



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Caracterización del comportamiento de
Aedes aegypti y *Anopheles
pseudopunctipennis* frente a estímulos
naturales y sintéticos para el desarrollo de
estrategias de control de bajo impacto
ambiental**

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: Ciencias Biológicas

Agustín Álvarez Costa

Director: Héctor M. Masuh

Consejero de estudios: Nicolás Schweigmann

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas –
CIPEIN/CONICET

Fecha de defensa: 25/3/2019

Buenos Aires

Alicia y un mosquito gigante en el vagón de un tren

Mosquito: Se que erés una una buena amiga mía y desde hace mucho tiempo. Por eso sé que no me harías daño, aunque sea un insecto.

Alicia: ¿Qué clase de insecto?

M: ¡Cómo! ¿Entonces a ti no te gustan todos los insectos?

A: Me gustan cuando pueden hablar. En el lugar de donde yo vengo no hablan.

M: ¿Cuáles son los insectos que te encantan en el país de donde vienes?

A: A mi no me gusta ningún insecto, me dan miedo... al menos los grandes. Pero puedo decirte los nombres de algunos.

M: Por supuesto que responderan por sus nombres.

A: Nunca me lo ha parecido.

M: ¿Entonces de que sirve que tengan nombres, si no responden cuando los llaman?

A: A ellos no les sirve de nada, pero sí a las personas. Si no ¿por qué tienen nombres las cosas?

M: ¡Vaya uno a saber!

Adaptado de "Alicia a través del espejo" L. Carroll

Agradecimientos	1
Resumen	2
Abstract.....	4

Capítulo 1:

Introducción general	6
1.1 Enfermedades transmitidas por vectores	7
1.1.1. <i>Arbovirus</i>	7
a. <i>Dengue</i>	7
b. <i>Fiebre amarilla</i>	9
c. <i>Zika</i>	10
d. <i>Chikungunya</i>	11
1.1.2. <i>Malaria</i>	12
1.2 Biología de los mosquitos	12
1.2.1. <i>Distribución</i>	12
1.2.2. <i>Ciclo de vida</i>	16
1.2.3. <i>Cría en el laboratorio</i>	19
1.3 Control.....	21
1.3.1. <i>Control ambiental</i>	22
1.3.2. <i>Control químico</i>	23
a. <i>Control de adultos</i>	24
b. <i>Control de larvas</i>	24
1.3.3. <i>Control biológico</i>	28
1.4 Repelentes.....	29
1.4.1. <i>Definiciones y terminología</i>	29
1.4.2. <i>Desarrollo de repelentes sintéticos</i>	29
1.5 Perspectivas de control	32
1.5.1. <i>Compuestos derivados de plantas</i>	32
1.5.2. <i>Uso de moduladores de comportamiento</i>	34
1.6 Objetivos generales.....	37

Capítulo 2:

Comportamiento de larvas de <i>An. pseudopunctipennis</i> y <i>Ae. aegypti</i> frente a moduladores de comportamiento y agentes ecológicos.....	38
2.1 Introducción	39
2.2 Objetivos	41
2.3 Materiales y métodos	42

2.3.1.	<i>Material biológico</i>	42
2.3.2.	<i>Compuestos químicos</i>	45
2.3.3.	<i>Caracterización de la entomofauna asociada a An. pseudopunctipennis</i> 53	
2.3.4.	<i>Movimiento basal de larvas de An. pseudopunctipennis y Ae. aegypti</i> ...	46
2.3.5.	<i>Respuesta de larvas a moduladores del comportamiento</i>	47
2.3.6.	<i>Respuesta de larvas de An. pseudopunctipennis a agentes ecológicos</i> .50	
2.3.7.	<i>Análisis estadístico</i>	51
2.4	Resultados.....	53
2.4.1.	<i>Caracterización de la entomofauna asociada a An. pseudopunctipennis</i> 53	
2.4.2.	<i>Movimiento basal de larvas de An. pseudopunctipennis y Ae. aegypti</i> ...	59
2.4.3.	<i>Respuesta de larvas a moduladores del comportamiento</i>	61
2.4.4.	<i>Respuesta de larvas de An. pseudopunctipennis a agentes ecológicos</i> .72	
2.5	Discusión	74
2.5.1.	<i>Caracterización de la entomofauna asociada a An. pseudopunctipennis</i> 74	
2.5.2.	<i>Movimiento basal de larvas de Ae. aegypti y An. pseudopunctipennis</i> ...	79
2.5.3.	<i>Respuesta de larvas a moduladores de comportamiento</i>	81
2.5.4.	<i>Evaluación de la respuesta individual a distintos agentes ecológicos</i>	86
2.6	Conclusiones.....	88

Capítulo 3:

Respuesta toxicológica y comportamental de larvas de *An.*

***pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti* a cuatro clases de larvicidas..... 90**

3.1.	Introducción.....	91
3.2.	Objetivos	92
3.3.	Materiales y métodos.....	93
3.3.1.	<i>Material biológico</i>	93
3.3.2.	<i>Compuestos químicos</i>	94
3.3.3.	<i>Susceptibilidad a larvicidas</i>	94
3.3.4.	<i>Comportamiento de intoxicación</i>	95
3.3.5.	<i>Comportamiento de larvas sobrevivientes</i>	96
3.3.6.	<i>Análisis de datos</i>	97
3.4.	Resultados.....	99
3.4.1.	<i>Susceptibilidad a larvicidas</i>	99
3.4.2.	<i>Intoxicación</i>	100
3.4.3.	<i>Comportamiento de larvas sobrevivientes</i>	104
3.5.	Discusión	116
3.5.1.	<i>Suceptibilidad de larvicidas</i>	116

3.5.2.	<i>Comportamiento de intoxicación</i>	119
3.5.3.	<i>Comportamiento de larvas sobrevivientes</i>	121
3.6.	Conclusiones.....	124

Capítulo 4:

Efecto repelente del aceite esencial de *E. nitens* en *An.*

***pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti* 126**

4.1	Introducción.....	127
4.2	Objetivos	128
4.3	Materiales y métodos.....	129
4.3.1.	<i>Material vegetal y extracción de aceites esenciales</i>	129
4.3.2.	<i>Verificación de la composición del aceite esencial: Análisis mediante GC/MS</i> 130	
4.3.3.	<i>Compuestos químicos</i>	131
4.3.4.	<i>Repelencia en placa</i>	131
4.3.5.	<i>Antebrazo en jaula</i>	132
4.3.6.	<i>Análisis estadísticos</i>	135
4.4	Resultados.....	136
4.4.1.	<i>Composición química</i>	136
4.4.2.	<i>Repelencia en placa</i>	136
4.4.3.	<i>Repelencia en antebrazo</i>	145
4.5	Discusión	146
4.5.1.	<i>Composición química</i>	146
4.5.2.	<i>Repelencia en placa</i>	147
4.5.3.	<i>Repelencia en antebrazo</i>	151
4.6	Conclusiones.....	156

Conclusiones finales 158

Trabajos publicados 161

Referencias 164

Agradecimientos

A *Héctor Masuh* por abrirme las puertas del laboratorio.

A *Lau* por ser mi guía y por sus siempre tan agradables correcciones.

A *Pau* por siempre estar para motivarme, enseñarme y laburar conmigo codo a codo.

A *Cristian Laci*, *Enrique Laci* y *Daniel Carrizo* y a los miembros de la Coordinación Nacional de Control de Vectores, Ministerio de Salud de Argentina, por su asistencia con el trabajo de campo.

A *Juan Ignacio Urcola*, *Georgina Rodriguez* y *Laura Libonatti* por ayudarme con los bichos difíciles.

A les chiques, *Lizzy*, *Georgi*, *Marian*, *Noel*, *Toti*, *Ceci*, *Moni*, *Fede*, *Vale* y *Fer*, por ser mi soporte afectivo, y muchas veces académico también, en el laboratorio.

A mis *compas del CIPEIN*, por siempre estar dispuestos a dejar todo para darme una mano.

A *mi familia* por el apoyo incondicional que siempre me brindan.

A *mis amigos* por estar siempre cuando los necesité. En especial a *Agos* y a *Marcos* por tomarse el inmenso trabajo de corregirme la tesis con mucho cariño.

Resumen

Los mosquitos *Aedes aegypti*, vector de fiebre amarilla, dengue, Zika y chikungunya, y *Anopheles pseudopunctipennis*, uno de los principales vectores de malaria en América, se crían en ambientes muy distintos. *Ae. aegypti* se cría en recipientes artificiales cercanos al domicilio y peridomicilio mientras que *An. pseudopunctipennis* se cría en márgenes de arroyos de montaña. Estas diferencias pueden tener implicancias importantes en las metodologías de control de estos mosquitos. Además, la información sobre *An. pseudopunctipennis* es muy escasa debido a la dificultad de criarlo en laboratorio. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de tesis consistió en caracterizar el comportamiento de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti* frente a estímulos naturales y sintéticos, con el fin de generar resultados aplicables a un plan de manejo integrado de vectores. Para ello se realizaron tres abordajes: se estudió el efecto de moduladores del comportamiento y agentes ecológicos en larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* (Capítulo 2). Se caracterizó la respuesta toxicológica y comportamental de larvas de ambas especies frente a cuatro clases de larvicidas (Capítulo 3). Y se evaluó el efecto repelente del aceite esencial de *E. nitens* en adultos de las especies mencionadas (Capítulo 4). Con respecto al primer abordaje, se determinó una gran riqueza de predadores en los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis*, y los principales candidatos a evaluar en futuros trabajos fueron las larvas de *Tropisternus noa*, las larvas de Libellulidae, los adultos de *Liodessus sp.*, *Microvelia sp.* y las larvas de *Toxorhynchites sp.* También se observó que los compuestos repelentes (DEET e IR3535) aumentaron la actividad de nado de larvas de ambas especies estudiadas pero los cebos atractantes (prolina y

levadura) solo disminuyeron la actividad de nado en larvas de *Ae. aegypti*. Además, se determinaron por primera vez los parámetros toxicológicos de los larvicidas temefós, permetrina, Bti y el aceite esencial de *E. nitens* en larvas de *An. pseudopunctipennis*, que resultaron más tolerantes a estos larvicidas que *Ae. aegypti*. En ambas especies se registró una disminución en la actividad de nado en las larvas expuestas a temefós y permetrina. En cambio, esta disminución solo se observó en las larvas de *Ae. aegypti* expuestas al formulado de *Bti* y al aceite esencial de *E. nitens*, pero no en las larvas de *An. pseudopunctipennis*. Finalmente, se registró el efecto repelente de la DEET y el aceite esencial de *E. nitens* en hembras de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* utilizando el método de repelencia en placa. Además, el aceite de *E. nitens* generó un aumento de la actividad locomotora en hembras de *Ae. aegypti*. Finalmente, el aceite esencial de *E. nitens* presentó un alto tiempo de protección total, comparable con el de la DEET, frente a hembras de *Ae. aegypti*. Los resultados de esta tesis aportan información valiosa para ser utilizada en los programas de control de los mosquitos estudiados, y es el primer estudio detallado sobre los comportamientos de las larvas y adultos de *An. pseudopunctipennis*.

Abstract

The mosquitoes *Aedes aegypti*, the vector of yellow fever, dengue, Zika and chikungunya, and *Anopheles pseudopunctipennis*, one of the main malaria vectors in America, breed in very different environments. *Aedes aegypti* breeds in artificial containers at home and peridomicile sites while *An. pseudopunctipennis* on margins of mountain streams. These differences may have important implications in the control methodologies that should be applied. In addition, the information of *An. pseudopunctipennis* is very scarce due to the difficulty of breeding it in laboratory. Therefore, the objective of this thesis was to characterize the behavioral responses of *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* against natural and synthetic stimulus with the aim to develop applied methodologies that contribute to an integrated management vector control. Then, three approaches were made: the effect of compounds that modulate behavior and ecological agents were studied in *An. pseudopunctipennis* and *Ae. aegypti* larvae (Chapter 2), the toxicological and behavioral response of four classes of larvicides were characterized against both species larvae (Chapter 3) and the repellent effect of the essential oil of *E. nitens* was evaluated on the mentioned species (Chapter 4). With respect to the first approach, a great diversity of predators was determined on *An. pseudopunctipennis* breeding sites and the main candidates to evaluate in future works were *Tropisternus noa* larvae, Libellulidae larvae, *Liodessus sp.* adults, *Microvelia sp.* and *Toxorhynchites sp.* larvae. It was also observed that the repellent compounds (DEET and IR3535) increased the activity of the larvae of both species, but the attractive baits (proline and yeast) only decreased the activity of *Ae. aegypti* larvae. In addition, this is the first determination of

toxicological parameters of the larvicides temephos, permethrin, *Bti* and the essential oil of *E. nitens* against *An. pseudopunctipennis* larvae, which was less susceptible to these larvicides than *Ae. aegypti*. In addition, a decrease in the activity of the larvae exposed to temephos and permethrin was registered in both species. In contrast, this decrease was only observed in *Ae. aegypti* larvae exposed to *Bti* and the essential oil of *E. nitens* but not in *An. pseudopunctipennis* larvae. Finally, with respect to the third approach, a repellent effect of DEET and the essential oil of *E. nitens* was identified against *Ae. aegypti* and *An. pseudopunctipennis* females by using the plaque repellency method. In addition, *E. nitens* essential oil generated an increase in the locomotor activity on *Ae. aegypti* females. Finally, the essential oil of *E. nitens* showed a high total protection time, comparable with DEET, against *Ae. aegypti* females. The results of this thesis provide valuable information to be used in the control programs of the mosquitoes studied, and is the first detailed study on the behavior of the larvae and adults of *An. pseudopunctipennis*.

Introducción general

1.1 Enfermedades transmitidas por vectores

1.1.1. *Arbovirus*

El término arbovirus (ArBoViruses = arthropod-borne viruses) es un agrupamiento ecológico de los virus basado en su transmisión vectorial por artrópodos. A continuación se describirán las características principales de cuatro enfermedades producto de la transmisión vectorial de arbovirus por parte de las hembras de *Aedes aegypti* Linnaeus (1762) (dengue, fiebre amarilla, Zika y chikungunya) (Contigiani et al. 2016).

a. *Dengue*

El dengue es una enfermedad endemo-epidémica causada por un virus que se transmite a través de la picadura del mosquito *Ae. aegypti*. Existen cuatro serotipos del virus que se denominan DENV 1, 2, 3 y 4. Las personas infectadas presentan un período de incubación de 5 a 7 días, y una alta proporción de las personas infectadas cursarán la enfermedad de manera asintomática. En algunos casos esta enfermedad puede evolucionar a formas graves en las que hay manifestaciones hemorrágicas. Los casos de dengue grave son más frecuentes en personas que ya padecieron dengue (infección primaria) y se infectan nuevamente (infección secundaria) con un serotipo diferente al que les ocasionó el primer cuadro. No obstante, también la infección primaria puede asociarse a dengue grave, en relación a la virulencia de la cepa o a otros factores del hospedador (Contigiani et al. 2016).

A nivel mundial el número de casos de dengue se ha incrementado 30 veces en las últimas cinco décadas. En América, durante los últimos 28 años, hubo una tendencia ascendente, con picos epidémicos que se repiten cada 3 a 5

años casi de manera estable. En Argentina, el virus del dengue se introdujo desde Paraguay. La primera epidemia registrada fue en el año 1916 en las provincias de Corrientes y Entre Ríos, afectando al 50 % de la población mesopotámica de aquella época. Durante 82 años no se documentaron casos por este virus en el territorio nacional hasta la reintroducción del mosquito vector. Desde su reemergencia en 1997, se registraron brotes todos los años excepto en 2001 y 2005. En 1998 se produjo el primer brote autóctono en Salta con un total de 330 casos confirmados, y en el año 2000 en Misiones y Formosa. Desde su reintroducción hasta el 2007 se habían reportado un total de 4.700 casos de dengue clásico abarcando principalmente las provincias del norte. Detectándose los serotipos DENV1, DENV2 y DENV3. Una de las mayores epidemias registradas hasta el momento ocurrió en el primer semestre del 2009 con más de 26.000 casos por DENV1. Durante el año 2010 se reportaron un total de 800 casos en la provincia de Misiones y casos autóctonos aislados en las provincias de Chaco, Jujuy, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Buenos Aires; registrándose casos autóctonos todos los años hasta el día de hoy (Contigiani et al. 2016). La peor epidemia de dengue en Argentina fue en 2016, con más de 40 mil casos confirmados, un 54% superior al gran brote del 2009. En esta epidemia circularon dos serotipos: el DENV1 (responsable del 98 % de los casos) y el DENV4 (sólo en Buenos Aires, Salta y Santa Fe) (MSN 2016).

El año pasado (2018) se registraron en nuestro país alrededor de 9 mil casos probables, entre ellos de 8 mil fueron autóctonos. Las provincias con mayor número de casos fueron Chaco, Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Misiones y Corrientes. Pero también se registraron casos en Córdoba,

Santa Fe, Entre Ríos y Mendoza. El serotipo predominante fue DENV1, aunque también hubo casos de DENV4 (MSN 2018).

A pesar de que en Argentina se han reportado frecuentemente brotes epidémicos, el dengue no se ha convertido en una endemia sino que requiere de la introducción anual del virus desde otros países con circulación endémica. Sin embargo, se evidencian en el país todas las condiciones biológicas y socio-ambientales necesarias para la transmisión y mantenimiento del DENV. La presencia del vector se ha reportado en la mayoría de las provincias con clima templado y subtropical del país. Estudios de competencia vectorial han corroborado que poblaciones de *Ae. aegypti* colectadas en Buenos Aires, Corrientes y Salto (Uruguay) son altamente susceptibles de infectarse y competentes en la transmisión del DENV. Dicha situación eco-epidemiológica requiere un sistema de vigilancia altamente sensible para detectar cada caso sospechoso y ejercer acciones de bloqueo para a minimizar el riesgo de transmisión (Contigiani et al. 2016).

b. Fiebre amarilla

La fiebre amarilla es una enfermedad zoonótica endémica de las zonas selváticas de África, América Central y América del Sur. Presenta dos ciclos de transmisión: uno silvestre y otro urbano. En ciclo urbano, el hospedador principal es el hombre y el vector es el mosquito *Ae. aegypti*. El aspecto clínico varía desde una enfermedad febril no específica a una enfermedad con desenlace fatal. En la actualidad la enfermedad sólo está presente en algunas regiones de África y Sudamérica. En Sudamérica los brotes son limitados y esporádicos, y se producen en las zonas selváticas y boscosas de 13 países

siendo los de mayor riesgo Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. En esta región, el mayor peligro lo representa la reinfestación de muchas ciudades por el mosquito *Ae. aegypti*, lo que conlleva el riesgo que se renueve la transmisión de la fiebre amarilla urbana. En 1871, hubo un importante brote de fiebre amarilla urbana en Argentina, en la provincia de Buenos Aires, con más de 10 mil casos humanos. La enfermedad fue traída por los soldados que regresaban de la Guerra de la Triple Alianza en Paraguay. Actualmente, una de las medidas utilizadas para su control y prevención es la vacuna a base del virus vivo atenuado, la cual induce una respuesta inmune eficaz y de larga duración (Contigiani et al. 2016).

Entre enero de 2017 y noviembre de 2018, seis países y territorios de la región de las Américas notificaron casos confirmados de fiebre amarilla: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa y Perú. Durante este período se notificó el mayor número de casos humanos y epizootias registradas en la Región de las Américas en varias décadas. Bolivia, Brasil, Colombia, Guayana Francesa y Perú han notificado casos nuevos de fiebre amarilla (MSN 2018).

c. Zika

El virus del Zika fue aislado por primera vez en 1947 en monos de la selva Zika (Kampala, Uganda); sin embargo cinco años después se aisló en humanos de Uganda y Tanzania. Su actividad fue registrada en África, Asia y Oceanía. El Zika recibió poca atención hasta su emergencia en 2007, cuando ocasionó una epidemia de casos febriles en las Islas Yap. Además provocó una epidemia aún mayor en la Polinesia Francesa en 2013, donde se lo asoció con un incremento de casos de Síndrome de Guillain-Barré y de microcefalia. Los

primeros casos de Zika en el continente americano se detectaron a principios de 2014 en Brasil. Debido a que es un virus de importancia epidemiológica reciente, la ecología y biología de este virus es poco conocida; sin embargo, numerosas evidencias ecológicas, epidemiológicas y experimentales apuntan a *Ae. aegypti* como el principal vector urbano en países asiáticos. La infección por Zika en humanos provoca una sintomatología similar a aquella causada por el dengue, diferenciándose por la alta frecuencia de conjuntivitis y poco dolor articular y baja fiebre (Contigiani et al. 2016). En el año 2018 en Argentina se registraron 57 casos positivos para Zika autóctonos, la mayoría en Salta y uno en la provincia de Buenos Aires, partido de La Matanza (MSN 2018).

d. *Chikungunya*

Por último, el virus chikungunya es transmitido por mosquitos del género *Aedes* y genera una enfermedad febril aguda que provoca dolor en las articulaciones y erupciones cutáneas. Esta enfermedad es endémica de la India, sureste asiático, Filipinas y África. A fines del 2013 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) informa los primeros casos autóctonos de infección por Chikungunya en islas de la región del Caribe (llegando en el 2014 a 43 países del Caribe), América central, América del Norte y América del Sur. Según un trabajo reciente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* son los principales vectores del virus en América del Sur y Central. En el 2016 se confirmó por primera vez circulación autóctona del virus chikungunya en Argentina, en las provincias de Salta y Jujuy (Contigiani et al. 2016), y en el 2018, se notificó un caso de transmisión autóctona en la provincia de Corrientes (MSN 2018).

1.1.2. Malaria

La malaria es causada por parásito del género *Plasmodium*, que es transmitido de persona a persona por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Los principales vectores de malaria en Argentina son *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (1901) en la región del noroeste argentino (NOA) y *An. darlingi* en el noreste argentino (NEA). Los parásitos que históricamente circularon en Argentina fueron *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* siendo *P. vivax* el responsable del último caso observado en Argentina en 2011 (Dantur Juri y Zaidenberg 2016).

A nivel mundial, la malaria afecta a millones de personas y se estima que 3,3 mil millones de personas en 97 países se encuentran en riesgo de ser infectadas. Durante el año 2014 ocurrieron 198 millones de casos de malaria y con 584 mil muertes; el 90 % de todas las muertes por malaria ocurrieron en África. En América, alrededor de 120 millones de personas viven en los 21 países con algún riesgo de transmisión de malaria. En 13 de estos países se observaron reducciones mayores al 75 % de la incidencia de los casos de malaria entre 2000 y 2013, y entre estos países se encuentra Argentina. Actualmente, Argentina está en la fase de eliminación de esta enfermedad, ya que no se han informado casos desde 2011, y ha iniciado el proceso de certificación de eliminación de la malaria (Dantur Juri y Zaidenberg 2016).

1.2 Biología de los mosquitos

1.2.1. Distribución

Ae. aegypti es originario del continente africano, donde se encuentran tres subespecies: *Ae. aegypti aegypti*, *Ae. aegypti queenslandensis* y *Ae. aegypti*

formosus. Las dos primeras habitan en el continente americano, son de hábito doméstico y poseen características taxonómicas similares, mientras que la subespecie *formosus* presenta taxonomía y biología diferentes y está limitada a ciertas regiones selváticas de África. Se cree que *Ae. aegypti aegypti*, subespecie a la cual nos referiremos a lo largo de esta tesis, fue introducida en América durante las primeras exploraciones europeas en el siglo XVI (Powell y Tabachnick 2013).

En Argentina, *Ae. aegypti* estuvo presente durante la primera mitad del siglo pasado en las provincias del norte y centro del país: Jujuy, Salta, Formosa, Misiones, Corrientes, Chaco, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires. En 1963, se lo consideró erradicado por el Ministerio Nacional de Salud Pública y en 1965 por el Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (Vezzani y Carbajo 2008). A finales de los años 80 se detectó la reinfestación, en Misiones (Posadas y Puerto Iguazú) y en Formosa (Clorinda y Puerto Pilcomayo). En 1991 *Ae. aegypti* fue hallado en Quilmes (Buenos Aires) y en 1994 en las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán. En 1995 se confirmó su presencia en Córdoba, en la ciudad de Buenos Aires y en las provincias de Corrientes, Chaco, Santa Fe y Entre Ríos (Figura 1.1) (Boffi 2002). En el año 2000 se registró su presencia en la provincia de Mendoza (Departamento de Guaymallén), siendo el hallazgo más occidental; y también en la provincia de La Pampa (Santa Rosa), correspondiendo al informe más austral. Finalmente, Rossi (2015) cita a la especie en todas las regiones del país, incluida Cuyo y la provincia de Neuquén (Figura 1.1).

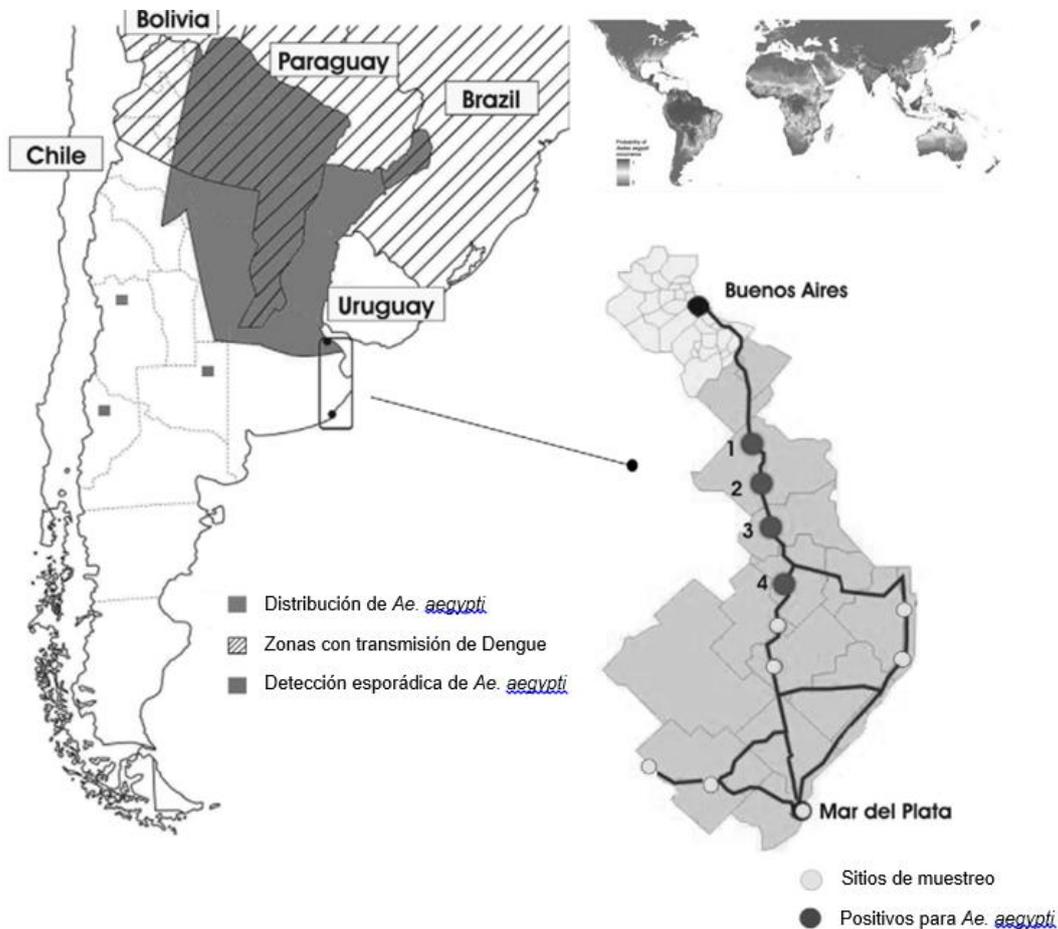


Figura 1.1 Distribución geográfica de *Ae. aegypti* (gris oscuro) en Argentina (figura adaptada de Díaz-Nieto et al. 2013).

Por otro lado, *An. pseudopunctipennis* es el vector de la malaria más ampliamente distribuido en América. Es el principal responsable de su transmisión en varios países, incluyendo Argentina, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Ecuador, Perú, Venezuela, Bolivia, Colombia, Paraguay, Antillas, Trinidad y Tobago y Brasil (Sasse y Hackett 1950, Darsie y López 1980, Fleming 1986, PAHO 1991, Berti et al 1993, Estrada-Franco et al. 1993, Fernández-Salas et al. 1994). Su distribución incluye desde Kansas en Estados

Unidos hasta el norte de Argentina (Córdoba y San Luis) y Chile (Tarapacá) (Figura 1.2 A) (Shannon et al. 1927, Darsie y López 1980, Darsie y Ward 1981). La aplicación de insecticidas y la modificación ambiental pudieron afectar la distribución de *Anopheles pseudopunctipennis*, cuya área de distribución abarcaba las provincias del NOA, incluyendo Córdoba, Formosa, Santa Fé y Santiago del Estero, totalizando 10 provincias (Figura 1.2 B) (Bejarano 1957). Solo a partir de los estudios de Dantur Juri et al. (2005) y Linares et al. (2014), la especie se cita nuevamente para Jujuy, La Rioja, Salta y Tucumán (Figura 1.2 C).

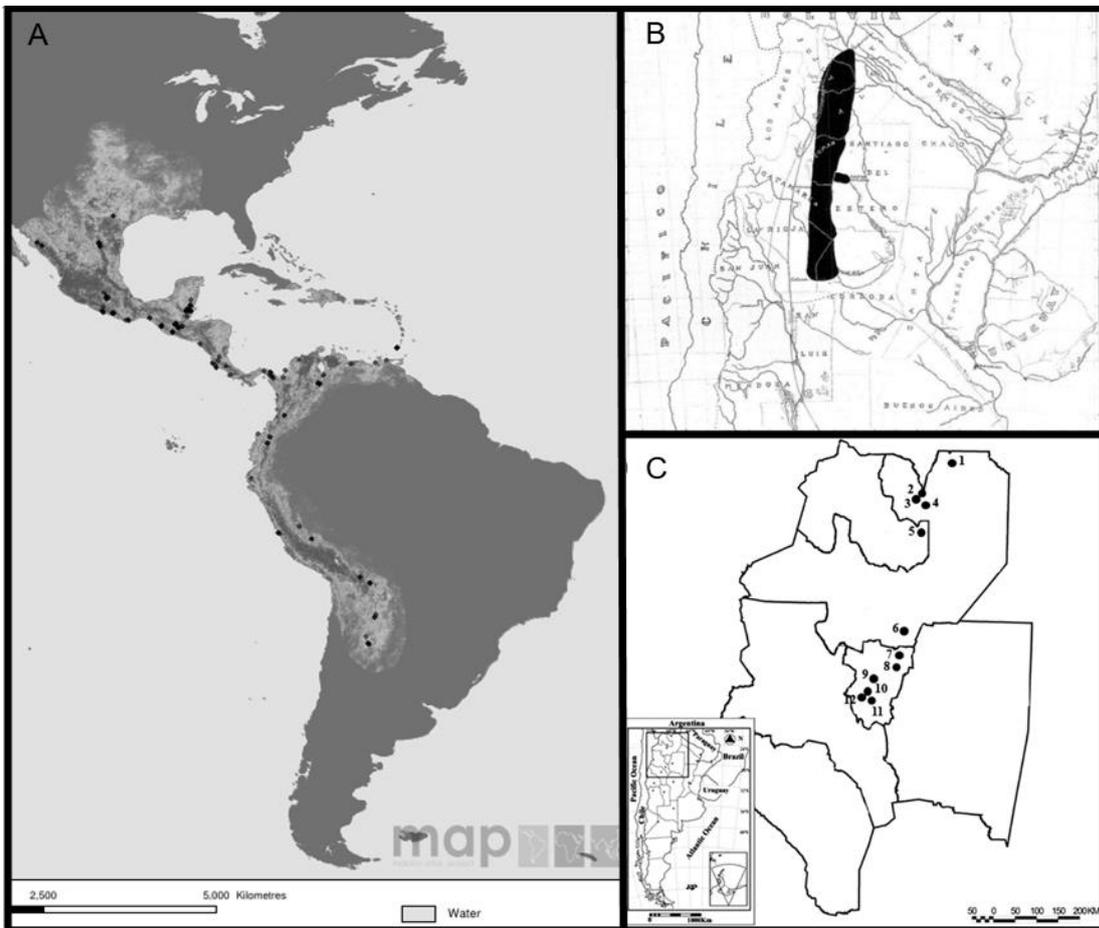


Figura 1.2 A Mapa predictivo de la distribución de *An. pseudopunctipennis* (Sinka et al. 2010), B Distribución geográfica de *An. pseudopunctipennis* en Argentina durante 1927 (Dantur Juri y Zaidenberg 2016) y C Localidades donde se colectaron larvas de *An. pseudopunctipennis* en el noroeste de Argentina (Dantur Juri et al. 2014).

