

**Universidad Nacional de Córdoba.
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
Carrera de Ciencias Biológicas.**



Tesina de grado

Evaluación del efecto insecticida de terpenos
obtenidos de plantas comestibles y medicinales
sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).

Tesinista: Guillermo A. M. Flores

Firma: _____

Director: Dr. Andrés M. Visintin

Firma: _____

Codirector: Dra. María Teresa Defagó

Firma: _____

Evaluación del efecto insecticida de terpenos obtenidos de plantas comestibles y medicinales sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae).

Tribunal Examinador

Dra. Raquel Miranda Gleiser

Firma:

Dra. Anahí Del Valle Turina

Firma:

Dra. María Paula Zunino

Firma:

Calificación:

Fecha:

Resumen

Aedes aegypti, vector de los virus dengue, fiebre amarilla, zika y chikungunya, ha sido combatido en Argentina principalmente mediante insecticidas químicos; los que producen impacto ambiental por contaminación y generación de resistencia en esta plaga. Como alternativa se buscan insecticidas naturales que no presenten esas desventajas como los aceites esenciales y sus componentes principales, los terpenos. Para aumentar la eficacia de estos compuestos se utilizan sinergistas como el piperonil butóxido (PBO) que inhibe el complejo de monooxigenasas CP450 implicado en el metabolismo de xenobióticos en insectos. El presente trabajo evalúa el efecto adulticida de siete terpenos, así como el sinergismo de los más tóxicos con PBO a dosis subletal, sobre *Ae. aegypti*. Para ello se realizaron bioensayos de fumigación en frascos de vidrio con un hilo de algodón en su tapa, donde se colocó la solución de los terpenos a distintas dosis con y sin PBO. Los ensayos duraron 30 minutos donde diez mosquitos adultos machos y hembras se tomaron del criadero y se colocaron en cada frasco. Se utilizaron 5 dosis de cada terpeno y de cada combinación con PBO, realizando tres réplicas de cada una. Con esos valores se calcularon las concentraciones letales 50 (CL₅₀) de cada terpeno y el índice de combinación (IC) de las mezclas. Los siete terpenos resultaron activos, sin embargo solo se detectaron diferencias significativas para pulegona, citronelal, linalool y eucaliptol, en ese orden de toxicidad. Los primeros dos presentaron los menores valores de CL₅₀ (0,02 y 0,03 mg/l respectivamente). La dosis subletal de PBO utilizada fue 19,43 mg/l resultando sinergismo significativo solo para una dosis de eucaliptol (IC=0,9). Se recomienda explorar el uso de pulegona como terpeno base para insecticidas naturales contra *Ae. aegypti*.

Abstract

Aedes aegypti, vector of dengue, yellow fever, zika and chikungunya viruses, has been fought in Argentina, mainly by chemical insecticides which produce environmental damages like contamination and resistance generation in this plague. As an alternative, there is a quest on botanical insecticides that lacks of those disadvantages like essential oils or its mainly component: terpenes. To enhance their efficacy, synergistic compounds like piperonyl butoxide (PBO) are used to inhibit the CP450 monooxygenase complex implied in insect xenobiotic detoxification. This work analyzes adulticide effect from seven terpenes and the most toxic ones synergism with PBO on sublethal doses against *Ae. aegypti*. For that, fumigation bioassays were carried on glass jars with a pendant cotton thread inside the cover, where different doses of the terpene solution with and without PBO were impregnated. Ten male and female mosquitoes were tested per jar; assays lasted 30 minutes. Five doses were used for each terpene or PBO mixture and three replicates of each were carried out. With those values lethal concentration 50 (LC₅₀) of each terpene and combination index (CI) were calculated. All seven terpenes were active, but statistical differences were appreciated only for, in toxicity order, pulegone, citronellal, linalool and 1,8-cineol. The first two presented the lowest LC₅₀ values (0.02 and 0.03 mg/l respectively). PBO sublethal dose in use was 19.43 mg/l resulting in significant synergism for just one 1,8-cineol dose (CI=0.9). We recommend pulegone as base terpene for *Ae. aegypti* insecticide formulations.

Introducción

Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae) es un insecto de gran importancia sanitaria al ser vector de distintos arbovirus como fiebre amarilla, dengue, chikungunya y zika (Contigiani et al., 2016). En los últimos años este mosquito se ha distribuido por una amplia región del territorio Argentino; según los registros se lo encuentra en todo el centro y norte del país (Rossi, 2015). Estos dípteros se desarrollan en ambientes urbanos, donde han encontrado el hábitat adecuado, criándose en recipientes artificiales como frascos, floreros, cubiertas de neumáticos u otros posibles contenedores de agua donde las hembras oviponen (Grech et al., 2016). Los huevos eclosionan para dar lugar a larvas acuáticas, que pasan por cuatro estadios hasta transformarse en pupas (exaradas) de las que emergerán los adultos reproductivos. El ciclo completo, desde huevo a adulto, oscila entre 15-28 días según las condiciones ambientales. Los adultos se alimentan de jugos vegetales, pero la hembra debe además ingerir sangre para adquirir las proteínas necesarias para la producción de huevos, teniendo particular preferencia por la sangre humana (Domínguez et al., 2000).

En 1947 se lanzó el programa continental de erradicación de *Ae. aegypti*, después de una gran epidemia de fiebre amarilla (Salvatella-Agrelo, 1996). Pero a mediados de la década del '80, en Argentina, se registra su reingreso desde el norte (Beceyro, 2009). Al detectarse su presencia se emplean para su manejo insecticidas sintéticos, inicialmente organoclorados, luego organofosforados y actualmente piretroides, sin embargo las poblaciones fueron desarrollando resistencia a estos grupos químicos (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013). Por otro lado, los insecticidas sintéticos tienen consecuencias negativas para el ambiente y la salud humana, porque se bioacumulan y biomagnifican de un eslabón trófico a otro y producen un impacto letal o subletal sobre distintas clases de organismos benéficos (Devine & Furlong, 2007).

Bajo este panorama, existe un interés creciente en estrategias alternativas de manejo, como la búsqueda de insecticidas naturales, particularmente los insecticidas botánicos (Isman, 2000; Valladares et al., 2003). Las plantas producen sustancias para defenderse de los herbívoros y microorganismos, generando compuestos químicos conocidos como aleloquímicos o metabolitos secundarios. Éstos pueden ser compuestos nitrogenados (como alcaloides, aminoácidos no proteicos, glucósidos cianogénicos, etc.), terpenoides (limonoides, curcubitacinas, mono y sesquiterpenos, etc.), fenólicos (flavonoides, quinonas, etc.) entre otros (Harborne & Williams, 2000), productos muy costosos para las plantas ya que constituyen menos del 10% de su peso seco. Estas sustancias pueden tener efecto tóxico, antialimentario, repelente, interfieren en el crecimiento y desarrollo o bien pueden afectar el comportamiento de artrópodos regulando así sus poblaciones (Koul et al., 2008).

