluate locomotor activity and repellency. The video camera captures the image of the insects placed on a circular piece of filter

paper. The image analyzer converts the analog signal input from the video camera into digital data with a resolution of 256 by 192 pixels and an acquisition and processing speed of 30 frames/s. The presence of insects on the filter paper is determined by visual contrast between the subjects (white) and the paper background (black), and is scored as the number of enlightened pixels. To quantify nymph's movement, Videomex-V uses the Multiple Zone Motion Monitor software that compares consecutive frames captured by the camera and records the number of pixels that changed from "on" to "off" and vice versa. The sum of pixels that changes during experimental time is called *motion* (*M*). The software also calculates the average number of pixels on during experimental time. This parameter is called *area* (*A*), and represents the average area occupied by the insects on the video image.

The recording started immediately after placing the insects onto the experimental arena. The illumination during testing was provided by a cold light lamp (22 watts) Luxa (Shanghai, China) placed at the zenith of the arena. Temperature was maintained at $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Each set of data were imported and processed in a personal computer.

Evaluation of Locomotor Activity. Circles of filter papers (7 cm in diameter) were impregnated with 0.5 ml of solution of monoterpene in acetone. After the solvent was evaporated, groups of four nymphs were allowed to walk on the experimental arena within which they were contained because of the presence of an opaque glass ring. First instars of triatomines are very small (3 mm in length, 1–2 mm in width, approximately). In preliminary bioassays, after adjusting the control of the digitized video image to remove noise and get optimal tracking of the subject image, a poor repeatability was observed when using only one nymph (because of very small changes in nymph's position, which caused variations in the area occupied by the insect on the video image). However, a good repeatability was obtained when four nymphs were placed on the experimental arena. Distribution of the four nymphs on the arena was consistently random (no aggregation was observed).

At the beginning of each trial, the four nymphs were gently placed in the geometric center of the experimental arena. All trials lasted 30 min, consisting of 60 recording sessions of 30 s each. The design was completely randomized. Four concentrations were tested for each substance. After screenings, the concentrations chosen were 3.9, 39, 390, and 3,900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Each bioassay had a negative control (acetone alone). Deltamethrin (3.9×10^{-3} , 3.9×10^{-2} , 0.39, and 3.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) was used as positive control. Each experiment was independently replicated six times (replicates were performed on different days, using different nymphs from a replicate to the next).

Because of the changes in nymph's position mentioned previously, the number of pixels on varies during the experimental time. To standardize the data for the size of the nymphs, we calculated the quotient $M/A = \text{Locomotor Activity}$ (Alzogaray et al. 1997). The results were expressed in units of pixels/area.

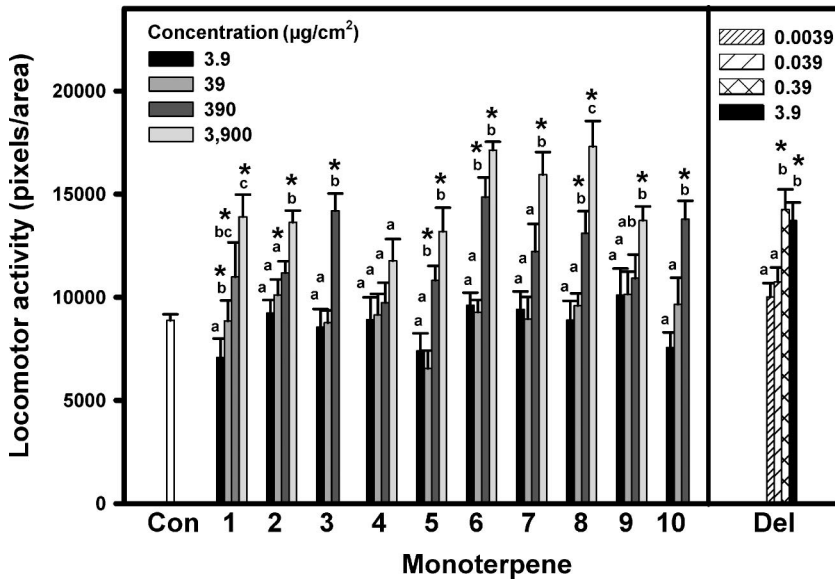


Fig. 1. Locomotor activity of *R. prolixus* nymphs exposed to filter papers treated with different concentrations of monoterpenes. Con: control, Del: deltamethrin (positive control), 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronellol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: menthol, 8: α -terpineol, 9: thymol, 10: (S)-*cis*-verbenol. Each bar represents the mean of six independent replicates. Vertical lines are SE. Inside each group, bars marked with the same letter are not significantly different (Fisher test; $P > 0.05$). Asterisks indicate significant difference from control (Fisher test; $P < 0.05$).

Evaluation of Repellency. The experimental design was similar to that used to measure locomotor activity, with the following modifications: 1) each filter paper was divided into two equal parts, one half being treated with 0.15 ml of a solution of the substance to be evaluated in acetone, and the other half with 0.15 ml of the solvent alone; and 2) the image analyzer was programmed to record the motion parameters on each zone separately.

All trials lasted 15 min, consisting of 30 recording sessions of 30 s each. The design was completely randomized, with six independent replicates for each trial and three concentrations for each substance (39, 390, and 3,900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Each bioassay had a negative control (acetone alone). DEET, used as positive control, was applied at 3.9, 39, and 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

We expressed the data by using a *Distribution Coefficient*:

$$DC = (AT - At) / AT$$

where *AT* is the total area occupied by nymphs on the arena, and *At* is the area occupied by nymphs on the treated zone, both during the experimental time. This coefficient varies between 0 and 1; 0 corresponds to the case where the substance produces maximum attraction and 1 to the case where it produces maximum repellence. The 0.5 value corresponds to an equal distribution of the insects between treated and non-treated zones (random distribution).

Evaluation of Knock-Down. Groups of 10 nymphs were exposed to monoterpenes inside plastic containers with lids (4 cm in diameter by 4 cm in height). The base of each container was covered with a filter paper circle. Filter papers were impregnated with 0.09 ml of

solution of monoterpene in acetone (3,900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) or with acetone alone (control), 5–10 min before starting each experiment, so that the solvent evaporates.

The number of knocked-down insects was recorded every 10 min. Insects were considered knocked-down when they lay on the paper, unable to walk.

Replicates were interrupted when 90% of the insects were knocked-down or after 7 h of exposure. Dichlorvos was used as positive control (3,900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Six independent replicates of each experiment were performed.

Statistical Analysis. Data from locomotor activity and repellency bioassays were analyzed by using 1-way analysis of variance (after passing normality and homocedasticity tests). In cases where $P < 0.05$, Fisher post hoc comparisons (LSD method) were used to detect significant differences between pairs of treatments. The series of data that did not pass homocedasticity tests were analyzed by using the nonparametric Kruskal–Wallis analysis of variance by ranks. In cases where $P < 0.05$, Tukey's test was used to detect significant differences between pairs of treatments.

Knock-down time 50% (KT_{50}) values were calculated with their respective 95% confidence limits by using the statistical software for correlated data developed by Throne et al. (1995). Differences between values were considered significant ($P < 0.05$) if the respective 95% confidence limits did not overlap.

Results

Locomotor Activity. The locomotor activity of *R. prolixus* and *T. infestans* nymphs exposed to monoterpenes is shown in Figs. 1 and 2, respectively. In all

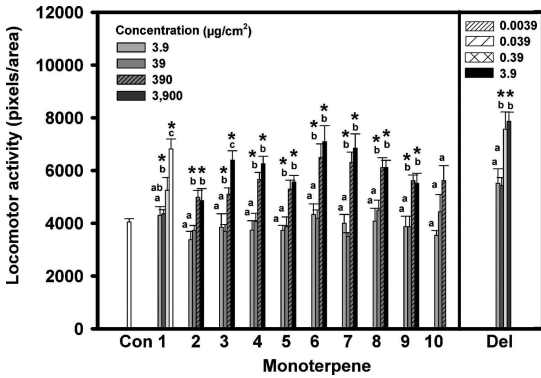


Fig. 2. Locomotor activity of *T. infestans* nymphs exposed to filter papers treated with different concentrations of monoterpenes. Con: control, Del: deltamethrin (positive control, only the highest concentration tested is shown), 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronellol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: menthol, 8: α -terpineol, 9: thymol, 10: (S)-*cis*-verbenol. Each bar represents the mean of six independent replicates. Vertical lines are SE. Inside each group, bars marked with the same letter are not significantly different (Fisher test; $P > 0.05$). Asterisks indicate significant difference from control (Fisher test, $P < 0.05$).

cases where hyperactivity was observed, it varied in a concentration-dependent way. Most of the 10 monoterpenes evaluated produced hyperactivity from 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ on both species. On *R. prolixus*, carvacrol produced hyperactivity from 39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; menthol, thymol, and (S)-*cis*-verbenol only at 3,900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Eugenol did not modify the nymphs' locomotor activity. Citronellol was not tested for the highest concentration on *R. prolixus* because nymphs started to show symptoms of intoxication. On *T. infestans*, (S)-*cis*-verbenol failed to modify nymphs' locomotor activity. (S)-*Cis*-verbenol was not tested for the highest concentration in any species, because it exceeded its limit of solubility in acetone. Results of analyses of variance are shown in Table 1.