1.2.2. Ciclo de vida

Los mosquitos poseen un ciclo de vida holometábolo con diferentes estados de desarrollo: los estados de huevo, larva y pupa, acuáticos, y el adulto, volador. Las hembras de *Ae. aegypti* depositan los huevos individualmente en las paredes de recipientes artificiales por encima del nivel de agua. Cuando los huevos quedan sumergidos bajo el agua, la mayoría eclosiona rápidamente, pero otros necesitan ser mojados varias veces para eclosionar; estos son capaces de resistir largos períodos de desecación, que pueden prolongarse por más de un año en algunas ocasiones. Luego de la eclosión, las larvas pasan por un ciclo de cuatro estadios larvales, que se alimentan del material orgánico en las paredes y el fondo del recipiente que habitan. Como otras larvas de mosquitos, la larva de *Ae. aegypti* posee la cabeza y el tórax ovoides y el abdomen presenta nueve segmentos. Sin embargo el sifón, órgano utilizado para respirar en la superficie del agua, es más corto que en la mayoría de los otros culícidos (Clements 1999).

La relación física de una larva de mosquito con la superficie del agua está determinada por su densidad relativa y las fuerzas de superficie. En general, las larvas de *Aedes* tienen una densidad relativa menor a 1 y, cuando no están nadando, flotan en la superficie, mientras que las larvas de *Anopheles* generalmente tienen densidades relativas mayores a 1 y para mantenerse en la superficie del agua utilizan las fuerzas de tensión superficial. Debido a esto, la posición de reposo también es diferente en los distintos géneros: las larvas de *Aedes* se mantienen en una posición casi vertical mientras que las de *Anopheles* permanecen paralelas a la superficie del agua.

Las pupas son la última fase del ciclo acuático y, aunque no se alimentan, son muy activas y se desplazan por todo el recipiente, reaccionando rápidamente ante diferentes estímulos externos (Clements 1999). El adulto que emerge es un mosquito de color negro. En el dorso del tórax presenta diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira". Los segmentos tarsales de las patas poseen un anillado característico. El macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y sus palpos más largos (Clements 1999). Las hembras son las únicas que succionan sangre, mostrando preferencia por la sangre humana, necesaria como fuente de proteínas para el desarrollo de los huevos. La alimentación sanguínea se lleva a cabo principalmente durante el día, en las primeras horas de la mañana o al anochecer. Debido a su estrecha relación con los seres humanos, *Ae. aegypti* es esencialmente un mosquito urbano, y se encuentra en mayor abundancia en poblados y ciudades (Figura 1.3 A).

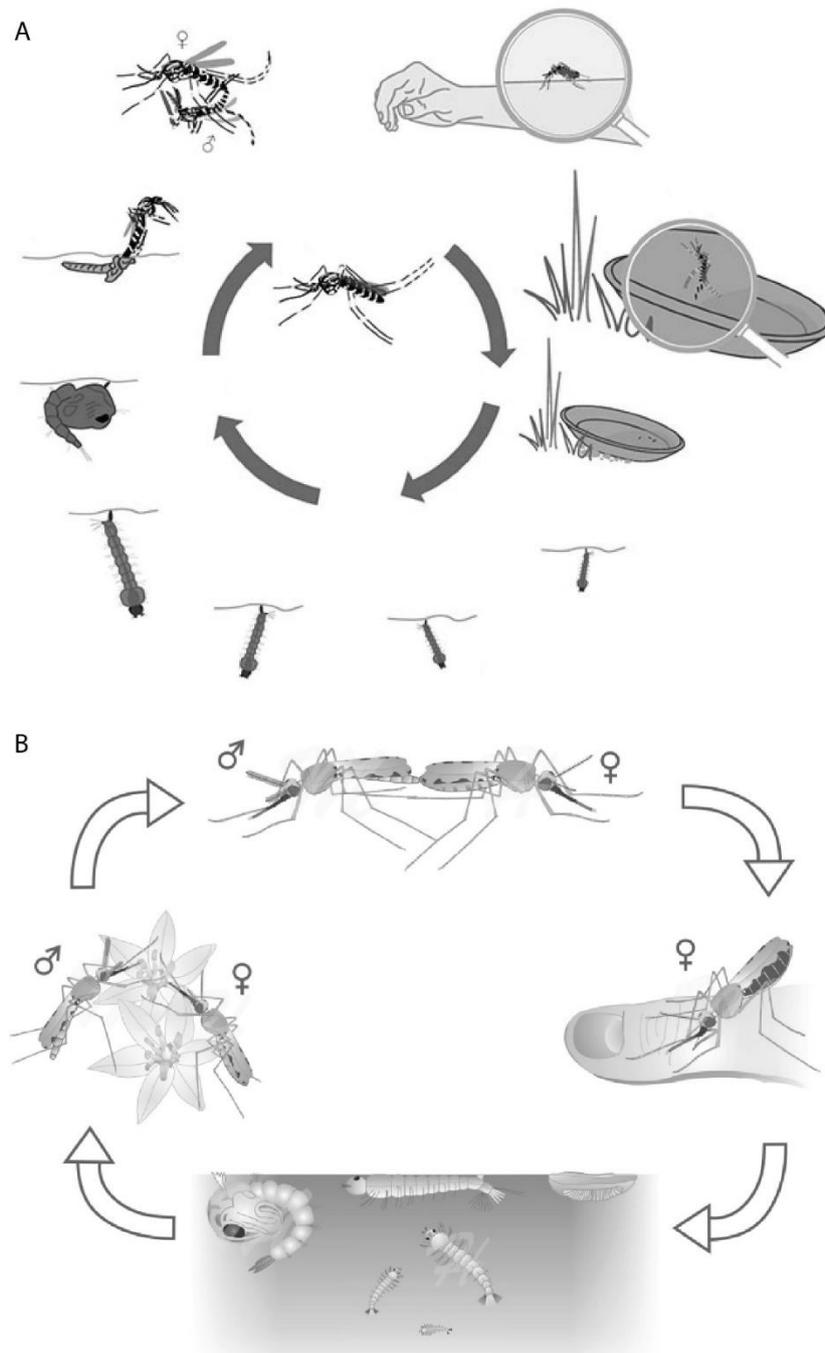


Figura 1.3 Ciclo de vida de mosquitos de los géneros *Aedes* (A) y *Anopheles* (B).

El ciclo de vida de *An. pseudopunctipennis* es similar al previamente descrito para *Aedes*. En este caso las hembras ponen los huevos individualmente sobre la superficie del agua en márgenes de arroyos de montaña (Dantur Juri 2016). Los huevos de esta especie poseen flotadores a ambos lados y no son resistentes a la desecación. A diferencia de muchos otros mosquitos, las larvas

de *Anopheles* no disponen de un sifón respiratorio, y respiran a través de espiráculos situados en el octavo segmento abdominal. Los hábitats larvales de *An. pseudopunctipennis* se caracterizan por ser cuerpos de agua clara, dulce y oxigenada, con exposición parcial al sol y con abundante cantidad de algas verdes filamentosas. La presencia de algas verdes (en su mayoría del género *Spirogyra*) es una característica típica de los hábitats larvales de esta especie (Savage et al. 1990, Manguin et al. 1996, Sinka et al. 2010). Los adultos de *Anopheles* presentan un patrón de escamas muy característico sobre las alas, y las hembras poseen palpos maxilares más desarrollados que los de otros géneros de mosquitos. Otro rasgo característico es su postura de reposo, ya que disponen el abdomen de forma empinada, en contraposición con el abdomen paralelo a la superficie de reposo que se observa en otros géneros. Los adultos de *An. pseudopunctipennis* son crepusculares, presentan picos de actividad al atardecer (Lugo Villalta 1991). En la región de noroeste argentino, los adultos de *An. pseudopunctipennis* suelen encontrarse en el borde de la selva y la mayor abundancia de este mosquito se observó durante la primavera, debido a la disponibilidad de cuerpos de agua con condiciones propicias para el desarrollo de sus estados inmaduros (Figura 1.3 B) (Dantur Juri et al. 2005, Dantur Juri 2016).

1.2.3. Cría en el laboratorio

El establecimiento de colonias de laboratorio es fundamental para la investigación de enfermedades transmitidas por mosquitos, y la incapacidad de mantenerlas es la principal causa de investigaciones fallidas. En condiciones naturales, las hembras del género *Anopheles* se aparean cuando se encuentran con un enjambre de machos. En condiciones de laboratorio, el

espacio limitado de una jaula estándar de 30 cm³ u otra área pequeña parece inhibir o reducir la formación de los enjambres de machos, esto provoca un fallo en la cópula. A este comportamiento se lo denomina *eurígamo* y se observa en muchas especies del género *Anopheles*, entre ellas *An. pseudopunctipennis*. Por otro lado, otros mosquitos pueden copular sin la necesidad de formar enjambres de machos, y se aparean fácilmente en espacios pequeños, como por ejemplo muchas especies que pertenecen al género *Aedes* (entre ellas *Ae. aegypti*), *Culex* y *Mansonia*. A este comportamiento se lo denomina *estenógamo* (Wharton 1953, Clements 1999, Wijit et al. 2016).

A pesar del comportamiento *eurígamo* de *An. pseudopunctipennis*, se lograron establecer crías de laboratorio de este mosquito en Panamá, El Salvador, Colombia, México y Bolivia (Baerg 1971, Darsie y Lopez 1980, Ramirez et al. 1986, Rodriguez-Perez 1990, Lardeux et al. 2007). Para establecer la cría en algunos casos se utilizó la técnica de apareamiento forzado, que consiste en inseminar a las hembras de mosquitos de manera artificial, utilizando un macho decapitado clavado en una aguja (McDaniel y Horsfall 1957, Ramirez et al. 1986). Como esta técnica es dificultosa y lleva mucho trabajo otros autores intentaron estimular la cópula utilizando simuladores de atardecer (Baerg 1971, Rodriguez-Perez 1990, Lardeux et al. 2007). Si bien estos autores pudieron establecer crías de laboratorio de *An. pseudopunctipennis* utilizando la técnica de apareamiento forzado y los simuladores de atardecer, la falta de trabajos experimentales posteriores dan indicios de que estas crías no resultaron fáciles de mantener. Debido a esto, la información que hay sobre *An. pseudopunctipennis* es escasa, y la mayoría de los estudios están asociados a su ecología en condiciones naturales (Rejmankova et al. 1991, Delgado-

Gallardo et al. 1994, Manguin et al 1996, Berti et al. 1998, Bond 1999, Dantur Juri et al. 2005, 2010a, 2010b, 2014a, 2014b, Bond et al. 2006, Galante et al. 2014, Dantur Juri 2016). Actualmente solo existe un estudio que evalúa el comportamiento de adultos de *An. pseudopunctipennis* en respuesta a componentes del alga (*Spirogyra*) en condiciones de laboratorio (Torres-Estrada et al. 2007).

1.3 Control

El riesgo que ocurra una epidemia de enfermedades vectoriales en una región (como las descritas en la sección 1.1) está dado por tres condiciones fundamentales: 1) que exista circulación del agente patógeno (personas infectadas), 2) que existan poblaciones susceptibles de enfermarse y 3) que esté presente el vector que lo transmita. Por ello el control de las densidades poblacionales de los mosquitos es crucial, y representa la forma más sencilla y económica de control epidemiológico. Este control sanitario se puede realizar mediante un manejo integrado por medio de diversas estrategias, utilizando tanto agentes químicos como biológicos, físicos o ambientales. El manejo integrado de vectores es el empleo de diferentes recursos con el menor costo ambiental posible, y según las necesidades específicas de cada situación, adecuando las estrategias según se trate de zonas endémicas o epidémicas. El desarrollo de estrategias de manejo integrado de mosquitos comprende cinco aspectos:

1. **Planificación gubernamental:** debe existir un ente gubernamental que regule y haga un seguimiento de las estrategias de control.

2. **Participación comunitaria:** es importante informar y capacitar a la población para que colabore con las estrategias de manejo.
3. **Control ambiental:** modificando las condiciones ambientales para interrumpir el ciclo de vida del vector.
4. **Control químico:** utilizando compuestos larvicidas y adulticidas que actúen directamente sobre los mosquitos.
5. **Control biológico:** el uso de predadores y parásitos de mosquitos.

1.3.1. *Control ambiental*

La gestión ambiental basada en principios ecológicos representa una intervención eficaz y rápida para el control de vectores (WHO 1982, Ault 1994). El mosquito *Ae. aegypti* se vincula íntimamente con las actividades humanas dentro y fuera de las viviendas, dado que el agua contenida en los recipientes es el sitio de cría de este mosquito. La acumulación de recipientes es una de las causas que inciden primordialmente, de manera indirecta, en la transmisión del dengue y el resto de las enfermedades transmitidas por este mosquito (WHO 2009). Entonces, para evitar la proliferación de este mosquito en las viviendas, se requiere concientizar a los ciudadanos de manera tal que adquieran un rol activo en el ordenamiento de su entorno. Debido a ello, la eliminación de estos criaderos es el método más eficiente para reducir la población de mosquitos. Sin embargo, se observa que un alto porcentaje de la población conoce acerca del mosquito, su papel en la transmisión y cómo prevenirla, pero aun así tienen criaderos en sus hogares. Una de las posibles causas de este hecho podría ser subestimar la contribución individual de los recipientes domésticos a la población adulta perceptible (Burrioni et al. 2016).

Por otro lado, la manipulación del hábitat que involucra prácticas de manejo del agua, controles de riego o la eliminación de la vegetación acuática ofrece la posibilidad de adaptar la intervención a los requisitos ecológicos específicos de la población local de insectos vectores (Kitron 1987, Ault 1994). La vegetación acuática facilita la reproducción y la supervivencia de los mosquitos anofelinos a través de tres mecanismos: abundancia de recursos alimenticios (Smock y Stoneburner 1980, Rejmankova et al. 1991), protección física contra las perturbaciones y refugio contra los predadores (Gregg y Rose 1982, Orr y Resh 1989), y condiciones favorables de microclima y acceso a los sitios de oviposición para adultos (Hall 1972, Orr y Resh 1992). En particular, los estados inmaduros de *An. pseudopunctipennis* se crían en meandros de arroyos de montaña íntimamente asociados con algas filamentosas del género *Spirogyra* (Manguin et al. 1996). Por lo que la manipulación del hábitat mediante la extracción de algas filamentosas puede ser una importante estrategia de control sostenible de *An. pseudopunctipennis* (Bond et al. 2004). Este manejo ambiental fue implementado en Argentina para disminuir la cantidad de casos de malaria en el primer período de eliminación de la malaria, 1891-1939 (Dantur Juri y Zaidenberg 2016).

1.3.2. Control químico

Además de los programas de saneamiento ambiental y eliminación de criaderos el control de vectores generalmente se complementa mediante el uso de métodos químicos.

a. Control de adultos

La metodología más utilizada para el control químico de los adultos de *Ae. aegypti* es el rociado espacial de insecticidas en forma de microgotas. La eficacia de este tipo de rociado, ULV (*Ultra Low Volume*), depende de factores tanto metodológicos (tamaño de gota, velocidad del vehículo de aplicación, solvente utilizado, etc.) como ambientales (dirección del viento, temperatura, hora de aplicación, etc.). También es importante que el vector esté activo durante la aplicación y que la comunidad colabore manteniendo abiertas las puertas y ventanas de las viviendas para aumentar la penetración del producto. En Argentina se han utilizado para el rociado ULV el organofosforado fenitrotión y los piretroides deltametrina y permetrina (tanto la mezcla racémica como formulaciones enriquecidas con el isómero *cis*) (Harburguer et al. 2016).

b. Control de larvas

El estado más vulnerable en el ciclo de vida de los mosquitos es la larva. Es por esto que, entre las alternativas de control vectorial propuestas, el control de larvas en sus sitios de desarrollo es ampliamente aceptado y utilizado (Ordoñez Gonzalez et al. 2008, OMS 2018). Sin embargo, no es recomendable para especies cuyos criaderos están constituidos en sitios naturales. Este método de control ha resultado ser muy eficaz contra *Ae. aegypti*, pese a que es muy tedioso y poco práctico de aplicar debido a la gran cantidad y diversidad de recipientes a inspeccionar.

Como en algunas ocasiones los larvicidas se usan en agua almacenada de consumo, estos deben tener muy baja toxicidad para los mamíferos y no deben alterar el sabor, olor o color del agua. En la actualidad, pocos compuestos

cumplen con estos criterios: los reguladores de crecimiento (IGR), el organofosforado temefós y el piretroide permetrina, aunque este último está siendo cuestionado para este tipo de uso (WHO 2008).

Existen una gran variedad de clases de los larvicidas y adulticidas con diversos modos de acción. A continuación se describen las más importantes para el control de *Ae. aegypti*:

- **Organofosforados:** Este término incluye a todos los insecticidas derivados del ácido fosfórico. Actúan como inhibidores irreversibles de la acetilcolinesterasa (AChE), enzima que hidroliza la acetilcolina, un neurotransmisor presente en la sinapsis, que permite la continuidad del impulso nervioso. Si la acetilcolinesterasa es inhibida, la acumulación de acetilcolina en la sinapsis colinérgica provoca la aparición de síntomas tóxicos cuya secuencia típica es la pérdida de coordinación muscular, convulsiones y muerte. En condiciones normales, una vez que la acetilcolina ha cumplido su función, es hidrolizada inmediatamente por la AChE, generando como producto de la reacción colina y acetato, que son inocuos para el organismo. La AChE es una enzima muy importante del sistema nervioso, tanto en vertebrados como invertebrados, por lo que el modo de acción de los insecticidas organofosforados es el mismo en ambos grupos.
- **Piretroides:** Son análogos sintéticos de las piretrinas, un conjunto de moléculas insecticidas obtenidas a partir del piretro, un componente que se extrae de las flores de determinadas especies de *Chrysanthemum*. El piretro ha sido un insecticida muy exitoso, pero hay una serie de problemas

asociados con su uso: es degradado rápidamente en presencia de la luz solar (su vida media promedio al aire libre es de unas pocas horas) y es fácilmente detoxificado por el metabolismo de los organismos blanco. En décadas recientes, los esfuerzos de la investigación se han encaminado a la obtención de productos de síntesis con estructura similar a las piretrinas, pero con propiedades más favorables, conocidos como piretroides. Son más estables en presencia de luz solar (su vida media promedio al aire libre es de un mes) y son muy efectivos contra una gran variedad de insectos plaga. Los piretroides, al igual que las piretrinas, interfieren con el funcionamiento de los canales de sodio dependientes de voltaje de las neuronas. Las células nerviosas intoxicadas producen descargas repetitivas del impulso nervioso, llevando a la parálisis y muerte del insecto.

- **Toxinas microbianas:** Desde hace tiempo se conoce la acción de distintas bacterias patógenas para los insectos, sin embargo, solamente unas pocas han alcanzado importancia en los tratamientos de control de plagas. Un ejemplo de ello es *Bacillus thuringiensis (Bt)*. Esta bacteria produce una protoxina o cristal tóxico durante la fase de esporulación denominada endotoxina que es depositada junto con la espora y es altamente tóxica para los insectos susceptibles, quienes deben ingerirlas para que se ejerza su acción. Una vez ingerida la bacteria, la protoxina se disuelve en el pH alcalino del intestino del insecto, se produce su activación proteolítica y se unen a receptores específicos localizados en la superficie de las membranas epiteliales. Como consecuencia, las células se destruyen y la larva cesa de alimentarse. Además, el pH alcalino provoca la germinación

de las esporas, ocasionando la proliferación de las bacterias. Finalmente la larva muere por inanición y/o septicemia.

- **Reguladores del crecimiento (IGR):** Los reguladores del crecimiento (IGR, del inglés *Insect Growth Regulator*) son capaces de interferir con los procesos de crecimiento, desarrollo y metamorfosis de los insectos blanco. Hay varios tipos de reguladores del crecimiento, según el proceso de desarrollo fisiológico con el que interfieren, por ejemplo: los agonistas y los antagonistas de la hormona de la muda, los antagonistas de la hormona juvenil, los análogos de la hormona juvenil y los inhibidores de la síntesis de quitina, siendo estos últimos dos los más numerosos. Los inhibidores de la síntesis de quitina, interfieren con la síntesis de este polímero y ocasionan la formación de una cutícula anormal. La larva o pupa no puede mudar correctamente y muere en el intento sufriendo una rápida deshidratación. Los análogos de la hormona juvenil afectan mayormente la muda de larva a pupa o de pupa a adulto. Según la dosis, su efecto hace que las pupas o los adultos no se formen correctamente, o generan la aparición de larvas supernumerarias o adultoides que no existen en condiciones naturales (Casida y Quistad 2004).

En Argentina, el larvicida más utilizado es el organofosforado temefós, pero como se ha detectado una resistencia incipiente a este activo, está siendo reemplazado por el uso de *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) (Seccacini et al. 2008).

Si bien el control de las larvas de *Anopheles* tiene una eficacia importante es poco utilizado en Argentina. Antes de 1940, las operaciones contra la malaria

se centraron en el control de las larvas del mosquito vector. Con el descubrimiento del DDT el principal método de control fue el rociado de interiores dirigido a mosquitos adultos. Posteriormente con la prohibición en todo el mundo del DDT, los tratamientos residuales con este insecticida fueron reemplazados por la aplicación de formulados en base a piretroides u organofosforados (Harburguer et al. 2016).

1.3.3. *Control biológico*

La predación es una de las principales fuerzas que estructuran las comunidades ecológicas, y está documentada sobre todas las etapas de los ciclo de vida de los mosquitos. Sin embargo, esta interacción ha sido ampliamente estudiada para los estados acuáticos (larvas y pupas), cuya interacción con los predadores podría afectar la regulación poblacional de los mosquitos debido a procesos denso-dependientes (Juliano 2007). En Argentina hay numerosos organismos que son predadores y que comparten hábitat con estados inmaduros de mosquitos. La coexistencia depende principalmente de las características del hábitat que determina cuales son las especies de predadores y de mosquitos que pueden colonizar cada uno de ellos. Los recipientes artificiales (sitios de cría de *Ae. aegypti*) son los hábitats con menor cantidad y diversidad de predadores, con excepción de algunos de gran tamaño. Si bien no se conocen estudios específicos sobre los predadores de mosquitos en estos ambientes, Fischer et al. (2016) confirman la presencia frecuente de algunos insectos en piscinas en desuso. A pesar de que los ambientes de arroyo de montaña parecen presentar altos valores de riqueza y diversidad de taxones que podrían ser predadoras de este mosquito (Von Ellenrieder 2007, Torres et al. 2008), no existen hasta el momento trabajos que

estudien la asociación entre mosquitos y sus predadores potenciales en ambientes de la región.

1.4 Repelentes

Entre las estrategias para lidiar con las enfermedades transmitidas por vectores la OMS sugiere el uso de repelentes para disminuir el contacto humano-vector.

1.4.1. Definiciones y terminología

El término “repelente” deriva del latín *repellere* que significa alejar. Dethier define repelente como “estímulo que genera una acción de evasión” (Dethier 1948) o “sustancia que hace que un insecto realice movimientos orientados que lo alejan de la fuente que la emite” (Dethier y Browne 1960).

En el campo de la entomología médica, es común observar en algunas publicaciones términos tales como irritante (*irritancy*) o excito-repelencia (*excito-repellency*) (Miller et al. 2009) para referirse a la actividad hiperlocomotora que se observa en insectos expuestos a insecticidas. Grieco et al. (2007) introdujeron dos nuevos términos: irritante por contacto (*contact irritant*) y repelente espacial (*spatial repellent*) para referirse a aquellos compuestos químicos que hacen que un insecto se aleje de la fuente de estímulo, mediante el tacto o el olor respectivamente.

1.4.2. Desarrollo de repelentes sintéticos

El interés por el desarrollo de repelentes para evitar enfermedades transmitidas por insectos fue iniciado en el área militar. En India se utilizaban repelentes a base de *Citronella*, alcanfor y parafina, pero tenían la desventaja de ser de una duración limitada. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)

durante 1942 a 1945 se interesó por el desarrollo de métodos repelentes o insecticidas para controlar pulgas, las niguas (*Tunga penetrans*). Los primeros productos desarrollados fueron el dimetilftalato (DMP, 1929), la Indalona® (1937) y el 2-etil-1,3-hexanodiol (1939). En Estados Unidos se popularizó un repelente que contenía estos tres compuestos, pero fueron retirados del mercado en 1991 debido a estudios que advertían sobre la toxicidad del etilhexanodiol (Moore et al. 2006).

La DEET, (N,N-dietil-3-metilbenzamida o N,N-dietil-m-toluamida) es sin dudas uno de los principales descubrimientos en el campo de la protección contra insectos (Figura 1.4 A). Hoy en día se mantiene en el podio como principal y más efectivo repelente, aun después de más de 60 años desde su descubrimiento en el año 1953 (Moore 2006).

La DEET es un repelente de amplio espectro, altamente efectivo contra mosquitos de diferentes especies: *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*; *Culex sp.*, *Mansonia sp.*, etc. Además es repelente contra varias especies de *Anopheles*: *An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. dirus*, *An. minimus* y *An. darlingi*. Sumado a esto, es activo contra otras especies de insectos y ácaros como simúlidos, moscas, chinches de cama, pulgas, garrapatas, etc. (Moore 2006).

A pesar de su gran efectividad, estudios recientes apuntan a buscar repelentes alternativos a la DEET, dado que se ha puesto en duda su seguridad toxicológica. Se ha responsabilizado a la DEET de producir encefalopatías y neurotoxicidad en niños, sin embargo, estos sucesos son escasos y en general estaban ligados a un excesivo o mal uso de la DEET (Snyder 1986, Osimitz 1997, Briassoulis 2001, Abdel-Rahman 2001).

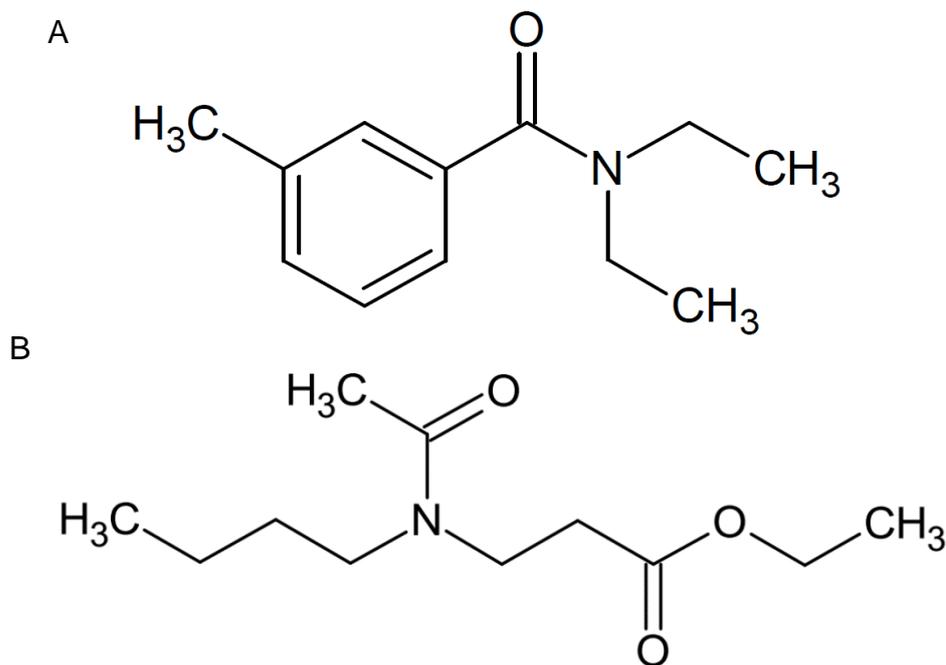


Figura 1.4 Estructura química de (A) la DEET (N,N-dietil-m-toluamida) y (B) del IR3535.

Por otro lado, el IR3535, etil éster del ácido 3-(N-acetil-N-butil) aminopropiónico, fue desarrollado en 1975 por la empresa Merck® y se encuentra en el mercado Europeo desde su creación (Figura 1.4 B). Es de baja toxicidad pero suele ser irritante para ojos y piel. En Estados Unidos está disponible desde 1999 y se lo considera como bioplaguicida, ya que es un derivado de un aminoácido. En general todas las publicaciones referidas a este compuesto lo consideran con un efecto repelente similar al DEET, aunque en algunos casos la duración de su efecto ha sido menor. Se ha demostrado que el IR3535 tiene eficacia similar al DEET contra *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. taeniorhynchus* entre otros, pero no contra *Anopheles dirus*. La Organización Mundial para la Salud (OMS/WHO) ha declarado al IR3535 como un compuesto seguro y efectivo para el uso en humanos. Si bien hay una gran cantidad de trabajos que estudian el efecto repelente de la DEET

y el IR3535 en varias especies de mosquitos, hasta ahora no existen trabajos que lo evalúen en *An. pseudopuncpennis*.

1.5 Perspectivas de control

1.5.1. Compuestos derivados de plantas

Varias sustancias de origen vegetal presentan actividad biológica, como tóxicas, repelentes, antialimentarias y/o inhibidoras del crecimiento y desarrollo en artrópodos plaga (Coats 1994). En particular, los aceites esenciales están compuestos de sustancias volátiles que se encuentran en una variedad de especies vegetales (Weinzieri 2000). Estos aceites presentan características como su fácil extracción, son biodegradables y presentan baja toxicidad contra los mamíferos y alta eficacia contra un amplio espectro de plagas de insectos (Amer y Mehlhorn 2006, Elango et al. 2009, Rahuman et al. 2009, Michaelakis et al. 2009, Isman y Grieneisen 2014).

Durante las últimas décadas, la investigación centrada en los aceites esenciales como sustancias potenciales para desarrollar nuevos larvicidas de mosquitos aumentó considerablemente. Pavela (2015) ha demostrado que los aceites esenciales que muestran un buen efecto de larvicida ($LC_{50} < 100$ ppm) contra los mosquitos provienen de sólo cinco familias: Lamiaceae, Cupressaceae, Rutaceae, Apiaceae y Myrtaceae. En particular, es interesante el estudio *Eucalyptus spp.* (Myrtaceae) porque se cultivan en todo el mundo, además diversos estudios demostraron que sus aceites tienen un gran efecto larvicida contra *Ae. aegypti* (Zhu et al. 2006, Lucia et al. 2007, Lucia et al. 2008, Cheng et al. 2009).

Por otro lado, los aceites esenciales se han utilizado terapéuticamente durante siglos. Antes de la aparición de DEET, las personas utilizaban materiales derivados de plantas para repeler a los artrópodos de importancia médica, incluyendo mosquitos (Curtis et al. 1990). Los aceites esenciales de un gran número de plantas tienen propiedades repelentes contra los mosquitos (Hao et al. 2008, Mann y Kaufman 2012). De los géneros de plantas que contienen aceites esenciales prometedores para utilizar como repelentes, los más estudiados son *Cympogon spp.*, *Ocimum spp.* y *Eucalyptus spp.* (Nerio et al. 2010). A pesar de esto, solo pocas especies de plantas presentaron aceites esenciales con un tiempo de protección repelente similar al DEET (Barnard 1999, Gillij et al. 2008, Sritabutra y Soonwera 2013, Satpute et al. 2015, Tisgratog et al. 2016).

En particular, la especie *Eucalyptus nitens* Maiden (*Shining gum*) es originaria de Australia, y su resistencia a bajas temperaturas permite cultivarla en el sur de Argentina y Chile (FAO 1981, Prado y Barros 1989, Eldridge et al. 1994). Además, la caracterización química del aceite esencial de esta especie realizada por Naspi (2015) demuestra que tiene una composición química compleja, con algunos monoterpenos, esteroides no terpenoides y β -tricetonas cíclicas (Tabla 1.1). Esta complejidad en la composición química resulta interesante, ya que podría traducirse en una actividad biológica relevante en mosquitos.