Los aceites esenciales (AE) que producen distintas plantas aromáticas, son líquidos volátiles, solubles en solventes orgánicos y de baja densidad, que se sintetizan en diversos órganos como raíz, yemas, tallo, frutos, hojas, semillas o corteza y se almacenan en células secretoras, epidérmicas o tricomas (Bakkali et al., 2008). Los componentes de los AE determinan sus propiedades biológicas, siendo dos o tres los compuestos mayoritarios que se encuentran en concentraciones del 20 al 70% (Daferera et al., 2000). Se presentan en dos grupos principales según su origen biosintético: terpenos o terpenoides, y compuestos aromáticos y alifáticos, ambos de bajo peso molecular (Bakkali et al., 2008).

Estos productos han sido utilizados tradicionalmente como insecticidas y repelentes para proteger granos almacenados (Koul et al., 2008), y tienen la ventaja de degradarse rápidamente por tratarse de moléculas simples y de alta volatilidad. No presentan riesgos genotóxicos a largo plazo y en muchos casos son antimutagénicos (Bakkali et al., 2008). Además, se probó su efectividad como insecticida fumigante y de contacto sobre numerosas plagas de importancia económica (Isman, 2000). Se demostró que algunos AE tienen efecto ovicida, larvicida, adulticida y repelente sobre varias especies de mosquitos, entre ellas *Ae. aegypti* (Prajapati et al., 2005; Waliwitiya et al., 2008). Los AE obtenidos de algunas especies de verbenáceas y

asteráceas de la región central de Argentina mostraron efecto larvicida (Gleiser & Zygadlo, 2007) y repelente sobre esta especie de díptero (Gleiser et al., 2011).

Algunos terpenos aislados de AE han resultado tóxicos para larvas de *Ae. aegypti*, entre ellos eucaliptol, alfa-pineno, pulegona, timol y citronelal. Sin embargo no es bien conocido el modo de acción de estos compuestos. Su rápido efecto es indicio de que actúan como neurotóxicos, quizás inhibiendo las acetilcolinesterasas y el sistema octopaminérgico en insectos (Lucia et al., 2007; Waliwitiya et al., 2009). Poco se ha indagado en relación al efecto que estos compuestos tienen sobre adultos de *Ae. aegypti*.

El complejo de monoxigenasas asociados al citocromo P450 (CP450) es un sistema metabólico de enzimas que actúa sobre diversos compuestos exógenos y endógenos (Feyereisen, 1999). En insectos cumple distintas funciones sobre el crecimiento, desarrollo y protección contra xenobióticos, como así también detoxificando aleloquímicos generados por plantas (Scott & Wen, 2001). La detoxificación de compuestos exógenos se realiza en dos fases. En la primera se genera un producto primario por oxidación, reducción o hidrólisis del sustrato; donde actúa predominantemente el CP450. En algunos casos este producto puede excretarse. A veces no alcanza con las primeras transformaciones y es necesario que se dé la fase II donde ocurren otros cambios, mediados por otras enzimas que lo vuelven soluble en agua (por ejemplo por adición covalente de azúcares, aminoácidos, sulfatos, etc.), para posteriormente eliminarlo a través de los túbulos de Malpighi (Chahine & O'Donnell, 2011).

La resistencia a insecticidas puede considerarse como el principal obstáculo para el control continuo de muchos vectores de enfermedades como los mosquitos. Sistemas metabólicos de detoxificación como CP450 o glutatión-S-transferasas se han mostrado como los responsables de la generación de resistencia a insecticidas en varias especies plaga (Schuler, 1996). El butóxido de piperonilo (PBO) ha sido utilizado como sinergista para aumentar la eficacia de ciertos insecticidas; esto se logra dada su capacidad para inhibir la actividad metabólica de estos dos sistemas particulares (CP450 y esterasas no específicas) (Jones, 1998). Los insectos expuestos

a este compuesto se vuelven más “sensibles” a ciertos compuestos de síntesis (Bingham et al., 2011) como también a productos naturales (Palacios et al., 2009; Rossi & Palacios, 2013).

En el presente trabajo se propone analizar la efectividad de diferentes terpenos presentes en AE de plantas medicinales y comestibles como posibles alternativas para el manejo de *Aedes aegypti* y determinar si existe sinergismo cuando se combinan con PBO.

Objetivo general

Medir el efecto adulticida de terpenos presentes en aceites esenciales de plantas sobre *Aedes aegypti* al utilizarlos solos o combinados con butóxido de piperonilo.

Objetivos específicos

1. Determinar la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de siete terpenos mediante ensayos de fumigación sobre adultos de *Ae. aegypti*.
2. Definir la dosis subletal de PBO para esta especie de mosquito.
3. Determinar el efecto de los terpenos más activos en solución conjunta con PBO y cuantificar si tienen actividad sinérgica.

Predicciones

*De acuerdo al efecto observado con los AE completos (Cavalcanti et al 2004; Prajapati et al 2005; Gleiser & Zygodlo, 2007; Lucia et al 2007; Gleiser et al., 2011), se espera que adultos de *Ae. aegypti* sean afectados por los terpenos puros de manera dosis-dependiente, en ensayos de fumigación.

*Así como el PBO sinergiza insecticidas sintéticos como los piretroides (Rose et al., 1995; Bingham et al., 2011; Joffe et al., 2011; Fazolin et al., 2016), se considera que combinado con un terpeno puro generará la misma respuesta bioquímica en *Ae. aegypti*.

Materiales y Métodos

1. Crianza de los individuos

Se estableció un criadero de mosquitos *Ae. aegypti* en el laboratorio de la Cátedra de Entomología, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC). Para iniciar la colonia se buscaron larvas en distintos tipos de recipientes contenedores de agua tales como cubiertas de vehículos en gomerías y floreros de cementerios, además se colocaron ovitrampas en patios-jardines de distintas viviendas ubicadas en la ciudad de Córdoba. Las ovitrampas consistían en recipientes oscuros con agua (decolorada) y restos vegetales, éstos últimos sirven como atrayentes para la oviposición. El volumen de agua de las ovitrampas fue de aproximadamente la mitad del recipiente, de forma tal que quede una parte de la superficie interna del mismo libre para que las hembras cementen los huevos, por tratarse de “mosquitos de inundación” (Fischer, 2016). Una vez detectadas las oviposturas se trasladaron las ovitrampas al laboratorio, las que fueron inundadas para estimular el desarrollo de los embriones. Cuando se observaron las larvas, estas fueron transferidas a bandejas de cría de 9 x 9 cm de lado y 5 cm de profundidad. Estas bandejas contenían, además del agua los detritos extraídos de las ovitrampas, aun así fueron suplementadas con hígado en polvo y alimento para peces, de ese modo las larvas contaban con alimento suficiente para completar su desarrollo. Una vez alcanzado el estado de pupa, las mismas fueron retiradas de las bandejas de cría utilizando una pipeta plástica y se colocaron en vasos plásticos con agua decolorada dentro de jaulas entomológicas hasta la emergencia de los adultos (Gerberg et al., 1994). Las jaulas son cubos de madera de 30cm de lado y cerradas con voile para contener a los adultos emergidos (Figura 1.a). La alimentación de los adultos se realizó con