Repellency. The values of DC for *R. prolixus* and *T. infestans* nymphs exposed to monoterpenes are shown in Figs. 3 and 4, respectively. On *R. prolixus*, carvacrol, eugenol, and geraniol produced a repellent effect from 39 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; (-)-carveol, citronellol, linalool, men-

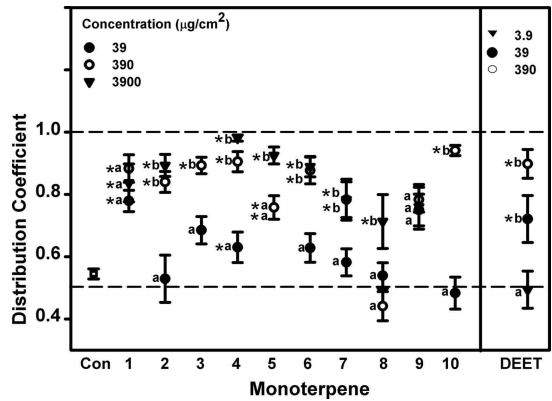


Fig. 3. Values of DC for monoterpenes on nymphs of *R. prolixus*. Con: control, DEET: N,N-diethyl-m-toluamide (positive control), 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronellol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: menthol, 8: α -terpineol, 9: thymol, 10: (S)-*cis*-verbenol. Each symbol represents the mean of six independent replicates. Vertical lines are SE. Inside each group, symbols marked with the same letter are not significantly different (Fisher test; $P > 0.05$). Dashed lines indicate 0.5 and 1 DC values. Asterisks indicate significant difference from control (Fisher test; $P < 0.05$).

thol, and (S)-*cis*-verbenol produced repellency from 390 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; α -terpineol from 3,900 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; and thymol did not produce repellency. Citronellol was not tested for the highest concentration on *R. prolixus* because nymphs started to show symptoms of intoxication. On *T. infestans*, all monoterpenes produced a strong repellent effect. On both species, DEET pro-

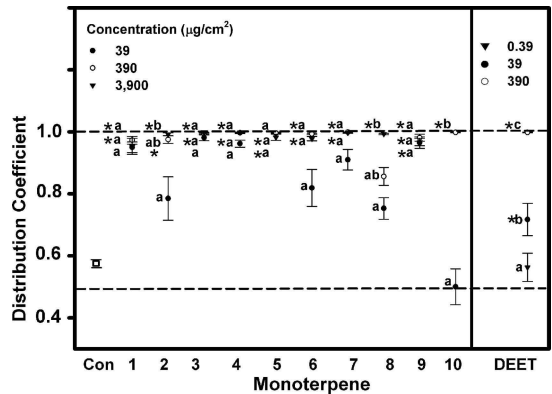


Fig. 4. Values of DC for monoterpenes on nymphs of *T. infestans*. Con: control, DEET: N,N-diethyl-m-toluamide (positive control), 1: carvacrol, 2: (-)-carveol, 3: citronellol, 4: eugenol, 5: geraniol, 6: linalool, 7: menthol, 8: α -terpineol, 9: thymol, 10: (S)-*cis*-verbenol. Each symbol represents the mean of six independent replicates. Vertical lines are SE. Inside each group, bars marked with the same letter are not significantly different (Tukey's test for ANOVA by ranks; $P > 0.05$). Asterisks indicate significant difference from control (Fisher test; $P < 0.05$).

Table 1. Results of ANOVA for locomotor activity bioassays on *R. prolixus* and *T. infestans*

Compound	<i>R. prolixus</i>			<i>T. infestans</i>		
	F	df	P	F	df	P
Carvacrol	4.809	4, 25	0.005	12.273	4, 25	<0.001
(-)-Carveol	9.447	4, 25	<0.001	5.389	4, 25	0.003
Citronellol	24.31	4, 25	<0.001	11.268	4, 25	<0.001
Eugenol	1.864	4, 25	0.148	13.454	4, 25	<0.001
Geraniol	12.27	4, 25	<0.001	9.66	4, 25	<0.001
Linalool	20.545	4, 25	<0.001	10.43	4, 25	<0.001
Menthol	5.89	4, 25	0.002	15.022	4, 25	<0.001
α -Terpineol	14.852	4, 25	<0.001	6.65	4, 25	<0.001
Thymol	3.821	4, 25	0.015	7.351	4, 25	<0.001
(S)- <i>Cis</i> -verbenol	7.396	3, 20	0.002	1.818	3, 20	0.176
Deltamethrin	8.938	4, 24	<0.001	8.478	4, 25	<0.001

Table 2. Results of ANOVA for repellency bioassays on *R. prolixus* and *T. infestans*

Compound	<i>R. prolixus</i>			<i>T. infestans</i>		
	F	df	P	H	df	P
Carvacrol	8.475	3, 20	<0.001	13.664	3	0.003
(-)-Carveol	24.716	3, 20	<0.001	17.973	3	<0.001
Citronellol	11.662	3, 20	<0.001	14.392	3	0.002
Eugenol	50.232	3, 20	<0.001	19.036	3	<0.001
Geraniol	28.717	3, 20	<0.001	13.365	3	0.004
Linalool	12.14	3, 20	<0.001	18.007	3	<0.001
Menthol	4.548	3, 20	0.014	18.496	3	<0.001
α-Terpineol	5.389	3, 20	0.007	19.207	3	<0.001
Thymol	1.486	3, 20	0.249	13.72	3	0.003
(S)-Cis-verbenol	40.238	2, 15	<0.001	11.392	2	0.003
	H	df	P	H	df	P
DEET	5.967	3	0.113	15.874	3	0.001

duced repellency from 39 μg/cm². In this way, carvacrol, eugenol, and geraniol showed a repellent effect similar to DEET on *R. prolixus*, whereas almost all the monoterpenes gave results similar to DEET on *T. infestans*. (S)-Cis-verbenol was not tested for the highest concentration in any species, because it exceeded its limit of solubility in acetone. Results of analyses of variance are shown in Table 2.

Knock-Down. The values of KT₅₀ for monoterpene alcohols applied as films on filter papers on *R. prolixus* and *T. infestans* are shown in Table 3. On *R. prolixus*, the monoterpenes presented the following order of increasing toxicity (KT₅₀ values in min): geraniol (213.7) < α-terpineol (164.5) < linalool (124.2) < carvacrol (111.6) < eugenol (89.8) < thymol (78.9). On *T. infestans*, the results were α-terpineol (298.9) < eugenol (221.3) < carvacrol (164.2) < linalool (154.9) < thymol (96.7). After 7 h of exposure, (-)-carveol, citronellol, and menthol (on both species) and geraniol (on *T. infestans*) produced <50% of knock-down. Dichlorvos (positive control) was more toxic than any monoterpene for both species, showing a KT₅₀ of 3.6 min for *R. prolixus* and 3.9 min for *T. infestans*. (S)-Cis-verbenol was not tested in any species, because the concentration to apply exceeded its limit of solubility in acetone.

Discussion

In this work, we evaluated the effect on locomotor activity, and the repellency and knock-down produced by 10 monoterpene alcohols on the vectors of Chagas disease *R. prolixus* and *T. infestans* (results are summarized in Table 4).

An increase in locomotor activity (hyperactivity) is the first symptom of intoxication produced by pyrethroids in insects (Miller and Adams 1982, Alzogaray et al. 1997, Alzogaray and Zerba 2001). Hyperactivity is of practical use for entomological pests because it causes the flushing-out phenomenon: hyperactivated insects leave their refuges, making it easier to estimate their presence and abundance by controllers (Pinchin et al. 1980, Gualtieri et al. 1985). This method has been applied to detect vectors of Chagas disease for decades (Wood et al. 1993). Hyperactivity was also observed in

Table 3. KT₅₀ and KT₉₅ values for 10 monoterpenes with an alcohol group on first-instar nymphs of *R. prolixus* and *T. infestans*

Compound	<i>R. prolixus</i>					<i>T. infestans</i>				
	N ^w	Slope (SE)	KT ₅₀ min (95% CL)	KT ₉₅ min (95% CL)	χ ²	N ^w	Slope (SE)	KT ₅₀ min (95% CL)	KT ₉₅ min (95% CL)	χ ²
Thymol	60	6.2 (0.64)	78.9a (67.3-92.7)	145a (118.5-204)	16.2	60	3.9 (0.40)	96.7a (78.2-120.4)	255.4a (191.6-401.4)	26.6
Eugenol	60	4.0 (0.46)	89.8ab (65.8-124.7)	233.6ab (158.4-541.4)	37.4	60	3.6 (0.40)	221.3b (187.2-263.7)	631.9b (491.7-904)	35.1
Carvacrol	60	6.2 (0.61)	111.6b (101.3-123.0)	205.4a (179.9-245.7)	16.3	60	5.6 (0.60)	164.2c (147.5-183.0)	321.0a (275.5-397.3)	21.0
Linalool	60	5.6 (0.58)	124.2bc (102.5-151.8)	244.0ab (191.1-379.5)	30.0	60	6.0 (0.61)	154.9c (140.1-171.5)	292.1a (253.7-354.7)	15.8
α-Terpineol	60	4.0 (0.45)	164.5c (129.4-213.9)	427.4bc (305.8-783.4)	41.4	60	6.7 (0.75)	289.8b (253.1-334.3)	508.6b (422.3-703.5)	37.9
Geraniol	60	2.5 (0.31)	213.7c (132.6-392.6)	963.7c (489.0-4,919.9)	73.2	60	-	-	-	-
(-)-Carveol	60	-	-	-	-	60	-	-	-	-
Citronellol	60	-	-	-	-	60	-	-	-	-
Menthol	60	-	-	-	-	60	-	-	-	-
Dichlorvos	60	7.2 (0.70)	3.6d (3.0-4.2)	6.1d (5-8.80)	18.8	60	6.8	3.9d (3.5-4.2)	6.8c (6-8)	6.1

KT₅₀ = 50% knock-down time; KT₉₅ = 95% knock-down time; CL = confidence limit.