Tabla 1.1 Composición química de *E. nitens* (extraído de Naspi et al. 2015)

No.	Componente	Porcentaje (%)
1	Propionato de isobutilo	0,22
2	Isobutirato de isobutilo	6,47
3	α -pineno	0,11
4	Metacrilato de isobutilo	0,32
5	Propionato de isobutilo	0,24
6	α -felandreno	< 0,1
7	Isovalerato de isobutilo	0,16
8	Isobutirato de isoamilo	4,99
9	Isobutanoato de isopentilo	0,99
10	<i>p</i> -cimeno	22,46
11	Limoneno	1,12
12	1,8-cineol	22,88
13	<i>cis</i> -ocimeno	0,80
14	Terpineno	7,52
15	Linalool	0,35
16	2-nonanol	0,20
17	4-terpineol	1,62
18	γ -terpineol	2,42
19	Geraniol	0,28
20	<i>iso</i> -carvacrol	0,75
21	Timol	0,61
22	Isobutirato de bencilo	0,31
23	Carvacrol	0,61
24	Isobutirato de etil fenilo	0,28
25	Flavesona	11,71
26	Espatulenol	0,53
27	<i>iso</i> -leptospermona	1,77
28	Leptospermona	5,94
29	α -eudesmol	0,28
30	β -eudesmol	0,30
<i>Monoterpenos hidrocarbonados</i>		32,01
<i>Monoterpenos Oxigenados</i>		29,52
<i>Sesquiterpenos Hidrocarbonados</i>		-
<i>Sesquiterpenos Oxigenados</i>		0,81
<i>Compuestos no terpenos (esteres y alcoholes)</i>		14,18
<i>β-tricetonas cíclicas</i>		19,42
Total (%)		95,94
Compuestos no identificados (%)		4,06
Rendimiento del aceite esencial (%)		0,14 \pm 0,01

1.5.2. Uso de moduladores de comportamiento

La utilización de claves químicas como atractantes (sustancia que induce a un animal a realizar movimientos hacia la fuente de emisión) (Dethier et al. 1960) y repelentes para el control de plagas es muy común en la agricultura, debido a

su bajo impacto ambiental. Sin embargo, estas medidas todavía no están muy desarrolladas en el terreno de la salud pública (Bowman et al. 2016). Para que estas herramientas sean efectivas resulta importante que se apliquen en un contexto de manejo integrado. Entre las herramientas que se pueden utilizar para el control de vectores se encuentran:

- **Trampas para adultos cebadas con atractantes:** Estas trampas atraen a los mosquitos adultos y en algunos casos pueden estar combinadas con algún agente letal. Estos atractantes pueden ser visuales (luz UV) y/o químicos; estos últimos pueden ser una o varias sustancias en una proporción definida e incluso provenir de animales vivos. Originalmente las trampas para adultos fueron desarrolladas para realizar muestreos; sin embargo, Okumu et al (2010) sugieren que combinadas con otras estrategias de control, pueden ser efectivas para el control de mosquitos transmisores de malaria en África. Incluso algunas mezclas sintéticas de olores pueden ser preferidas por sobre olores de humanos (Okumu et al. 2010).
- **Ovitrampas con atractantes de oviposición:** los atractantes de oviposición también pueden jugar un papel relevante como metodología de control. Estos compuestos atraen a hembras grávidas a depositar sus huevos en trampas que contienen insecticidas. Por ejemplo, en Kenia se combinó un atrayente de oviposición con un regulador de crecimiento (IGR), y esto produjo que las hembras dirigieran su postura de huevos a la trampa, en donde las larvas no pueden completar su desarrollo (Otieno et al. 1988). Unas ovitrampas similares, con el IGR pyriproxifen,

ya fueron desarrolladas en Argentina para el control de *Ae. aegypti* (Harburguer et al. 2016).

- **Repelentes espaciales:** Los repelentes espaciales son productos químicos que en fase gaseosa previenen el contacto del humano con el vector alterando su patrón de comportamiento normal en un área designada (zona segura) lo que genera un espacio inadecuado para el insecto. Esto disuade al vector de entrar en un espacio ocupado por un hospedador reduciendo los encuentros entre humanos y vectores, disminuyendo así la probabilidad de transmisión de patógenos. Entre los repelentes espaciales más usados se encuentran algunos insecticidas piretroides (aletrina) y derivados de plantas, aceites esenciales (*Citronella sp.*, *Cymbopogon sp.*, entre otros) o sus componentes (por ejemplo el eugenol) (Achee et al. 2012).
- **Estrategias *push-pull*:** El término *push-pull* (empujar-tirar) fue definido como una estrategia para el control de plagas de insectos por Pyke et al. (1987). Esta estrategia consiste en el uso de repelentes y atractantes para manipular la distribución de una plaga y reducir de ese modo la utilización de insecticidas. Esta metodología consiste en dirigir el movimiento del insecto plaga, y controlar su distribución y abundancia (Cook et al. 2007). Para esto, el insecto es repelido para que se aleje de un recurso (*push*) usando un estímulo que enmascare el efecto atractante del hospedador. Simultáneamente, el insecto es atraído (*pull*) con otro estímulo a otras áreas que pueden actuar como trampas, facilitando su eliminación. En el caso de los mosquitos, pueden utilizarse como repelentes, compuestos de origen natural o artificial, y como

atractantes compuestos del sudor humano o de otros hospedadores preferidos (Gonzalez et al. 2016).

1.6 Objetivos generales

En base a lo expuesto los objetivos de este trabajo de tesis fueron:

1. Estudiar el efecto de compuestos moduladores del comportamiento y agentes ecológicos en larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* (Capítulo 2).
2. Caracterizar la respuesta toxicológica y comportamental de larvas de ambas especies a larvicidas de distinta clase (Capítulo 3).
3. Evaluar el efecto repelente del aceite esencial de *E. nitens* en adultos las especies mencionadas (Capítulo 4).

Comportamiento de larvas de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti* frente a moduladores de comportamiento y agentes ecológicos

2.1 Introducción

El comportamiento de las larvas de los culícidos se relaciona principalmente con sus necesidades de respiración y nutrición, y con la evasión a predadores (Clements 1999). Estos comportamientos pueden ser muy variables y pueden depender de los ambientes donde se crían. Por ejemplo, larvas de mosquitos que se crían en recipientes artificiales, como las de *Ae. aegypti*, al tener una baja presión de predación, invertirán más energía en la búsqueda de alimento y en la respiración que en el desarrollo de estrategias antipredatorias (Fischer et al. 2016). Por otro lado, si bien hasta el momento no existen estudios sobre el comportamiento de las larvas de *An. pseudopunctipennis*, ni se conoce cuál es la presión de predación a las que están sometidas, se sabe que las larvas de este mosquito están íntimamente asociadas a algas filamentosas (*Spirogyra* sp.). Este alga podría brindarles a las larvas recursos alimenticios, contención física frente a corrientes del agua y refugio contra los predadores (Manguin et al. 1996).

Los requerimientos sensoriales de las larvas de mosquitos son más limitados que los de los adultos, ya que presentan un número menor de estructuras sensoriales. Además, los hábitats acuáticos representan un sitio confinado fácil de identificar para las estrategias de control (Killen et al. 2002). En este sentido, se han desarrollado algunas metodologías que podrían mejorar el control de las larvas basándose en su ecología química. Por ejemplo, la combinación de larvicidas con ciertos atractantes puede aumentar significativamente su eficiencia (González et al. 2016). Por otro lado, el uso de repelentes de larvas puede ayudar a eliminar hábitats larvarios.

Además, la combinación de los mecanismos de atracción y repelencia presenta un efecto sinérgico que resulta atractivo en el diseño de estrategias "push-pull" para controlar los mosquitos en sus sitios de cría. Al alejar a las larvas de ciertos lugares usando repelentes, uno podría alejar a las larvas de los refugios estimulando su movimiento hacia trampas cebadas con atractantes (Thomas et al. 2012, Menger et al. 2014). Si bien se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar nuevos repelentes y atractantes para el control de mosquitos adultos, existen muy pocos estudios que evalúen moduladores de comportamiento en larvas.

En este sentido, estudios previos evaluaron las respuestas comportamentales de grupos de larvas de *Ae. aegypti* a diversos odorantes naturales y sintéticos, como el extracto de levadura y la DEET (Gonzalez et al. 2015). Si bien estos estudios proporcionan información valiosa sobre las respuestas olfativas de las larvas de *Ae. aegypti*, no permiten realizar un análisis detallado de su comportamiento individual frente a compuestos atractantes o repelentes. Además, estos experimentos requieren de un gran número de larvas y resulta difícil realizarlos en especies que son difíciles de criar en condiciones de laboratorio, como *An. pseudopunctipennis* (Lardeux et al. 2007).

Actualmente se han desarrollado numerosas metodologías para estudiar el comportamiento de los organismos en forma individuales. Un ejemplo consiste en el software de seguimiento, EthoVision (Noldus et al. 2001), el cual permite cuantificar el comportamiento de las larvas de los mosquitos, y analizar detalladamente varios parámetros comportamentales. Por ejemplo, expresar el movimiento general de un individuo con mediciones espaciales (distancia,

velocidad, giro, etc.) que el observador humano no puede estimar con precisión (Burešová et al. 1986, Spruijt et al. 1998, Noldus et al. 2001).

2.2 Objetivos e hipótesis

En base a estos antecedentes, los objetivos específicos de este capítulo son:

1. Estudiar la entomofauna asociada a *An. pseudopunctipennis*.
2. Caracterizar el movimiento basal de larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*.
3. Evaluar la respuesta individual de larvas de ambas especies a potenciales moduladores del comportamiento.
4. Evaluar la respuesta individual de larvas de *An. pseudopunctipennis* a distintos agentes ecológicos.

Y se plantearon las siguientes hipótesis:

1. Los estados inmaduros *An. pseudopunctipennis* coexisten con una gran diversidad y abundancia de taxones por los ambientes donde se crían.
2. Las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* al criarse en ambientes tan diferentes presentan distintas estrategias locomotoras para lidiar con estos ambientes.
3. Compuestos que fueron identificados como repelentes y atrayentes en larvas de otras especies de mosquitos también modulan el comportamiento de larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*.
4. Los compuestos químicos presentes en agentes ecológicos a los que *An. pseudopunctipennis* está expuesto en sus sitios de cría modulan el comportamiento de sus larvas.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1. Material biológico

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en establecer la cría de *An. pseudopunctipennis* en condiciones de laboratorio. Se intentó hacerlo en dos lugares en simultáneo: en el CIPEIN (Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina, 34°33'13,92"S; 58°30'31,52"O) y en un lugar cercano al sitio de colecta (Base de la Coordinación Nacional de Control de Vectores, San Ramón de la Nueva Orán, Salta, Argentina, 23°7'42,60"S; 64°19'26,46"O) (Figura 2.1). En ambos sitios se logró criar a las larvas hasta pupas y que emergieran los adultos. También se logró que los adultos se alimenten de una fuente de azúcares (naranja) y de sangre (paloma), pero no se logró que se apareen ni que pongan huevos. Debido a esto se decidió utilizar para los experimentos el material obtenido en el campo teniendo en cuenta sus inherentes limitaciones.

Se intentaron efectuar los experimentos con *An. pseudopunctipennis* en el CIPEIN y se estableció un sistema de envío de material vivo para poder realizarlos. Sin embargo, el material no llegaba en buenas condiciones y los datos obtenidos no eran confiables. Debido a esto, todos los experimentos realizados en esta especie fueron efectuados en un laboratorio *ad hoc* montado en la Coordinación Nacional de Control de Vectores de San Ramón de la Nueva Orán (Salta, Argentina).

Las larvas de *An. pseudopunctipennis* se recolectaron con un cucharón en criaderos naturales en un área montañosa subtropical llamada "El Oculto"

(23°7'1,80"S; 64°29'50,03"O), a 30 km de San Ramón de la Nueva Orán, Salta, Argentina (Figura 2.1). Las colectas se realizaron en octubre del 2016 y noviembre del 2017. Todos los mosquitos utilizados luego de los experimentos fueron fijados y determinados para confirmar su identidad utilizando claves taxonómicas (Darsie 1985).

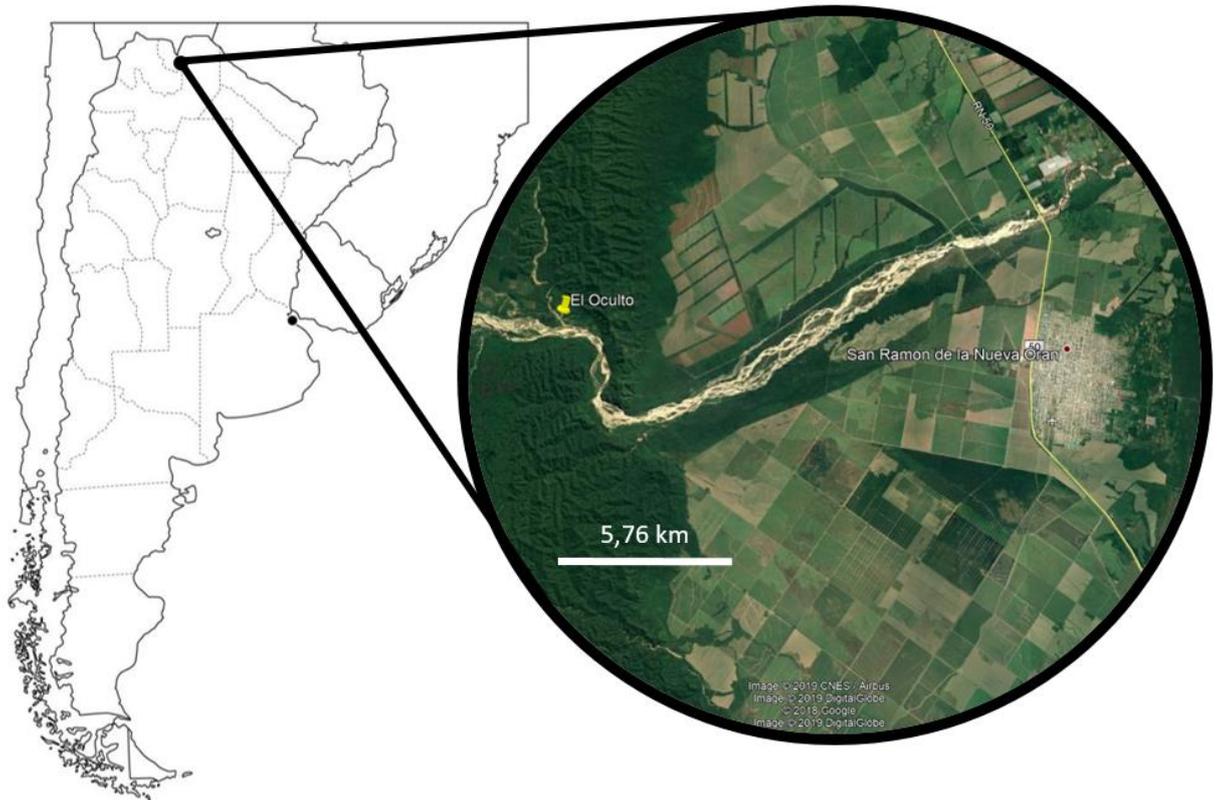


Figura 2.1 Localización de “El Oculito”, sitio donde se colectaron las muestras de larvas de *An. pseudopunctipennis*.

En el muestreo de noviembre del 2017 se separaron las larvas de *An. pseudopunctipennis* de la entomofauna asociada. Las muestras de entomofauna fueron fijadas en el campo con etanol 70 (Figura 2.2). Las larvas de *An. pseudopunctipennis* se transportaron vivas al laboratorio, se guardaron en recipientes con agua declorada y se alimentaron con una mezcla de *pellets* de conejo y levadura.



Figura 2.2 Fotos del muestreo de estados inmaduros de *An. pseudopunctipennis* en “El Oculito”. (A) muestreo de estados inmaduros en el sitio de colecta con cucharón, (B) paisaje de los sitios de colecta, (C) larvas de *An. pseudopunctipennis* en el cucharón y (D) separación del material biológico en el campo.

Respecto a la cepa de laboratorio de *Ae. aegypti*, se utilizaron mosquitos derivados de la cepa Rockefeller de Venezuela. Esta colonia se cría desde 1996 en nuestro insectario a 25 ± 2 °C, 60-70 % de HR y un fotoperíodo de L12: D12 y está libre de exposición a patógenos, insecticidas o repelentes. Las larvas también se alimentaron con una mezcla de *pellets* de conejo y levadura. Los huevos de *Ae. aegypti* se recogieron en un papel de filtro húmedo, se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron durante al menos 30 días. Los huevos almacenados se sumergieron en agua de clorada (500 huevos / 2 L de agua), y se observó eclosión de larvas de primer estadio 24 hs más tarde (Seccacini et al. 2006). Las pupas se transfirieron a contenedores de plástico

de 250 ml con agua y se colocaron en jaulas de acrílico de 20 cm x 20 cm x 20 cm hasta la eclosión de los adultos. A los adultos se les ofreció agua y pasas de uva *ad libitum*, y una paloma inmovilizada para alimentarse tres veces por semana.

Por último, para obtener larvas de una cepa de campo de *Ae. aegypti* se colectaron huevos de ovitrampas colocadas durante el mes de febrero 2017 en el barrio de Devoto, CABA, Argentina (34°36'00"S, 58°31'00"O). Los huevos colectados se sumergieron en agua de clorada, y se observó eclosión de larvas de primer estadio 24 h más tarde. Las condiciones de cría de estas larvas fueron las mismas que las especificadas para la cepa de laboratorio.

2.3.2. *Compuestos químicos*

La N, N-dietil-m-toluamida (DEET) (97%) y la L-prolina (> 99,5%) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, EE. UU.). Para la levadura, se compró levadura de cerveza Virgen® (Tucumán, Argentina). El IR3535 (99,6%) fue una contribución de Merck Argentina (Buenos Aires, Argentina). El agar se adquirió en Parafarm® (Saporiti, Buenos Aires, Argentina).

2.3.3. *Caracterización de la entomofauna asociada a An.*

pseudopunctipennis

Con respecto a las muestras de entomofauna asociada, se contabilizaron y determinaron todos los insectos hasta el nivel taxonómico más fino posible, mediante claves sistemáticas adecuadas para la fauna local (Merritt y Cummins 1984, Darsie 1985, Rossi 2002, Dominguez y Fernandez 2009, Libonatti et al. 2014). Solo se estudió la comunidad estrictamente acuática y se puso especial énfasis en la determinación taxonómica de los insectos. Los dípteros fueron

considerados a nivel de familia y los culícidos fueron identificados hasta el nivel de especie. Además, se consideraron por separado a los adultos y los estados inmaduros de Coleoptera.

2.3.4. *Movimiento basal de larvas de An. pseudopunctipennis y Ae. aegypti*

Para este estudio se utilizaron larvas del cuarto estadio provenientes de dos cepas de *Ae. aegypti*, una de campo y otra de laboratorio. También se utilizaron larvas de *An. pseudopunctipennis* obtenidas de sitios de cría de “El Oculto”. Para todas las larvas se realizó el siguiente procedimiento, se recogieron y lavaron cuidadosamente en agua declorada para eliminar cualquier partícula de alimento y se dejaron durante 2 hs antes de ser utilizadas. Las larvas se transfirieron individualmente a una placa de Petri (9 cm de diámetro) que contenía 40 ml de agua y se la dejó aclimatar durante 10 minutos. Luego, se grabó su comportamiento con una cámara de video digital (Lumix DMS-LS 80, Panasonic, Kadoma, Japón) durante los 10 minutos siguientes. El ensayo se realizó bajo condiciones ambientales de temperatura y humedad controladas ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60-70% HR). Se utilizó una luz fluorescente colgante sobre la arena experimental (con una intensidad de luz de 36 W), para garantizar un contraste suficiente entre el insecto y el fondo del escenario experimental. Para cada cepa, se realizaron treinta réplicas independientes. Se cuantificó actividad larval en los videos grabados utilizando un software de seguimiento (EthoVision® XT10.1), que registró la posición de la larva cada 0,04 s, para calcular las variables de comportamiento (Noldus et al. 2001). Para diferenciar a las larvas del fondo se utilizó el modo “sustracción dinámica”.

Las variables de actividad cuantificadas fueron: a) Distancia (distancia recorrida por las larvas en la arena experimental, en cm), b) Velocidad media (media de la distancia recorrida por las larvas por unidad de tiempo, en cm por segundos), d) Velocidad Angular Absoluta -AAV- (cambio en la dirección del movimiento de las larvas entre dos muestras consecutivas, calculada en radianes por segundos) y e) Estado de movilidad, el cual es el tiempo acumulado, en segundos, de una variable discreta (estado) con tres estados posibles: movilidad alta (HMt), movilidad media (Mt) o inmóvil (It), dependiendo cómo cambian los píxeles del sujeto detectado entre la muestra actual y la muestra anterior que se relaciona con dos umbrales definidos (Grieco et al. 2010). La variable estado de movilidad se estableció para cada muestra, de acuerdo con el valor de la movilidad en relación con los siguientes umbrales:

-Debajo del umbral del 20%, el estado es inmóvil (It).

-Entre el umbral del 20% y el del 60%, el estado es movilidad media (Mt).

-Por encima del umbral de 60%, el estado es movilidad alta (HMt).

Estos parámetros se utilizaron en todos los experimentos en los que se midió la actividad.

2.3.5. *Respuesta de larvas a moduladores del comportamiento*

Los cebos fueron elaborados disolviendo un compuesto odorante (> 99% puro o del grado más alto disponible comercialmente) en una solución de agar-agar precalentada al 5% (70 °C). Los cebos control, Control Agar (CA), se hicieron con una solución de agar precalentado sin odorantes. Para estos ensayos se utilizaron como repelentes la DEET y el IR3535, y como atrayentes extracto de

levadura y el aminoácido prolina. Las concentraciones utilizadas en este estudio fueron 23, 47 y 95 mg/ml para IR3535 y DEET, 10 mg/ml para levadura y 0,7; 1,5 y 3 mg/ml para el aminoácido prolina. Estas concentraciones fueron elegidas, debido a que provocan las respuestas atractantes o repelentes máximas en las larvas de *An. gambiae*, *Ae. aegypti* y *Culex pipiens* (Xia et al. 2008, González et al. 2015). Las respuestas de comportamiento de las larvas a estas concentraciones se compararon con su respuesta al tratamiento control (CA).

Se utilizaron larvas del cuarto estadio de la cepa de campo de *An. pseudopunctipennis* y la cepa de laboratorio de *Ae. aegypti*. Las larvas se lavaron cuidadosamente en agua de clorada para eliminar cualquier partícula de alimento, se mantuvieron a 27 °C y se dejaron sin alimento durante 2 hs. Los ensayos se realizaron en un microcosmos de placa de Petri (9 cm de diámetro) similar al utilizado por Liu et al. (2010) con pequeñas modificaciones. Las larvas se transfirieron individualmente a una pequeña jaula (aro de aluminio de 2 cm de diámetro) que se encontraba en una placa de Petri con 40 ml de agua de clorada. Esta jaula impedía que la larva se mueva libremente en la placa y permitió que se aclimate durante 10 minutos antes de comenzar el ensayo. Mientras tanto, se colocó un cebo de 0,3 g en el lado opuesto de la caja de Petri y se lo dejó 5 minutos para que se genere un halo de concentración de los compuestos incluidos en él (Figura 2.3). Luego, se liberó a la larva en la placa removiendo la jaula y se registró su comportamiento durante 10 minutos con una cámara de video (Panasonic Lumix DMS-LS 80). Las pruebas se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60-70% HR). Se utilizó luz colgante estandarizada (sobre la arena

experimental) para asegurar un contraste suficiente entre el insecto y el fondo de la arena experimental. Se realizaron 10 réplicas independientes, cada una de las cuales consiste en una larva individual para cada compuesto y cada concentración. Las larvas solo se usaron una vez por réplica.

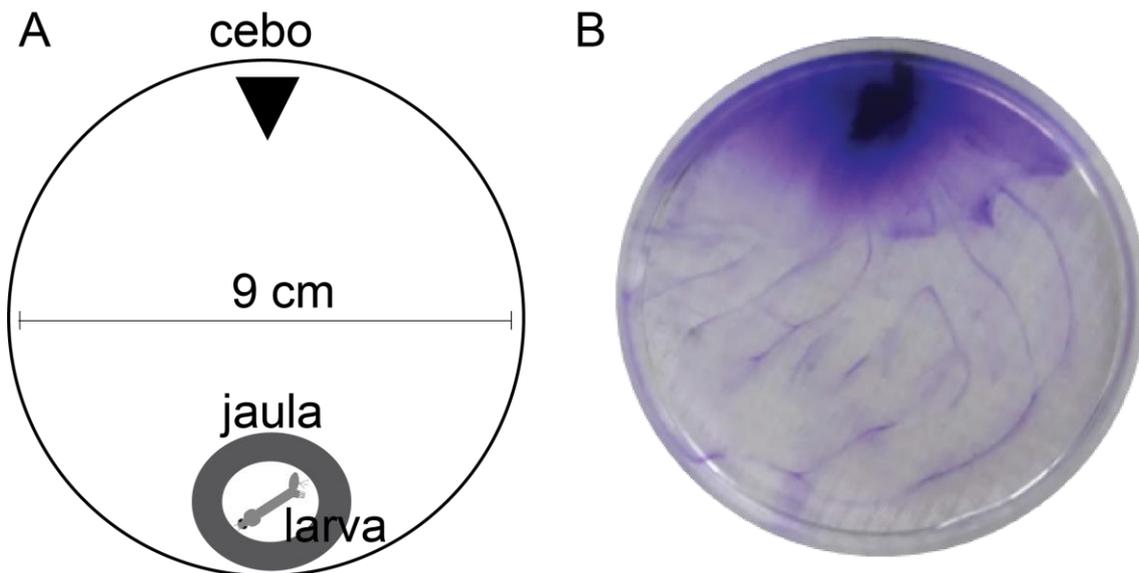


Figura 2.3 Esquema de arena experimental (A) y halo de concentración del cebo con el colorante “Coomasie blue” luego de 5 minutos (B).

Los videos grabados se digitalizaron y se evaluó la actividad de las larvas de mosquitos utilizando el software de seguimiento (EthoVision® XT10.1) para calcular las variables de comportamiento (Noldus et al. 2001). Se utilizó la sustracción dinámica para identificar a las larvas de su fondo. Las variables de actividad cuantificadas fueron: a) distancia, b) distancia media al cebo (media de las distancias de las larvas al cebo en cada muestra) c) velocidad media, d) Velocidad angular absoluta (AAV) y los tiempos acumulados en los tres estados de movilidad (HMt, Mt y It).

2.3.6. Respuesta de larvas de *An. pseudopunctipennis* a agentes ecológicos

En este experimento, las larvas de *An. pseudopunctipennis* se transfirieron individualmente a placas de Petri con 40 ml de agua declorada, y se dejaron en una jaula 10 minutos para aclimatarse. Mientras tanto, se agregó en el otro extremo de la placa un agente ecológico confinado en otra jaula de metal, levemente elevada para permitir el paso de sustancias químicas pero al mismo tiempo impedir que la larva lo detectara visualmente, y se dejó 5 minutos para que se forme un halo de concentración. Luego se liberó a la larva y se filmó su comportamiento con una cámara de video (Lumix MDS-LS 80, Panasonic®) durante 10 minutos.

Los videos grabados se digitalizaron y se evaluó la actividad de las larvas utilizando el software de seguimiento (EthoVision® XT10.1) para calcular las variables de comportamiento (Noldus et al. 2001). Usamos la sustracción dinámica para contrastar a las larvas de su fondo. Las variables de actividad cuantificadas fueron: a) distancia, b) distancia media a la jaula (media de las distancias de las larvas a la jaula en cada muestra) c) velocidad media, d) Velocidad angular absoluta (AAV) y los tiempos acumulados en los tres estados de movilidad (HMT, Mt y It).

Los agentes ecológicos utilizados fueron: un recurso alimenticio, que consistió en una porción del alga filamentosa *Spirogyra sp.*; un competidor, una larva estadio 4 de *Culex sp.*; un predador: una larva 3 de escarabajo, *Tropisternus noa* (Coleoptera: Hydrophilidae, Figura 2.4); como control se utilizó otra larva

de *An. pseudopunctipennis* y como control de procedimiento se utilizó sólo la jaula. Para este ensayo se realizaron seis réplicas independientes.



Figura 2.4 Larva de tercer estadio de *Tropisternus noa* (Coleoptera: Hydrophilidae) junto con una larva de cuarto estadio de *An. pseudopunctipennis*.

2.3.7. Análisis estadístico

Para estudiar la diversidad de la fauna asociada a las larvas de *An. pseudopunctipennis* se construyó una tabla con información de cada taxón: su estado de desarrollo (larva, pupa o adulto), su clasificación trófica como potencial predador de mosquitos según Merrit y Cummings (1984), el número de individuos capturados, y la abundancia relativa (número de organismos capturados de un taxón/ número de organismos capturados totales).

Para caracterizar el comportamiento basal de las larvas de ambas especies de mosquitos se realizó un análisis indirecto de las variables comportamentales obtenidas con el software de seguimiento (Pinheiro y Bates 2006). Para ello en primer lugar, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) utilizando las variables velocidad, distancia, velocidad angular absoluta y los

tiempos en cada estado de movilidad, HMt, Mt e It. Del ACP se obtuvo el primer componente principal (CP1) que condensa la información de las variables utilizadas. Dado que el ACP genera ejes teóricos, la importancia biológica del CP1 se determinó mediante correlaciones de Spearman con las variables comportamentales. En este estudio, el CP1 dio como resultado un eje de inactividad. Finalmente, se realizó un Modelo Lineal Generalizado (GLM), con la función '*VarIdent*' que asigna una varianza diferente a cada tratamiento para modelar la varianza, con el eje de inactividad (CP1 obtenido) como variable respuesta y utilizando como variable exploratoria la especie y el origen de la cepa. Luego se usó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher *a posteriori* para comparar las diferencias entre las medias de los distintos tratamientos. Los supuestos fueron probados gráficamente y se estableció un umbral de significancia de 0,05.

Para evaluar la respuesta individual de las larvas de ambas especies a cebos con compuestos atractantes y repelentes se procedió con un análisis similar. Para ello, se realizó un ACP para cada especie utilizando las variables velocidad, distancia y los tiempos en cada estado de movilidad, HMt, Mt e It. Los componentes principales obtenidos se caracterizaron biológicamente mediante correlaciones de Spearman. En este caso ambos CP1 obtenidos resultaron en ejes de actividad. Para evaluar los efectos de los compuestos sobre el comportamiento larval, se realizaron para cada especie tres Modelos Lineales Generalizados (GLM), con la función '*VarIdent*' para modelar la varianza, sobre las tres variables obtenidas: el eje de actividad (CP1), la velocidad angular absoluta (AAV) y la distancia media al cebo. Los supuestos fueron probados gráficamente. Luego, se utilizó la prueba de diferencia mínima

significativa (LSD) de Fisher *a posteriori* para comparar las diferencias entre las medias de los distintos tratamientos. Para mantener un error global de 0,05, el umbral de significancia fue corregido usando el método de corrección secuencial de Bonferroni-Holm (Abdi 2010).

Finalmente para evaluar el efecto de agentes ecológicos en el comportamiento de larvas de *An. pseudopunctipennis* también se replicó el análisis explicado en el párrafo anterior. Se realizó un ACP con las variables velocidad, distancia y los tiempos en cada estado de movilidad, HMt, Mt e It para obtener una variable (CP1) que las condense. Se caracterizó biológicamente el CP1 teniendo en cuenta sus correlaciones de Pearson con las variables originales y en este caso también se obtuvo un eje de actividad. Para finalizar se realizaron tres Modelos Lineales Generalizados (GLM), con la función '*VarIdent*' para modelar la varianza, sobre las tres variables obtenidas: el eje de actividad (CP1), la AAV y la distancia media a la jaula. Luego, las comparaciones entre las medias se hicieron con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher *a posteriori*. Para mantener un error global de 0,05, el umbral de significancia fue corregido usando el método de corrección secuencial de Bonferroni-Holm (Abdi 2010). Para todos los análisis estadísticos se utilizaron RStudio (Versión 1.0.153) e Infostat (Di Rienzo et al. 2014).

2.4 Resultados

2.4.1. Caracterización de la entomofauna asociada a An. pseudopunctipennis

Se determinaron un total de 26 taxones pertenecientes a cinco órdenes de insectos y dos de crustáceos. Los insectos colectados pertenecieron a los

siguientes órdenes: Coleoptera, Heteroptera, Diptera, Odonata y Ephemeroptera (ordenados en riqueza decreciente). El grupo que presentó mayor riqueza fueron los coleópteros con 9 géneros pertenecientes a cuatro familias. La familia de coleópteros más diversa fue Dytiscidae, representada por los géneros *Celina* (larva), *Laccophilus* (larva y adulto), *Liodessus* (adulto) y *Hemibidessus* (adulto) (Figura 2.5 E, D, I y J). Luego *Tropisternus* (larva), *Enochrus* (larva y adulto) y *Hemiosus* (adulto) fueron los representantes de Hydrophilidae (Figura 2.5 A, C, G y F). Finalmente las familias Scirtidae e Hydraenidae estuvieron representadas por un género cada una, *Scirtes* sp.(larva) e *Hydraena* (adulto) respectivamente (Figura 2.5 B y H; Tabla 2.1).

El orden Heteroptera presentó una diversidad intermedia con cinco familias representadas por un género cada una. Estas familias fueron Belostomatidae, Gelastocoridae, Naucoridae, Pleidae y Veliidae, que estuvieron representadas por los géneros *Ambrysus*, *Gelastocoris*, *Belostoma*, *Microvelia* y *Neoplea* respectivamente (Figura 2.5 K-O). Además, se identificaron tres familias de dípteros, Empididae, Chironomidae y Culicidae. Y en el caso de Culicidae, se encontraron cuatro especies, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Toxorhynchites* sp., *Culex pipiens* y *Culex maxi* (Figura 2.5 P-S). Finalmente, solo se encontraron dos familias de Odonata, Coenagrionidae y Libellulidae, y una familia de Ephemeroptera, Baetidae, representada por dos géneros, *Callibaetis* y *Americabaetis* (Figura 2.5 T; Tabla 2.1).