algodones embebidos en una solución azucarada al 10%, ubicados en vasos plásticos dentro de las jaulas, y se renovaron cada tres días. A las hembras adultas se les ofreció, además, como fuente de sangre, un ratón de laboratorio, inmovilizado con una malla metálica y colocado dentro de la jaula en sesiones de una hora, para así complementar su alimentación y desencadenar la producción de huevos. Dentro de las jaulas se ubicaron recipientes plásticos para coleccionar nuevas oviposiciones. La temperatura se mantuvo controlada en 27 ± 2 °C mediante un radiador eléctrico con termostato. Para los bioensayos se emplearon individuos tomados al azar del criadero, pertenecientes a cualquier generación.

2. Ensayos de fumigación

Para realizar los ensayos se contó con terpenos puros, provistos por el Laboratorio de Química Fina de la Universidad Católica de Córdoba. Se eligieron terpenos presentes en AE de plantas comestibles y medicinales: eucaliptol (1,8-cineol) (*Eucalyptus cinerea*, *Laurus nobilis*, *Artemisa annua* y *Mentha piperita*), limoneno (*Citrus aurantium*, *C. limon*, *C. paradise*, *C. reticulata* y *C. sinensis*), pulegona (*Mintostachys verticillata* y *Hedeoma multiflora*), β -cariofileno (*Syzygium aromaticum*), γ -terpineno (*Citrus limon* y *C. reticulata*), citronelal (*Cymbopogon nardus* y *C. winterianus*) y linalool (*Coriandrum sativum* y *Laurus nobilis*) (Palacios et al., 2009a, 2009b; Gleiser et al., 2011) comprados a la empresa Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA); se empleó como compuesto sinergista piperonil butóxido y acetona como solvente. Su aplicación se realizó mediante microjeringas Hamilton de 5, 10, 100 y 250 microlitros. Los ensayos de fumigación se realizaron en frascos de vidrio de un litro, cuyas tapas tenían adherido un hilo de algodón de 10 cm, que al cerrarse quedaba colgando en el interior del frasco (Figura 1.b). De esta forma, la fumigación se produce al aplicar el compuesto en el hilo y éste se evapora a temperatura ambiente.



Figura 1: a) Jaula entomológica de cría de adultos y b) Frascos de vidrio para bioensayos.

2.1. Efecto adulticida de los terpenos. Se aplicaron soluciones de cada terpeno diluido en acetona en al menos cinco concentraciones diferentes, realizando tres repeticiones de cada una, en días diferentes. En el control se aplicaron las dosis más altas del solvente (acetona) y se realizó el mismo número de repeticiones. En todos los casos en cada frasco se ubicaron 10 individuos adultos y la experiencia se dio por terminada a los 30 minutos.

2.2. Evaluación de Piperonil butóxido (PBO). Se realizaron ensayos de fumigación para determinar la concentración subletal del PBO, para ello se aplicó el compuesto en distintas concentraciones (diluido en acetona) hasta encontrar una dosis donde sobrevivan más del 90% de los adultos de *Ae. aegypti* después de 30 minutos de iniciada la experiencia. Se emplearon 10 insectos por frasco, realizándose tres repeticiones de cada concentración.

2.3. Efecto de terpenos combinados con PBO. Se eligieron los terpenos cuyas CL_{50} fueron las más activas para combinarlos con la dosis subletal de PBO encontrada previamente. Para el bioensayo se aplicaron conjuntamente ambos compuestos, diluidos en acetona, después de 30 minutos, se registró el número de individuos muertos para el cálculo de mortalidad. Se emplearon 10 individuos por frasco y tres repeticiones de cada concentración.

En todos los ensayos propuestos, el conteo de los individuos muertos pasado el tiempo estipulado, se realizó utilizando el criterio establecido en las pruebas de detección de resistencia en mosquitos, empleando el método del bioensayo de la botella CDC (World Health Organization, 2016), donde se consideran individuos intoxicados por el tratamiento aquellos inmóviles (muertos) y los que se dejan arrastrar al rotar suavemente el frasco sin tomar vuelo (noqueados).

3. Análisis de los resultados

3.1. Curvas dosis respuesta y CL_{50}

Los datos de dosis-respuesta fueron analizados con el software CompuSyn (Chou & Martin, 2007) que ajusta una curva sigmoidea sobre la distribución de los puntos observados, para las variables dependiente (respuesta) e independiente (dosis), basado en la ecuación de efecto mediano (Ec. 1) (Chou, 2006) donde D es la concentración del terpeno, f_a es la fracción afectada y f_u la no afectada. D_m es la concentración de efecto medio (CL_{50}) y m es el coeficiente que muestra la forma de la relación dosis-efecto, con valores $m=1$, $m>1$ y $m<1$ para forma hiperbólica, sigmoideal o sigmoideal plana respectivamente.

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m \quad (1)$$

De las que pueden aislarse la dosis (Ec. 2) y el efecto (Ec. 3).

$$D = D_m [f_a/(1 - f_a)]^{1/m} \quad (2)$$

$$f_a = 1/[1 + (D_m/D)^m] \quad (3)$$

Sobre esta nueva distribución el programa realiza una regresión definiendo una recta en la cual a cada valor de dosis le corresponde una probabilidad de respuesta. Se obtiene así el parámetro “ m ” que representa también la pendiente de regresión, la CL_{50} con su rango y el coeficiente “ r ” de ajuste de la correlación lineal. Los valores de respuesta utilizados fueron corregidos utilizando la fórmula de Abbott para incluir lo observado en los controles (Abbott, 1987). Para comparar las CL_{50} se utilizó el método de superposición de rangos, que establece diferencias estadísticamente significativas entre aquellos terpenos cuyo rango de valores no se superponen

(Wheeler et al., 2006). Utilizando las variables obtenidas en CompuSyn para las fórmulas de Chou (2006), se reconstruyeron los gráficos con el software Microsoft Excel.