^a Total number of nymphs used for bioassay.

^b KT₅₀ or KT₉₅ values were not calculated because <50% of knocked-down nymphs were observed after 7 h of exposure. Within a column, values followed by the same letter are not significantly different (P > 0.05).

Table 4. Summary of results obtained in this work, showing the monoterpenes ordered according to their effects on locomotor activity, their repellency, and knock-down

Hyperactivity			Repellency			Knock-down ^a		
LOEL $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	<i>R. prolixus</i>	<i>T. infestans</i>	LOEL $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	<i>R. prolixus</i>	<i>T. infestans</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>T. infestans</i>	<i>T. infestans</i>
0.39	Deltamethrin	Deltamethrin	39	DEET Carvacrol Geraniol Eugenol	DEET	Dichlorvos Thymol Eugenol Carvacrol Linalool α -Terpineol Geraniol	Dichlorvos Thymol Linalool Carvacrol Eugenol α -Terpineol	
39	Carvacrol	Linalool Menthol α -Terpineol Eugenol	≤ 39		Geraniol Thymol			
390	Linalool Citronellol (S)-Cis-verbenol α -Terpineol (-)-Carveol Geraniol	(S)-Cis-verbenol Citronellol Linalool (-)-Carveol Menthol	390		(S)-Cis-verbenol Eugenol Citronellol Linalool Menthol Carvacrol (-)-Carveol			Geraniol Menthol Citronellol (-)-Carveol
3,900	Menthol Thymol	(S)-Cis-verbenol	3,900	α -Terpineol				(S)-Cis-verbenol
NE	Eugenol		NE	Thymol	α -Terpineol			

LOEL = lowest observed effect level; N = not observed effects at the concentrations tested; NC = not calculated; NT = not tested.
^a Monoterpenes are shown in order of increasing KT_{50} values.

insects exposed to DEET. Concentrations higher than $350 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of this repellent produced an increase in the locomotor activity of *R. prolixus* (Sfara et al. 2009).

Hyperactivity was observed as a toxicity symptom of essential oils in American cockroaches treated with monoterpene alcohol, although it was not quantified (Enam 2001). It was also reported for menthyl acetate in German cockroaches (Alzogaray et al. 2013). The results presented in this article are of relevance for surveillance and control purposes because they constitute the first report of a quantitative analysis of the hyperactivity effect produced by monoterpenes in Chagas disease vectors. Except (S)-cis-verbenol and eugenol, the tested compounds produced hyperactivity on both species, although the concentrations required was at least a 1,000 times higher than that of deltamethrin (positive control).

A repellent is a chemical that causes negative chemotaxis: oriented movement directly away from the chemical source (Dethier et al. 1960). Repellents are used mainly to prevent bites from hematophagous arthropods (Katz et al. 2008) and also in food packaging materials as a strategy for keeping insects away from the products (Wong et al. 2005).

Monoterpenes with repellent properties are generally less effective than DEET, either because of their lower repellent activity per se or because of their shorter effective time (Omolo et al. 2004, Isman 2006, Moore et al. 2007). All the monoterpenes studied in this work showed repellency on several species of mosquitoes and sandflies (Ansari et al. 2000; Choi et al. 2001; Kumar et al. 2011; Omolo et al. 2004; Odalo et al. 2005; Müller et al. 2008, 2009; Qualls and Xue 2009; Weldon et al. 2010). Geraniol has also shown repellence against ticks (Tunón et al. 2006) and fifth-instar nymphs of *R. prolixus* (Sfara et al. 2009); menthol and thymol against *Pediculus humanus capitis* (De Geer) (Tolosa et al. 2006); and α -terpineol against *Tribolium castaneum* (Herbst) (García et al. 2005). There are even commercial repellents available nowadays, containing geraniol as active ingredient (Chen and Viljoen 2010).

This study constitutes the first report of repellency on Chagas vectors for carvacrol, (-)-carveol, citronellol, eugenol, linalool, menthol, α -terpineol, thymol, and (S)-cis-verbenol. Although applications of repellency data are less straightforward and require deeper work in chemical, biological, and safety issues, the results of repellency bioassays are interesting. Carvacrol, eugenol, and geraniol resulted as repellent as DEET for *R. prolixus*, whereas almost every monoterpene had the same result for *T. infestans*.

Repellents are not usually used as a personal protective measure to interrupt transmission of Chagas disease. This may be due largely to the lack of studies and demonstrations of their efficacy for this purpose. However, repellents may be useful to protect the residents of homes infested with Chagas vectors, health workers, and temporary workers who live part of the year in areas affected by this disease. Furthermore, in regions where Chagas is endemic, other diseases vectors exist (i.e., mosquitoes and hematophagous

gous flies), so the use of a broad-spectrum repellents could provide general protection against various insects that threaten human health.

Monoterpenes vapors are much less toxic than other fumigant insecticides such as phosphine, ethyl bromide, and the organophosphate dichlorvos (Rice and Coats 1994a,b; Rajendran and Sriranjini 2008; Lucía et al. 2009; Alzogaray et al. 2011). The lethal concentration 50% values of 22 monoterpenes varied between 2 and >2,500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ in *Musca domestica* (L.), whereas the lethal concentration 50% of dichlorvos was 0.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Rice and Coats 1994a). In the same study, a similar tendency was observed in *T. castaneum*, where the monoterpenes applied were between 9 and >175.6 times less toxic than dichlorvos. However, there were exceptions: pulegone showed the same toxicity as dichlorvos, and *l*-fenchone resulted in only 1.3 times less toxicity. The KT_{50} values of monoterpenes evaluated here were higher than those for dichlorvos, showing a knock-down time that is, as a first approach, too slow to be of practical use.

Jang et al. 2005 evaluated fumigant toxicity by using the same technique as ours (in closed recipients with impregnated papers) on *Blattella germanica* (L.) and pointed out that degrees of saturation, types of functional groups, hydrophobicity, and vapor pressure parameters appear to play a role in determining the monoterpenoids' toxicity. However, even though their results indicate that the mode of delivery of linalool, α -terpineol, and thymol was likely by vapor action via the respiratory system, neither hydrophobicity nor vapor pressure parameters appeared significantly related to the observed toxicities. Convergenly, we did not find any correlation between vapor pressure values or octanol-water partition coefficients and the toxicity of the monoterpenes in knock-down bioassays (results not shown).

In conclusion, we suggest that some of the monoterpenes evaluated in this work could be used as tools for controlling triatomines. In particular, even though the hyperactivation effect was significantly lower than that produced by deltamethrin, the onset of the hyperactivity effect by most of the monoterpenes is encouraging for a possible use as flushing-out agents. We plan to perform experiments for determining the hyperactivant effect of monoterpene alcohols in other triatomine stages (late nymphs and adults). Finally, we will evaluate the flushing-out effect of these compounds applied as aerosol formulations in laboratory and field assays.

Acknowledgments

We thank Delmi Canale and Raúl Stariolo (Servicio Nacional de Chagas de Argentina, Santa María de Punilla, provincia de Córdoba) for providing us *T. infestans* eggs. We also thank the valuable comments from an anonymous reviewer. R.A.A. and E.N.Z. are members of the Carrera del Investigador Científico y Tecnológico of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas from Argentina (CONICET). A.N.M. is a fellowship holder of the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica from Ar-

gentina (ANPCyT). The financial support for this research was provided by ANPCyT (PICT 2008-1331).

References Cited

- Abramson, C. I., E. Aldana, and E. Sulbaran. 2007. Exposure to citral, cinnamon and ruda disrupts the life cycle of a vector of chagas disease. *Am. J. Environ. Sci.* 3: 7-8.
- Ansari, M. A., P. Vasudevan, M. Tandon, and R. K. Razdan. 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresour. Technol.* 71: 267-271.
- Alzogaray, R. A., and E. N. Zerba. 2001. Third instar nymphs of *Rhodnius prolixus* exposed to α -cyanopyrethroids: from hyperactivity to death. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46: 119-126.
- Alzogaray, R. A., A. Fontán, and E. N. Zerba. 1997. Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35: 323-333.
- Alzogaray, R. A., A. Lucía, E. N. Zerba, and H. Masuh. 2011. Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. *J. Econ. Entomol.* 104: 595-600.
- Alzogaray, R. A., V. Sfara, A. N. Moretti, and E. N. Zerba. 2013. Behavioural and toxicological responses of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to monoterpenes. *Eur. J. Entomol.* 110: 247-252.
- Appel, A. G., M. J. Gehret, and M. J. Tanley. 2001. Repellency and toxicity of mint oil to American and German Cockroaches (Dictyoptera: Blattidae and Blattellidae). *J. Agric. Urban Entomol.* 18: 149-156.
- Chen, W., and A. M. Viljoen. 2010. Geraniol: a review of a commercially important fragrance material. *S. Afr. J. Bot.* 76: 643-651.
- Choi, W. S., B. S. Park, S. K. Ku, and S. E. Lee. 2001. Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 18: 348-351.
- Dethier, V. G., L. B. Browne, and C. N. Smith. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* 53: 134-136.
- Enam, E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 325-337.
- Fournet, A., A. Rojas de Arias, B. Charles, and J. Bruneton. 1996. Chemicals constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *J. Ethnopharmacol.* 52: 145-149.
- García, M., O. J. Donadel, C. E. Ardanaz, C. E. Tonn, and M. E. Sosa. 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Manag. Sci.* 61: 612-618.
- Gimenez, L., and J. E. Mitelman. 2010. Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Iberoamérica. (http://www.intramed.net/sitios/libro_chagas/situacion.pdf).
- Gualtieri, J. M., M. Nelson, and J. A. Cichero. 1985. Presente y perspectiva del control químico, pp. 319-329. In R. U. Carcavallo, J. E. Rabinovich, and R. J. Tonn (eds.), *Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas*. 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.