Con respecto a la abundancia relativa, los taxones dominantes fueron Chironomidae con una abundancia relativa del 28,62%. Seguido de los microcrustáceos Otracoda y Copepoda con 11% y 7,5% respectivamente. Luego las larvas de *Tropisternus noa* también presentaron un 7,5% de

abundancia relativa. Los taxones que presentan abundancias intermedias, entre 6,25 y 1,8%, son las larvas de *Scirtes sp.*, las larvas de Libellulidae, los adultos de *Enochrus sp.*, los adultos de *Liodessus sp.*, las larvas de *Culex maxi*, las larvas de *Callibaetis sp.* y *Microvelia sp.* Los taxones restantes, con abundancias menores al 1,5 % fueron considerados raros (Tabla 2.1; Figura 2.6).

Teniendo en cuenta las categorías tróficas, de los 26 taxones determinados, 15 se identificaron como potenciales predadores de *An. pseudopunctipennis*. El único taxón predador que presentó altos valores de abundancia relativa fue *T. noa* (L). En particular, en el sitio de muestreo se observaron larvas de *T. noa* alimentándose de larvas de *An. pseudopunctipennis*. Las larvas de Libellulidae, los adultos de *Liodessus sp.* y *Microvelia sp.* son los predadores que presentaron abundancias intermedias. Y finalmente, los predadores restantes se clasificaron como raros (Figura 2.6).



Figura 2.5 Taxa presentes de los ambientes de cría de *An. pseudopunctipennis*. A *Tropisternus noa*, B *Scirtes* sp., C *Enochrus* sp., D *Laccophilus* sp., E *Celina* sp., F *Hemiosus* sp., G *Enochrus* sp., H *Hydraena* sp., I *Laccophilus* sp., J *Liodessus* sp., K *Ambrysus* sp., L *Gelastocoris* sp., M *Belostoma* sp., N *Microvelia* sp., O *Neoplea* sp., P *An. pseudopunctipennis*, Q *Toxorhynchites* sp., R *Culex pipiens*, S *Culex maxi* y T Libellulidae.

Tabla 2.1 Clasificación de taxones según estadio de desarrollo (E; L: larva y A: adulto) y categoría trófica (predador de mosquitos: Si o No). Número de individuos (N) y abundancia relativa (%) de los taxones colectados.

Clase	Orden	Familia	Género	P	E	N	%
Insecta	Odonata	Coenagrionidae		Si	L	4	1,49
		Libellulidae		Si	L	14	5,20
	Ephemeroptera	Baetidae	<i>Callibaetis sp.</i>	No	L	8	2,97
			<i>Americabaetis sp.</i>	No	L	1	0,37
	Heteroptera	Veliidae	<i>Microvelia sp.</i>	Si	L	5	1,86
		Belostomatidae	<i>Belostoma sp.</i>	Si	L	3	1,12
		Naucoridae	<i>Ambrysus sp.</i>	Si	L	3	1,12
		Gelastocoridae	<i>Gelastocoris sp.</i>	Si	L	1	0,37
		Pleidae	<i>Neoplea sp.</i>	Si	A	2	0,74
	Coleoptera	Dytiscidae	<i>Celina sp.</i>	Si	L	1	0,37
			<i>Laccophilus sp.</i>	Si	L	4	1,49
			<i>Laccophilus sp.</i>	Si	A	3	1,12
			<i>Liodessus sp.</i>	Si	A	13	4,83
			<i>Hemibidessus sp.</i>	Si	A	1	0,37
		Hydraenidae	<i>Hydraena sp.</i>	No	A	1	0,37
		Hydrophilidae	<i>Hemiosus sp.</i>	No	A	2	0,74
			<i>Enochrus sp.</i>	No	A	13	4,83
			<i>Enochrus sp.</i>	Si	L	1	0,37
			<i>Tropisternus noa</i>	Si	L	20	7,43
	Scirtidae	<i>Scirtes sp.</i>	No	L	17	6,25	
	Diptera	Culicidae	<i>Culex maxi</i>	No	L	10	3,72
			<i>Culex pipiens</i>	No	L	1	0,37
			<i>Toxorhynchites sp.</i>	Si	L	1	0,37
<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>			No	L	12	4,46	
Chironomidae			No	L	77	28,62	
	Empididae		No	L	1	0,37	
Copepoda	Calanoida			No		20	7,43
Ostracoda				No		30	11,15

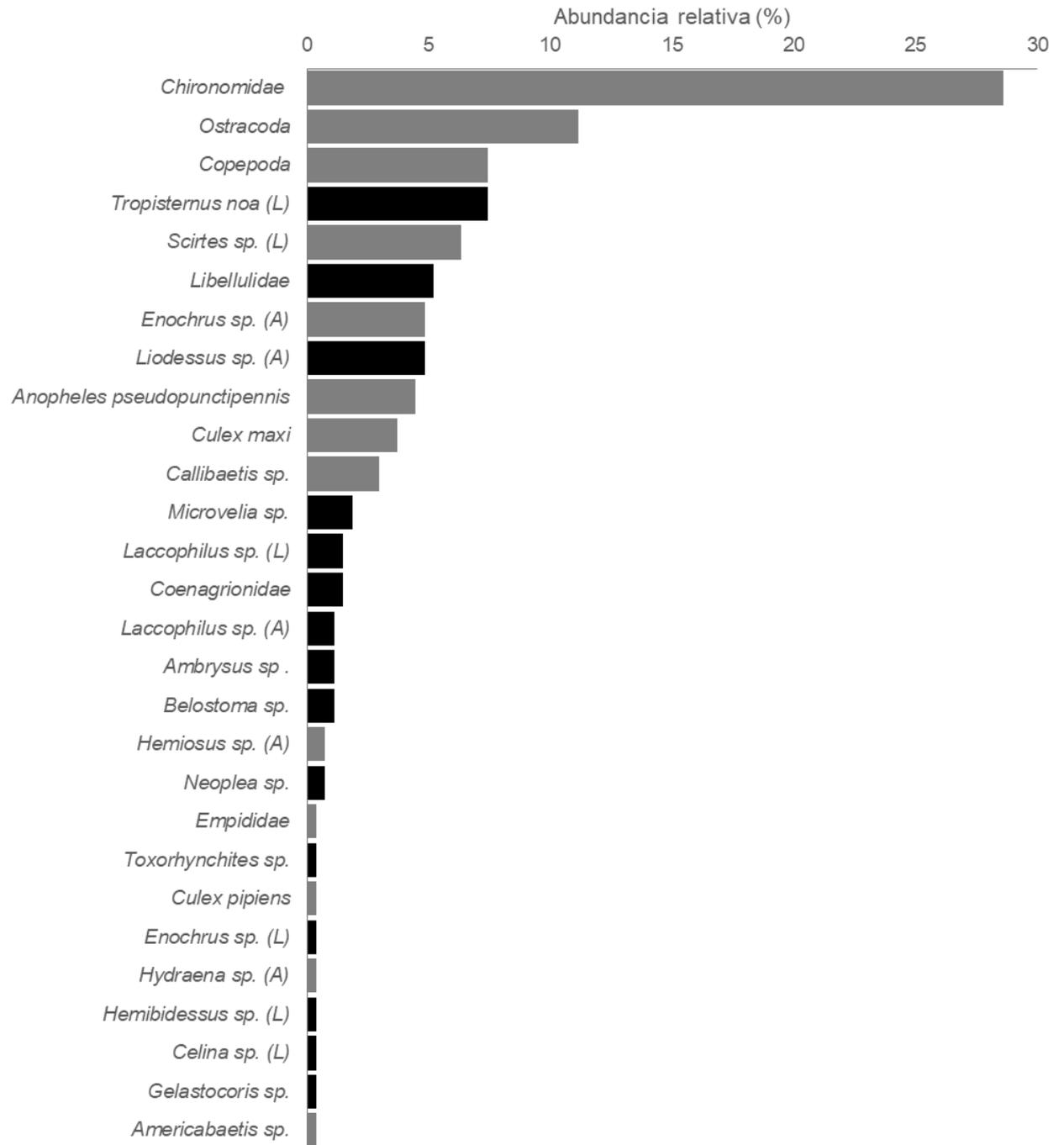


Figura 2.6 Abundancia relativa (%) de la fauna asociada colectada en los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis*. Taxones predadores (barras negras) y no predadores (barra gris).

2.4.2. Movimiento basal de larvas de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti*

Los resultados del ACP de los experimentos de comportamiento larvario para ambas especies se muestran en la Figura 2.7. El primer componente principal (CP1) del ACP representó el 84,6 % de la variabilidad. Las variables distancia, velocidad y HMt y Mt tuvieron correlaciones significativas y negativas con el CP1, con coeficientes de Pearson de -0,98, -0,99, -0,91 y -0,91, respectivamente. Las correlaciones entre el CP1 e It y AAV también fueron significativas pero positivas, con coeficientes de 0,98 y 0,72 respectivamente. Por lo tanto, el CP1 se definió como un eje de inactividad, mayores valores de este eje indican un menor nivel de actividad de nado de las larvas (Figura 2.7).

Además, se observaron diferencias significativas en el eje de inactividad para los distintos tratamientos (GL = 2; F = 29,41; p-valor < 0,0001). En general, las larvas de *An. pseudopunctipennis* se movieron menos que las larvas de las dos cepas de *Ae. aegypti*, ya que presentaron los mayores valores de inactividad. Por otro lado, no se observaron diferencias en la actividad de nado entre la cepa de campo y la cepa de laboratorio de *Ae. aegypti* (Figura 2.8).

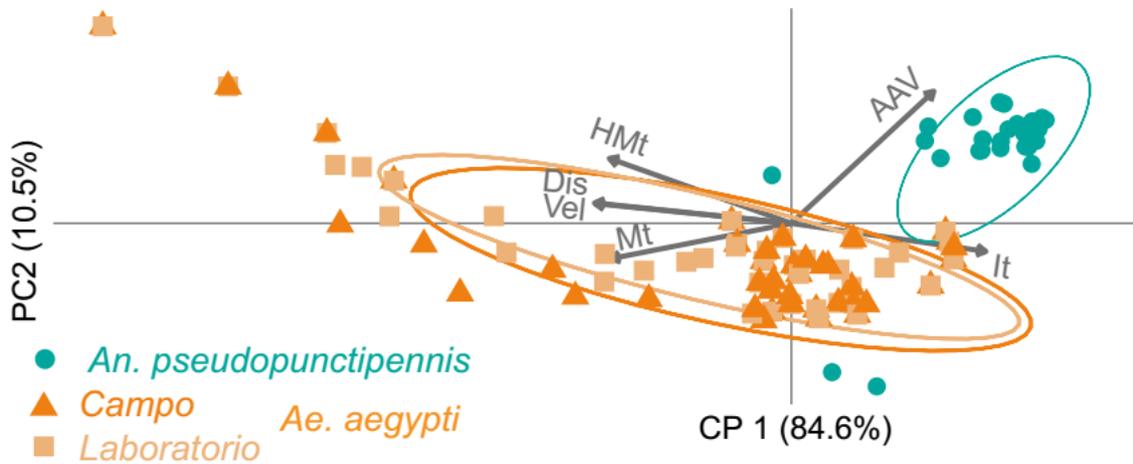


Figura 2.7 Biplot del Análisis de Componentes Principales obtenido del comportamiento basal de larvas de *Ae. aegypti* de campo y de laboratorio y de *An. pseudopunctipennis* de campo. AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMt: tiempo en velocidad alta, Mt: tiempo en velocidad media y It: tiempo inmóvil.

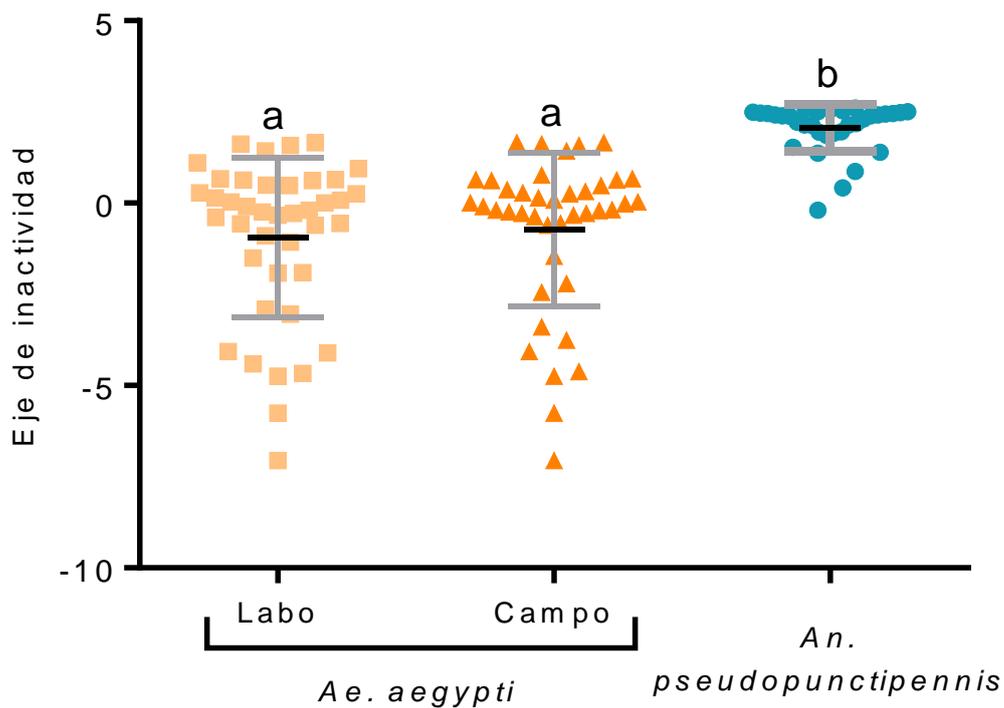


Figura 2.8 Media (línea negra) y error estándar (barras grises) de los valores de inactividad de larvas de *Ae. aegypti* de campo y de laboratorio (Labo) y de *An. pseudopunctipennis* de campo.

2.4.3. Respuesta de larvas a moduladores del comportamiento

En esta sección se estudió la respuesta comportamental de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* a compuestos atractantes, como la prolina y la levadura, y repelentes, como el IR3535 y la DEET. El mapa de calor muestra, de manera esquemática, las diferencias en el movimiento individual de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a los distintos tratamientos (Figura 2.9). Las larvas en presencia de los repelentes IR3535 y DEET mostraron mayor movilidad en general con respecto al control agar (CA). Y las larvas en presencia de la levadura y prolina presentaron menor movilidad en comparación con el CA (Figura 2.9).

Con respecto al ACP en *Ae. aegypti*, el primer componente obtenido ($CP1_{Ae}$) explicó el 63% de la variabilidad (Figura 2.10). Este $CP1_{Ae}$ presentó una correlación negativa con It y una correlación positiva con HMt , Mt , distancia y velocidad (Tabla 2.2). Estos resultados permiten definir al $CP1_{Ae}$ como un eje de actividad de nado, es decir mayores valores de este eje indican una mayor actividad de nado y valores menores un descenso en esta actividad (Figura 2.10, Tabla 2.2).

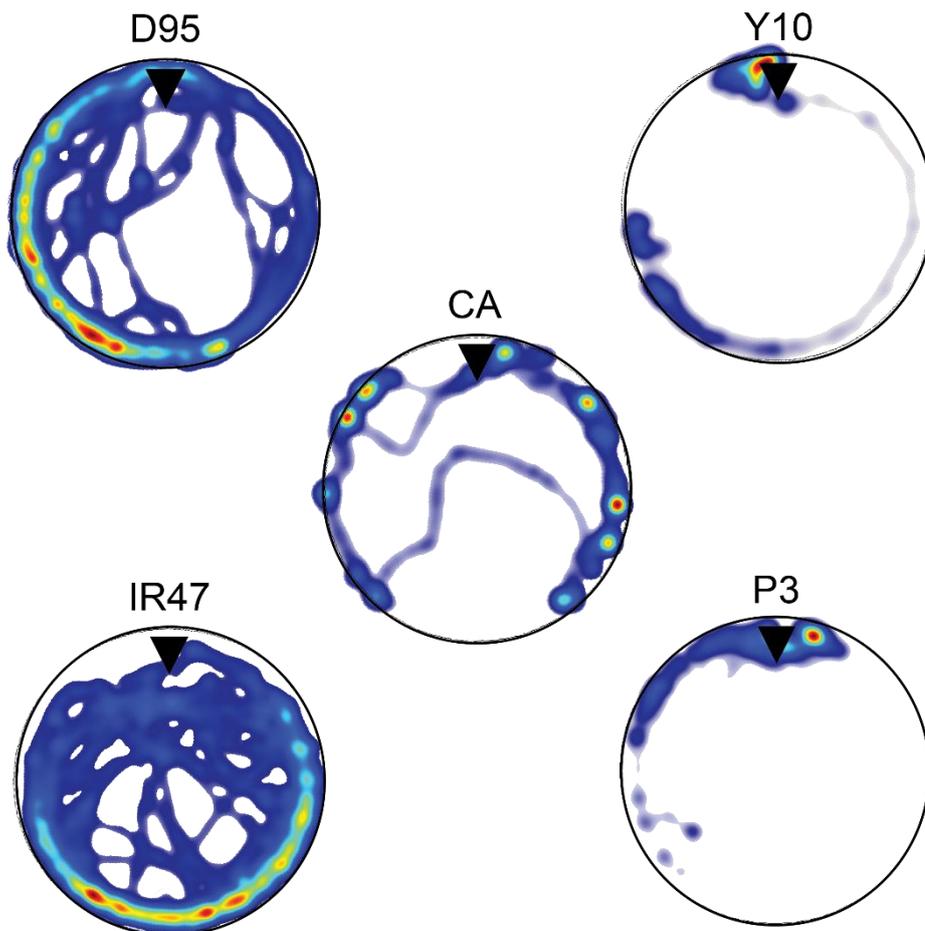


Figura 2.9 Mapa de calor obtenido de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a cebos: control (CA), de 10 mg/ml de levadura (Y10), de 3 mg/ml del aminoácido prolina (P3), de 47 mg/ml de IR3535 (IR47) y de 95 mg/ml de DEET (D95). Los colores cálidos indican que la larva estuvo un mayor tiempo en esa zona y colores fríos un menor tiempo nadando en esa zona. El triángulo negro indica la posición del cebo.

Tabla 2.2 Índice de correlación de Spearman entre las variables comportamentales utilizadas para el ACP y el CP1. HMt: tiempo en alta movilidad, Mt: tiempo en movilidad media e It: tiempo inmóvil.

	Var. exp. (%)	Distancia	Velocidad	HMt	Mt	It
<i>Ae. aegypti</i>	63,0	0,86	0,94	0,62	0,89	-0,83
<i>An. pseudopunctipennis</i>	68,2	0,91	0,95	0,89	0,84	-0,78

Las larvas de *Ae. aegypti* presentaron diferencias significativas en la actividad de nado (DF: 12; F: 14,22; p-valor <0,0001; n: 10; Figura 2.11), la velocidad angular absoluta (AAV; DF: 12; F: 12,07; p-valor <0,0001; n: 10; Figura 2.12 A) y la distancia media al cebo (DF: 12; F: 59,47; p-valor<0,0001; n: 10; Figura 2.12 B).

Las larvas de *Ae. aegypti* expuestas a los repelentes, DEET e IR3535, presentaron valores de actividad de nado más altos (Figura 2.11) y valores de AAV más bajos que las larvas expuestas al control (CA) en todas las concentraciones evaluadas (Figura 2.12 A). Estas larvas también presentaron valores más altos de la distancia media al cebo en los tratamientos repelentes que en el CA en todas las concentraciones evaluadas (Figura 2.12 B). Esto indica que las larvas tienen una tendencia a alejarse del cebo como respuesta a la presencia de un compuesto que les resulta repelente.

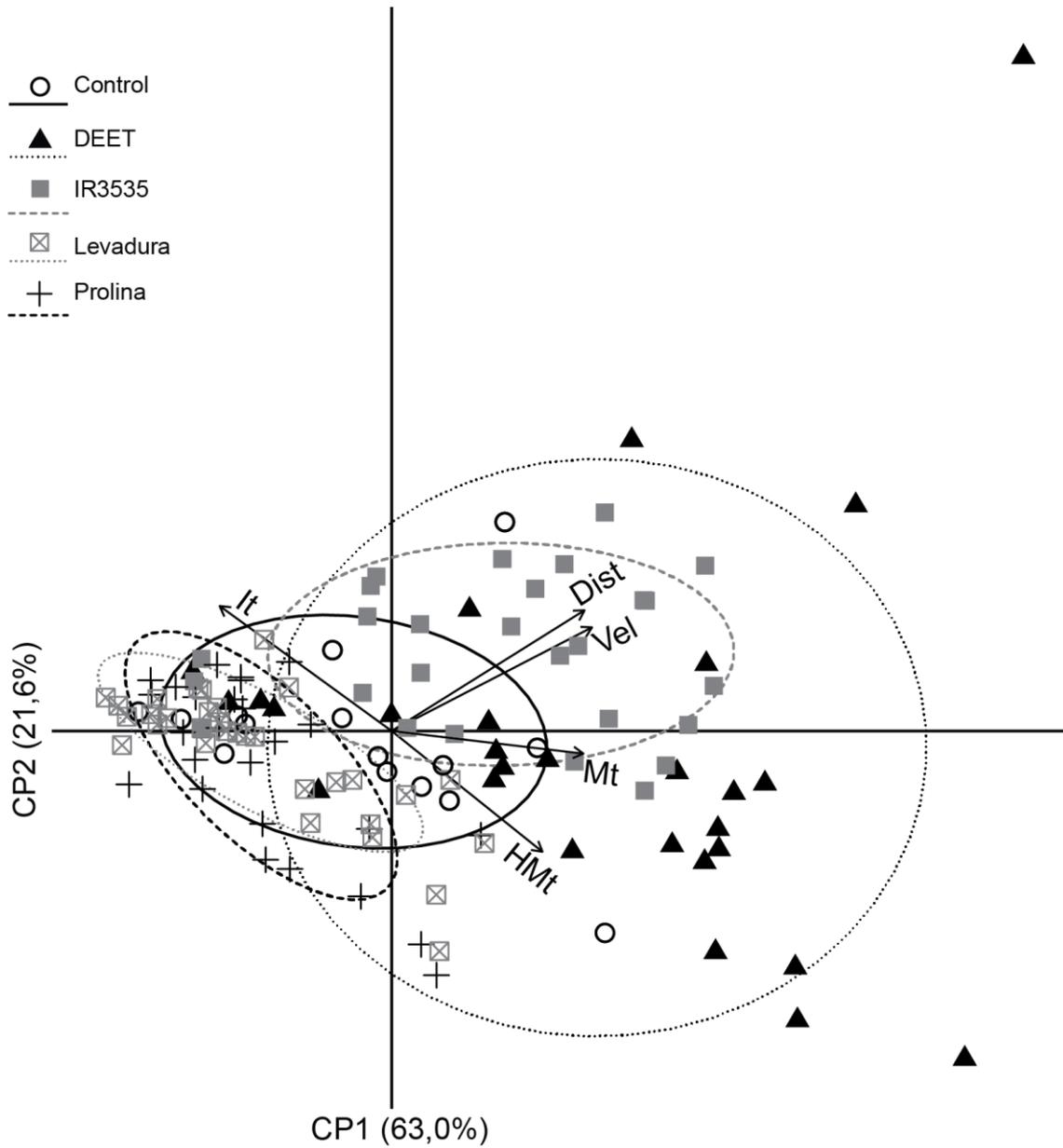


Figura 2.10 Biplot del Análisis de Componentes Principales obtenido de las larvas de *Ae. aegypti* expuestas a cebos control, de levadura, del aminoácido prolina, de IR3535 y de DEET. CP: Componente Principal, AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMt: tiempo en movilidad alta, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil.

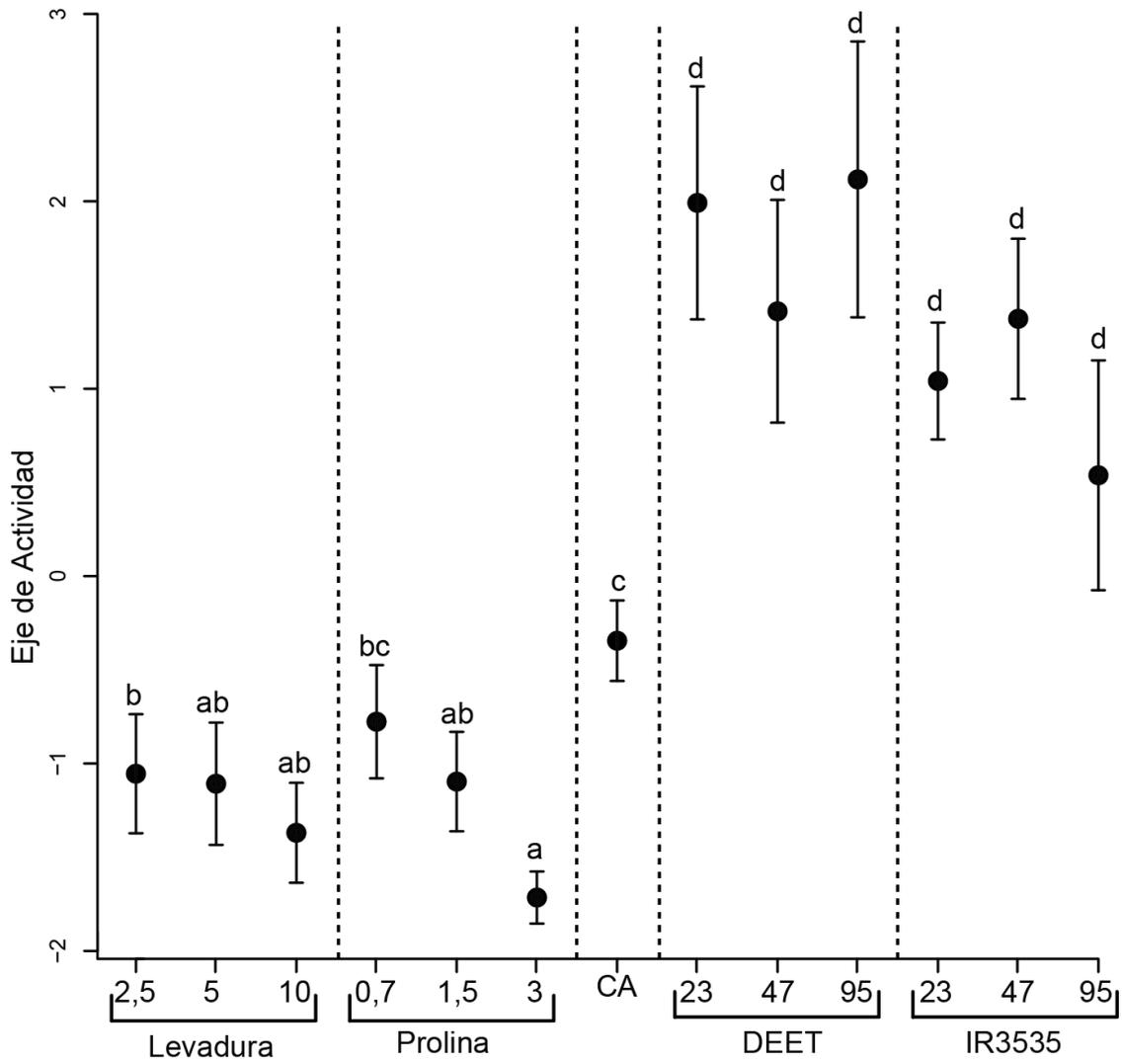


Figura 2.11 Medias (círculo negro) y error estándar (barras negras) de los valores de actividad de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a cebos control y de distintas concentraciones de levadura, del aminoácido prolina, de IR3535 y de DEET. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

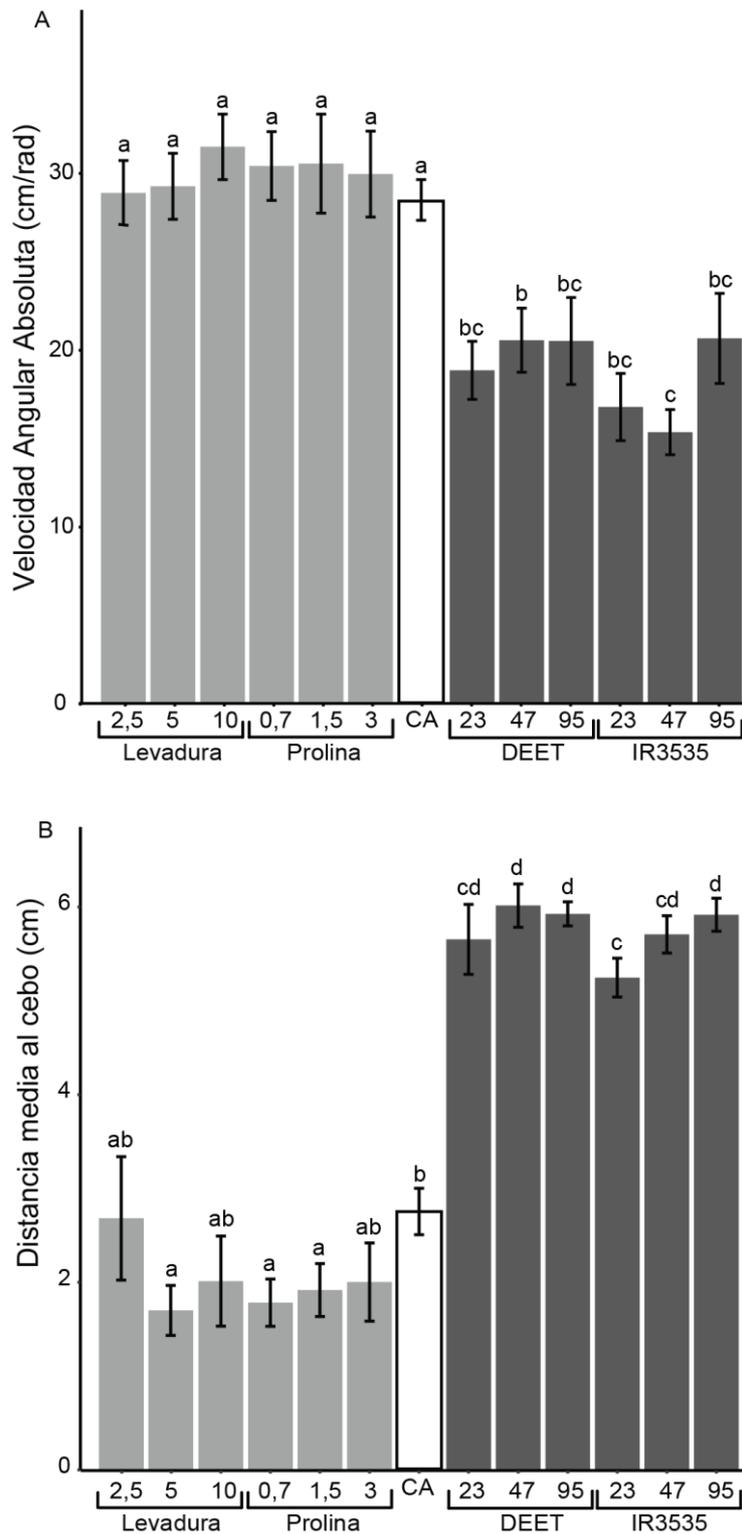


Figura 2.12 Medias (barras) y error estándar (barras negras) de la velocidad angular absoluta (AAV; A) y la distancia media al cebo (B) de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a cebos control (CA, barra blanca) y de distintas concentraciones (en mg/ml) de levadura, del aminoácido prolina, de IR3535 y de DEET. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Finalmente, las larvas de *Ae. aegypti* expuestas a los atractantes, levadura y prolina, presentaron valores de actividad más bajos que el control en todas las concentraciones evaluadas, excepto en 0,7 mg/ml de prolina (Figura 2.11). Además, no se observaron diferencias significativas en la AAV entre los tratamientos atractantes y control (Figura 2.12 A). Sin embargo, la distancia media al cebo fue significativamente menor en algunos tratamientos atractantes, 5 mg/ml de levadura y 0,7 y 1,5 mg/ml de aminoácido prolina, en comparación con el control agar (Figura 2.12 B).

En la Figura 2.13 puede observarse de manera gráfica la respuesta diferencial de las larvas de *An. pseudopunctipennis* a cebos repelentes con respecto al CA.