3.2. Sinergismo Terpeno+PBO

Para analizar el sinergismo se utilizó el Índice de Combinación (IC) (Ec. 4) que refleja el sinergismo entre los compuestos 1 y 2 para cada dosis ensayada.

$$IC = \frac{D_1}{Dm_1[fa/(1-fa)]^{1/m_1}} + \frac{D_2}{Dm_2[fa/(1-fa)]^{1/m_2}} \quad (4)$$

Sus valores muestran sinergismo si se encuentran entre 0 y 1, aditividad en 1, y antagonismo para valores mayores a 1 (Chou, 2006). Este autor describe el sinergismo por rangos de IC como: sinergismo muy fuerte (<0,1), fuerte (0,1–0,3), normal (0,3–0,7), moderado (0,7–0,85), leve (0,85–0,90) y casi aditivo (0,90–1,10); de la misma forma para el antagonismo: leve (1,10–1,20), moderado (1,20–1,45), normal (1,45–3,3), fuerte (3,3–10) y muy fuerte (>10).

Resultados

Efecto adulticida de los terpenos

De acuerdo a los resultados obtenidos, los terpenos más activos fueron pulegona y citronelal, donde con concentraciones muy bajas, respecto al resto de los terpenos, se obtuvo una mortalidad media (Figura 2.a). En el caso de Linalool se necesitaron 2,7 veces más del compuesto para obtener la misma respuesta (Figura 2.b) y para el resto de los terpenos se necesitaron entre 2-3,7 mg/l más (Figura 2.c).

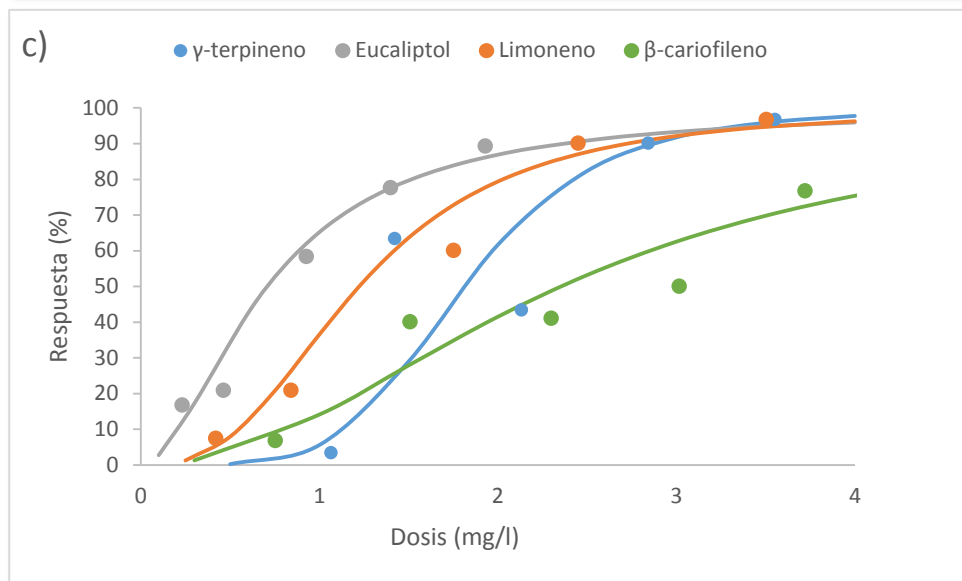
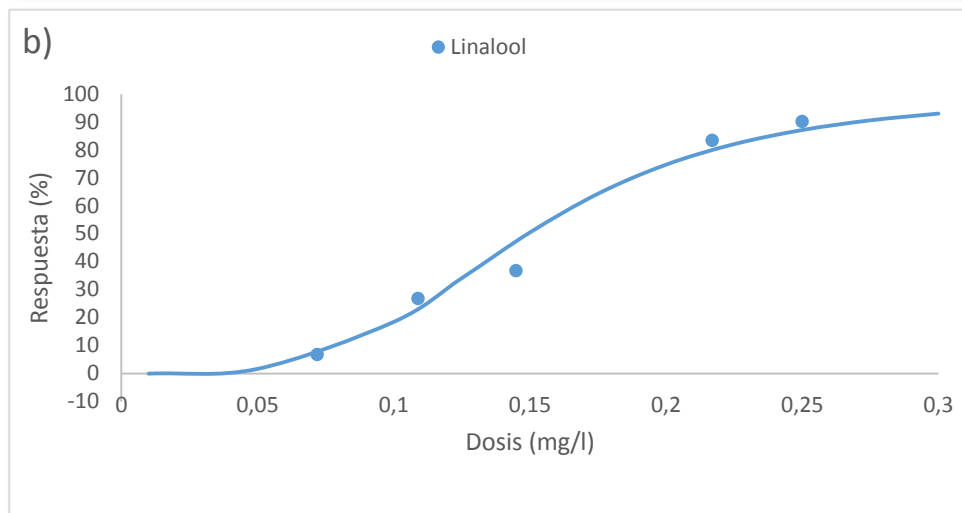
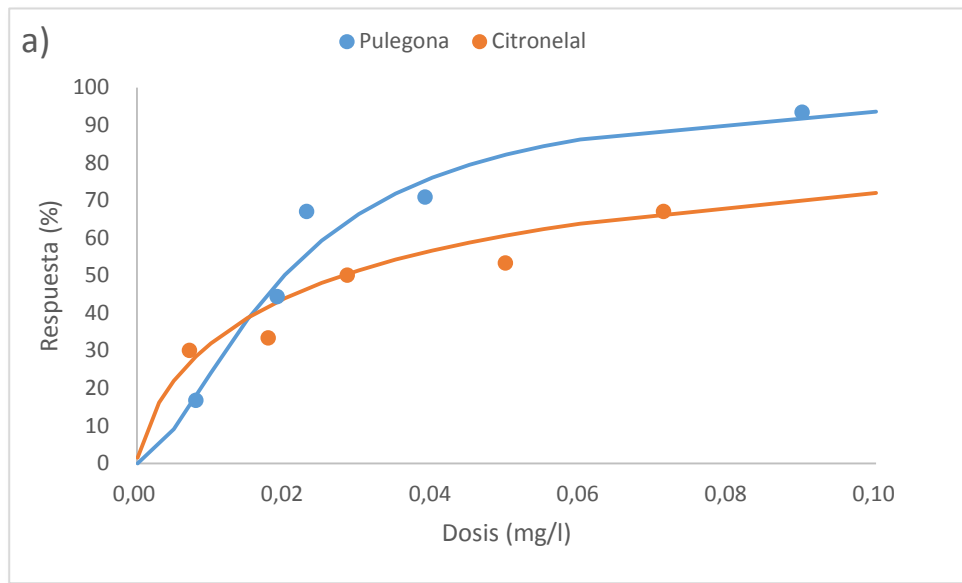


Figura 2: Curvas Dosis-Respuesta (mortalidad) para los terpenos: a) Citronelal y Pulegona; b) Linalool y c) γ -terpineno, Eucaliptol, Limoneno y β -cariofileno; los puntos indican la respuesta registrada experimentalmente.