- Hummelbrunner, L. A., and M. B. Isman. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoids essential oil compounds on the Tobacco Cutworm *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49: 715–720.
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603–608.
- Isman, M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasing regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45–66.
- Isman, M. B. 2010. Botanical insecticides, deterrents, repellents and oils, pp. 433–445. *In* B. P. Singh (ed.), *Industrial Crops and Uses*. Fort Valley State University, Fort Valley, GA.
- Jang, Y. S., Y. C. Yang, D. S. Choi, and Y. J. Ahn. 2005. Vapor phase toxicity of marjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *J. Agric. Food Chem.* 53: 7892–7898.
- Katz, T., J. Miller, and A. Hebert. 2008. Insect repellents: historical perspectives and new developments. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58: 865–871.
- Kumar, P., S. Mishra, A. Malik, and S. Satya. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Ind. Crops Prod.* 34: 802–817.
- Lucía, A., S. Licastro, E. Zerba, P. González Audino, and H. Masuh. 2009. Sensitivity of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. *Bioresour. Technol.* 100: 6083–6087.
- Laurent, D., L. A. Vilaseca, J. M. Chantraine, C. Ballivian, G. Saavedra, and R. Ibáñez. 1997. Insecticidal activity of essential oils on *Triatoma infestans*. *Phytother. Res.* 2: 285–290.
- Miller, T. A., and M. E. Adams. 1982. Mode of action of pyrethroids, pp. 3–27. *In* J. R. Coats (ed.), *Insecticide Mode of Action*. Academic Press, New York, NY.
- Moore, S. J., N. Hill, C. Ruiz, and M. M. Cameron. 2007. Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector *Anopheles darlingi* in Riberalta, Bolivian Amazon. *J. Med. Entomol.* 44: 624–630.
- Müller, G. C., A. Junnila, V. D. Kravchenko, E. E. Revay, J. Butler, and Y. Schlein. 2008. Indoor protection against mosquito and sand fly bites: a comparison between citronella, linalool, and geraniol candles. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 24: 150–153.
- Müller, G. C., A. Junnila, J. Butler, V. D. Kravchenko, E. E. Revay, R. W. Weiss, and Y. Schlein. 2009. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *J. Vect. Ecol.* 34: 2–8.
- Nerio, L. S., J. Olivero-Verbel, and E. Stashenko. 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour. Technol.* 101: 372–378.
- Odalo, J. O., M. O. Omolo, H. Malebo, J. Angira, P. M. Njeru, I. O. Niedege, and A. Hassanali. 2005. Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against *Anopheles gambiae*. *Acta Trop.* 95: 210–218.
- Omolo, M. O., D. Okinyo, I. O. Niedege, W. Lwande, and A. Hassanali. 2004. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* 65: 2797–2802.
- (OPS) Organización Panamericana de la Salud. 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD/425-06. Organización Mundial de la Salud, Montevideo.
- Park, I. K., S. G. Lee, D. H. Choi, J. D. Park, and Y. J. Ahn. 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 39: 375–384.
- Petrakis, P. V., V. Roussis, D. Papadimitriou, C. Vagias, and C. Tsitsimpikou. 2005. The effect of terpenoids extracts from 15 pine species on the feeding behavioral sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. *Behav. Processes* 69: 303–322.
- Piccolo, M. I., C. Vassena, P. Santo Orihuela, S. Barrios, M. Zaidenberg, and E. N. Zerba. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637–642.
- Pinchin, R., A. M. de Oliveira Filho, and A.C.B. Pereira. 1980. The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Panstrongilus megistus*, a vector of Chaga's disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 691–694.
- Qualls, W. A., and R. D. Xue. 2009. Field evaluation of three botanical repellents against *Psorophora ferox*, *Aedes atlanticus*, and *Aedes mitchellae*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25: 379–381.
- Rajendran, S., and V. Sriranjini. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.* 43: 126–135.
- Rice, P. J., and J. R. Coats. 1994a. Insecticidal properties of several monoterpenoids to house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172–1179.
- Rice, P. J., and J. R. Coats. 1994b. Insecticidal properties of monoterpenoids derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pestic. Sci.* 41: 195–202.
- Sahaf, B. Z., S. Moharrampour, and M. H. Meshkatsadat. 2008. Fumigant toxicity of essential oils from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Asia Pac. Entomol.* 11: 175–179.
- Santos, S.R.L., M. A. Melo, A. V. Cardoso, R.L.C. Santos, D. P. de Sousa, and S.C.H. Cavalcanti. 2011. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes argypti* Linn. *Mesosphere* 84: 150–153.
- Sfara, V., E. N. Zerba, and R. A. Alzogaray. 2009. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *J. Med. Entomol.* 46: 511–515.
- Sritabutra, D., M. Soonwera, S. Waltanachanobon, and S. Pongjai. 2011. Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrion. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1: 5124–5128.
- Tarelli, G., E. N. Zerba, and R. A. Alzogaray. 2009. Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 102: 1383–1388.
- Throne, J. E., D. K. Weaver, V. Chew, and J. E. Baker. 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* 88: 1510–1512.
- Tolozza, A. C., J. Zygadlo, G. Mougabure Cueto, F. Biurrun, E. Zerba, and M. I. Picollo. 2006. Interspecific hybridization of eucalyptus as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina. *Bioresour. Technol.* 99: 7341–7347.
- Tolozza, A. C., C. Vasenna, and M. I. Picollo. 2008. Ovicidal and adulticidal effects of monoterpenoids against permethrin-resistant human lice, *Pediculus humanus capitis*. *Med. Vet. Entomol.* 22:335–339.

- Tunón, H., W. Thorshell, A. Mikiver, and I. Malander. 2006. Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*. *Fitoterapia* 77: 257–261.
- Vassena, C., M. I. Picollo, and E. N. Zerba. 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 51–55.
- Weldon, P. J., J. F. Carroll, and M. Kramer. 2010. Anointing chemicals and hematophagous arthropods: responses by ticks and mosquitoes to *Citrus* (Rutaceae) peel exudates and monoterpene components. *J. Chem. Ecol.* 37: 348–359.
- Wong, K.K.Y., F. A. Signal, S. H. Campion, and R. L. Motion. 2005. Citronella as an insect repellent in food packaging. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4633–4636.
- Wood, E., S. A. de Licastro, N. Casabé, J. L. Sívori, and E. N. Zerba. 1993. Evaluation of the flushing out activity of pyrethroids on *Triatoma infestans*. *Insect Sci. Appl.* 14: 651–655.
- Yang, N. W., A. L. Li, F. H. Wan, W. X. Liu, and D. Johnson. 2010. Effects of plant essential oils on immature and adult Sweetpotato Whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop Prot.* 29: 1200–1207.
- Zahran, H.E.D. M., and S.A.M. Abdelgaleil. 2011. Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *J. Asia Pac. Entomol.* 14: 46–51.

Received 2 November 2012; accepted 30 May 2013.

Lethal and sublethal effects of eucalyptol on *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*, vectors of Chagas disease

Ariadna N. Moretti¹, Eduardo N. Zerba^{1,2} & Raúl A. Alzogaray^{1,2*}

¹Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN/UNIDEF-CONICET), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina, and ²Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental (UNSAM), San Martín, Buenos Aires, Argentina

Accepted: 22 October 2014

Key words: 1,8-cineole, monoterpene, essential oils, DEET, triatomines, behavioral modification, locomotor activity, repellence, knock-down, Hemiptera, Reduviidae

Abstract

Eucalyptol is the common name for a cyclic ether monoterpene found in essential oils from *Eucalyptus* species and other plants. Several reports showed its insecticidal activity. In this work, visible symptoms of intoxication, effect on locomotor activity, knock-down, and repellence produced by eucalyptol were evaluated on nymphs of *Triatoma infestans* Klug and *Rhodnius prolixus* Stål (both Hemiptera: Reduviidae). Both insects are among the main vectors of Chagas disease in Latin America. Visible symptoms of intoxication were similar to those observed for neurotoxic insecticides. A video tracking technique was used to evaluate locomotor activity and repellence by exposing the nymphs to impregnated papers. Hyperactivity (a non-directional increase in locomotor activity) is a symptom of intoxication that is used to detect triatomines in rural houses, because it causes the insects to leave their refuges. Eucalyptol produced hyperactivity only in *T. infestans* at a concentration 1 000× higher than the positive control, deltamethrin [(S)-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (1*R*,3*R*)-3-(2,2-dibromoethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate]. It also produced repellence on both species at a concentration 10× higher than the positive control, DEET (*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide). Knock-down effect was evaluated by exposing the nymphs to impregnated papers in closed containers (contact and fumigation simultaneously). Values of knock-down time for 50% of exposed nymphs (KT₅₀) were calculated for various concentrations of eucalyptol. The onset of knock-down occurred more rapidly as the concentration increased. In the best cases, eucalyptol was 12–15× less toxic than the positive control dichlorvos (2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate). After these results, eucalyptol seems discouraged as a hyperactivant agent for monitoring insects in rural houses. Nevertheless, its knock-down and repellence effect on vectors of Chagas disease deserve further investigation.