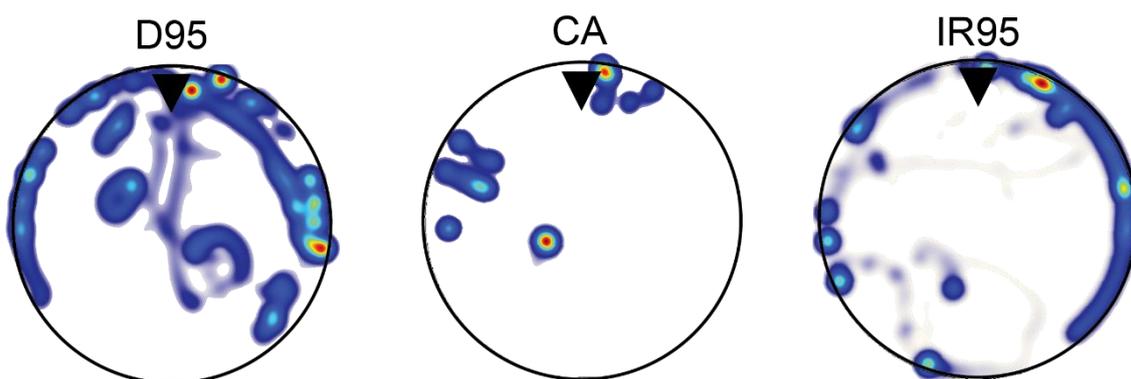


Figura 2.13 Mapa de calor obtenido de individuos de larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a cebos control (CA), de 95 mg/ml de IR3535 (IR47) y de 95 mg/ml de DEET (D95). El triángulo negro indica la posición del cebo.

En el ACP de *An. pseudopunctipennis*, el primer componente ($PC1_{An}$) explicó el 68,2% de la variabilidad y presentó correlaciones positivas con HMt, Mt, distancia y velocidad y una correlación negativa con It. Por lo tanto, también se definió al $PC1_{An}$ como un eje de actividad de nado, en el cual valores positivos

indican una mayor actividad de nado y valores negativos una menor actividad de nado (Figura 2.14, Tabla 2.2).

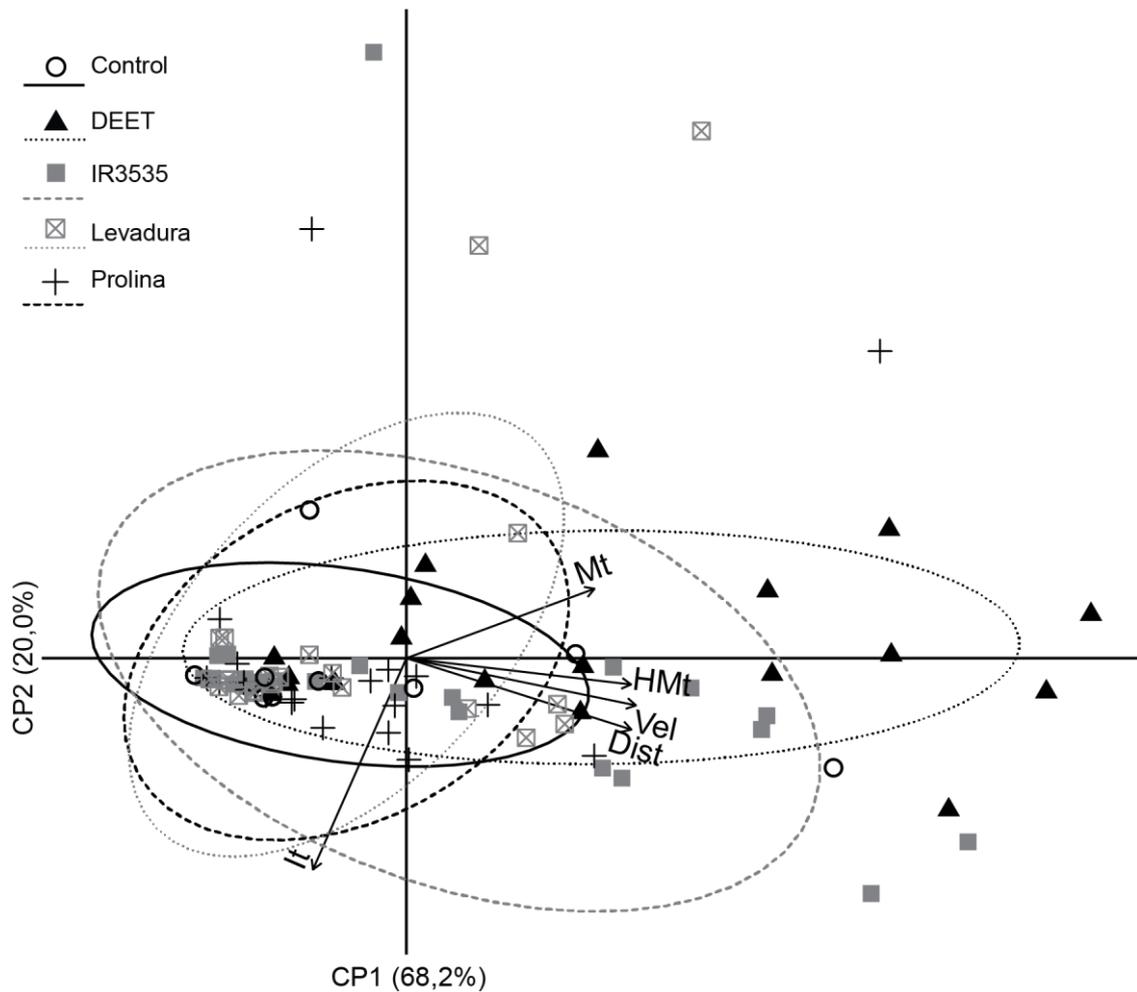


Figura 2.14 Biplot del Análisis de Componentes Principales obtenido de las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a cebos control, de levadura, del aminoácido prolina, de IR3535 y de DEET. CP: Componente principal, AAV: velocidad angular absoluta, HMt: tiempo en movilidad alta, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil.

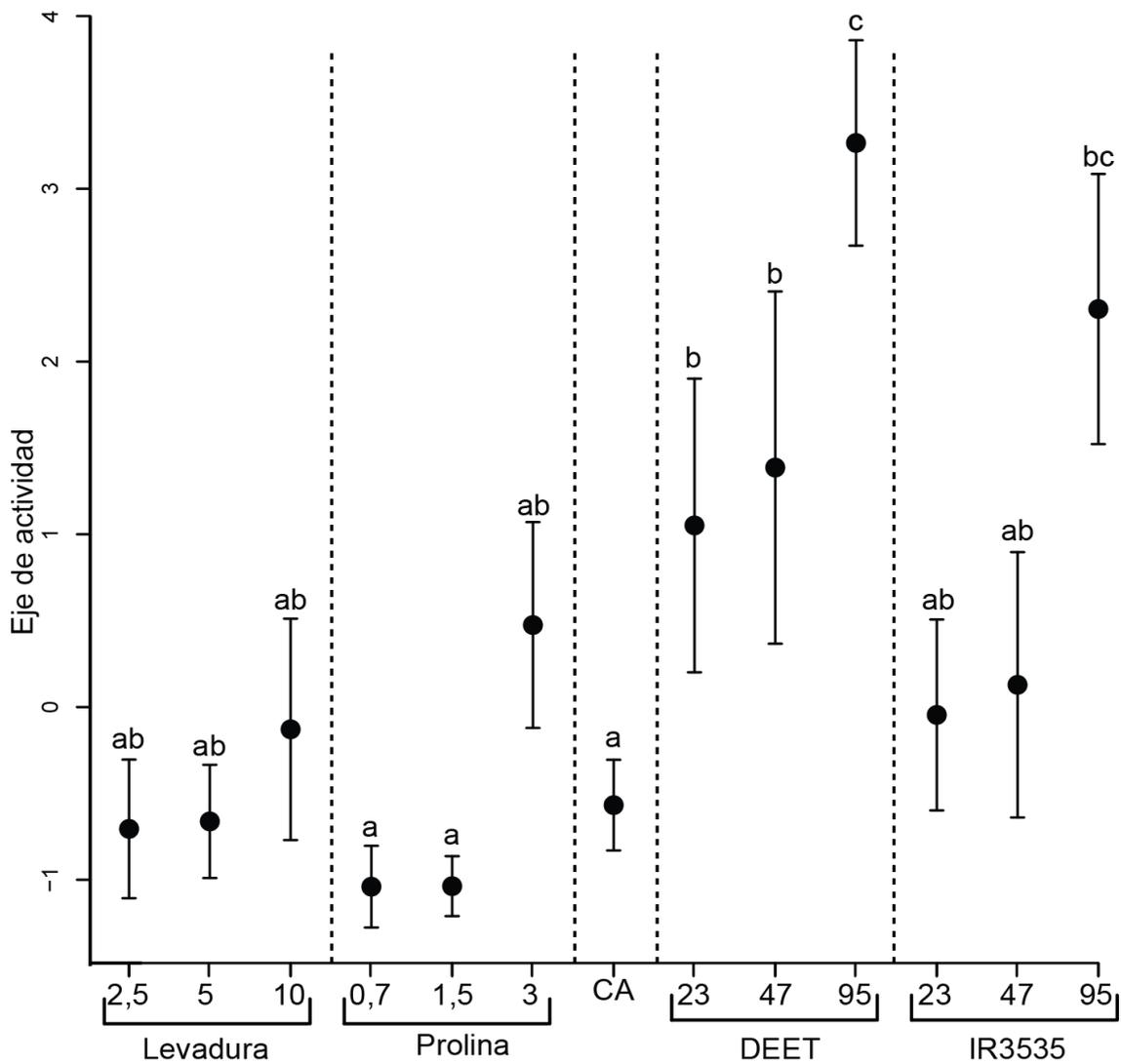


Figura 2.15 Medias (círculos negros) y error estándar (barras negras) de los valores de actividad de larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a cebos control y de distintas concentraciones de levadura, del aminoácido prolina, de IR3535 y de DEET. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Las larvas de *An. pseudopunctipennis* presentaron diferencias significativas en la actividad de nado (DF: 12; F: 6,59; p-valor < 0,0001; n: 10; Figura 2.15) y la AAV (DF: 12; F: 3,88; p-valor < 0,001; n: 10; Figura 2.16 A). En cambio, no se encontraron diferencias significativas para la distancia media al cebo en larvas de *An. pseudopunctipennis* (DF: 12; F: 1,77; p-valor > 0,05; n: 10; Figura 2.16 B).

Las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a DEET presentaron valores de actividad más altos que las larvas expuestas al CA para todas las concentraciones evaluadas (Figura 2.15). Sin embargo, solo las larvas expuestas a la mayor concentración de IR3535 (95 mg/ml) presentaron valores de actividad más altos que las larvas del control (Figura 2.15). Además, las larvas expuestas a repelentes también presentaron valores de AAV más bajos, para 23 mg/ml y 95 mg/ml de DEET y la concentración más alta de IR3535, 95 mg/ml (Figura 2.16 A). Finalmente, y a pesar de que las larvas expuestas a DEET presentaron valores de actividad más altos, no se encontraron efectos significativos en la distancia media al cebo en larvas expuestas a los repelentes (Figura 2.16 B).

Por otro lado, no se encontró un efecto significativo en las variables medidas para las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a ninguno de los dos atrayentes evaluados (levadura o prolina) (Figura 2.15 y 2.16).

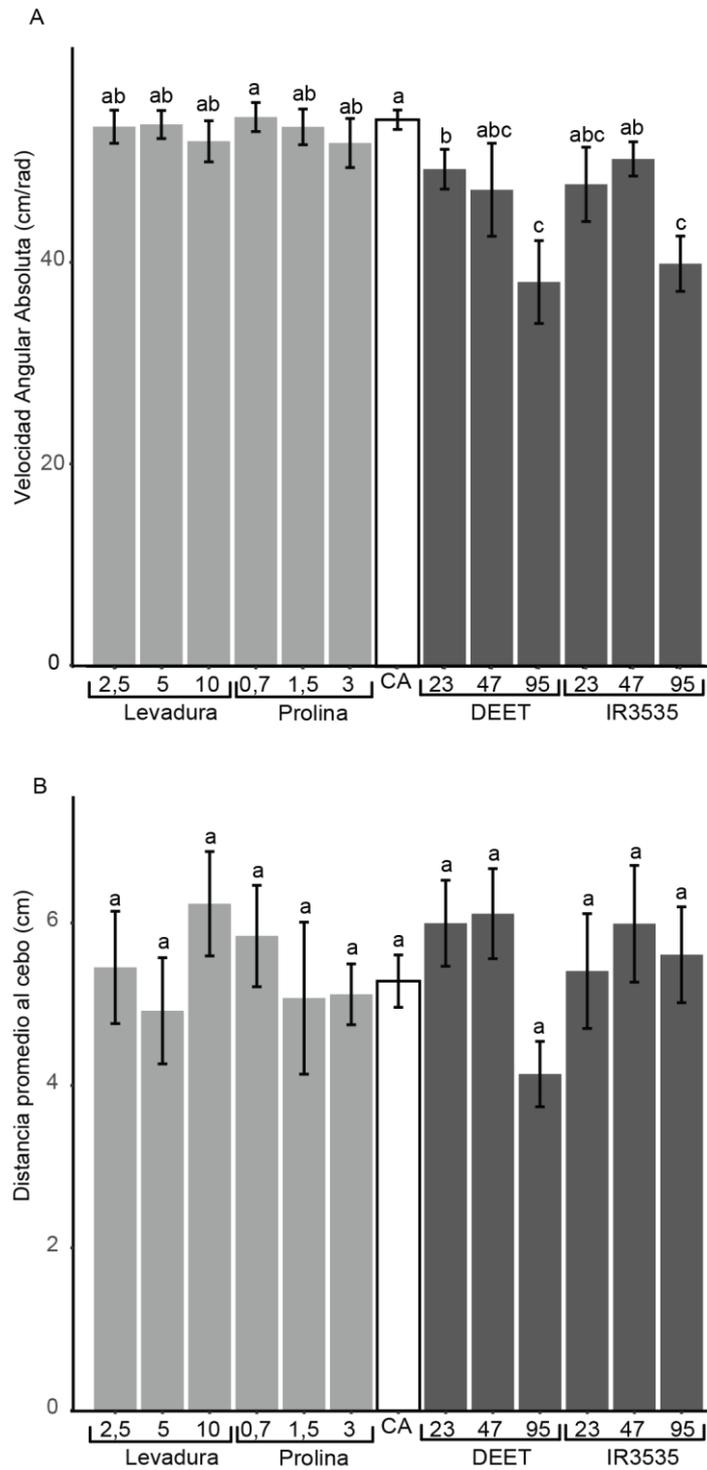


Figura 2.16 Medias (barras) y error estándar (barras negras) de la velocidad angular absoluta (AAV; A) y la distancia media al cebo (B) de larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a cebos control (CA, barra blanca) y de distintas concentraciones (en mg/ml) de levadura, del aminoácido prolina, de IR3535 y de DEET. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

2.4.4. Respuesta de larvas de *An. pseudopunctipennis* a agentes ecológicos

En este ACP, el primer componente principal (CP1) representó el 67,36 % de la variabilidad. Las variables distancia, velocidad, HMt y Mt tuvieron correlaciones significativas y positivas con el CP1, con coeficientes de 0,96, 0,98, 0,90 y 0,75, respectivamente. La correlación entre el CP1 e It también fue significativa pero negativa, con un coeficiente de -0,34. Por lo tanto, se define al CP1 como un eje de actividad de nado, lo que indica que mayores valores de este eje se traducen en mayor actividad de nado de las larvas.

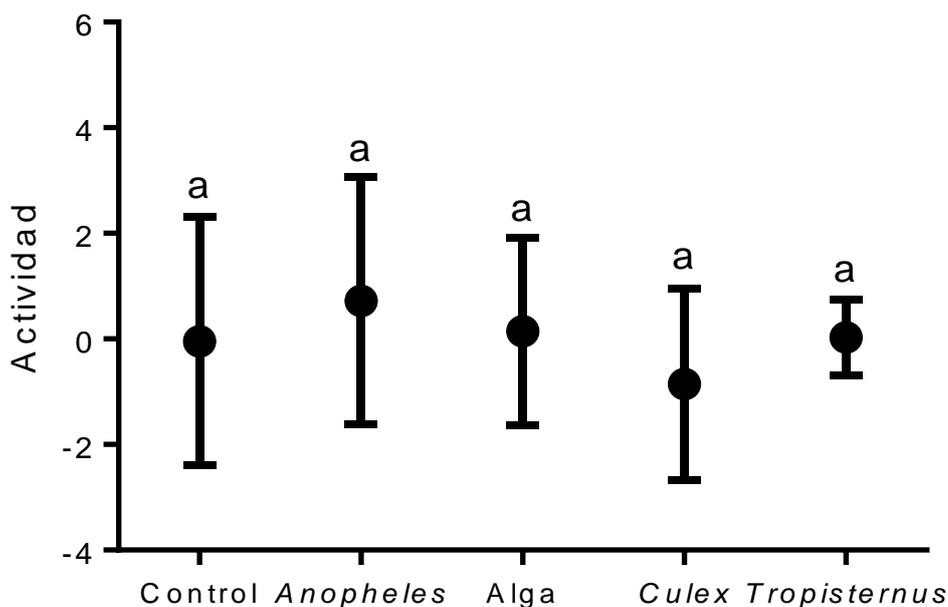


Figura 2.17 Actividad de nado(media \pm error estándar) de las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a distintos agentes ecológicos. Letras distintas indican diferencias significativas.

Las larvas de *An. pseudopunctipennis* no presentaron diferencias significativas en la actividad de nado (DF: 4; F: 0,53; p-valor: 0,73; n: 6; Figura 2.17), la velocidad angular absoluta (AAV; DF: 4; F: 0,88; p-valor: 0,49; n: 6; Figura 2.18

A) y la distancia media a la jaula (DF: 4; F: 1,54; p-valor: 0,22 ; n: 6; Figura 2.18 B).

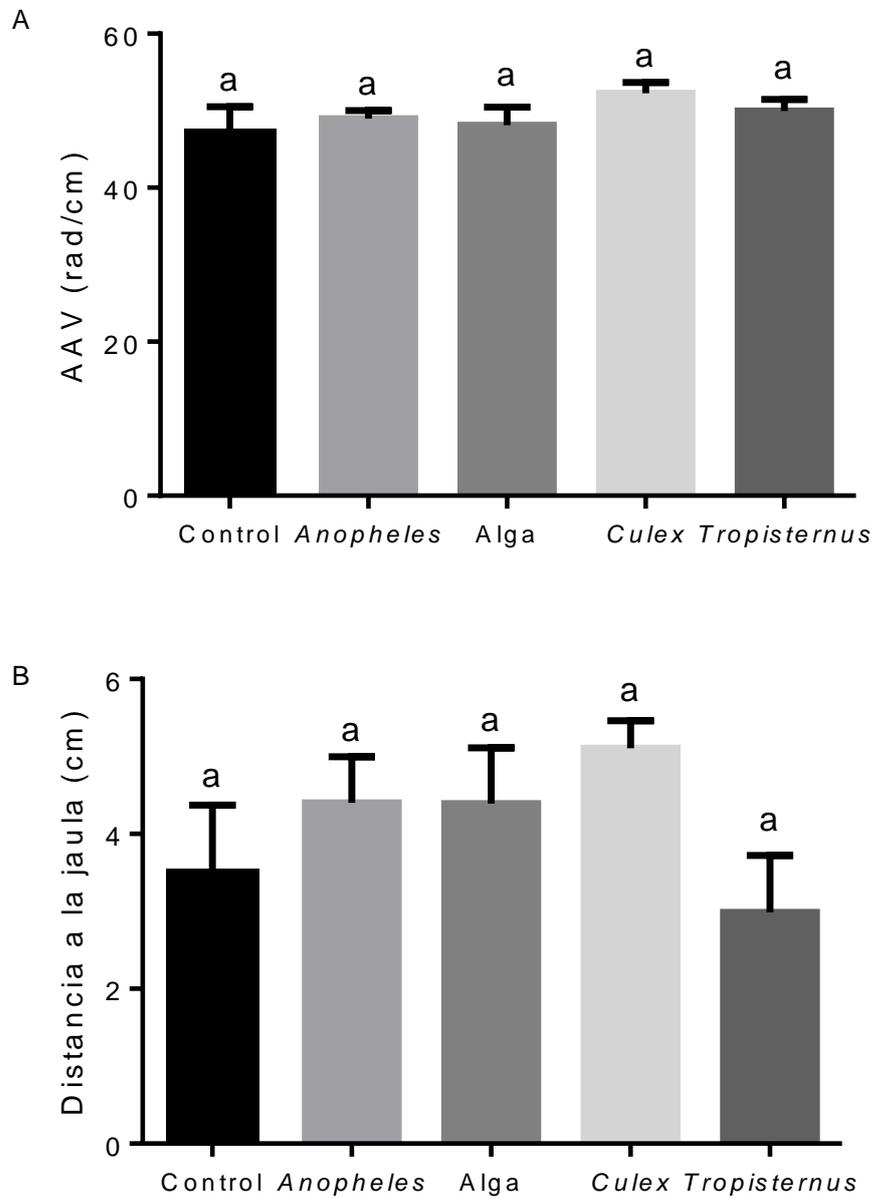


Figura 2.18 Velocidad angular absoluta (AAV; A) y distancia media a la jaula (B) (media + error estándar) de las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a distintos agentes ecológicos. Letras distintas indican diferencias significativas.

2.5 Discusión

2.5.1. Caracterización de la entomofauna asociada a *An.*

pseudopunctipennis

En esta sección se caracterizó la fauna macroscópica presente en los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis* de “El Oculto”. Se identificaron 26 taxones pertenecientes a cinco órdenes de insectos y dos de crustáceos. El grupo de insectos que presentó mayor riqueza fue Coleoptera, seguido por Heteroptera y luego por Diptera y los grupos que presentaron menor riqueza fueron Odonata y Ephemeroptera. Las larvas de Chironomidae (Diptera) fueron los taxones dominantes en estos ambientes. Y finalmente, en cuanto a los predadores, el que presentó mayores valores de abundancia fue *Tropisternus noa* (Coleoptera: Hydrophilidae).

La información sobre la entomofauna asociada a los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis* es escasa y la bibliografía se reduce a dos trabajos que estudian sitios de México (Delgado-Gallardo 1994, Bond 1999). Si bien Delgado-Gallardo (1994) registro mayor riqueza de taxones, en esta tesis se registraron taxones que no fueron asociados a *An. pseudopunctipennis*, entre ellos se encuentran las familias Gelastocoridae, Pleidae y Empididae, y los géneros *Americabaetis*, *Celina*, *Laccophilus*, *Liodessus*, *Hemibidessus*, *Hemiosus* y *Toxorhynchites*.

En Argentina, la comunidad de macroinvertebrados de los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis* tampoco ha sido muy estudiada debido a la dificultad de acceder a ellos, y solo existe un trabajo que estudia la composición de insectos acuáticos en sitios cercanos al muestreo (Von Ellenrieder 2007) y otro que

estudia los coleópteros y heterópteros de un Parque Nacional cercano al sitio de muestreo que presenta ambientes similares (Parque Nacional Calilegua, 23°40'46.08"S, 64°51'58.45"O) (Torres et al. 2008). En particular, los resultados de esta tesis coinciden con el trabajo de Von Ellenrieder (2007), donde los órdenes que presentaron mayor riqueza fueron Heteroptera y Coleoptera, y el que presentó mayor abundancia fue Diptera. Con respecto a la riqueza de taxones, en nuestro trabajo se encontró un menor número de taxones que los encontrados por Von Ellenrieder (2007) y Torres et al. (2008). Esta diferencia podría deberse al esfuerzo de muestreo, tanto en la cantidad de sitios relevados como en las metodologías de captura. Los trabajos mencionados relevaron una mayor cantidad de sitios y también utilizaron otras metodologías de captura de insectos como las trampas de luz (Von Ellenrieder 2007, Torres et al. 2008).

Aunque en esta tesis se encontró una menor riqueza de taxones, se encontraron taxones que no habían sido relevados en otros estudios en la región. Por ejemplo, los coleópteros *Celina sp.*, *Enochrus sp.*, *Hydraena sp.* y *Hemibidessus sp.*, los heterópteros *Gelastocoris sp.* y *Neoplea sp.* y dos especies de mosquitos, *Culex pipiens* y *Culex maxi*, no se encontraron en el trabajo de Von Ellenrieder (2007). Además, el heteróptero *Gelastocoris sp.* y los coleópteros *Hydraena sp.* y *Hemibidessus sp.* no habían sido encontrados en el trabajo que estudió la fauna de heterópteros y coleópteros del Parque Nacional Calilegua (Torres et al. 2008). Con respecto a *Gelastocoris sp.*, si bien ninguno de los dos estudios citados lo registraron, Torres et al. (2008) menciona que los sitios muestreados podrían contener especímenes pertenecientes a este género. Entonces, esta tesis aporta información

importante respecto de la composición taxonómica de los arroyos de montaña de los ambientes de yungas de NOA en cuanto a la identidad de taxones. Como estos ambientes están poco explorados y presentan una elevada riqueza de taxones, futuros estudios que evalúen sus variaciones estacionales podrían ser relevantes para identificar nuevos taxones aún no descriptos.

En este trabajo también se tuvo en cuenta la abundancia relativa de los taxones encontrados. El hecho de que en esta tesis Chironomidae sea el taxón más abundante coincide con lo encontrado por Von Ellenrieder (2007). Según Paggi et al. (2007) en la región estudiada habitan 7 géneros de esta familia. Sería interesante poder aumentar la resolución taxonómica en esta familia, ya que algunos géneros podrían aportar información relevante para caracterizar el sitio de cría, dado que son indicadores biológicos de calidad de agua y contaminación en ambientes dulceacuícolas (Paggi 1999).

Con respecto a las categorías tróficas, en nuestro trabajo se identificaron 15 taxones que son potenciales predadores naturales de *An. pseudopunctipennis*. Entre ellos el más abundante fue *Tropisternus noa* y, en particular, se observó que se alimenta de larvas de *An. pseudopunctipennis* en condiciones naturales. Existen evidencias de que larvas del género *Tropisternus* son importantes predadores de larvas de otros mosquitos (*Culex sp.*) en cultivos de arroz (Zalom 1980). Estos datos indican que la larva de este coleóptero podría ser un regulador importante de las poblaciones de *An. pseudopunctipennis* en condiciones naturales. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que evalúen la eficiencia de consumo o la respuesta funcional de las larvas de *Tropisternus noa* sobre las larvas de *An. pseudopunctipennis*. Debido a esto, futuros ensayos podrían estar destinados a evaluar la eficiencia de predación

de las larvas de *Tropisternus noa* sobre las larvas de *An. pseudopunctipennis* para poder considerarlos como potencial agente de control de este mosquito.

Además los predadores potenciales que presentaron abundancias intermedias fueron las larvas de Libellulidae, los adultos de *Liodessus sp.* y *Microvelia sp.* En primer lugar, en otros estudios se identificaron larvas pertenecientes a la familia Libellulidae como predadoras naturales de larvas de *An. gambiae* (Morales et al. 2003). En segundo lugar, las larvas de Libellulidae ya fueron utilizadas como controladores naturales de otras especies de mosquitos (Sebastian et al. 1990). Esto sumado a que las larvas de Libellulidae fueron identificadas como uno de los predadores dominantes de larvas de *An. pseudopunctipennis* en los sitios de cría de México (Bond et al. 2006), las hace candidatas importantes para evaluar como agentes de control. Por otro lado, en varios trabajos se han identificado a los adultos de *Liodessus sp.* como potenciales predadores de mosquitos, sin embargo esto no fue verificado experimentalmente (Fischer et al. 2000, Campos et al. 2004). Finalmente, Frick (1949) identificó que una de las presas preferidas de *Microvelia capitata* eran las larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esto hace de *Microvelia sp.* uno de los mejores candidatos como predador natural de esta larva de mosquitos. Sin embargo, aún no se cuenta con información actualizada de la capacidad de predación de esta especie de *Microvelia* sobre las larvas de estos mosquitos, por lo que sería interesante actualizar estos estudios.

En este trabajo se puso especial énfasis en la interacción predador-presa, clasificando a los taxones que potencialmente podrían ser predadores de larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esto se debe a que la presión ejercida por predadores genera impactos importantes en la estructura de una comunidad

acuática, pudiendo ocasionar cascadas tróficas, cambios relevantes en la dominancia de especies clave, etc. (Blaustein 1998, Blaustein et al. 1995). Sin embargo, otras interacciones como la competencia también podrían afectar significativamente la dinámica poblacional de *An. pseudopunctipennis*, siendo interesante realizar experimentos de competencia, por ejemplo utilizando larvas de Chironomidae, para evaluar como esta interacción puede afectar a las larvas de *An. pseudopunctipennis*.

Con respecto a los mosquitos, en este trabajo se identificaron especies del género *Culex*, género que no se había identificado en el trabajo de Von Ellenrieder (2007). Sin embargo, estas especies fueron registradas para la región y es un resultado esperable, ya que son cosmopolitas y presentan un amplio rango de distribución en Argentina (Stein et al. 2016). En particular, *Culex pipiens* es un complejo que contiene dos especies *Cx. pipiens pipiens* y *Cx. pipiens quinquefasciatus*, cada una con un rango de distribución específico. Según este rango las larvas colectadas deberían ser *Cx. pipiens quinquefasciatus* ya que la otra especie no ha sido registrada en la región estudiada (Stein et al. 2016). Por otro lado, el hecho de que se hayan encontrado larvas de *Toxorhynchites sp.* en estos ambientes no parece común, ya que según la bibliografía las larvas de este género están asociadas principalmente a recipientes naturales (fitotelmata) y artificiales (Campos y Gleiser 2016). Sin embargo, este género podría criarse en estos ambientes ya que Von Ellenrieder (2007) también encontró larvas de *Toxorhynchites sp.* en ambientes similares a los muestreados en este trabajo. Sería interesante estudiar la coexistencia de *Toxorhynchites sp.* con larvas de *An.*

pseudopunctipennis, porque se ha registrado que este género es un importante predador de larvas de mosquito (Fischer et al. 2016).

Finalmente, *An. pseudopunctipennis* es la única especie del género que fue identificada en este trabajo. Esto no coincide con lo encontrado en otros trabajos, en los que identifican que las larvas *An. argyritarsis* comparten los mismos sitios de cría (Manguin et al. 1996, Dantur Juri et al. 2014, Galante et al. 2014). Sumado a esto en nuestro laboratorio también se han identificado larvas de *An. argyritarsis* en los mismos sitios colectadas en otros meses de muestreo. Esto podría indicar que si bien estas especies coexisten en los sitios de cría, existe una dinámica temporal que hace que en los meses muestreados para esta tesis la especie dominante sea *An. pseudopunctipennis*. Esto coincide con lo descrito por Dantur Juri (2016), que indica que el pico de abundancia de *An. pseudopunctipennis* es durante la primavera, temporada en la que se realizó el muestreo.

2.5.2. Movimiento basal de larvas de *Ae. aegypti* y *An.*

pseudopunctipennis

En este trabajo se utilizó un microcosmos experimental de placa de Petri y un software de seguimiento para estudiar el movimiento basal de larvas de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti*, y proporcionar datos cuantitativos de su actividad de nado. Se estudiaron dos cepas de *Ae. aegypti*, una de campo y otra de laboratorio, para identificar cómo el origen de la cepa puede afectar el comportamiento de las larvas en el microcosmos. El hecho de no detectar diferencias en el comportamiento basal de las dos cepas de *Ae. aegypti* podría indicar que el origen del material biológico no afecta su comportamiento basal.

Este es un buen punto de partida para validar futuros experimentos de laboratorio utilizando cepas de campo como la de *An. pseudopunctipennis*. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta comparación no se realizó con cepas de esta especie.

Este estudio demuestra que las larvas de *Ae. aegypti* presentan mayor actividad de nado que las de *An. pseudopunctipennis*, mientras que el tiempo inmóvil y la velocidad angular absoluta (AAV) fueron mayores en esta última. Los resultados podrían estar relacionados con las condiciones ecológicas de los sitios de cría específicos de cada mosquito, que ofrecen diferentes suministros de alimentos, refugios y predadores. Como fue observado en este capítulo las larvas de *An. pseudopunctipennis* coexisten con una gran diversidad de predadores. Si bien no hay estudios específicos sobre la respuesta antipredadora de larvas de *An. pseudopunctipennis*, el hecho que las larvas de esta especie pasaran más tiempo inmóviles que las de *Ae. aegypti* sugiere que este comportamiento podría ser una respuesta para pasar inadvertido frente a un predador (Ferrari et al. 2007). Este "comportamiento antipredador" es más evidente en *An. pseudopunctipennis* probablemente debido a que *Ae. aegypti* suele estar sometido a una menor presión de predación (Sih 1986, Fischer et al. 2016). Este comportamiento de evitación de predadores también se ha observado en las larvas de *Ae. triseriatus* (Say), *Cx. pipiens* y *An. gambiae* (Giles), estas reducen su movimiento como respuesta ante estímulos provocados por predadores (Kasap 1980, Kasap 1981, Juliano y Gravel 2002, Gimonneau et al. 2012). Además, la AAV fue mayor para *An. pseudopunctipennis* que para *Ae. aegypti*. Esta variable también podría asociarse con la respuesta de escape (otro comportamiento antipredador),

dónde las larvas pueden cambiar rápidamente la dirección de sus movimientos para evitar ser capturadas (Turesson et al. 2009).