El efecto fumigante de los terpenos sobre *Ae. aegypti* se comparó mediante los valores de CL_{50} (Tabla 1), donde pulegona mostró ser el más tóxico seguido por citronelal. Las CL_{50} de linalool fue 4,96 veces más alta que la de citronelal y el resto de terpenos evaluados mostraron valores de CL_{50} que fueron entre 23,36 y 78,33 veces más altas respecto a los dos terpenos más activos.

Por método de superposición de rangos, se observaron diferencias significativas entre la CL_{50} de los cuatro compuestos que mostraron mayor letalidad: pulegona, citronelal, linalool y eucaliptol. Los restantes terpenos (limoneno, γ -terpineno y β -cariofileno) no difirieron significativamente entre ellos.

Tabla 1. Actividad fumigante de siete terpenos presentes en AE sobre adultos de *Ae. aegypti*.

<i>Compuesto</i>	CL_{50}	LC	m^1	r
Pulegona	0,02	(0,0197-0,0203)	1,66	0,96
Citronelal	0,03	(0,0249-0,0352)	0,74	0,89
Linalool	0,15	(0,1458-0,1538)	3,7	0,98
Eucaliptol	0,7	(0,6496-0,8063)	1,82	0,96
Limoneno	1,22	(1,3419-3,0398)	2,74	0,98
γ -terpineno	1,8	(1,3388-5,6587)	4,77	0,91
β -cariofileno	2,35	(1,0726-1,4604)	2,11	0,95

Concentración Letal expresada en mg/l de aire. LC: límites de confianza, 1: Pendiente de regresión

Las regresiones calculadas a partir de las curvas dosis-respuesta dieron valores de ajuste superiores a 0,85 en todos los casos.

Piperonilbutóxido

Cuando se calculó la toxicidad del compuesto empleado como sinergista piperonilbutóxido (PBO) la curva dosis-respuesta se ajustó a una sigmoideal (Figura 3), la pendiente de regresión fue $m=3,75$. La CL_{50} obtenida fue de 77,46 mg/l y la dosis

subletal, aquella que afecta a menos del 10% de los individuos, la CL10 fue de 43,12 mg/l, para los bioensayos de combinación empleamos 19,43 mg/l.

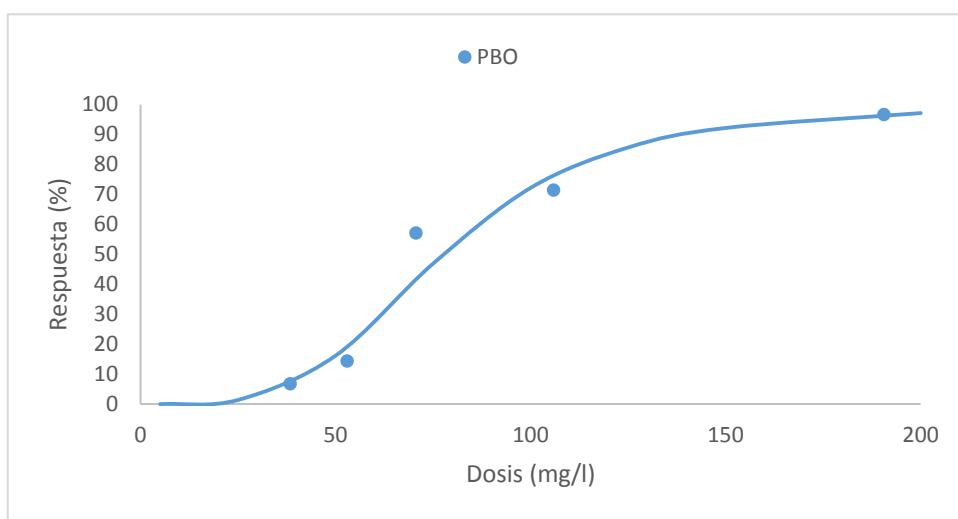


Figura 3: Curva Dosis-Respuesta (mortalidad) para piperonilbutóxido; los puntos indican los datos observados experimentalmente.

Combinaciones Terpeno+PBO

Las combinaciones se plantearon con aquellos terpenos que mostraron mayor toxicidad sobre adultos de *Ae. aegypti*: pulegona, citronelal, linalool y eucaliptol. Se observó sinergismo para citronelal+PBO a la menor dosis (Tabla 2) con un valor considerado casi aditivo y a medida que aumentó la dosis se tornó antagonista.

Tabla 2. Actividad sinérgica entre citronelal+PBO

Citronelal (mg/l)	PBO (mg/l)	Mortalidad (%)	Índice de Combinación
0,01	19,43	32,2	0,97
0,03	19,43	43	1,6
0,04	19,43	48,1	1,72
0,06	19,43	53	1,7
0,07	19,43	58,9	1,5

Eucaliptol en cambio mostró un Índice de Combinación considerado como sinergismo leve a 0,31 mg/l y antagonismo leve a moderado para el resto de las concentraciones (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad sinérgica entre eucaliptol+PBO

Eucaliptol (mg/l)	PBO (mg/l)	Mortalidad (%)	Índice de Combinación
0,15	19,43	11,7	1,09
0,31	19,43	35	0,9
0,7	19,43	49,2	1,25
0,93	19,43	59,2	1,29
1,39	19,43	83	1

En cambio para linalool+PBO y pulegona+PBO los valores del Índice de Combinación nunca fueron inferiores a uno para ninguna de las dosis probadas (Tablas 4 y 5).

Linalool en las dosis evaluadas presentó valores de IC ligeramente mayores a uno, lo rondando un antagonismo moderado (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad sinérgica entre linalool+PBO

Linalool (mg/l)	PBO (mg/l)	Mortalidad (%)	Índice de Combinación
0,07	19,43	14,8	1,17
0,15	19,43	40,5	1,36
0,22	19,43	46	1,78
0,29	19,43	58,4	1,99
0,43	19,43	76,2	2,31

Pulegona en cambio presentó valores crecientes de IC a medida que aumentó la dosis utilizada, alcanzando un valor que indicaría un efecto antagonista fuerte (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad sinérgica entre pulegona+PBO

Pulegona (mg/l)	PBO (mg/l)	Mortalidad (%)	Índice de Combinación
0,01	19,43	12,5	1,68
0,02	19,43	25,7	2,55
0,05	19,43	29,1	4,32
0,08	19,43	34,4	6,06
0,16	19,43	44,2	9,26

Discusión

Desde la antigüedad el hombre empleó productos vegetales para resolver diferentes aspectos de la vida cotidiana. Sin embargo, su uso contra las plagas disminuyó cuando se desarrollaron los insecticidas de síntesis. Fue durante las últimas décadas que comenzó una marcada preocupación por los efectos de estas sustancias sobre la salud pública y la seguridad ambiental, y nuevamente se consideró a los productos botánicos como una alternativa para el manejo de insectos plagas (Amer & Mehlhorn, 2006). Algunas plantas comestibles y medicinales son conocidas por la producción de metabolitos secundarios (Gandhi et al., 2014). Particularmente, los aceites esenciales son uno de los componentes principales de estos aleloquímicos, con propiedades terapéuticas como la actividad antibacteriana, antiparasitaria, insecticida, antifúngica, antitumoral, entre otras (Bakkali et al., 2008; Tavares et al., 2008). Estos aceites son mezclas volátiles de diferentes sustancias orgánicas liposolubles, constituidas, entre otros compuestos, por terpenos considerados el mayor grupo de productos naturales que las plantas liberan al medio ambiente (Ormeno et al., 2007). Los terpenos purificados pueden llegar a ser moderadamente

tóxicos para mamíferos por vía oral, es el caso de eucaliptol, pulegona, γ -terpineno y linalool sobre ratas (Koul et al., 2008).