Introduction

During the second half of the 20th century, the indiscriminate overuse of synthetic insecticides (organochlorines, organophosphorus, and carbamates) produced environmental contamination, wildlife destruction, as well as undesirable effects on human health (Alavanja et al., 2004; Rattner, 2009). Recognition of these problems came by the hand of the ban or restriction of many compounds. At the

same time, insect pest populations started to become resistant to insecticides (Parakrama Karunaratne, 1998). Because of this, it is essential to have alternative products to replace those who are no longer efficient.

Nowadays there is a constant search for new insecticides. In this context, plants have proven to be an important source of molecules showing insecticidal activity in laboratory bioassays (Isman, 2006; Dayan et al., 2009). In the last years, many works have reported the insecticidal properties of essential oils and their monoterpene components (Shaaya & Rafaeli, 2007).

Eucalyptol is the common name of 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane, a cyclic ether monoterpene

*Correspondence: Raúl A. Alzogaray, CIPEIN/UNIDEF-CONICET, Juan Bautista de la Salle 4397, Villa Martelli, Buenos Aires B1603ALO, Argentina. E-mail: ralzogaray@hotmail.com

also known as 1,8-cineole. At environmental temperature, it is a colorless liquid with camphor smell (Hawley, 1993). Eucalyptol is commonly found as the main component of *Eucalyptus* spp. essential oils (Coppen, 1995). It is also produced by plants of the genera *Achillea*, *Alpinia*, *Blumea*, *Cinnamomum*, *Eugenia*, *Laurus*, *Lavandula*, *Melaleuca*, *Mentha*, *Rosmarinus*, and *Salvia* (Lee et al., 2004). Eucalyptus essential oil was categorized as 'Generally Regarded as Safe', classified as 'non-toxic' and approved for use on human skin by the United States Food and Drug Authority (USEPA, 1993; Rehman et al., 2014). However, some cases of human poisoning upon ingestion of this oil have been reported (Spoerke et al., 1989; Webb & Pitt, 1993; Barnes, 1996; Darben et al., 1998).

The bioactivity of eucalyptol has been documented extensively. It has shown broad antibacterial and antifungal activity (Vilela et al., 2009; Mulyaningsih et al., 2010; Stojkovic et al., 2011; Shukla et al., 2012), antioxidant effect (Tepe et al., 2007; Wang et al., 2008), and anti-inflammatory and vasorelaxant action in rats (Santos et al., 2004; Pinto et al., 2009). Eucalyptol also has a broad insecticidal activity reported against stored grain beetles (Papachristos & Stamopoulos, 2002; Lee et al., 2004), human lice (Yang et al., 2004; Toloza et al., 2010), German cockroaches (Alzogaray et al., 2011), house flies and blow flies (Sukontason et al., 2004; Tarelli et al., 2009; Kumar et al., 2012), sandflies (Maciel et al., 2010) and mosquitoes (Batish et al., 2008; Lucía et al., 2009), among others species.

In addition to mortality, pesticides produce sublethal effects on insects. These are defined as 'effects (either physiological or behavioral) on individuals that survive exposure to a pesticide (the pesticide dose/concentration can be sublethal or lethal)' (Desneux et al., 2007). Repellence, metamorphosis interference, and reduced fecundity and egg hatchability are sublethal effects that have been reported for eucalyptol in insects (Stamopoulos et al., 2007; Alzogaray et al., 2011; Liška et al., 2011).

The blood-sucking bugs *Triatoma infestans* Klug and *Rhodnius prolixus* Ståhl (both Hemiptera: Reduviidae) are among the most important vectors of *Trypanosoma cruzi* (Chagas), the protozoon that causes Chagas disease (Stevens et al., 2011). This is the most severe parasitic disease of the American continent (Organización Panamericana de la Salud, 2006). In Argentina, there are 2 300 000 infected people (7.2% of total population) and 7 300 000 people are exposed in endemic areas, turning it into the main endemic in this country (Gimenez & Mitelman, 2010). During 2009 and 2010, several indexes related with entomological surveillance and vector control have improved, but the goals considered acceptable have not yet been reached (Ministerio de Salud de la Nación, 2013).

Essential oils containing eucalyptol have shown antiparasitic action against *T. cruzi* (Raposo Borges et al., 2012), but evaluations on Chagas vectors are scarce. On *T. infestans*, the effects of eucalyptol had not been evaluated before this study. On *R. prolixus*, eucalyptol has only been reported to show good performance as a fumigant on first instars (Sfara et al., 2009). The aim of this study was to evaluate the visible intoxication symptoms, the effect on locomotor activity, the knock-down, and the repellence produced by eucalyptol on first instars of *T. infestans* and *R. prolixus*.

Materials and methods

Biological material

First instars of *T. infestans* and *R. prolixus*, 1–5 days old and starved since eclosion, were used in all experiments. The *T. infestans* nymphs emerged from eggs provided by the Centro de Referencia de Vectores (Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina), whereas the *R. prolixus* nymphs came from a stable colony reared at the Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina).

Resistance to the pyrethroid deltamethrin was reported for *T. infestans* from several places in Argentina (Vassena et al., 2000; Picollo et al., 2005). For this reason, prior to performing the bioassays, the toxicity of deltamethrin was evaluated on the insects applying a diagnostic dose (which kills 100% of individuals from a susceptible colony) (French-Constant & Roush, 1990). Every time we received a sample of *T. infestans*, we applied the diagnostic dose on a group of 1- to 3-day-old first instars. In all cases, mortality was 100%, suggesting lack of resistance.

Chemicals

All the chemicals used in this work were technical grade. Eucalyptol (99%) and *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET, 97%) were bought from Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina); DEET was used as positive control in repellence bioassays. Deltamethrin (98%) and dichlorvos (96.5%) were used as positive controls in bioassays of locomotor activity and knock-down, respectively. Both of them were a gift from Chemotecnica (Spegazzini, Argentina). Analytical grade acetone (Merck, Darmstadt, Germany) was used as solvent.

Recording equipment

A video camera black and white closed-circuit (VC, 1910; Sanyo Electrical, Tokyo, Japan) and an image analyzer (Videomex V, Columbus, OH, USA) were used to evaluate repellence and locomotor activity. The video camera captures the image of the insects placed on a circular piece of

treated filter paper. The image analyzer converts the analogue signal input from the video camera into digital data with a resolution of 256×192 pixels and an acquisition and processing speed of 30 frames s^{-1} . On the screen, the video signal colors are inverted: white objects appear black and vice versa. Therefore, the presence of insects on the filter paper is determined by visual contrast between the subjects (white) and the paper background (black), and is scored as the number of enlightened pixels. To quantify nymph movement, Videomex-V uses the Multiple Zone Motion Monitor software that compares consecutive frames captured by the camera and records the number of pixels that changed from 'on' to 'off' and vice versa. The sum of pixels that changes during experimental time is called 'motion' (M). The software also calculates the average number of pixels 'on' during experimental time. This parameter is called 'area' (A), and represents the average area occupied by the insects on the video image.

The illumination during testing was provided by a cold-light lamp (22 W; Luxa, Shanghai, China) placed at the zenith of the arena. Temperature was maintained at $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Each set of data was imported and processed in a personal computer.

Description of visible intoxication symptoms

A disc of filter paper (4 cm diameter) was impregnated with 0.09 ml of a solution of eucalyptol in acetone. After acetone evaporated, the filter paper was placed at the bottom of a plastic container (4 cm diameter, 4 cm high). Ten first instars were placed on the filter paper and the container was closed with a plastic lid. As a control, 10 nymphs were placed on a filter paper treated with acetone alone. The normal triatomine locomotor behavior was confirmed experimentally with the control groups. Their visible changes (modifications or complete loss of normal movement of legs during walking) and the appearance of other visible unexpected behavior (grooming and/or feeding movements in the absence of triggering stimuli) were considered intoxication symptoms and recorded. Symptoms were divided into two phases according to their severity: first phase (minor to moderate) and second phase (severe). The observations were done throughout the knock-down bioassays (7 h maximum). Five concentrations of eucalyptol were studied: 39, 390, 780, 1 950, and $3\ 900 \mu\text{g cm}^{-2}$. Six independent replicates were performed.

Quantification of locomotor activity

Discs of filter papers (70 mm diameter, 101 FAST; Hangzhou Xinxing Paper Industry, Fuyang, China) were impregnated by pipette (ensuring total and even distribution of the solution) with 0.3 ml of solution of eucalyptol

or deltamethrin (positive control) in acetone. Through preliminary bioassays, the lowest effective concentration observed (i.e., the lowest concentration which increases nymph locomotor activity) was determined for both eucalyptol and deltamethrin. After this, bioassays were performed using serial dilutions ($10\times$) including the lowest effective concentration observed. This approach allowed us to identify threshold concentrations and whether the effect on nymph locomotor activity varies with concentration.