Este primer experimento representa una metodología simple para obtener y analizar patrones de movimiento en larvas de mosquitos. Podría ser útil para evaluar la respuesta de larvas a compuestos tóxicos, repelentes, atractantes, entre otros, en condiciones de laboratorio. Este es el primer estudio en analizar los patrones de comportamiento de larvas de *An. pseudopunctipennis*, encontrando diferencias nuevas e importantes en los comportamientos larvales de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti*, que amplían la comprensión de estos estados de desarrollo de estos importantes insectos vectores.

2.5.3. Respuesta de larvas a moduladores de comportamiento

En este trabajo se evaluó la respuesta comportamental de larvas de mosquitos frente a diferentes estímulos olfativos utilizando un software de seguimiento. Este es el primer estudio que evalúa la respuesta del comportamiento olfativo de larvas de *An. pseudopunctipennis*. La exposición a repelentes comerciales produjo un aumento en la actividad de nado en larvas de ambas especies. Mientras que la respuesta a los atractantes fue diferente entre las dos especies estudiadas, las larvas de *Ae. aegypti* mostraron una disminución en el movimiento general y las de *An. pseudopunctipennis* no mostraron ningún cambio comportamental detectable.

El efecto repelente de la DEET ha sido descrito ampliamente para varias especies de insectos; la mayoría de estos estudios se centran en insectos hematófagos, particularmente en mosquitos (Barnard y Xue 2004, Cilek et al. 2004, N'Guessan et al. 2006). En este trabajo, las larvas de *Ae. aegypti*

mostraron un aumento significativo en la actividad de nado en todas las concentraciones de la DEET y el IR3535. La misma respuesta se observó en *An. pseudopunctipennis* para la DEET, y solo en la dosis más alta del IR3535. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Liu et al. (2010), quienes también observaron un aumento en la actividad de nado en larvas de *An. gambiae* expuestas a concentraciones similares de DEET. Otros estudios también mostraron que la exposición a DEET e IR3535 produjo un aumento significativo en la actividad locomotora de estados adultos e inmaduros de *Blatella germanica* y *Triatoma infestans* (Sfara et al. 2008, Reynoso et al. 2017). Con respecto a la diferencia en la sensibilidad de las distintas especies de mosquito al IR3535, en otros trabajos también se informó una respuesta diferencial entre la DEET y el IR3535 en hembras de mosquito adultos, donde la actividad repelente fue similar entre *Aedes* y *Culex spp.*, pero fue menos eficiente para *Anopheles* (Barnard et al. 2002, Fradin y Day 2002, Barnard y Xue 2004, Cilek et al. 2004, N 'Guessan et al. 2006). Sin embargo, estos estudios fueron realizados en mosquitos adultos. Debido a la falta de investigación sobre la ecología química de las larvas de mosquitos no existe información sobre la respuesta de larvas de estas especies al IR3535.

Además del aumento en la actividad de nado, la velocidad angular absoluta (AAV) disminuyó en ambas especies en los tratamientos repelentes. Esta disminución en la AAV en presencia de estímulos adversos se observó también en otros invertebrados (Armsworth et al. 2005). Este comportamiento podría implicar que las larvas responden a los repelentes sintéticos utilizando la *klinokinesis*; donde el insecto, en el momento en que ingresa en un ambiente desfavorable comienza a hacer giros, después de un tiempo se habitúa al

estímulo adverso; nadando en una única dirección mientras el estímulo permanezca igual o disminuya (Wigglesworth 1974).

Por otro lado, las larvas de *Ae. aegypti* se mantuvieron alejadas de los cebos con repelentes en todas las concentraciones (distancia media al cebo), pero en *An. pseudopunctipennis* no se obtuvieron respuestas significativas para esta variable. Según White y Moore (2015), un repelente de insectos se ha definido como "un producto químico que hace que un individuo realice movimientos orientados, alejándolo de su fuente". Esta definición coincide con lo que se observó en nuestro estudio para las larvas de *Ae. aegypti*, que podría atribuirse a un efecto repelente similar al observado en mosquitos adultos. Esto no fue así para *An. pseudopunctipennis* ya que en esta especie la variable distancia media al cebo no resultó significativa. Sin embargo, el hecho de no detectar un comportamiento de alejamiento del cebo frente a la DEET y al IR3535 no significa que estos compuestos no sean repelentes para estas larvas de especie, ya que estas se comportaron de manera similar a las de *Ae. aegypti* en cuanto a la actividad de nado y la AAV. Probablemente las razones por las que esta variable no fue significativa en *An. pseudopunctipennis* pueden ser la necesidad de un mayor número de réplicas o que estas larvas respondan de otra manera a la observada en *Ae. aegypti* a estos compuestos.

Con el fin de evaluar la respuesta comportamental de las larvas a atractantes se estudiaron el efecto del extracto de levadura y la prolina sobre en *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. Los cebos atractantes produjeron una disminución drástica en las variables relacionadas con la movilidad para *Ae. aegypti*, observando una reducción general del movimiento de larvas en la mayoría de las concentraciones probadas. Estos resultados podrían atribuirse a

que la larva se dirigió directamente hacia la fuente de emisión, ya que en general la distancia promedio al cebo fue menor en comparación al tratamiento control (Control Agar, CA). Esta disminución de los movimientos globales en respuesta a los compuestos atractantes, como la levadura, también fue observada por Liu et al. (2010) en *An. gambiae*. Sin embargo, no observamos ninguna respuesta estadísticamente significativa frente a levadura o prolina en larvas de *An. pseudopunctipennis*. Estos resultados podrían atribuirse al hecho que estos compuestos no serían atractantes a esas concentraciones o simplemente a que no son atractantes para esta especie, ya que no están relacionados con sus sitios de cría naturales. Por lo tanto, se necesitan más estudios para evaluar otras concentraciones de estos compuestos u otros componentes pertenecientes a los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis*, por ejemplo algún componente del alga (*Spirogyra sp.*). Otra posible razón por la cual no registramos una respuesta significativa a los atractantes evaluados en las larvas de *Anopheles* podría deberse a que en ausencia de estímulos las larvas de *An. pseudopunctipennis* pasan más tiempo inmóviles que las de *Ae. aegypti* (resultados del experimento anterior). Por lo tanto, este comportamiento podría enmascarar el cambio en la actividad de nado producida por el compuesto atractivo liberado por el cebo.

En esta tesis, hemos evaluado las variables de comportamiento en respuesta a estímulos sintéticos y naturales en larvas de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti*. Se analizaron variables como la actividad de nado, la velocidad angular (AAV) y la distancia a un cebo a través de registros de seguimiento de video. La evaluación de los movimientos horizontales de las larvas, utilizada por varios autores (Liu et al. 2010, Tomé et al. 2014, Marriel et al. 2016),

permitió obtener una primera aproximación de las variables de comportamiento de las larvas en respuesta a estímulos sintéticos y naturales de una manera sencilla. Sin embargo, estudios futuros pueden estar dirigidos en incluir también el estudio de sus movimientos verticales con el fin de proporcionar una imagen más completa y cercana a la realidad de los patrones de movimiento larval. En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio podrían contribuir al desarrollo de técnicas *push-pull* para controlar las larvas de mosquitos, expulsándolos de sus refugios con un repelente y dirigiéndolos a trampas con atractantes combinados con un agente letal. El desarrollo de esta técnica es especialmente relevante para controlar los mosquitos que se reproducen en grandes cuerpos de agua, como los anofelinos (Xia 2008).

Finalmente, sabiendo que la respuesta comportamental a los diferentes estímulos de las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* no son comparables dadas sus diferencias ecológicas y al origen del material biológico, y que la información experimental sobre *An. pseudopunctipennis* es escasa debido a la dificultad de criarlo en condiciones de laboratorio por su condición eurímaga (Lardeux et al. 2007). Se optó por utilizar la cepa de laboratorio estandarizada de *Ae. aegypti* como marco de referencia para poder interpretar los resultados obtenidos en *An. pseudopunctipennis*. Hasta la fecha no existían estudios que evalúen su comportamiento larvario a través de las respuestas olfativas, ya que solo hay un trabajo que identifica compuestos presentes en el alga *Spirogyra majuscula* como atractantes de oviposición para las hembras de esta especie (Torres-Estrada et al. 2007). Las respuestas olfativas de las larvas de *An. pseudopunctipennis* no fueron tan marcadas como las de *Ae. aegypti*, pero teniendo en cuenta la falta de información

experimental en el mosquito *An. pseudopunctipennis*, los resultados obtenidos en esta tesis representan una importante contribución al estudio de la ecología química de los vectores de enfermedades con el objetivo de desarrollar herramientas más eficientes para la vigilancia y el control. Además, esta tesis es una contribución importante para desarrollar nuevas estrategias de control para esta especie, uno de los principales vectores de la malaria en América Latina.

2.5.4. *Evaluación de la respuesta individual a distintos agentes ecológicos.*

En este experimento se evaluó la modulación del comportamiento de diversos agentes ecológicos sobre las larvas de *An. pseudopunctipennis*. No se detectó una respuesta comportamental de las larvas de *An. pseudopunctipennis* en ninguna de las variables obtenidas frente a los agentes ecológicos evaluados; un recurso (el alga), un predador (larvas de *Tropisternus noa*) y un competidor (larva de *Culex sp.*). Esto no apoyaría la hipótesis que asume que el alga y el predador deberían ser importantes moduladores del comportamiento de las larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esta hipótesis está basada en la estrecha asociación entre el alga filamentosa y las larvas de *An. pseudopunctipennis* en condiciones de campo, como fue descrito por Manguin et al. (1996) y observado en los sitios de muestreo. Además, Torres-Estrada et al. (2007) observaron cómo los compuestos presentes en el alga *Spirogyra majuscula* pueden modular el comportamiento de oviposición de hembras de *An. pseudopunctipennis*. Entonces, se hubiese esperado que el alga también module el comportamiento de las larvas ya que podría representar múltiples beneficios, como ser un sustrato para evitar ser arrastradas por corriente, una

importante fuente de alimento o un refugio frente a la presencia de predadores, entre otras cosas (Manguin et al. 1996).

Por otro lado, en esta tesis se observó que las larvas de *An. pseudopunctipennis* están expuestas a una gran diversidad de predadores y se identificaron comportamientos que podrían ser antipredatorios en su movimiento basal. En particular, las larvas *Tropisternus noa* son los predadores dominantes en los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis* y se observó el comportamiento de predación sobre este mosquito en condiciones naturales. Además, la modulación de comportamiento en respuesta a predadores está ampliamente estudiada en larvas de mosquitos (Kasap 1980, Kasap 1981, Juliano y Gravel 2002, Gimonneau et al. 2012). El hecho de no haber detectado un efecto en el comportamiento por parte de estos agentes ecológicos podría deberse a las condiciones experimentales del ensayo. Entre las condiciones que se pueden tener en cuenta a la hora de diseñar otro ensayo están la difusión de los compuestos de los agentes ecológicos en la arena experimental y las dimensiones de la arena experimental. La jaula usada en este ensayo, si bien dejaba pasar compuestos químicos, se observó, en una prueba que hicimos con agentes de tinción, que la concentración del colorante era mucho mayor dentro de la jaula que lo que libera a la arena experimental, así que probablemente esta difusión no generó la concentración de compuestos suficiente para generar la respuesta comportamental esperada. Por otro lado, probablemente la arena experimental de la placa de Petri no sea la indicada para detectar comportamientos complejos como antipredatorios o de búsqueda de refugio; entonces una arena experimental de mayor tamaño y que permita evaluar los movimientos verticales podría representar mejor las condiciones de

los ambientes naturales y favorecer el desarrollo y evaluación de estos comportamientos complejos.

2.6 Conclusiones

En este capítulo se caracterizó la fauna asociada a los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis*. Se determinaron 26 taxones de los cuales 15 podrían ser predadores de las larvas. El predador más abundante fue *Tropisternus noa*, e incluso se observó que este taxón es predador efectivo de las larvas en condiciones naturales. Luego se identificaron larvas de Libellulidae, adultos de *Liodessus sp.* y *Microvelia sp.* como predadores candidatos debido a su abundancia relativa. Se identificaron también larvas de *Toxorhynchites sp.* en los sitios de cría, especie que puede ser un importante predador de larvas de mosquitos según bibliografía.

En el ensayo realizado para evaluar el comportamiento basal, se observó que no hubo diferencias en el comportamiento entre las dos cepas evaluadas (campo y laboratorio) para *Ae. aegypti*. Además, se observó que las larvas de *An. pseudopunctipennis* presentan menores valores de actividad y mayores de velocidad angular absoluta. Este patrón podría ser resultado de un comportamiento antipredatorio de las larvas de *An. pseudopunctipennis* como consecuencia de estar expuestas a una alta presión de predación.

En los ensayos con repelentes y atrayentes en cebos de agar, se observó una modulación de la respuesta comportamental en las larvas de ambas especies. La exposición a compuestos repelentes aumentó la actividad de nado y disminuyó la AAV en ambas especies, y resultó en una distancia mayor al cebo sólo en *Ae. aegypti*. Respecto a los atrayentes la respuesta fue distinta; si bien

las larvas de *Ae. aegypti* reaccionaron a los cebos atractantes disminuyendo su actividad de nado y acercándose al cebo, no se detectó ninguna respuesta comportamental en las larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esto podría deberse a que los compuestos evaluados no sean atractantes para las larvas de *An. pseudopunctipennis* o que no lo sean a las concentraciones evaluadas.

Finalmente, no se detectó ningún efecto de los componentes de los distintos agentes ecológicos evaluados sobre el comportamiento de larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esto podría deberse a las condiciones experimentales del ensayo, entre las que se podrían tener en cuenta en futuros experimentos se encuentra el aumento de la difusión de los compuestos de los agentes ecológicos a la arena experimental. También podría aumentarse el tamaño de la arena experimental y considerar la posibilidad de registrar los movimientos verticales de las larvas ya que esto permitiría detectar patrones de movilidad más complejos.

**Respuesta toxicológica y comportamental
de larvas de *An. pseudopunctipennis* y *Ae.
aegypti* a cuatro clases de larvicidas**

3.1 Introducción

El estado más vulnerable en el ciclo de vida de los mosquitos es la larva, entre las alternativas de control propuestas, el control de larvas en sus sitios de desarrollo es ampliamente aceptado y utilizado para *Ae. aegypti* y, en algunas circunstancias, para *An. pseudopunctipennis* (Ordoñez Gonzalez et al. 2008, WHO 2018). Los insecticidas neurotóxicos, particularmente los organofosforados y los piretroides, son los compuestos más utilizados contra estos mosquitos. El piretroide permetrina es un adulticida de mosquitos de uso frecuente para el control de ambas especies y fue recomendado para el tratamiento de recipientes de agua potable durante muchos años hasta el 2011 (Herrera 2003, OMS 2008). Además, el organofosforado temefós es el principal larvicida utilizado en recipientes artificiales, donde se cría *Ae. aegypti* (tratamiento focal) (Chavasse y Yap 1997). Sin embargo, su uso continuo contribuyó a seleccionar poblaciones resistentes de este vector, por lo que es necesario explorar productos alternativos (WHO 1992, Osimitz y Murphy 1997, Abdel-Rahman et al. 2001, Braga y Valle 2007, Melo-Santos et al. 2010, Polson et al. 2011). Debido a la detección de cepas resistentes, el uso de temefós está siendo reemplazado por el de la toxina microbiana de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*). Además, los aceites esenciales obtenidos de ciertas las plantas exhiben una buena letalidad contra las larvas de mosquitos (Pavela y Benelli 2015). En particular, el aceite esencial de *Eucalyptus nitens* (Myrtaceae) contiene un porcentaje importante de β -tricetonas, que podrían traducirse en una importante actividad insecticida (Cantrell et al. 2012, Naspi et al. 2015, Park et al. 2017).

Los estudios sobre los insecticidas en los mosquitos se centran principalmente en su objetivo principal, sus efectos letales (Paul et al. 2006, Pridgeon et al. 2008). Sin embargo, la degradación de los larvicidas o su baja dosificación pueden conducir a las larvas de mosquitos (y a su fauna asociada) a la exposición a dosis subletales. Por lo tanto, la evaluación de los efectos no letales de estos compuestos es necesaria ya que podrían tener consecuencias importantes sobre las actividades vitales de las larvas de mosquitos (Desneux et al. 2007, Cohnstaedt y Allan 2011, Shi et al. 2011, Guedes y Cutler 2014).

Varias actividades realizadas por mosquitos inmaduros, como la respiración, la búsqueda de refugio y la evasión de predadores, dependen estrictamente de la capacidad de nado de las larvas. Esto es muy importante a la hora de tener en cuenta los cambios inducidos por insecticidas en dichos patrones de comportamiento (Brackenbury 2001, Schulz y Dabrowski 2001, Kembro et al. 2009, Reynaldi et al. 2011, Janssens y Stoks 2012). La investigación sobre el comportamiento de nado de las larvas de mosquito es escasa y la metodología generalmente es compleja. Sin embargo, en el capítulo anterior de esta tesis se desarrolló un ensayo simple para evaluar el comportamiento basal de las larvas de las dos especies de mosquitos utilizadas en este trabajo.

3.2 Objetivos e hipótesis

Debido a lo mencionado anteriormente los objetivos de este capítulo fueron:

- Estudiar la susceptibilidad de larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* a temefós, permetrina, *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens*.

- Caracterizar el comportamiento de intoxicación de larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* frente a los cuatro larvicidas mencionados.
- Evaluar el comportamiento de nado de larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* sobrevivientes a concentraciones crecientes de cuatro larvicidas.

Y se plantearon las siguientes hipótesis:

- Las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* presentan distinta sensibilidad a los larvicidas por características intrínsecas de cada especie.
- Las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* se intoxican de manera diferencial con los distintos larvicidas ya que estos últimos presentan distinto modo de acción.
- Sobrevivir a los tratamientos larvicida tiene un costo en las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1. Material biológico

Se utilizaron larvas de *An. pseudopunctipennis* colectadas en criaderos naturales de áreas montañosas subtropicales en márgenes de arroyos de “El Oculito”, San Ramón de la Nueva Orán, Salta, Argentina. Además, se utilizaron larvas de *Ae. aegypti* provenientes de una cepa susceptible a insecticidas (cepa Rockefeller, Venezuela) que se mantuvo en el laboratorio del CIPEIN.

Las condiciones de traslado, cría y mantenimiento del material biológico se encuentran detallados en la sección 2.3.1 del Capítulo 2.

3.3.2. *Compuestos químicos*

El temefós (grado técnico, 97,6 %) fue obtenido de Supelco (Analytical Bellefonte, PA USA). El formulado de *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Introban®, 1200 Unidades Tóxicas Internacionales, UTI) fue proporcionado por Chemotecnica SA, Argentina. La permetrina (94,5 %, 1:1, *cis:trans*) fue obtenida de Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania. El aceite esencial de *E. nitens* fue obtenido de hojas de una plantación del laboratorio, la metodología de colecta, extracción del material vegetal y caracterización química están detallados en los capítulos 1 y 4.

3.3.3. *Susceptibilidad a larvicidas*

Se evaluó la actividad larvicida de los cuatro insecticidas siguiendo el protocolo de Gómez et al. (2011). En este ensayo se evaluaron los larvicidas: temefós, permetrina, un formulado de *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens*. Se evaluaron cuatro concentraciones de cada larvicida junto con su respectivo control, el solvente sin insecticida. Se utilizaron concentraciones que otorgaron un rango de mortalidad entre 5 y 95 % de las larvas expuestas. Los solventes fueron acetona para permetrina y el aceite esencial de *E. nitens*; etanol absoluto para temefós; y agua deionada para el formulado de *Bti*. Se añadió un mililitro de solución larvicida o solvente a 199 ml de agua deionada en un recipiente de plástico de 500 ml, 10 cm de altura y 8 cm de diámetro, y se agitó para obtener una solución homogénea. Luego, se agregaron al recipiente 50 ml de agua con 20 larvas del tercer estadio tardío o cuarto temprano de *Ae. aegypti* o *An. pseudopunctipennis*. La mortalidad de las larvas se registró transcurridas las 24

horas de exposición continua. Fueron consideradas como muertas aquellas larvas que permanecían inmóviles o eran incapaces de ascender hacia la superficie. Se realizaron al menos cinco réplicas independientes por tratamiento. El ensayo se realizó y se mantuvo en las mismas condiciones utilizadas para la cría.

3.3.4. Comportamiento de intoxicación

Para caracterizar la intoxicación de las larvas se registró su comportamiento mientras se expusieron a dosis altas de los larvicidas. Para este ensayo se utilizaron concentraciones 20 veces superiores a la CL_{95} obtenida en el ensayo anterior, para asegurarnos de que el proceso completo de intoxicación ocurra durante el tiempo de registro del comportamiento. En el caso del aceite esencial de *E. nitens*, se utilizó una concentración de 80 ppm ya que una concentración mayor comprometía la solubilidad de algunos de sus componentes en el agua. En este caso se utilizó la placa de Petri tapada para evitar la evaporación de los componentes altamente volátiles (Tabla 3.1). Las larvas se transfirieron individualmente, una por réplica, a una placa de Petri (9 cm de diámetro) llenas con 40 ml de solución de larvicida o agua con solvente, en el caso de los controles. Luego, se grabaron durante 60 minutos para *Ae. aegypti* y 40 minutos para *An. pseudopunctipennis* con una cámara de video (Panasonic Lumix DMS-LS 80). Las pruebas se realizaron en las mismas condiciones utilizadas para la cría. Para asegurar un contraste suficiente entre los insectos y el fondo se utilizó una luz colgante sobre la arena experimental.

Tabla 3.1 Concentraciones utilizadas (en ppm) para evaluar la intoxicación de las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*.

Especie	Temefós	Permetrina	Bti	<i>E. nitens</i>
<i>Ae. aegypti</i>	0,08	0,23	0,98	80

An. pseudopunctipennis | 0,23 1,15 7,91 80

Se evaluó la actividad de las larvas de mosquito utilizando el software de seguimiento (EthoVision® XT10.1) para calcular las variables de comportamiento (Noldus et al. 2001). Se utilizó sustracción dinámica para distinguir las larvas del fondo de la imagen. La variable de actividad cuantificada fue la velocidad (distancia recorrida por las larvas por unidad de tiempo en la arena experimental, en cm por segundo). Para este ensayo se utilizaron 6 réplicas por tratamiento.

3.3.5. *Comportamiento de larvas sobrevivientes*

Para este estudio se utilizaron las larvas de ambas especies que sobrevivieron al ensayo larvicida descrito en el punto 3.3.3, se extrajo una larva por réplica. Se realizaron 10 réplicas por tratamiento. Estas larvas provienen de los tratamientos control y de las tres o cuatro concentraciones más bajas utilizadas en el ensayo de susceptibilidad a larvicidas. Las larvas se recogieron y se lavaron cuidadosamente en agua de clorada para eliminar los residuos de larvicida y se mantuvieron a 25 °C durante 2 hs. Cada ensayo se realizó en microcosmos de placas de Petri, de 9 cm de diámetro. Las larvas se transfirieron individualmente a las placas con 40 ml de agua de clorada. Se dejaron 10 minutos para aclimatarse. Luego, se grabaron digitalmente durante 10 minutos con una cámara de video (Panasonic Lumix DMS-LS 80). Las pruebas se realizaron en las mismas condiciones utilizadas para la cría. Se utilizó luz colgante (sobre la arena experimental) para asegurar un contraste suficiente entre los insectos y el fondo.

Se evaluó la actividad de las larvas de mosquito utilizando el software de seguimiento (EthoVision® XT10.1) para calcular las variables de comportamiento (Noldus et al. 2001). Se utilizó sustracción dinámica para distinguir las larvas del fondo de la imagen. Finalmente, se evaluaron las variables de actividad explicadas en el capítulo 2: velocidad media, distancia recorrida, AAV y tiempo acumulado en tres estados de movilidad: alta (HMT), media (Mt) e inmóvil (It).

3.3.6. *Análisis de datos*

Para evaluar la susceptibilidad de las larvas a los insecticidas se calcularon las concentraciones letales 50 y 95 (CL₅₀ y CL₉₅), concentraciones a las cuales mueren el 50 % y 95 % de la población expuesta respectivamente. Para ello, los datos de mortalidad para cada dosis de cada tratamiento se sometieron a una regresión probit (Litchfield y Wilcoxon 1949). Las CL₅₀ y CL₉₅ con los límites de confianza correspondientes del 95% se obtuvieron utilizando PoloPlus 2.0 (LeOra Software, EE. UU.). Se compararon los valores obtenidos evaluando la superposición de los intervalos de confianza entre los tratamientos.

Para caracterizar la intoxicación generada por los larvicidas se realizó un ANOVA sobre la diferencia entre la velocidad media de los primeros 5 minutos con la velocidad media de los últimos 5 minutos del ensayo (Vi-Vf). Los supuestos del ANOVA se testearon con la prueba de Levene (para probar la homocedasticidad), con la prueba de Shapiro-Wilks (para probar la normalidad) y gráficamente. Para caracterizar el patrón temporal de intoxicación se realizaron gráficos de la velocidad media de las larvas vs el tiempo de

exposición durante los primeros 5 minutos (cada 30 segundos) y durante todo el ensayo (40 minutos para *An. pseudopunctipennis* y 60 minutos para *Ae. aegypti*, cada 5 minutos). Finalmente, se utilizó el segundo gráfico para estimar el tiempo de latencia (Lt), tiempo en el cual se empiezan a detectar comportamientos de intoxicación generados por los larvicidas, o dicho de otra manera es el tiempo en el que se observa una velocidad media de las larvas tratadas distinta a las de las larvas control.

Para evaluar el comportamiento de las larvas sobrevivientes a los ensayos larvicidas se realizó un análisis indirecto de las variables comportamentales obtenidas. Primero se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para cada tratamiento y luego se realizó una regresión lineal simple entre el primer Componente Principal (CP1) y la concentración de larvicida a la que la larvas estuvo expuesta. Realizamos ACP independiente para los cuatro larvicidas en cada especie. Para caracterizar el CP1 se usaron correlaciones de Spearman con las variables obtenidas. Dado que el ACP genera ejes teóricos, la importancia biológica para cada CP1 obtenida es siempre independiente para cada tratamiento. En el caso de nuestro estudio, casi todos los CP1 dieron como resultado un eje de inactividad, salvo para los tratamientos con *Bti* en ambas especies y *E. nitens* en *An. pseudopunctipennis*. En estos casos, el CP1 resultó en un eje de actividad. Finalmente, se realizaron análisis de regresiones lineales simples entre el CP1 obtenido y la concentración de insecticida a la que había sido expuesta la larva. Los supuestos de este análisis fueron testeados gráficamente. Para todos los análisis, el umbral de significancia se estableció en $P < 0,05$.

3.4 Resultados

3.4.1. Susceptibilidad a larvicidas

La mortalidad de las larvas producida por los tres larvicidas fue dosis-dependiente para ambas especies de mosquitos. Para *Ae. aegypti*, las concentraciones letales 50 (CL₅₀) obtenidas fueron distintas para temefós, permetrina, *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* y en orden creciente fueron 0,0022 ppm (0,0021-0,0024), 0,0037 ppm (0,0033-0,0072), 0,020 ppm (0,017-0,024) y 43,85 ppm (35,90-51,54) respectivamente. Por otro las CL₅₀ las de temefós, permetrina, *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* obtenidas para *An. pseudopunctipennis* fueron 0,0036 ppm (0,0028-0,0048), 0,0091 ppm (0,0074-0,0122), 0,050 ppm (0,032-0,069) y 87,88 ppm (67,97-150,94) respectivamente. En base a las CL₅₀ obtenidas, las larvas de *Ae. aegypti* fueron más sensibles que las de *An. pseudopunctipennis* en todos los casos. Además, en ambas especies el aceite esencial de *E. nitens* presentó CL₅₀ varios órdenes de magnitud mayores que las de temefós, permetrina y *Bti* (Tabla 3.2). Por último, no se registró mortalidad en los tratamientos de control (C).

Tabla 3.2 Concentración letal 50, CL₅₀, y concentración letal 95, CL₉₅, (intervalo de confianza de 95%) de temefós, permetrina, *Bti* (*Bacillus turingiensis* var. *israelensis*) y aceite esencial de *E. nitens* para *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. X²: parámetro chi-cuadrado, GL: grados de libertad, H: heterogeneidad, n: número total de larvas utilizadas en los ensayos.

		CL ₅₀	CL ₉₅	X ²	GL	H	n
<i>Ae. aegypti</i>							
	Temefós	0,0022 ppm (0,0021-0,0024)	0,0042 ppm (0,0038-0,0048)	28,43	30	0,94	640
	Permetrina	0,0037 ppm (0,0033-0,0072)	0,012 ppm (0,0097-0,0148)	51,24	34	1,51	720
	<i>Bti</i>	0,020 ppm (0,017-0,024)	0,049 ppm (0,039-0,074)	187,3	40	4,68	1036
	<i>E. nitens</i>	43,85 ppm (35,90-51,54)	91,12 ppm (72,90-142,02)	185,97	26	7,15	560
<i>An. pseudopunctipennis</i>							
	Temefós	0,0036 ppm	0,0119 ppm	25,85	10	2,59	240

Permetrina	(0,0028-0,0048)	(0,0077-0,0313)	5,60	10	0,56	240
	0,0091 ppm	0,058 ppm				
<i>Bti</i>	(0,0074-0,0122)	(0,033-0,164)	15,70	11	1,43	316
	0,050 ppm	0,395 ppm				
<i>E. nitens</i>	(0,032-0,069)	(0,237-1,115)	4,33	10	0,43	240
	87,88 ppm	663,31 ppm				
	(67,97-150,94)	(292,73-5313,7)				

3.4.2. Intoxicación

La exposición a altas concentraciones de larvicidas resultó en la mortalidad de todas las larvas al finalizar el ensayo. Por otro lado, no se registró mortalidad en los tratamientos control. Con respecto a la diferencia entre la velocidad media inicial y final (V_i - V_f), se observa una diferencia significativa en ambas especies (F_{Ae} : 9,32, GL_{Ae} : 4, p -valor $_{Ae}$ <0,0001 , F_{An} : 5,87, GL_{An} : 4, p -valor $_{An}$: 0,0023). Todos los tratamientos con altas dosis de larvicidas presentaron valores de la V_i - V_f significativamente mayores que el control (Figura 3.1 A y B). En el caso de *Ae. aegypti*, los tratamientos que presentaron valores más altos fueron los de permetrina y el aceite esencial de *E. nitens*, seguido por el tratamiento con *Bti*. Por último, el tratamiento con temefós mostró valores intermedios entre el control y los otros larvicidas (Figura 3.1 A). Por otro lado, las larvas de *An. pseudopunctipennis* mostraron un patrón similar para V_i - V_f . En esta especie, el tratamiento que presentó valores mas altos fue el de permetrina, seguido por temefós y el aceite esencial de *E. nitens*, quedando el formulado de *Bti* con valores intermedios de V_i - V_f (Figura 3.1 B).

Con respecto a la dinámica temporal de intoxicación, en ambas especies se observó en los primeros 5 minutos del ensayo las larvas del tratamiento control presentaron una velocidad media similar a las tratadas con altas concentraciones de larvicidas (Figura 3.2 A y B). Sin embargo, este patrón no

se mantuvo a lo largo de todo el ensayo. En todos los tratamientos con larvicida se observó que a cierto tiempo la velocidad media de las larvas tratadas presentó valores inferiores al control. Este tiempo fue variable entre distintos larvicidas y especies, y se lo denominó tiempo de latencia (Lt). En el caso de *Ae. aegypti*, las larvas expuestas a permetrina, el aceite esencial de *E. nitens* y al formulado de *Bti* presentaron un Lt alrededor de 15 minutos, mientras que las larvas expuestas a temefós presentaron un Lt de 40 minutos (Figura 3.3 A). Por otro lado, las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a *Bti* mostraron un Lt casi instantáneo (a los 5 minutos), mientras que en las expuestas a permetrina y al aceite esencial de *E. nitens* fue de 15 minutos. Al igual que en *Ae. aegypti* las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a temefós fueron las que más tardaron en mostrar la disminución en su velocidad media, ya que presentaron un Lt de 30 minutos (Figura 3.3 B).