Al ser este trabajo una de las primeras investigaciones donde se evalúan terpenos puros sobre adultos de *Ae. aegypti* para obtener su CL_{50} , nos vemos obligados a comparar nuestros resultados con otros donde se probó el efecto fumigante de terpenos y/o AE cuyos componentes principales son algunos de los aquí considerados, los que fueron aplicados particularmente sobre estados inmaduros de ésta y otras especies de mosquitos y sobre otros dípteros.

Nuestros resultados muestran una respuesta adulticida dosis-dependiente de los terpenos según lo predicho, siendo pulegona y citronelal los compuestos más tóxicos para esta especie de insecto ya que su CL_{50} fue de un orden de magnitud menor que el resto de las CL_{50} obtenidas. Además de estos dos últimos terpenos, también linalool y eucaliptol mostraron diferencias significativas.

El AE de *Mentha longifolia* tiene como componente principal pulegona. Al evaluarse la actividad de este aceite mediante ensayos de fumigación sobre *Culex pipiens*, se observaron porcentajes de mortalidad máximos (Al-Sarar, 2014). El mismo terpeno fue el más tóxico, entre 14 evaluados, sobre larvas de *Ae. aegypti* (Waliwitiya et al., 2009). Los altos valores de mortalidad que encontramos generados por pulegona coinciden con los hallados por Rossi y colaboradores (2012) para *Musca domestica*. Trabajando con el AE de peperina (*Minthostachys verticillata*), cuyo componente principal también es pulegona, obtuvieron una LC_{50} 3,4 veces menor respecto al terpeno aislado empleado en ese trabajo. Los autores señalan que, junto a mentona, fueron transformados por acción de CP450 en un compuesto aún más tóxico para el insecto: mentofurano. Considerando lo extendido que está este sistema metabólico en insectos, es posible que en *Ae. aegypti* se genere el mismo producto resultando altamente tóxico para este insecto.

Otro de los terpenos estudiados en este trabajo fue citronelal, que al ser evaluado por Waliwitiya y colaboradores (2009) se observó que redujo la oviposición y tuvo diferente efecto larvicida, según el estadio considerado, sobre *Ae. aegypti*. Más conocido es el efecto de este terpeno, y de AE que lo contienen, como repelentes

tanto en *Ae. aegypti* (Amer & Mehlhorn, 2006; Gleiser et al., 2011; Hsu et al., 2013) como para *Cx. pipiens* (Kim et al., 2005; Amer & Mehlhorn, 2006). Makhaik y colaboradores (2005) señalan que el AE de *Eucalyptus citriodora* fue activo como fumigante sobre *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* debido posiblemente a la alta proporción de citronelal (0,46). Por otro lado, este terpeno resultó ligeramente tóxico para hembras de *Ae. aegypti*, empleando la metodología de vapor (Vartak & Sharma, 1993).

En larvas de *Ae. aegypti*, tratadas con el AE de *Cananga odorata*, donde linalool es el componente mayoritario (15,8%), resultó ser el aceite más efectivo de los testeados por Muñoz y colaboradores (2014). Sin embargo linalool era uno más entre varios compuestos activos del AE de *Rosmarinus officinalis*, esto podría indicar que otros compuestos del aceite pueden producir el efecto observado sobre las larvas de este mosquito, o bien linalool podría actuar como sinergista de otro/s componente/s del AE (Waliwitiya et al., 2009). Al evaluarse linalool sobre adultos fue reportado como activo sobre mosca doméstica por Palacios y colaboradores (2009a) y para *Cx. pipiens* por Kang y colaboradores (2009), aunque en ningún caso fue uno de los terpenos más efectivos. El extracto de *Ocimum basilicum* donde linalool es uno de sus compuestos mayoritarios generó efecto adulticida sobre *Cx. pipiens*, indicando que este terpeno actúa inhibiendo la acetilcolinesterasa, lo que provocaría la muerte de los mosquitos (Torres & Roldán, 2015).

La bibliografía presenta a eucaliptol como un larvicida de baja actividad sobre *Ae. aegypti* (Lucia et al., 2007; Silva et al., 2008; Waliwitiya et al., 2009). Los resultados del presente trabajo lo muestran como un adulticida importante, resultados que se relacionan con el encontrado para mosca doméstica (Palacios et al., 2009b; Rossi & Palacios, 2014). En ensayos donde se emplearon mosquitos adultos de *Culex quinquefasciatus* (Ramar et al., 2014) y *Ae. aegypti* (Castro et al., 2013) se utilizó AE de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), encontrándose en ambos estudios que este aceite tuvo poco efecto respecto a los otros evaluados. Por su parte, Lucia y colaboradores (2009) analizaron qué tiempo necesitan los principales terpenos de los AEs de distintas especies de eucalipto, para producir la respuesta de “noqueado” y señalan que 1,8-cineol es el más efectivo para hembras de *Ae. aegypti* y que los

AEs con alta proporción de este terpeno resultan más efectivos. Sugieren, además, que el rápido efecto de eucaliptol se debe a su acción neurotóxica.

Limoneno, β -cariofileno y γ -terpineno resultaron activos aunque a concentraciones más altas, tal como fue registrado para mosca doméstica (Palacios et al., 2009a; Rossi & Palacios, 2013). Silva y colaboradores (2008) destacan a β -cariofileno y γ -terpineno como efectivos larvicidas y señalan a éste último como sinergista en AE de *Lippia gracilis* y más potente que el primero. El AE de *Citrus sinensis*, tiene entre sus componentes principales a limoneno, este aceite mostró baja actividad sobre adultos de *Ae. aegypti* (Phasomkusolsil & Soonwera, 2011).