The following concentrations were used: 39, 390, and $3\ 900 \mu\text{g cm}^{-2}$ for eucalyptol, and 0.0039, 0.039, 0.39, and $3.9 \mu\text{g cm}^{-2}$ for deltamethrin. Each bioassay had a negative control (acetone alone). After the solvent evaporated, the filter paper disc was placed on a horizontal surface and a glass ring (2.5 cm high, 5.5 cm diameter) was placed on top. Finally, four-first instars were gently placed in the center of the arena enclosed by the ring. In preliminary bioassays, after adjusting the control of the digitized video image to remove noise and get optimal tracking of the subject image, a poor repeatability was observed when using only one nymph. This is because first instars of triatomines are very small (3 mm long, 1.2 mm wide). For this reason, small changes in nymph position caused important variation in the area occupied by the insects (pixels 'on' in the video image). However, when four nymphs were placed on the experimental arena repeatability was good. No obvious aggregation occurred in the spatial distribution of the four nymphs on the arena.

To determine the nymph's locomotor activity we calculated the quotient M/A (Alzogaray et al., 1997). The results were expressed in units of pixels per area.

Evaluation of knock-down

During the bioassays for recording the symptoms of intoxication (see above), the number of knocked-down insects was recorded every 10 min. Insects were considered knocked down when they were unable to stand. Each trial was interrupted when 90% of the insects were knocked down or after 7 h of exposure. Dichlorvos, an organophosphate fumigant insecticide, was used as positive control (same concentrations as eucalyptol). Six replicates (10 nymphs each) were made for each trial. The results were used to calculate values of knock-down time for 50% of exposed nymphs (KT_{50}).

To assess knock-down recovery, nymphs of both species were exposed to the highest concentration of eucalyptol that showed important toxicity in the above described bioassays ($3\ 900 \mu\text{g cm}^{-2}$), for two durations: KT_{50} and KT_{90} . Nymphs were then moved to clean containers with untreated filter papers and checked for knock-down 24 and 48 h later. Two replicates (10 nymphs each) were

made for each trial. If a knock-down recovery phenomenon exists, the number of knocked-down nymphs at 48 h would be lower than at 24 h (because some of the knocked-down nymphs at 24 h will be asymptomatic at 48 h).

Evaluation of repellence

The experimental design was similar to that used to measure locomotor activity but with the following modifications: (1) each filter paper was divided into two equal parts, one half being treated with 0.15 ml of a solution of the monoterpene in acetone, the other half with 0.15 ml of the solvent alone; and (2) the image analyzer was programmed to record the motion parameters on each zone separately. All trials lasted 15 min, consisting of 30 recording sessions of 30 s each. The design was completely randomized, with six independent replicates for each trial and three concentrations of eucalyptol (39, 390, and 3 900 $\mu\text{g cm}^{-2}$). Each bioassay had a negative control (acetone alone). DEET, used as positive control, was applied at 3.9, 39, and 390 $\mu\text{g cm}^{-2}$. We expressed repellence by a distribution coefficient (Sfara et al., 2011): $DC = (AT - At) / AT$, where AT is the total area occupied by nymphs on the arena, and At is the area occupied by nymphs on the treated zone, both during the experimental time. This coefficient varies between 0 and 1; 0 corresponds to the case where the substance produces maximum attraction, and 1 to the case where it produces maximum repellence. The 0.5 value corresponds to an equal distribution of the insects between treated and untreated zones (random distribution).

Statistical analysis

All analyses were done using the InfoStat 2014/e statistical package (Di Rienzo et al., 2014). Data from locomotor

activity and repellence bioassays were analyzed (independently per each species dataset) using one-way ANOVA. If ANOVA indicated significant treatment effects, Fisher's least significant difference (LSD) test for post-hoc comparisons was used to explore differences between treatment pairs. If ANOVA assumptions were not met, data were analyzed using Kruskal–Wallis ANOVA on-ranks followed by Dunn's post-hoc comparisons. Percentage of abdomen distension was analyzed by t-test. KT_{50} values were calculated with their respective 95% confidence interval (CI) using the statistical software for correlated data developed by Throne et al. (1995). Differences between KT_{50} values were considered significant if the 95% CIs did not overlap.

Results

Visible intoxication symptoms

Nymphs exposed to eucalyptol showed leg paralysis, abnormal movements of proboscis and antennae, inability to return to their normal position after accidentally getting into dorsal decubitus position, and other symptoms resembling toxic effects on the nervous system (Table 1). Neither species-specific nor concentration-specific symptoms were identified. Not all symptoms were necessarily observed in the same individual and the order of appearance was sometimes different.

Exposure to two concentrations of eucalyptol also produced abdominal distension in nymphs of both species (Table 2). Control groups did not show it in any case. Both concentrations of eucalyptol produced the effect on *T. infestans* and *R. prolixus* nymphs (t-test, *T. infestans*: $t = 4.365$, d.f. = 5, $P = 0.007$; *R. prolixus*: $t = 9.851$, d.f. = 5, $P < 0.001$), but only the effect of the higher one was significantly different from the control.

Table 1 Visible symptoms of intoxication with eucalyptol observed in first instars of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*

First phase (minor to moderate)	Second phase (severe)
<ul style="list-style-type: none"> • Abnormal rest position: ventral contact of full body with support surface (at normal rest position, the body remains suspended over the support surface) • Reverse or lateral walk • Flexion of antennal flagella 90° outwards • Proboscis extension (in absence of phagostimulants) • Paralysis of hind legs • Antennas aligned forward 	<ul style="list-style-type: none"> • Reverse walk with elevated abdomen or normal walk with leaning abdomen • Slow vertical oscillation of body over antero-posterior axis • 'Praying mantis' position: forelegs flexed beneath elevated thorax • Unable to return to normal position after accidentally getting in dorsal decubitus position • Total immobility

Effect on locomotor activity

Eucalyptol induced an increase in locomotor activity in both species (Figure 1), but this was significantly different from its control only for *T. infestans* exposed to 3 900 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Dunn's test: $H = 19.88$, d.f. = 5, $P = 0.001$). Deltamethrin (positive control) hyperactivated both *T. infestans* (at 0.39 $\mu\text{g cm}^{-2}$) and *R. prolixus* (at 0.039 $\mu\text{g cm}^{-2}$) (Fisher's test: *T. infestans*: $F_{4,29} = 3.04$, $P = 0.036$; *R. prolixus*: $F_{4,29} = 3.47$, $P = 0.022$).

Knock-down

The values of KT_{50} for eucalyptol and dichlorvos (positive control) applied as films on filter papers are shown in Figure 2. KT_{50} value for the lowest concentration of eucalyptol on *R. prolixus* was not calculated because <50% of knocked-down nymphs were observed after 7 h of exposure. Dichlorvos was at least 12–15 \times more toxic than the monoterpene for both species. No recovery was observed in knocked-down nymphs exposed to 3 900 $\mu\text{g cm}^{-2}$ of

Table 2 Mean (\pm SE) percentage abdomen distension observed in first instars of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* exposed to eucalyptol

Dose ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	<i>T. infestans</i>	<i>R. prolixus</i>
0 (control)	0	0
390	10 \pm 5.2	18.3 \pm 7.5
3900	15 \pm 4.3*	23.3 \pm 4.2*

*Significantly different from control (t-test: $P < 0.05$).

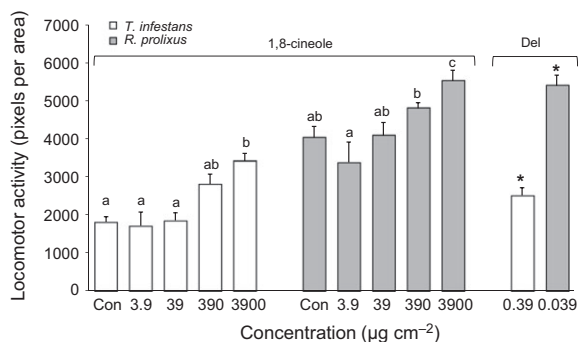


Figure 1 Mean (\pm SE) locomotor activity of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs exposed to filter paper treated with different concentrations of eucalyptol. Each bar represents the mean of six independent replicates. Con: control, Del: deltamethrin (only the lowest effective concentration is shown). Means within a group marked with the same letter are not significantly different (Dunn's test: $P < 0.05$ for *T. infestans* and Fisher's LSD: $P < 0.05$ for *R. prolixus*). The asterisks for deltamethrin indicate significant difference from corresponding controls (Fisher's LSD: $P < 0.05$).

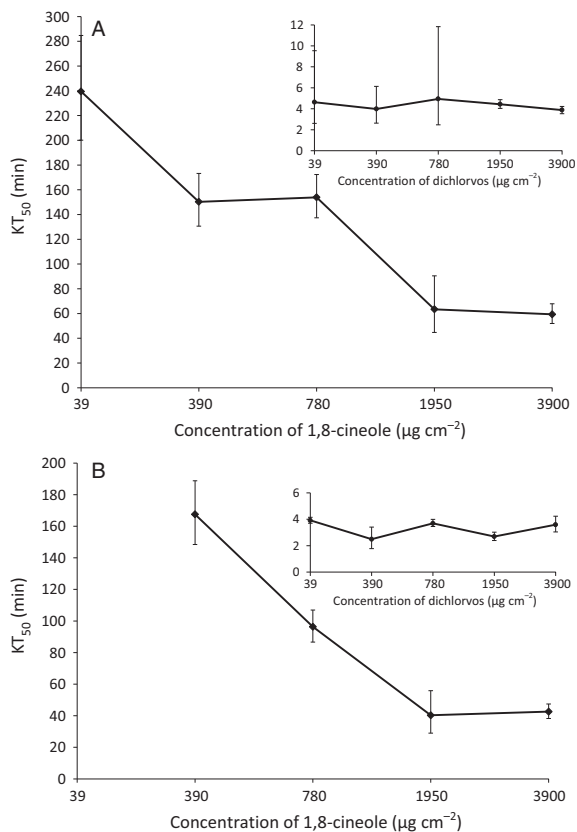


Figure 2 Mean KT_{50} values (\pm 95% confidence interval) for eucalyptol on first instar (A) *Triatoma infestans* and (B) *Rhodnius prolixus*. Each symbol represents the mean of six independent replicates. Insets show KT_{50} values for dichlorvos (positive control). All KT_{50} values for eucalyptol are significantly different from positive control (95% CIs do not overlap).

eucalyptol (the number of knocked-down nymphs at 48 h was never lower than at 24 h).