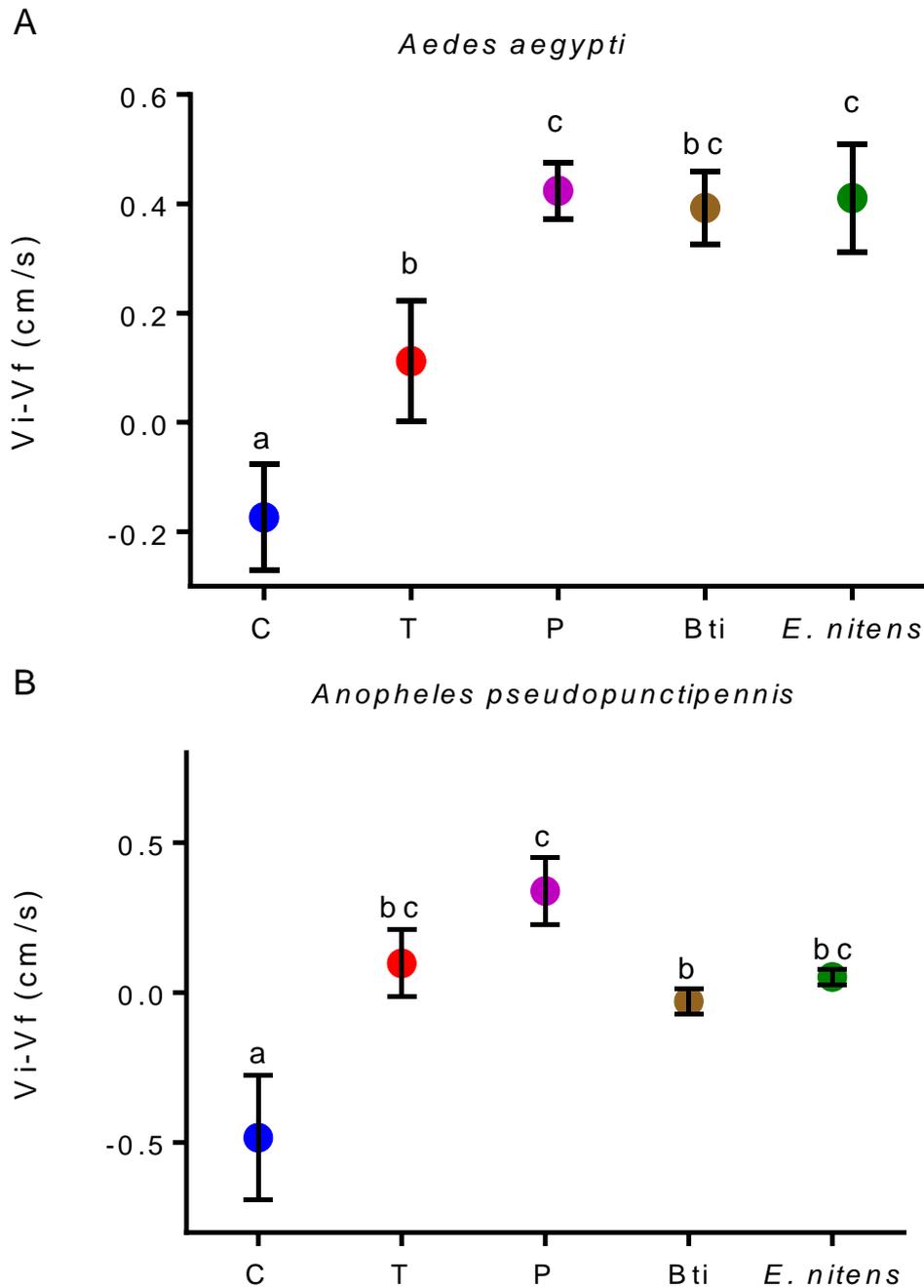


Figura 3.1 Promedio y error estándar de la diferencias entre velocidad media inicial (V_i) y velocidad media final (V_f , cm/s) de las larvas de *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B) expuestas a altas concentraciones de larvicidas. C: Control; T: Temefós; P: Permetrina. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

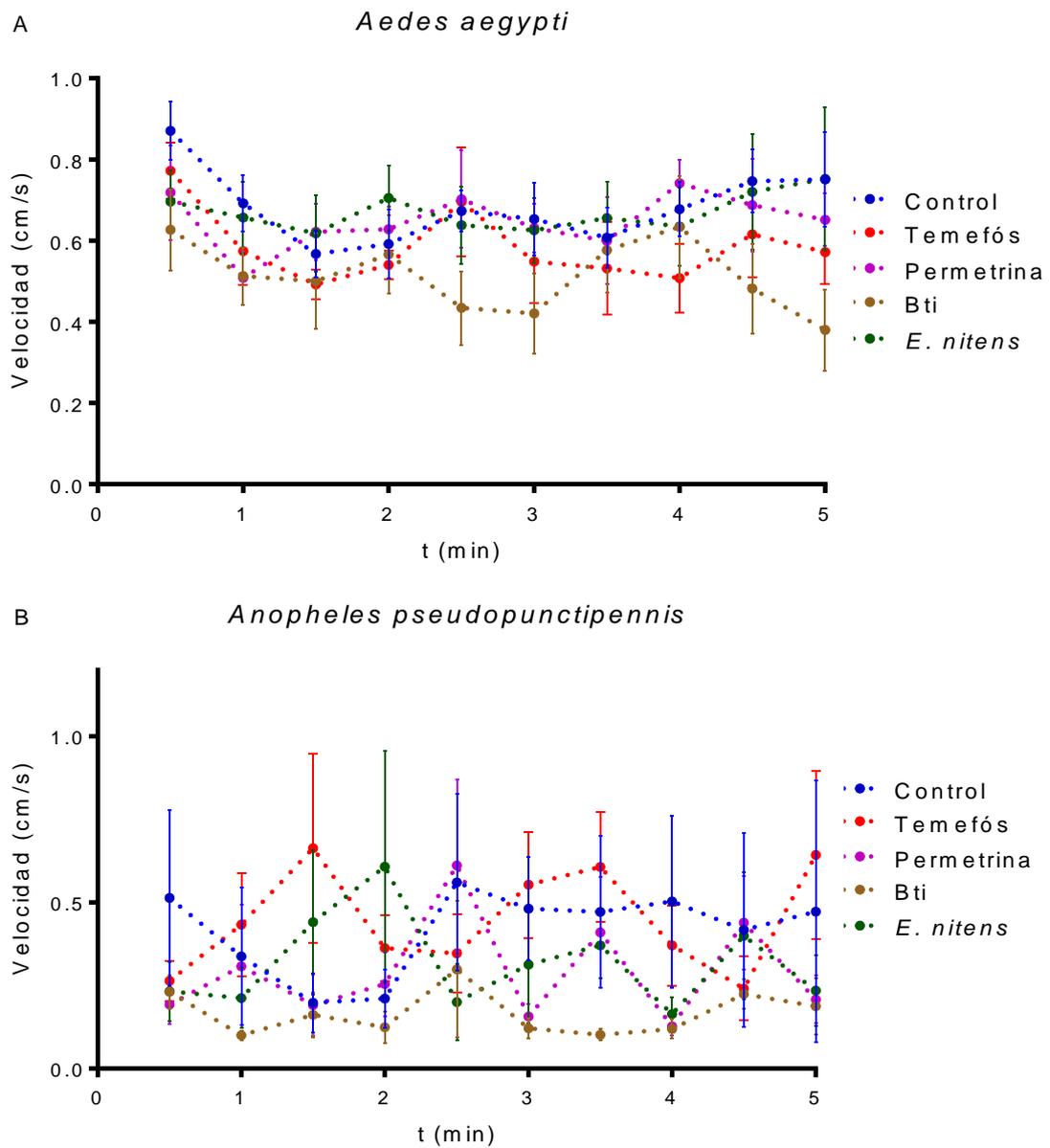


Figura 3.2 Promedio y error estándar de la velocidad media (cm/s), tomada cada 30 segundos durante los primeros 5 minutos, de las larvas de *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B) expuestas a altas concentraciones de larvicidas.

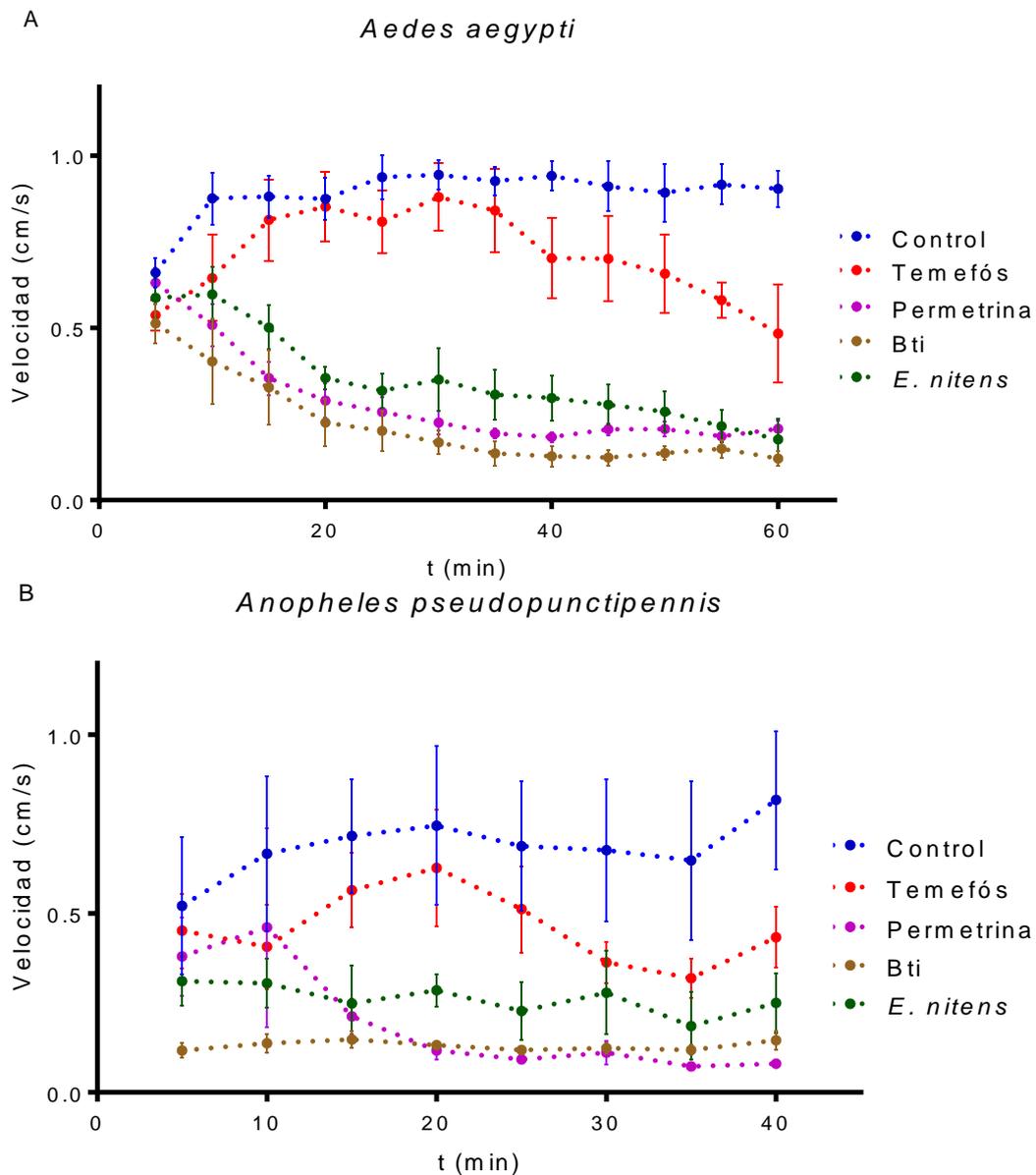


Figura 3.3 Promedio y error estándar de la velocidad media (cm/s), tomada cada 5 minutos hasta el final del ensayo, de las larvas de *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B) expuestas a altas concentraciones de larvicidas.

3.4.3. Comportamiento de larvas sobrevivientes

Los Análisis de Componentes Principales (ACP) para los experimentos de comportamiento de las larvas sobrevivientes a los cuatro larvicidas en ambas especies de mosquitos se muestran en las Figuras 3.4 a 3.7. En todos los casos, el primer Componente Principal (CP1) absorbió un alto porcentaje de la

variabilidad, entre 64,3 y 90,1%. En los tratamientos de temefós, permetrina y el aceite esencial de *E. nitens* en *Ae. aegypti*, las variables distancia, velocidad, tiempo de movilidad alta (HMt) y tiempo de movilidad media (Mt) presentaron correlaciones negativas y significativas con el CP1, sin embargo, el tiempo de inmovilidad (It) y la velocidad angular absoluta (AAV) presentaron correlaciones positivas y significativas (Tabla 3.3, Figura 3.4 y Figura 3.5 B). Por lo tanto, en estos casos, el CP1 podría definirse como un eje de inactividad, con valores positivos mayores que indican una menor actividad de nado. Por el contrario, las correlaciones entre las variables y el CP1 obtenido para las larvas de *Ae. aegypti* expuestas al formulado de *Bti* fueron diferentes. Las variables distancia, velocidad, HMt y Mt, presentaron correlaciones significativas positivas, mientras que It y AAV presentaron correlaciones significativas negativas (Tabla 3.3, Figura 3.5 A). Por lo tanto, en este caso, el CP1 se puede asignar como un eje de actividad.

En el caso de *An. pseudopunctipennis*, las variables comportamentales obtenidas de larvas expuestas a permetrina siguieron el mismo patrón que para *Ae. aegypti*, distancia, velocidad, HMt y Mt presentaron correlaciones negativas y significativas con el CP1, mientras que It y AAV presentaron correlaciones positivas y significativas (Tabla 3.3, Figura 3.6 B). Se observó un patrón similar cuando se utilizó temefós, aunque en este caso la correlación entre It y CP1 no fue significativa (Tabla 3.3, Figura 3.6 A). Por lo tanto, en estos casos el CP1 también se lo definió como un eje de inactividad. Por el contrario, las correlaciones entre las variables obtenidas y el CP1 para las larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a *E. nitens* y *Bti* fueron diferentes. En estos casos, las variables distancia, velocidad, HMt y Mt presentaron correlaciones

significativas y positivas con CP1 mientras que It, y AAV solo en el caso del aceite esencial de *E. nitens*, presentaron correlaciones negativas y significativas (Tabla 3.3, Figura 3.7). Por lo tanto, en estos casos, el CP1 se puede asignar como un eje de actividad.

En resumen, dado que ACP genera ejes teóricos, la importancia biológica de cada CP1 obtenido es siempre independiente en cada tratamiento. Las correlaciones de los CP1 obtenidos con las variables comportamentales obtenidas con el Ethovision son las que le dan el sentido biológico. En estos casos se construyeron ejes de actividad y de inactividad. En el caso de los ejes de actividad las larvas que obtuvieron valores altos de ese eje fueron larvas que se movieron más que larvas que tuvieron valores más bajos. El caso contrario es el de los ejes de inactividad, en los cuales larvas que obtuvieron valores más altos de estos ejes fueron larvas que se movieron menos que las larvas con valores más bajos. En el caso de nuestro estudio, todos los CP1 dieron como resultado un eje de inactividad, excepto los tratamientos de *Bti* en ambas especies y el tratamiento de *E. nitens* en *An. pseudopunctipennis* donde los CP1 se interpretaron como ejes de actividad.

Tabla 3.3 Índice de correlación de Spearman entre las variables comportamentales medidas y el CP1 obtenido del ACP. AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMt: tiempo en alta movilidad, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil. NS: correlación no significativa.

	Distancia	Velocidad	HMt	Mt	It	AAV
<i>Ae. aegypti</i>						
Temefós	-0,95	-0,96	-0,92	-0,88	0,90	0,78
Permetrina	-0,87	-0,89	-0,92	-0,90	0,79	0,85
<i>Bti</i>	0,94	0,94	0,98	0,92	-0,98	-0,93
<i>E. nitens</i>	-0,99	-0,99	-0,97	-0,89	0,98	0,95
<i>An. pseudopunctipennis</i>						
Temefós	-0,94	-0,95	-0,89	-0,92	0,24 (NS)	0,73
Permetrina	-0,87	-0,87	-0,77	-0,81	0,70	0,71
<i>Bti</i>	0,85	0,90	0,69	0,56	-0,77	0,05 (NS)
<i>E. nitens</i>	0,80	0,81	0,83	0,90	-0,73	-0,68

Las larvas de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* del tratamiento de control presentaron la mayor actividad de nado con respecto a las expuestas a los larvicidas temefós y permetrina, ya que presentaron los valores más bajos de inactividad (Figura 3.8 y 3.10). Este patrón también se observó con las larvas de *Ae. aegypti* expuestas al aceite esencial de *E. nitens* (Figura 3.9 B). Algo similar se observa en las larvas de *Ae. aegypti* expuestas a *Bti*, ya que las larvas de los tratamientos control presentaron mayores valores en el eje de actividad que las larvas expuestas al insecticida (Figura 3.9 A). Los análisis de regresión indicaron una reducción de la actividad de nado de las larvas de *Ae. aegypti* dependiente de la concentración de los cuatro larvicidas, temefós, permetrina, *Bti* y aceite esencial de *E. nitens* ($p < 0,05$, Figura 3.8 y 3.9, Tabla 3.4). Además, se observó la misma reducción de la actividad dependiente de la concentración en larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a temefós y permetrina ($p < 0,05$, Figura 3.10, Tabla 3.4). Sin embargo, no se observó ninguna relación entre la actividad de las larvas de *An. pseudopunctipennis* y la

concentración en los tratamientos del aceite esencial de *E. nitens* y del *Bti* ($p > 0,05$, Figura 3.11, Tabla 3.4).

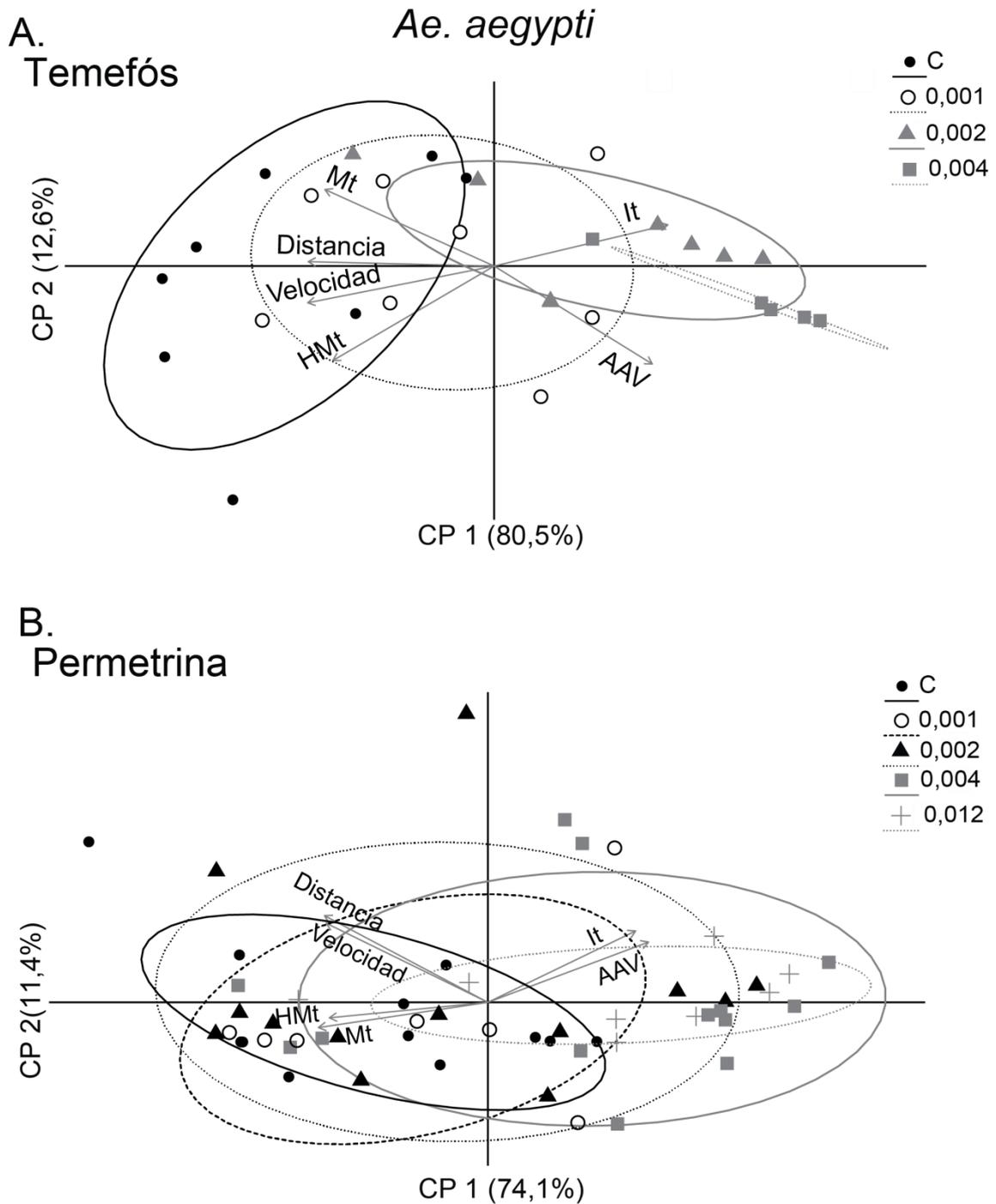


Figura 3.4 Biplot de los Análisis de Componentes Principales obtenidos de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a distintas concentraciones (ppm) de temefós (A) y permetrina (B). C: tratamientos control, AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMt: tiempo en movilidad alta, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil.

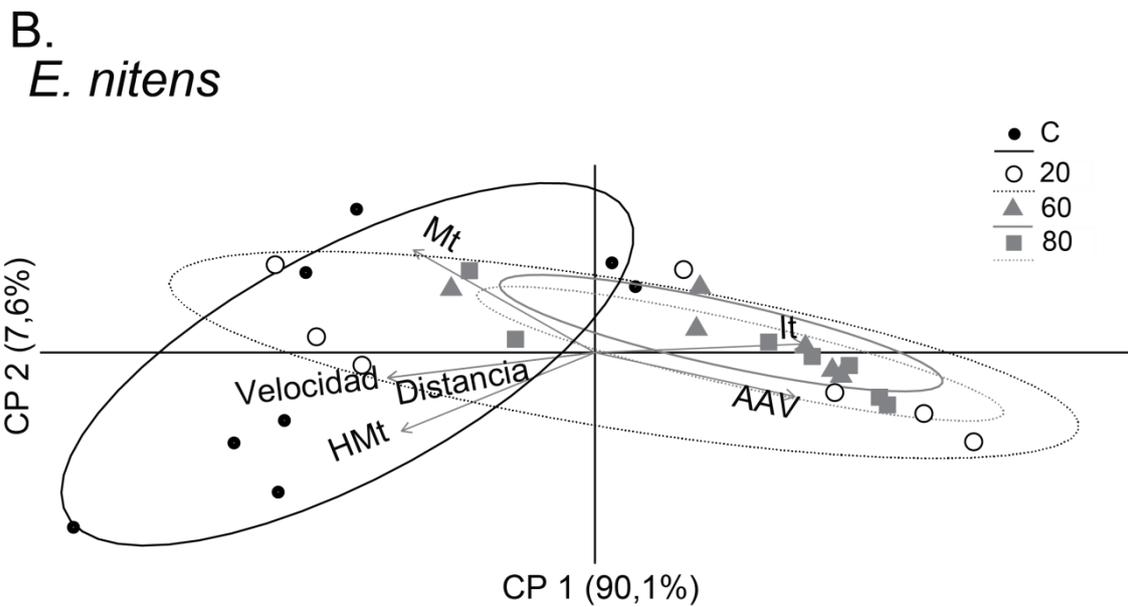
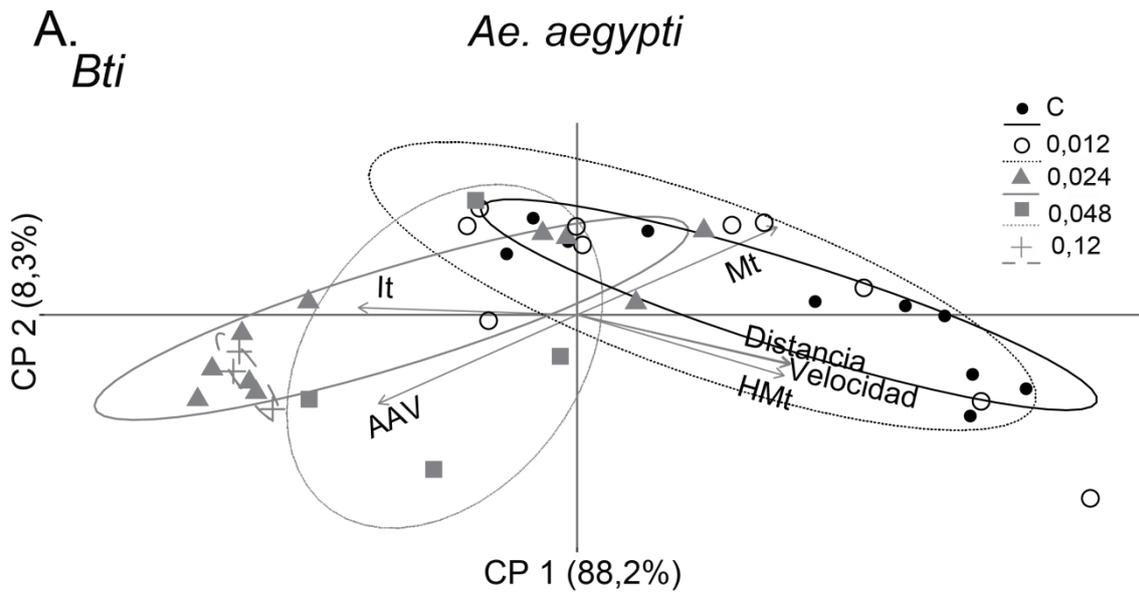


Figura 3.5 Biplot de los Análisis de Componentes Principales obtenidos de larvas de *Ae. aegypti* expuestas a distintas concentraciones (ppm) del formulado de *Bti* (A) y al aceite esencial de *E. nitens* (B). C: tratamientos control, AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMT: tiempo en movilidad alta, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil.

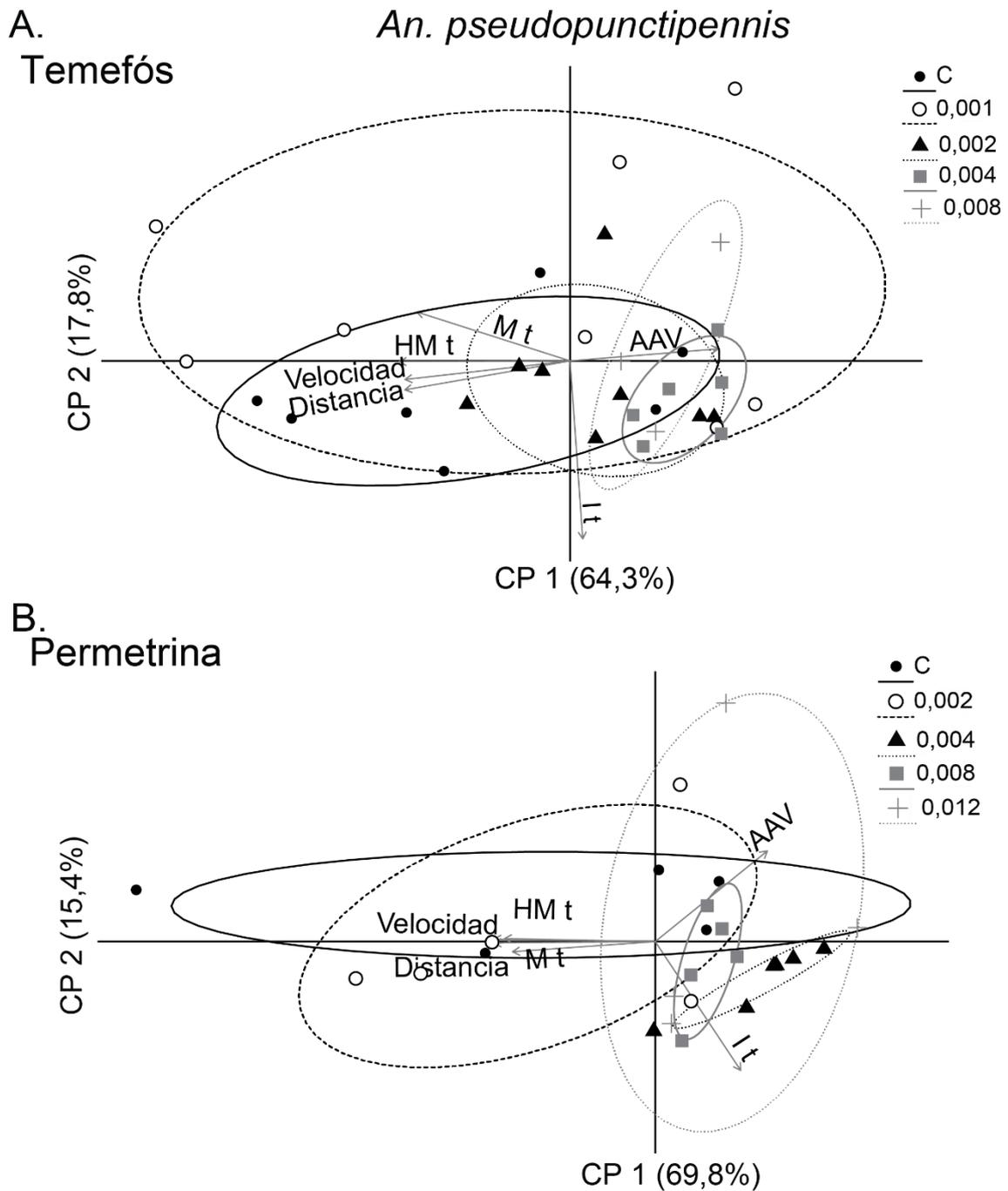


Figura 3.6 Biplot de los Análisis de Componentes Principales obtenidos de larvas de *An. pseudopunctipennis* expuestas a distintas concentraciones (ppm) de temefós (A) y permetrina (B). C: tratamientos control, AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMt: tiempo en movilidad alta, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil.

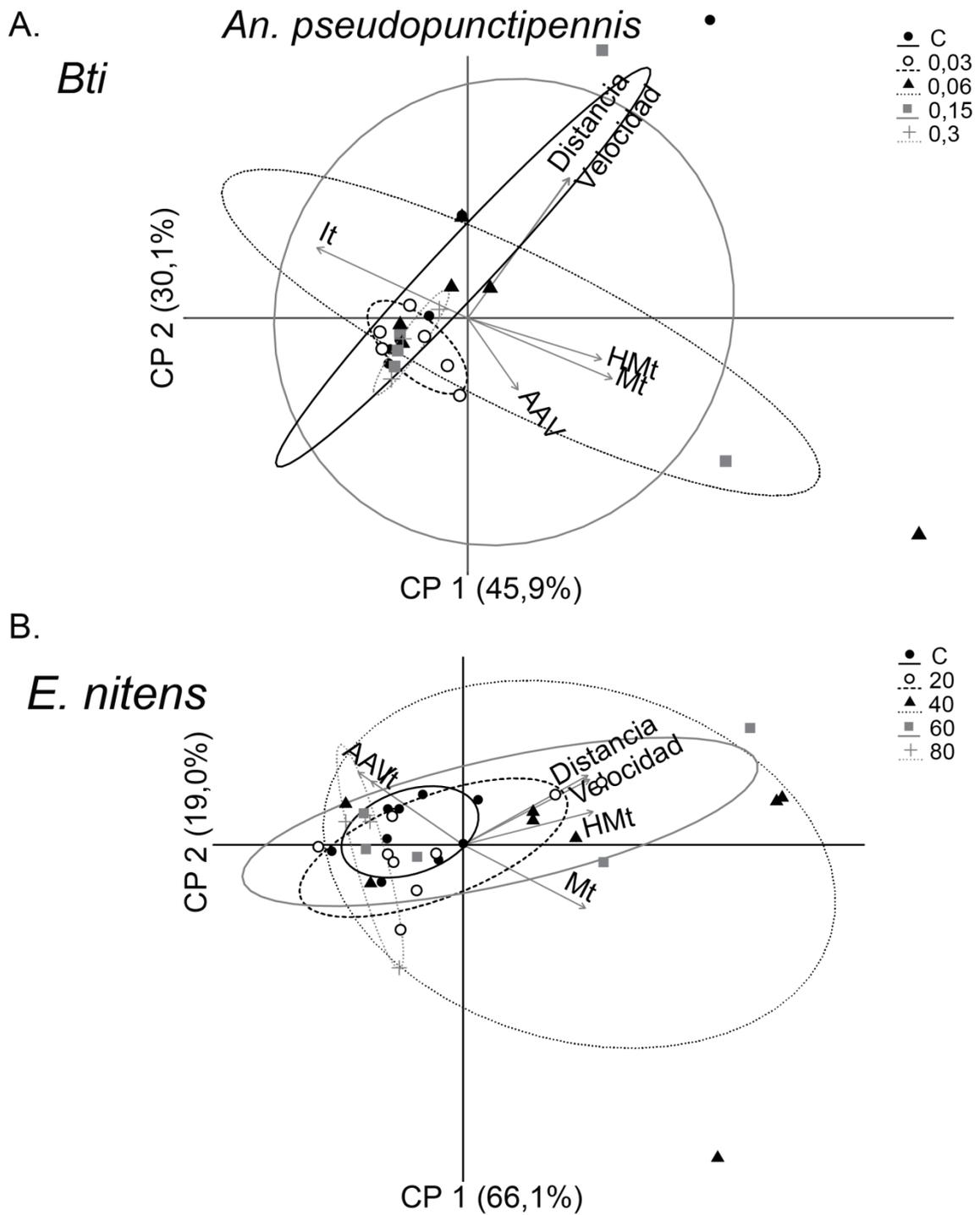
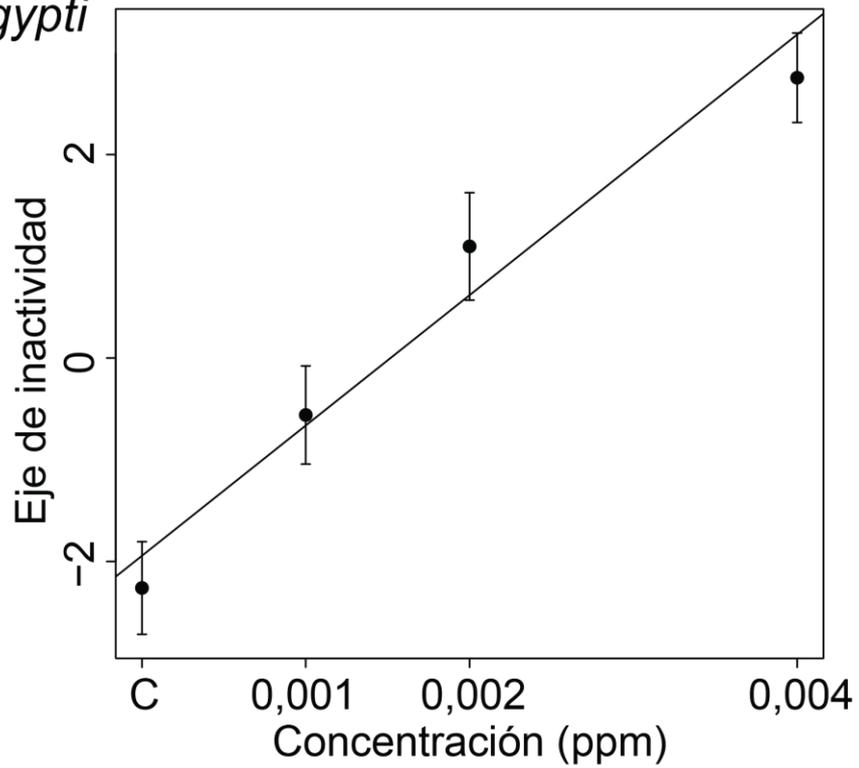


Figura 3.7 Biplot de los Análisis de Componentes Principales obtenidos de larvas de *An pseudopunctipennis* expuestas a distintas concentraciones (ppm) del formulado de *Bti* (A) y al aceite esencial de *E. nitens* (B). C: tratamientos control, AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMt: tiempo en movilidad alta, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo inmóvil.