La resistencia a los insecticidas puede deberse a una serie de mecanismos, pero las enzimas metabólicas de desintoxicación son una de las vías por la que los insectos se deshacen de compuestos tóxicos (naturales o de síntesis), jugando un importante papel las esterasas, glutatión-S-transferasas (GST) y monoxigenasas. En 1942, se descubre la importancia de algunas fracciones del aceite de sésamo (sesamin) las que agregadas al extracto de piretro se comportan como sinergistas superando la resistencia metabólica a insecticidas. Los sinergistas son capaces de inhibir enzimas implicadas en la resistencia, restaurando así la susceptibilidad a éstos compuestos. En 1947 se sintetiza piperonilbutóxido (PBO), que presenta muchas ventajas sobre otros inhibidores dada su completa miscibilidad en los solventes empleados junto a los insecticidas (Tozzi, 1998; Bingham et al., 2011).

Los bioensayos donde se empleó solo PBO sobre adultos de *Ae. aegypti*, mostraron que la respuesta a este compuesto tiene una distribución dosis-dependiente, resultando tóxico para esta especie de mosquito solo en altas concentraciones.

Esperábamos que PBO fuese sinergista sobre los terpenos ensayados en combinación con éste. Sin embargo para pulegona y linalool no se registró sinergismo. Resultados similares observaron Rossi y colaboradores (2012) evaluando el sinergismo entre pulegona y PBO sobre *Musca domestica*, observaron que la CL_{50} de la combinación resultó mayor respecto a la del terpeno puro; según los autores por acción de CP450 sobre el terpeno. El AE de cilantro (*Coriandrum sativum*) con 74% de linalool, tampoco se sinergiza al combinarse con PBO ni con otros inhibidores

enzimáticos involucrados en la generación de resistencia en insectos, para *Cx. pipiens* (Kang et al., 2009) coincidiendo con lo observado en este trabajo cuando se empleó la mezcla linalool+PBO.

En el caso de eucaliptol hallamos sinergismo para solo una de las dosis evaluadas. Trabajos donde emplean este terpeno junto a PBO sobre *M. domestica* observaron que este compuesto fue sinergizado por PBO mostrando una CL₅₀ menor para la combinación en relación al terpeno solo (Rossi & Palacios, 2015).

Nuestros resultados muestran que la combinación citronelal+PBO se mantuvo relativamente estable en aditividad. Por su parte Waliwitiya y colaboradores (2012) combinaron citronelal con PBO y ensayaron además otros inhibidores enzimáticos, en todos los casos aumentó la toxicidad para larvas de cuarto estadio de *Ae. aegypti* durante las 24 horas que duró la experiencia. Es posible que en los adultos de esta especie de mosquito el efecto sinérgico sea observable en períodos de exposición más largos como ocurre en larvas para el citado trabajo.

*Se recomienda un estudio más profundo de pulegona y/o el AE donde este terpeno sea uno de sus compuestos mayoritarios, para el desarrollo de insecticidas botánicos sobre adultos de *Ae. aegypti*. A su vez citronelal y linalool se perfilan también como compuestos prometedores en el manejo de este insecto plaga.

*Se necesita ajustar la metodología por fumigación para el empleo de las combinaciones con PBO. Consideramos que el tiempo de exposición a éste compuesto podría no haber sido el adecuado, en algunos trabajos se los expone durante una hora (Makhaik et al., 2005; Muñoz et al., 2014; Phasomkusolsil & Soonwera, 2011). Rossi y Palacios (2013) realizan una aplicación tópica del sinergista sobre adultos de *M. domestica* luego de anestésarlos. Sin embargo, considerando la fragilidad de éstos insectos sería adecuada una aplicación en “spray” como proponen Umerie y colaboradores (1998) sobre mosquitos y Kang y colaboradores (2009) en *Cx. pipiens*. Además debería considerarse la posibilidad de buscar otro compuesto natural (AE) volátil a temperatura ambiente, como sinergista de los terpenos evaluados en este trabajo; algunos ensayos de este tipo ya se han realizado sobre larvas de mosquitos (Benelli et al., 2017).

Bibliografía

Abbott, W. S. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(2), 302.

Al-Sarar, A. (2014). Chemical composition, adulticidal and repellent activity of essential oils from *Mentha longifolia* L. and *Lavandula dentata* L. against *Culex pipiens* L. *J Plant Prot and Path, Mansoura Univ*, 5(7), 817-826.

Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*, 99(4), 478-490.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.

Beceyro, A. C. (2009). Distribución geográfica del dengue en Argentina. *Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina*, 20(1-2), 1–2.

Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H. & Maggi, F. (2017). Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: synergistic and antagonistic effects. *Parasitology international*, 66(2), 166-171.

Bingham, G., Strode, C., Tran, L., Khoa, P. T., & Jamet, H. P. (2011). Can piperonylbutoxide enhance the efficacy of pyrethroids against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti*?. *Tropical Medicine & International Health*, 16(4), 492-500.

Castro, E. C., Toledo, I. R., & Vargas, L. L. (2013). Efecto insecticida de cuatro aceites esenciales sobre adultos de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* en condiciones experimentales. *Entomotropica*, 28(1), 1-10.

Cavalcanti, E. S. B., Morais, S. M. d., Lima, M. A. A., & Santana, E. W. P. (2004). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), 541-544.

Chahine, S., & O'Donnell, M. J. (2011). Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 214(3), 462-468.

Chou, T.C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681.

- Chou, T. C. & Martin, N. (2007). CompuSyn software for drug combinations and for general dose-effect analysis, and user's guide. ComboSyn, Inc. Paramus, NJ 2007.
- Contigiani, M. S., Diaz, L. A., Spinsanti, L. I. y Tauro, L. B. (2016). Arbovirus. Pp.157-178. En: Berón; C. M., Campos, R. E.; Gleiser, R.; M., Díaz-Nieto L. M.; Salomón, O. D. y Schweigmann, N (eds). Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. Mar del Plata, Argentina, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2576–2581.
- Devine, G. J., & Furlong, M. J. (2007). Insecticide use: contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*, 24(3), 281-306.
- Domínguez, M. C., Ludueña Almeida, F. F., & Almirón, W. R. (2000). Dinámica poblacional de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en Córdoba capital. *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*, 59(1-4), 41-50.
- Fazolin, M., Estrela, J. L. V., Monteiro, A. F. M., Silva, I. M. d., Gomes, L. P., & Silva, M. S. d. F. (2016). Combining the essential oil of *Piper aduncum* L. with commercial insecticides. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(6), 3903.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual review of entomology*, 44(1), 507-533.
- Fischer, S. (2016). Mosquitos que crían en cuerpos de agua temporarios. Pp.105-141. En: Berón; C. M., Campos, R. E.; Gleiser, R.; M., Díaz-Nieto L. M.; Salomón, O. D. y Schweigmann, N (eds). (2016). Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. Mar del Plata, Argentina, Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Gandhi, S. G., Mahajan, V., & Bedi, Y. S. (2015). Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. *Planta*, 241(2), 303–317.
- Gerberg, E. J., Barnard, D. R., & Ward, R. A. (1994). Manual for mosquito rearing and experimental techniques. American Mosquito Control Association, Inc.
- Gleiser, R. M., & Zygadlo, J. A. (2007). Insecticidal properties of essential oils from *Lippiaturbinata* and *Lippiapolystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 101(5), 1349.
- Gleiser, R. M., Bonino, M. A., & Zygadlo, J. A. (2011). Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 108(1), 69-78.