Repellence

The distribution coefficients for both *T. infestans* and *R. prolixus* nymphs exposed to eucalyptol indicated significant repellence at 3 900 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Figure 3). DEET (positive control) at 390 $\mu\text{g cm}^{-2}$ produced a repellent effect significantly higher than the negative control, for both species (Fisher's test: *T. infestans*: $F_{3,23} = 18.3$; *R. prolixus*: $F_{3,23} = 17.35$, both $P < 0.001$).

Discussion

In this study, we describe the visible intoxication symptoms and evaluate the changes in locomotor activity, knock-down, and repellence produced by the monoterpene eucalyptol on first instars of *T. infestans* and

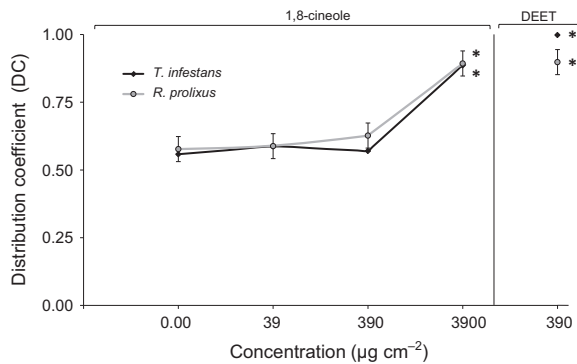


Figure 3 Distribution coefficient values for eucalyptol on nymphs of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. Each symbol represents the mean of six independent replicates. 0.00: control, DEET: *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (only the lowest effective concentration is shown). Symbols marked with asterisks are significantly different from their corresponding controls (Fisher's LSD: $P < 0.05$).

R. prolixus, vectors of Chagas disease. The mode of action of monoterpenes is still relatively unknown and may not be represented by a single mechanism (Grodnitzky & Coats, 2002). Our findings suggest that eucalyptol could affect the insect's nervous system, as intoxicated nymphs of *T. infestans* and *R. prolixus* displayed hyperactivity, incoordination, paralysis, and other symptoms resembling the response elicited by neurotoxic insecticides as organophosphates (Wood et al., 1982) and pyrethroids (Alzogaray et al., 1997). It is also noticeable that eucalyptol caused abdominal distension in both species studied here. *Triatoma infestans* and *R. prolixus* are hematophagous insects able to ingest several times their own weight in blood. This is possible because their cuticle can stretch rapidly to accommodate large meals. When *R. prolixus* takes a blood meal, the abdomen surface is quadrupled and the cuticle becomes thinner (Orchard et al., 1988). This phenomenon, called plasticization, is initiated by blood-sucking activity and is under control of the central nervous system. Abdomen distension in absence of any stimulants was also reported in instars of *T. infestans* intoxicated with the pyrethroid *cis*-permethrin (Alzogaray, 1996). However, no abdominal distension was observed in similar experiments with alcohol monoterpenes (Moretti et al., 2013). How and why these starved insects intoxicated with eucalyptol or *cis*-permethrin undergo cuticle plasticization remains to be investigated.

Locomotor hyperactivation (a non-directional increase in locomotor activity) is the first intoxication symptom observed in insects exposed to pyrethroids (Gammon, 1978; Miller & Adams, 1982). This symptom is exploited to detect vectors of Chagas disease in rural houses, because

hyperactivated insects end up leaving their refuges (flushing-out phenomenon), making it easier to estimate their presence and abundance (Pinchin et al., 1980). Tetramethrin is a flushing-out agent used for Chagas disease vectors. This pyrethroid exerts a very slow lethal effect though a good flushing-out activity for large nymphs and adults of triatominae (Wood et al., 1993; Gürtler et al., 1999). In Argentina, specialized staff from the Servicio Nacional de Chagas sprays aerosolized tetramethrin on the walls and roofs of rural houses (Gürtler et al., 1995). Triatomines that leave their refuges are collected (1 man-hour per house). With one triatomine detected, a house is considered positive (infested).

At present, alternative flushing-out agents need to be identified because resistance to pyrethroids, and therefore to hyperactivation (Sfara et al., 2006), has been detected in *T. infestans* populations from Argentina and Bolivia (Vasena et al., 2000; Picollo et al., 2005). Taking this into account, we had firstly planned the use of tetramethrin as a positive control. Unexpectedly, preliminary bioassays indicated that this pyrethroid does not hyperactivate first instars of neither *T. infestans* nor *R. prolixus* when applied as films on filter papers. So, we used deltamethrin as positive control instead. Eucalyptol showed a low hyperactivation effect on first instars of *T. infestans* and only applied at a concentration 1 000× higher than deltamethrin. Moreover, it failed to hyperactivate nymphs of *R. prolixus*. When interpreting these results, one must keep in mind that deltamethrin is among the most powerful insecticides used for controlling pest insects. Furthermore, eucalyptol demonstrated very poor toxicity as contact triatomicide (in another experiment, it was about 5 000 000× less toxic than deltamethrin when topically applied on *T. infestans* and *R. prolixus* (AN Moretti, EA Zerba & RA Alzogaray, unpubl.).

Phosphine, ethyl bromide, and the organophosphate dichlorvos are fumigant insecticides restricted or banned in several countries due to its high toxicity in humans. During the search for alternative compounds, monoterpene vapors proved less toxic than the above mentioned fumigants (Rice & Coats, 1994a,b; Rajendran & Sriranjini, 2008; Lucía et al., 2009). In terms of lethal effects, eucalyptol appeared more potent than other monoterpenes against stored grain pests (Lee et al., 2004) and triatomines (Sfara et al., 2009), and a synergistic or additive action between eucalyptol and CO₂ was reported in a sealed fumigation system (Lee et al., 2004). In the German cockroach, the variation in the KT₅₀ values for essential oils from various species of *Eucalyptus* was partially explained by the concentration of eucalyptol (Alzogaray et al., 2011). When tested alone, eucalyptol was about 3× less toxic than dichlorvos to first instars of this cockroach. In

the present work, the KT_{50} values for different concentrations of eucalyptol were 10–60× higher than those for dichlorvos (positive control). KT_{50} values herein presented are far more promising in comparison with the ones obtained for other monoterpenes (Moretti et al., 2013).

Repellents are chemicals that cause insects to move directly away from its source (Dethier et al., 1960). More than 60 years after its discovery, *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) remains the most widely used insect repellent (Frances, 2007). However, it occasionally affects human skin (inflammation, itchiness, and irritation) and nervous system (convulsions, especially in children) (Osimitz et al., 2010), which could be due to the ability of inhibiting acetylcholinesterase activity in insects and mammals (Corbel et al., 2009). Given these undesirable effects, there is a constant search for new repellents and plants have proven to be a good place to look for. Several monoterpenes produced repellence on both haematophagous and non-haematophagous insects (Nerio et al., 2010; Moretti et al., 2013). Eucalyptol has already shown promising results against various mosquito species (Batish et al., 2008). We found that eucalyptol was 10× less effective than DEET on *T. infestans* and *R. prolixus*. This opens the gate to further investigation in synergistic mixtures.

The poor effect of eucalyptol on nymph locomotor activity, reported here, discourages us to consider this monoterpene as a potential diagnostic tool of triatomine infestation in rural houses. Its repellent effect deserves further investigation. It may be worth to look for synergistic interactions with monoterpenes of higher repellency. The knock-down effect showed the more promising results, pointing to eucalyptol as a potentially good triatomicide.

Acknowledgements

We thank Delmi Canale and Raúl Stariolo (Centro de Referencia de Vectores, Santa María de Punilla, Córdoba province) for providing *T. infestans* eggs. RAA and ENZ are members of the Carrera del Investigador Científico y Tecnológico of the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas from Argentina (CONICET). ANM is a fellowship holder of the CONICET for her doctoral studies as a University of Buenos Aires (UBA) PhD student. The financial support for this research was provided by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT, 2008-1331).

References

Alavanja MC, Hopping JA & Kamel F (2004) Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annual Review of Public Health* 25: 155–197.