Grech, M., Rossi, y Ludueña Almeida, F. F. (2016). Mosquitos que crían en microambientes artificiales. Pp.142-153. En: Berón; C. M., Campos, R. E.; Gleiser, R.; M., Díaz-Nieto L. M.; Salomón, O. D. y Schweigmann, N (eds). (2016). Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. Mar del Plata, Argentina, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

Hsu, W.-S., Yen, J.-H., & Wang, Y.-S. (2013). Formulas of components of citronella oil against mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(11), 1014-1019.

Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8), 603-608.

Joffe, T., Gunning, R., & Moores, G. (2011). The use of natural synergists to enhance pyrethrum activity against resistant insect pests. En: I International Symposium on Pyrethrum, The Natural Insecticide: Scientific and Industrial Developments in the Renewal of a 1073 (pp. 119-128).

Jones, D. G. (1998). Piperonylbutoxide. Elsevier.

Kang, S.-H., Kim, M.-K., Noh, D.-J., Yoon, C., & Kim, G.-H. (2009). Spray adulticidal effects of plant oils against house mosquito, *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Pesticide Science*, 34(2), 100-106.

Kim, J. K., Kang, C.-S., Lee, J. K., Kim, Y.-R., Han, H.-Y., & Yun, H. K. (2005). Evaluation of Repellency Effect of Two Natural Aroma Mosquito Repellent Compounds, Citronella and Citronellal. *Entomological Research*, 35(2), 117-120.

Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, G.S. (2008) Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticides International*, 4, 63-84.

Lucia, A., Gonzales Audino, P., Seccacini, E., Licastro, S., Zerba, E., & Masuh, H. (2007). Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(3), 299-303.

Lucia, A., Licastro, S., Zerba, E., Gonzalez Audino, P., & Masuh, H. (2009). Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. *Bioresource Technology*, 100(23), 6083-6087.

Makhaik, M., Naik, S. N., & Tewary, D. K. (2005). Evaluation of anti-mosquito properties of essential oils. *Journal of scientific & industrial research*, 64(2), 129-133.

- Manjarres-Suarez, A., & Olivero-Verbel, J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 22(1), 68-75.
- Muñoz, J. A. V., Staschenko, E., & Ocampo, C. B. D. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40, 198.
- Ormeno, E., Fernandez, C. & Mevy, J.P. (2007). Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry* 68, 840–852.
- Palacios, S. M., Bertoni, A., Rossi, Y., Santander, R., & Urzua, A. (2009a). Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. *Molecules*, 14(5), 1938-1947.
- Palacios, S. M., Bertoni, A., Rossi, Y., Santander, R., & Urzua, A. (2009b). Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). *Parasitology Research*, 106(1), 207-212.
- Phasomkusolsil, S., & Soonwera, M. (2011). Efficacy of herbal essential oils as insecticide against *Aedes aegypti* (Linn.), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 42(5), 1083.
- Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K., & Khanuja, S. P. S. (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, 96(16), 1749-1757.
- Ramar, M., Ignacimuthu, S., & Paulraj, M. G. (2014). Biological activity of nine plant essential oils on the filarial vector mosquito, *Culex quinquefasciatus* SAY. (Insecta: Diptera: Culicidae). *International Journal of Research in Biological Sciences*, 4(1), 1-5.
- Rose, R. L., Barbhuiya, L., Roe, R. M., Rock, G. C., & Hodgson, E. (1995). Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(3), 178-191.
- Rossi, G. C. (2015). Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List*, 11(4), 1712.
- Rossi, Y. E., Canavoso, L., & Palacios, S. M. (2012). Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R)-pulegone and menthone. *Fitoterapia*, 83(2), 336-342.

- Rossi, Y. E., & Palacios, S. M. (2013). Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. *Acta Tropica*, 127(1), 33-37.
- Rossi, Y. E., & Palacios, S. M. (2015). Insecticidal toxicity of Eucalyptus cinerea essential oil and 1, 8-cineole against *Musca domestica* and possible uses according to the metabolic response of flies. *Industrial Crops and Products*, 63, 133–137.
- Salvatella-Agrelo, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores em las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*, 12, 28-36.
- Schuler, M. A. (1996). The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant physiology*, 112, 1411-1419.
- Scott, J. G., & Wen, Z. (2001). Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science*, 57(10), 958-967.
- Silva, W. J., Dória, G. A. A., Maia, R. T., Nunes, R. S., Carvalho, G. A., Blank, A. F., Cavalcanti, S. C. H. (2008). Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*, 99(8), 3251-3255.
- Tavares, A.C., Gonc, alves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Canhoto, J., & Salgueiro, L.R. (2008). Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*. 119(1),129–134.
- Torres, A., y Roldán, J. (2015). Efecto insecticida del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* en *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio. *Revista REBIOLEST*, 3(1), 78–90.
- Tozzi, A. (1999). A brief history of the development of piperonyl butoxide as an insecticide synergist. In *Piperonyl butoxide* (pp. 1-5).
- Umerie, S. C., Anaso, H. U., & Anyasoro, L. J. C. (1998). Insecticidal potentials of *Ocimum basilicum* leaf-extract. *Bioresource Technology*, 64(3), 237-239.
- Valladares, G., Garbin, L., Defagó, M. T., Carpinella, C., & Palacios, S. (2003). Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62(1-2), 53-61.
- Vartak, P. H., & Sharma, R. N. (1993). Vapour toxicity & repellence of some essential oils & terpenoids to adults of *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae). *The Indian Journal of Medical Research*, 97, 122-127.

Waliwitiya, R., Kennedy, C. J., & Lowenberger, C. A. (2009). Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest management science*, 65(3), 241-248.

Waliwitiya, R., Nicholson, R. A., Kennedy, C. J., & Lowenberger, C. A. (2012). The Synergistic Effects of Insecticidal Essential Oils and Piperonyl Butoxide on Biotransformational Enzyme Activities in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49(3), 614-623.

Wheeler, M. W., Park, R. M., & Bailer, A. J. (2006). Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(5), 1441–1444.

World Health Organization. (2016). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes.

Agradecimientos

- A la comision evaluadora Anahí, Paula y Raquel
- A mis directores Andrés y Marisa
- A mis compañeros de laboratorio y de la Cátedra de Entmología
- A mis familiares y amigos