- Alzogaray RA (1996) Caracterización de la Toxicidad de Insecticidas Piretroides en *Triatoma infestans* (Klug). PhD dissertation, University of Buenos Aires, Argentina.
- Alzogaray RA, Fontán A & Zerba EN (1997) Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35: 323–333.
- Alzogaray RA, Lucía A, Zerba EN & Masuh H (2011) Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. *Journal of Economic Entomology* 104: 595–600.
- Barnes W (1996) *Eucalyptus* oil poisoning in children. *Australian Journal of Emergency Care* 3: 15–20.
- Batish DR, Singh HP, Kohli RK & Kaur S (2008) *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256: 2166–2174.
- French-Constant RH & Roush RT (1990) Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. *Pesticide Resistance in Arthropods* (ed. by RT Roush & BE Tabashnik), pp. 4–38. Chapman & Hall, New York, NY, USA.
- Coppen JJW (1995) Flavours and Fragrances of Plant Origin. Non-wood Forest Products (1). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Corbel V, Stankiewicz M, Penetier C, Fournier D, Stojan J et al. (2009) Evidence of inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biology* 7: 47–57.
- Darben T, Cominos B & Lee CT (1998) Topical *Eucalyptus* oil poisoning. *Australasian Journal of Dermatology* 39: 265–267.
- Dayan FE, Cantrell CL & Duke SO (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17: 4022–4034.
- Desneux N, Decourtye A & Delpuech J-M (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52: 81–106.
- Dethier VG, Browne LB & Smith CN (1960) The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *Journal of Economic Entomology* 53: 134–136.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Tablada M & Robledo CW (2014) Infostat 2014/e. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Frances SP (2007) Efficacy and safety of repellents containing deet. *Insect Repellents* (ed. by M Debboun, SP Frances & D Strickman), pp. 311–322. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Gammon DW (1978) Neural effects of allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta americana*: and investigation using defined doses at 15 and 32 °C. *Pesticide Science* 9: 79–81.
- Gimenez L & Mitelman JE (2010) Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Iberoamérica. *IntraMed web*. Available at: http://www.intramed.net/sitios/libro_chagas/situacion.pdf (accessed on February 27, 2014).
- Groditzky JA & Coats JR (2002) QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50: 4576–4580.

- Gürtler RE, Chuit R, Cécere MC & Castañera MB (1995) Detecting domestic vectors of Chagas disease: a comparative trial of six methods in north-west Argentina. *Bulletin of the World Health Organization* 73: 487–494.
- Gürtler RE, Cecere MC, Canale DM, Castañera MB, Chuit R & Cohen JE (1999) Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Tropica* 72: 213–234.
- Hawley G (1993) *Diccionario de Química y de Productos Químicos*. Omega, Barcelona, Spain.
- Isman MB (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 45–66.
- Kumar P, Sapna M & Anushree M (2012) Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica* 122: 212–218.
- Lee BH, Annis PC, Tumaalii F & Lee S (2004) Fumigant toxicity of *Eucalyptus blakelyi* and *Melaleuca fulgens* essential oils and 1,8-cineole against different development stages of the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Phytoparasitica* 32: 498–506.
- Liška A, Rozman V, Kalinović I, Eđed A, Mustač S & Perhoč B (2011) Bioactivity of 1,8-cineole against red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst), pupae. *Poljoprivreda* 17: 58–63.
- Lucía A, Licastro S, Zerba EN, González Audino P & Masuh H (2009) Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. *Bioresource Technology* 100: 6083–6087.
- Maciel MV, Morais SM, Bevilacqua CML, Silva RA, Barros RS et al. (2010) Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology* 167: 1–7.
- Miller TA & Adams ME (1982) Mode of action of pyrethroids. *Insecticide Mode of Action* (ed. by JR Coats), pp. 3–27. Academic Press, New York, NY, USA.
- Ministerio de Salud de la Nación (2013) El Chagas en el país y América Latina. Ministerio de la Salud web. Available at: <http://www.msal.gov.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/el-chagas-en-el-pais-y-america-latina> (accessed on February 27, 2014).
- Moretti AN, Zerba EN & Alzogaray RA (2013) Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to ten monoterpene alcohols. *Journal of Medical Entomology* 50: 1046–1054.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Zimmermann S, Reichling J & Wink M (2010) Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytotherapy* 17: 1061–1066.
- Nerio LS, Oliverio-Verbel J & Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology* 101: 372–378.
- Orchard I, Lange AB & Barrett FM (1988) Serotonergic supply to the epidermis of *Rhodnius prolixus*: evidence for serotonin as the plasticizing factor. *Journal of Insect Physiology* 34: 873–879.
- Organización Panamericana de la Salud (2006) *Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas*. OPS/HDM/CD/425-06. Organización Mundial de la Salud, Montevideo, Uruguay.
- Osimitz TG, Murphy JV, Fell LA & Page B (2010) Adverse events associated with the use of insect repellents containing N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56: 93–99.
- Papachristos DP & Stamopoulos DC (2002) Toxicity of vapours of three essential oils to the immature eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 38: 117–128.
- Parakrama Karunaratne SHP (1998) Insecticide resistance in insects: a review. *Ceylan Journal of Science* 25: 72–99.
- Piccolo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaindemberg M & Zerba EN (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective fiel treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *Journal of Medical Entomology* 42: 637–642.
- Pinchin R, de Oliveira Filho AM & Pereira ACB (1980) The flushing-out activity of pyrethrum and synthetic pyrethroids on *Parstrongylus megistus*, a vector of Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 801–803.
- Pinto NV, Assreuy AMS, Coelho-de-Souza AN, Ceccatto VM, Magalhães PJC et al. (2009) Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from the aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole on rats. *Phytotherapy* 16: 1151–1155.
- Rajendran S & Srranjini V (2008) Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research* 43: 126–135.
- Raposo Borges A, Ramos de Albuquerque Aires J, Maciel Higino TM, Freire de Medeiros MG, Lopes Citó AMG et al. (2012) Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology* 132: 123–128.
- Rattner BA (2009) History of wildlife toxicology. *Ecotoxicology* 18: 773–783.
- Rehman JU, Ali A & Khan IA (2014) Plant based products: use and development as repellent against mosquitoes: a review. *Fitoterapia* 95: 65–74.
- Rice PJ & Coats JR (1994a) Insecticidal properties of several monoterpenoids to house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 87: 1172–1179.
- Rice PJ & Coats JR (1994b) Insecticidal properties of monoterpene derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pesticide Science* 41: 195–202.
- Santos FA, Silva RM, Campos AR, de Araújo RP, Lima Júnior RCP & Rao VSN (2004) 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food and Chemical Toxicology* 42: 579–584.

- Sfara V, Zerba EN & Alzogaray RA (2006) Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 89–94.
- Sfara V, Zerba EN & Alzogaray RA (2009) Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Medical Entomology* 46: 511–515.
- Sfara V, Mougabure Cueto G, Zerba EN & Alzogaray RA (2011) Adaptation to the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology* 57: 1431–1436.
- Shaaya E & Rafaeli A (2007) Essential oils as biorational insecticides – potency and mode of action. *Insecticides Design Using Advanced Technologies* (ed. by I Shaaya, R Nauen & AR Horowitz), pp. 249–261. Springer, New York, NY, USA.
- Shukla R, Singh P, Prakash B & Dubey NK (2012) Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control* 25: 27–33.
- Spoerke DG, Vandenberg SA, Smolinske SC, Kulig K & Rumack BH (1989) *Eucalyptus* oil: 14 cases of exposure. *Veterinary and Human Toxicology* 31: 166–168.
- Stamopoulos DC, Damos P & Karagianidou G (2007) Bioactivity of five monoterpenoid vapours to *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 43: 571–577.
- Stevens L, Dorn PL, Schmidt JO, Klotz JH, Lucero D & Klotz SA (2011) Kissing bugs. The vectors of Chagas. *Advances in Parasitology* 75: 169–192.
- Stojkovic D, Soković M, Glamočlija J, Džamić A, Ćirić A et al. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry* 128: 1017–1022.
- Sukontason KL, Boonchu N, Sukontason K & Choochote W (2004) Effects of eucalyptol on house fly (Diptera: Muscidae) and blow fly (Diptera: Calliphoridae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46: 97–101.
- Tarelli G, Zerba EN & Alzogaray RA (2009) Toxicity to vapor exposure and topical application of essential oils and monoterpenes on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* 102: 1383–1388.
- Tepe B, Daferera D, Tepe AS, Polissiou M & Sokmen A (2007) Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. *Food Chemistry* 103: 1358–1364.
- Throne JE, Weaver DK, Chew V & Baker JE (1995) Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology* 88: 1510–1512.
- Tolozza AC, Lucía A, Zerba E, Masuh H & Picollo MI (2010) Eucalyptus essential oil toxicity against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Parasitology Research* 106: 409–414.
- USEPA [United States Environmental Protection Agency] (1993) R.E.D Facts. Flower and vegetable oils. Available at: <http://www.epa.gov/oppsrd1/REDS/factsheets/4097fact.pdf> (accessed on July 3, 2014).
- Vassena C, Picollo MI & Zerba EN (2000) Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 51–55.
- Vilela G, de Almeida GS, Regitano D'Arce MAB, Duarte Moraes MH, Brito JO et al. (2009) Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45: 108–111.
- Wang W, Wu N, Zu YG & Fu YJ (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry* 108: 1019–1022.
- Webb NJ & Pitt WR (1993) Eucalyptus oil poisoning in childhood – 41 cases in south-east Queensland. *Journal of Paediatrics and Child Health* 29: 368–371.
- Wood EJ, Picollo de Villar MI, Melgar F & Zerba EN (1982) Mode of action of organophosphorus insecticides in *T. infestans*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 70: 801–814.
- Wood E, de Licastro S, Casabé N, Sívori J & Zerba E (1993) Evaluation of the flushing out activity of pyrethroids on *Triatoma infestans*. *International Journal of Tropical Insect Science* 14: 651–655.
- Yang Y, Choi H, Choi W, Clark JM & Ahn Y (2004) Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2507–2511.