A. *Ae. aegypti*
Temefós



B.
Permetrina

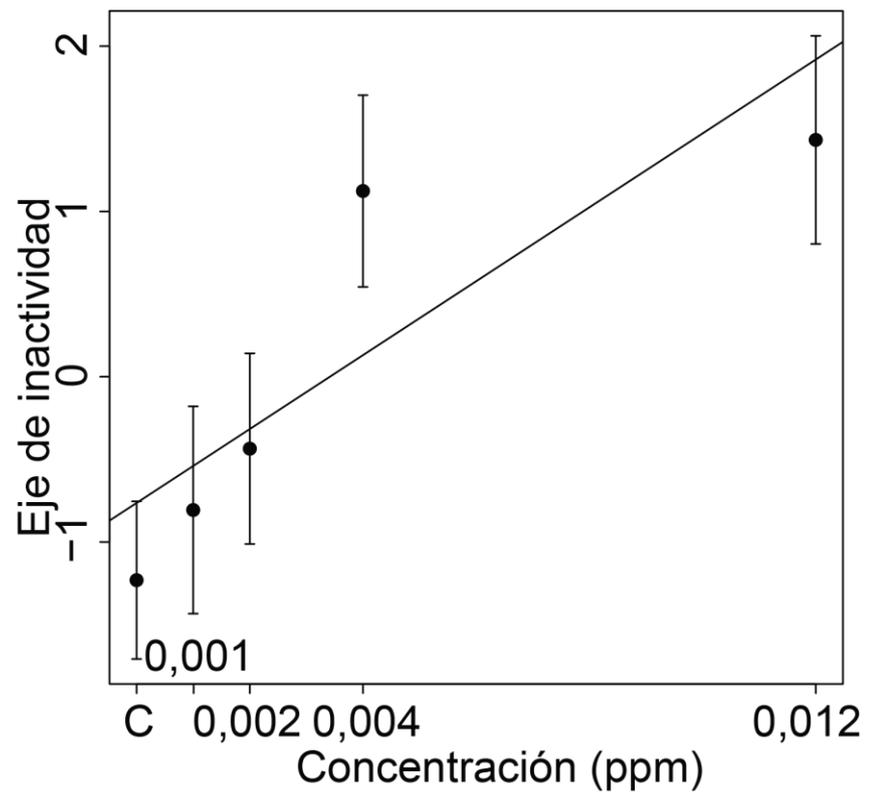
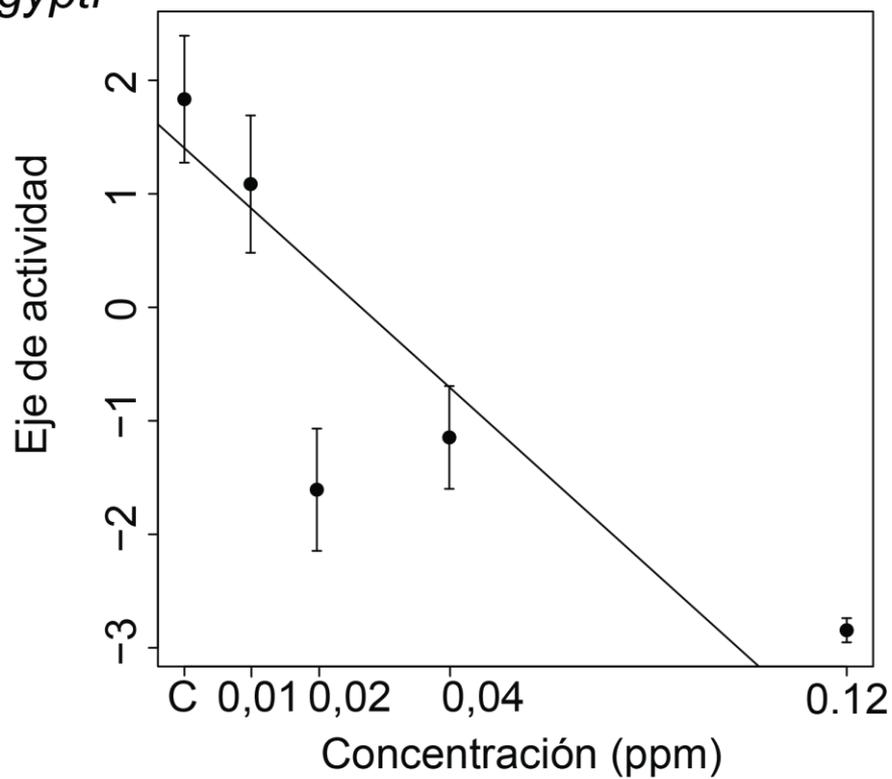


Figura 3.8 Regresión lineal entre el CP1 obtenido del ACP y la concentración de larvicida temefós (A) y permetrina (B) para *Ae. aegypti*. C: tratamientos control.

A. *Ae. aegypti*
Bti



B.
E. nitens

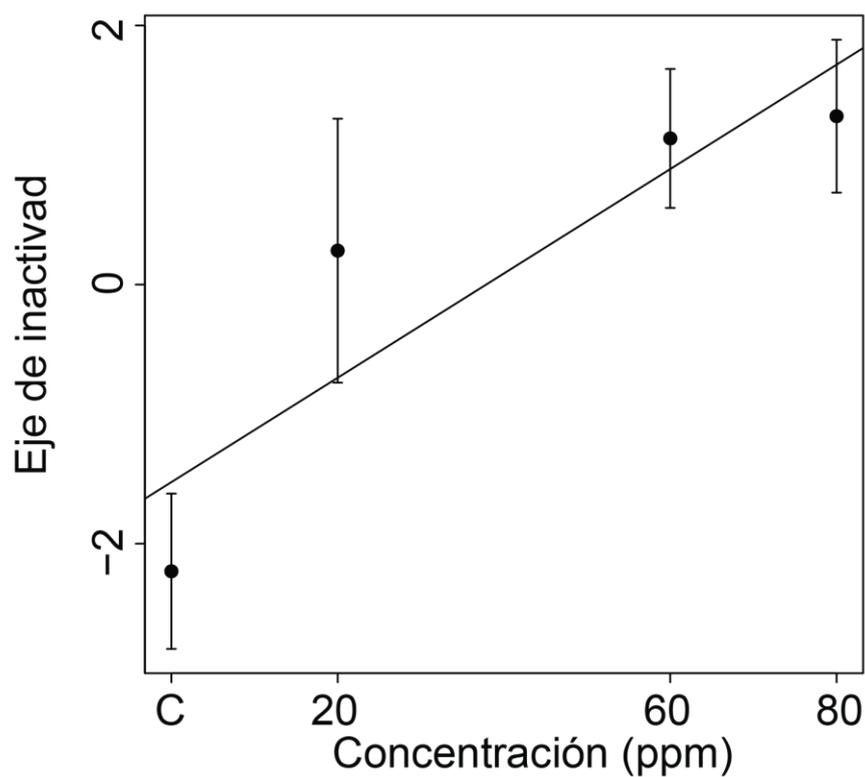
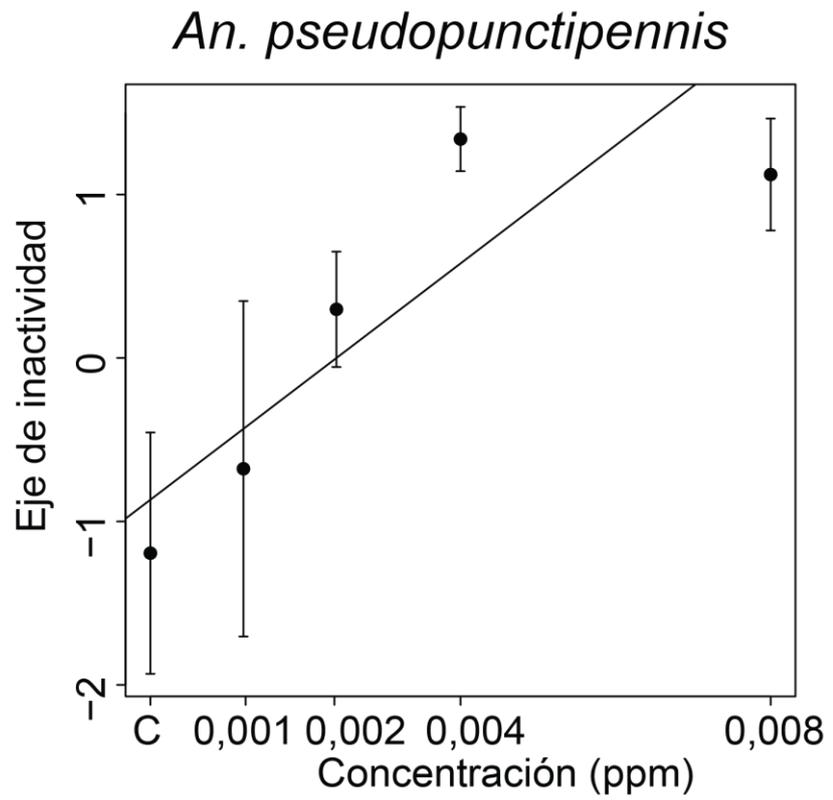


Figura 3.9 Regresión lineal entre el CP1 obtenido del ACP y la concentración de larvicida *Bti* (A) y aceite esencial de *E. nitens* (B) para *Ae. aegypti*. C: tratamientos control.

A.
Temefós



B.
Permetrina

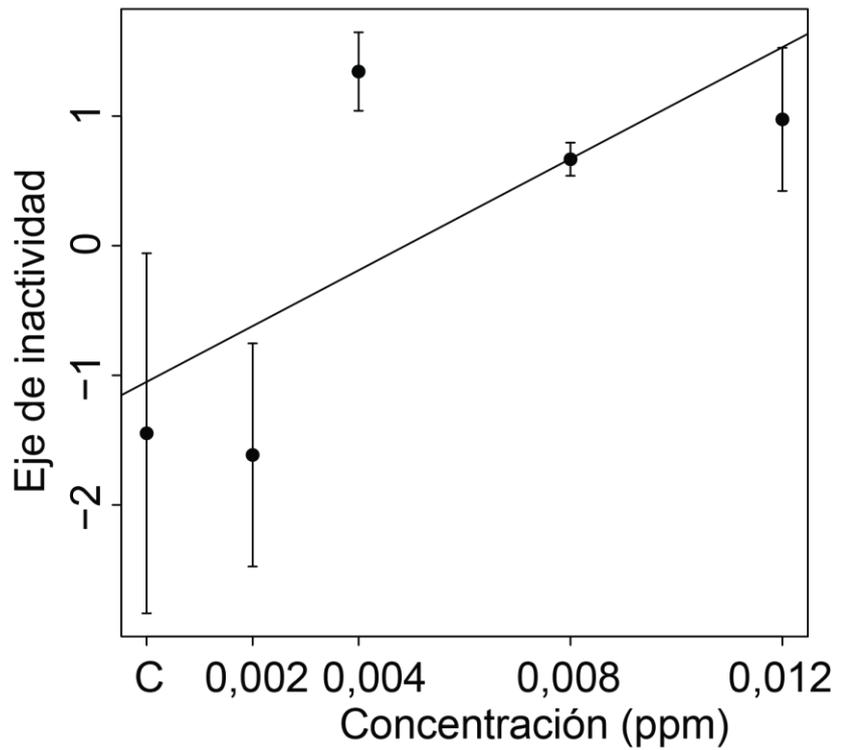


Figura 3.10 Regresión lineal entre el CP1 obtenido del ACP y la concentración de larvicida temefós (A) y permetrina (B) para *An. pseudopunctipennis*. C: tratamientos control.

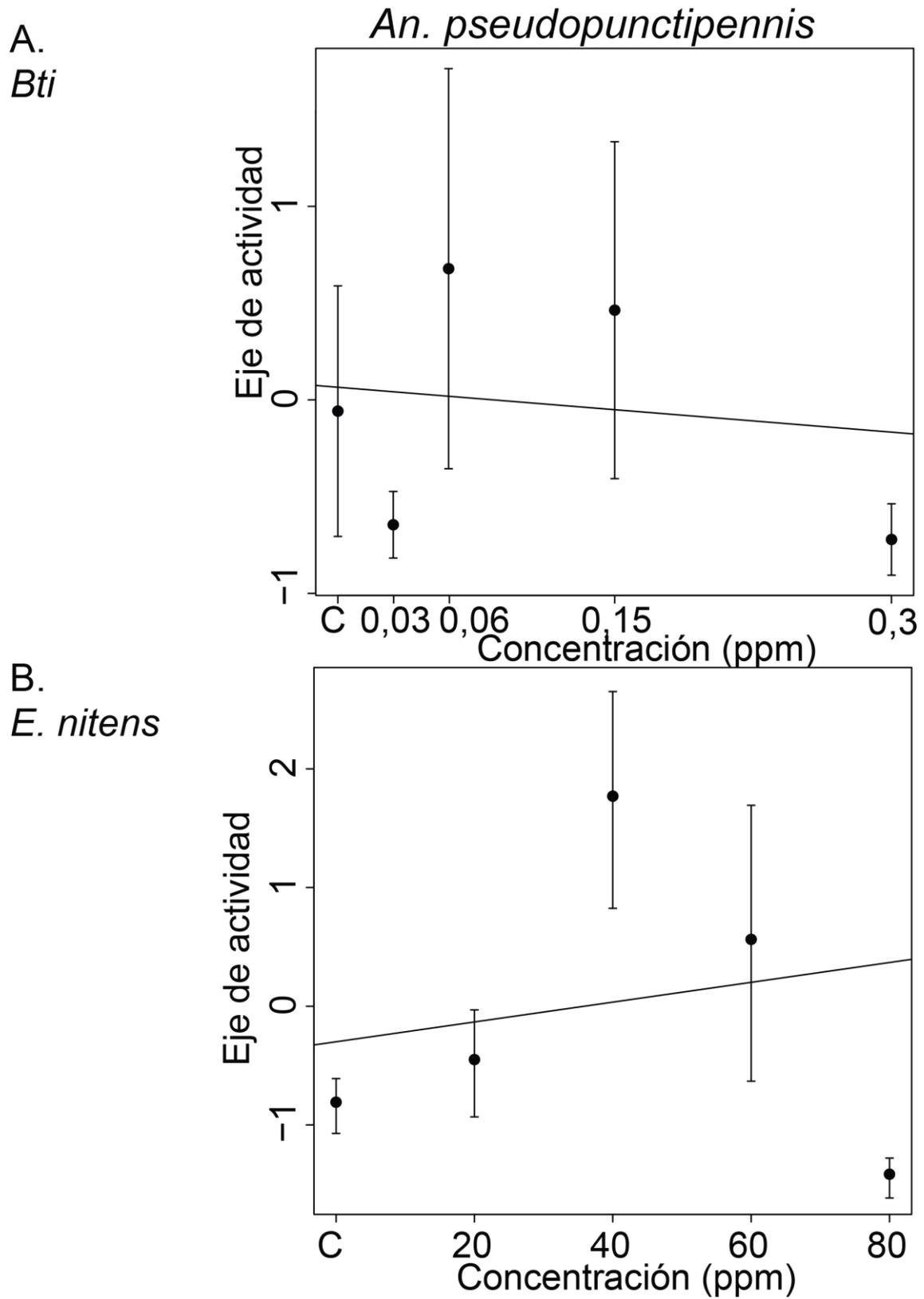


Figura 3.11 Regresión lineal entre el CP1 obtenido del ACP y la concentración de larvicida *Bti* (A) y aceite esencial de *E. nitens* (B) para *An. pseudopunctipennis*. C: tratamientos control.

Tabla 3.4 Parámetros de regresión del CP1 (eje de actividad o inactividad) y la concentración de temefós, permetrina, el formulado *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* en *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. b: ordenada al origen, F: estadístico de Fisher, GL: grados de libertad, NS: No significativo.

Especie	Larvicida	b	Pendiente	R ²	F	GL	p-valor
<i>Ae. aegypti</i>							
	Temefós	-1,94 ± 0,37	1281,12 ± 182,33	0,65	49,37	1	1,5E-7*
	Permetrina	-0,76 ± 0,35	223,54 ± 68,42	0,17	10,67	1	0,002*
	<i>Bti</i>	1,00 ± 0,40	-40,39 ± 1,00	0,32	16,32	1	0,0002*
	<i>E. nitens</i>	-1,52 ± 0,57	0,04 ± 0,01	0,32	12,4	1	0,0016*
<i>An. pseudopunctipennis</i>							
	Temefós	-0,87 ± 0,47	361,27 ± 142,65	0,18	6,41	1	0,016*
	Permetrina	-1,05 ± 0,59	215,13 ± 92,06	0,19	5,46	1	0,028*
	<i>Bti</i>	0,07 ± 0,45	-0,77 ± 3,57	0,002	0,05	1	0,83(NS)
	<i>E. nitens</i>	-0,27 ± 0,54	0,008 ± 0,013	0,012	0,42	1	0,52(NS)

3.5 Discusión

3.5.1. Susceptibilidad de larvicidas

En este estudio, se determinaron los efectos de temefós, permetrina, un formulado de *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* en la supervivencia de larvas dos especies de mosquitos, *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti*. Además, es la primera determinación de parámetros toxicológicos de estos cuatro larvicidas en *An. pseudopunctipennis*.

En todos los casos evaluados en este estudio, la mortalidad de las larvas fue dependiente de la dosis. Para *Ae. aegypti*, la CL₅₀ obtenida para temefós, permetrina y *Bti* fue similar a los valores obtenidos por Gómez et al. (2011). En esta especie, la CL₅₀ del aceite esencial fue similar a los valores obtenidos para otros aceites de aceites extraídos de árboles del mismo género (Lucia et al. 2008), pero fue varias veces mayor que los valores obtenidos para los

larvicidas sintéticos. Esta gran diferencia entre las concentraciones letales del aceite esencial con los larvicidas sintéticos también se observó en *An. pseudopunctipennis*. Esto indicaría que los aceites esenciales a pesar de presentar varias ventajas frente a los productos sintéticos (como presentar múltiples mecanismos de acción, ser biodegradables y ser poco tóxicos para mamíferos) el hecho de que sean efectivos a dosis mucho más altas implica la utilización de mayores cantidades de activo en un contexto de control. Esto sumado a su baja persistencia en el ambiente hace que estos productos representen un costo mayor (Pavela 2015, Pavela y Benelli 2016).

Por otro lado, este es el primer estudio que informa las CL₅₀ de estos cuatro larvicidas en *An. pseudopunctipennis*. Los valores de CL para *Ae. aegypti* fueron más bajos que los de *An. pseudopunctipennis*, indicando su mayor sensibilidad a los larvicidas. Por un lado, esta mayor sensibilidad de las larvas de *Ae. aegypti* podría deberse a que pertenece a una cepa de laboratorio, que se ha mantenido durante décadas sin estar bajo presión de selección, mientras que las larvas de *An. pseudopunctipennis* se recogieron de condiciones de campo. Por otro lado, esta mayor sensibilidad de *Ae. aegypti* respecto a otras especies de *Anopheles* también fue informada por varios autores (Amer y Mehlhorn 2006, Arredondo-Jiménez y Valdez-Delgado 2006, Kumar et al. 2012, Kemabonta y Nwankwo 2013, Senthilkumar et al. 2013, Elumalai et al. 2016). Sin embargo, en este trabajo no podemos discriminar si la diferencia en la sensibilidad a estos larvicidas es una característica de la especie o una consecuencia del origen del material biológico.

Dado que los aceites esenciales son mezclas complejas de diversos compuestos su modo de acción no es tan claro (Pavela y Benelli 2016). La

toxicidad de varios monoterpenos tales como γ -terpineno, p-cimeno, limoneno y α -terpineol, presentes en el aceite esencial de *E. nitens* se han evaluado previamente para *Ae. aegypti* (Lucia et al. 2013, Park et al. 2017) y pueden ser algunos de los responsables de la actividad larvicida. Además, es conocida la actividad larvicida de algunos aceites esenciales con diversas concentraciones de 1,8-cineol en *Ae. aegypti* (Lucia et al. 2007, 2008, 2013), y otras especies de mosquitos (Traboulsi et al. 2005, Conti et al. 2010). Por otro lado, la hidrofobicidad de estos compuestos se considera una propiedad importante que está fuertemente asociada con la toxicidad sobre las larvas de mosquitos (Fahmy et al. 1978). Las moléculas con mayor hidrofobicidad poseen mejor capacidad de penetrar en la cutícula de larvas de mosquitos (Welling y Paterson 1985). Además, el aceite esencial de *Ruta chalepensis*, rico en cetonas de cadena larga (C9 y C11) y un éster (C11), mostró valores de CL₅₀ frente a larvas de *Aedes albopictus* similares a los obtenidos para *E. nitens* frente a *Ae. aegypti* (Conti et al. 2013). Esto sugiere que los ésteres y tricetonas que se encuentran en el aceite esencial de *E. nitens* también pueden estar involucrados en su actividad larvicida.

Por otro lado, para *An. pseudopunctipennis* solo existe un trabajo que evalúa la capacidad larvicida del temefós en condiciones de semi-campo. Dado que para el uso de un producto en el campo se utilizan concentraciones varios órdenes de magnitud mayores a las determinadas en condiciones de laboratorio, en dicho trabajo obtienen una mortalidad del 80 % utilizando concentraciones 100 veces mayor que la CL₉₅ obtenida en esta tesis (Arredondo-Jimenez y Valdez-Delgado 2006). Algo similar se observa para *Ae. aegypti* (Arredondo-Jimenez y Valdez-Delgado 2006). Esto se explica por la existencia de otros factores que

pueden afectar la eficiencia del compuesto activo. Entre estos factores se encuentran la temperatura, el pH, la presencia de materia orgánica, la intensidad de la luz solar, la presencia de algas y la densidad larval, entre otros (Mulla et al. 1990, Pusztai et al. 1991, Becker et al. 1992, Soares Pinheiro y Tadei 2002). Debido a eso, para estimar una concentración de larvicida recomendada para el uso en campo es recomendable evaluar su actividad en esas condiciones (Setha et al. 2007). En conclusión, si bien los valores toxicológicos obtenidos en esta tesis (CL₅₀ y CL₉₅) no son aplicables a condiciones de campo, es un buen punto de partida que nos permitirá explorar los efectos de estos larvicidas en larvas de *Ae. aegypti* y sobre todo de *An. pseudopunctipennis*. Estos estudios proveerán valiosa información que puede ser implementada en programas de control, ya que permitirá a las autoridades tomar decisiones basadas en evidencia científica.

3.5.2. Comportamiento de intoxicación

Con respecto a la intoxicación de las larvas expuestas a altas dosis de los cuatro insecticidas evaluados, en la presente tesis se estudió su dinámica temporal sobre la velocidad media de nado. Este comportamiento no ha sido muy bien estudiado en larvas de mosquitos y la literatura reciente se reduce a un trabajo que estudia la intoxicación de larvas de *Cx. quinquefasciatus* con dos aceites esenciales (Kembro et al. 2009). En coincidencia con Kembro et al. (2009), todas las larvas tratadas presentaron una disminución en la actividad de nado (representada con la Vi-Vf). Cabe considerar que en ambas especies los tratamientos control presentaron valores negativos de Vi-Vf. Esto podría deberse a que en los primeros 5 minutos del ensayo las larvas se movieron menos que en el tiempo restante, debido a que están alteradas por la

manipulación; ya que no se realizó la aclimatación de la larva previa al inicio del ensayo.

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que el tiempo de latencia (tiempo hasta que la velocidad media de las larvas presentó valores inferiores al control) fue variable en los distintos tratamientos. Estas diferencias podrían estar relacionadas con los distintos modos de acción de los larvicidas utilizados (Casida y Quistad 2004, Pavela y Benelli 2015). El formulado de *Bti* presentó un tiempo de latencia de 10 minutos en *Ae. aegypti* y de 5 minutos en *An. pseudopunctipennis*. Con respecto al bajo tiempo de latencia del *Bti*, si bien para poder actuar este activo tiene que ser ingerido por las larvas, una vez que lo ingieren los síntomas de intoxicación aparecen rápidamente (Lahkim-Tsrer et al. 1987). Por otro lado, el aceite esencial de *E. nitens* mostró un tiempo de latencia de 10 minutos en ambas especies, similar al que se observó en *Cx. quinquefasciatus* utilizando otros dos aceites esenciales en una concentración similar (Kembro et al. 2009). La composición química del aceite esencial de *E. nitens* (Naspi 2015, Capítulo 1) presenta componentes que presentan distintos modos de acción que podrían actuar conjuntamente: el linalool puede actuar como inhibidor de la acetilcolinesterasa, el γ -terpineol puede activar los receptores del neuromodulador octopamina y el timol puede interrumpir el funcionamiento de los receptores GABA (Pavela y Benelli 2016).

El organofosforado temefós fue el larvicida que presentó mayores tiempos de latencia en ambas especies, siendo de 30 y 40 minutos para *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti* respectivamente. Estos tiempos de latencia fueron mucho mayores a los obtenidos para el piretrode permetrina, ya que los insectos intoxicados con piretroides suelen presentar síntomas tempranos de

intoxicación (Alzogaray y Zerba 2001). Los tiempos de latencia obtenidos en esta tesis para temefós son levemente inferiores a los registrados en otro trabajo en el cual midieron el tiempo letal de este compuesto a concentraciones similares sobre *Ae. aegypti* (Chen et al. 2009). Sumado a esto, Subramaniam et al. (2006) observaron que los tiempos letales para larvas de *Ae. aegypti* obtenidos para temefós también son mayores que los obtenidos para permetrina. Esto coincide con Corbet et al. (1984) que demostraron que los insectos tratados con insecticidas organofosforados tardan más tiempo en mostrar signos de intoxicación que los tratados con insecticidas sintéticos de otras clases, como los carbamatos.

3.5.3. Comportamiento de larvas sobrevivientes

Se identificó una disminución en la actividad de nado dependiente de la concentración para las larvas que sobrevivieron al tratamiento larvicida. En *Ae. aegypti* esta disminución se observó para los cuatro larvicidas evaluados y en *An. pseudopunctipennis* para temefós y permetrina. Otros estudios también mostraron un descenso en la actividad de nado en larvas de mosquitos expuestos a insecticidas sintéticos y naturales (Kembro et al. 2009, Tomé et al. 2014, Marriel et al. 2016). Esta disminución en la actividad de nado observado para ambas especies podría deberse al modo de acción neurotóxico de temefós y permetrina (Narahashi 1996, Mileson et al. 1998, Ray y Fry 2006). La disminución en la actividad detectada en este estudio podría afectar las posibilidades de supervivencia de las larvas de estas especies en su ambiente natural, pudiendo afectar el tiempo dedicado a alimentarse y respirar (Brackenbury 2001). Además, podría influir en el comportamiento de la evasión de predadores afectando su desempeño en la búsqueda de refugio o su

respuesta de escape (Reynaldi et al. 2011, Janssens y Stoks 2012). Sin embargo, se requieren más estudios sobre cómo el descenso en la actividad de nado, como consecuencia de la exposición a larvicidas, afecta estos rasgos ecológicos en las larvas en estas especies.

La actividad de nado de las larvas expuestas al formulado de *Bti* y al aceite esencial de *E. nitens* disminuyó en el caso de *Ae. aegypti* pero no fue afectada en el caso de *An. pseudopunctipennis*. Esta diferencia podría deberse a varias razones. En el caso del formulado *Bti*, una posible explicación podría ser la afinidad diferencial de sus toxinas por las proteínas de las distintas especies de mosquitos (Berón et al. 2016). Y en el caso de los aceites esenciales, al ser una mezcla compleja de compuestos y una combinación de diferentes modos de acción podrían afectar diferencialmente a cada especie (Pavela y Benelli 2015, Dambolena et al. 2016). Por otro lado, la concentración máxima de aceite esencial evaluada para *An. pseudopunctipennis* estaba por debajo de la CL_{50} obtenida en este estudio, dado que utilizamos 80 ppm como concentración máxima debido a la limitación de la solubilidad en agua de dos de los principales componentes del aceite esencial, p-cimeno y flavesona (Banerjee et al. 1980, TGSC 2018). Probablemente el uso de concentraciones más altas presenten un mayor nivel de letalidad y podrían producir un cambio en el comportamiento de las larvas. El uso de una concentración más alta del aceite esencial es posible, sin embargo quedaría comprometida la solubilidad de algunos de sus componentes principales en el agua, modificando su actividad como larvicida. Por último, esta diferencia en la respuesta comportamental de las larvas expuestas a *Bti* y al aceite esencial de *E. nitens* podría estar relacionada con que las larvas de *An. pseudopunctipennis* tienden a pasar más

tiempo inmóviles en comparación con larvas de *Ae. aegypti* (capítulo 2). Este comportamiento podría enmascarar la disminución en la actividad de nado producida por estos larvicidas.

En este estudio, hemos elegido evaluar las variables de comportamiento que estaban directamente relacionadas con la actividad de nado de las larvas: la distancia de nado, la velocidad media, el tiempo de cada estado de movilidad (HMT, Mt e It) y la velocidad angular absoluta (AAV). La última variable, AAV, está relacionada con cambios de sentido en la dirección de nado. La relación positiva de esta variable con la inactividad, y en consecuencia con la concentración, podría implicar un comportamiento de nado no dirigido. Este fenómeno generado por concentraciones subletales de insecticidas ya se observó en otros organismos (varias especies de peces) y fue identificado como una primera respuesta de intoxicación a los larvicidas (Little y Finger 1990).

Si bien en este estudio se evaluaron cuatro clases de larvicidas diferentes en dos especies de mosquitos, esto no implica que se recomiende usar estos insecticidas en sus sitios de cría; en especial teniendo en cuenta que *An. pseudopunctipennis* se cría en ambientes naturales como meandros de arroyos de montaña (Manguin et al. 1996). Aplicar insecticidas sintéticos como el temefós o la permetrina en esos ambientes, podría tener consecuencias importantes en organismos no blanco (Antwi y Reddy 2015). Sin embargo, se estudió el efecto de estos insecticidas en *An. pseudopunctipennis* ya que podrían ser utilizados confinados en dispositivos de control, como trampas de larvas cebadas con atractantes, ya que estos larvicidas son efectivos a muy bajas concentraciones. Por otro lado, hay varios trabajos que no detectaron

impacto del tratamiento con *Bti* sobre organismos no blanco tanto en charcos como arroyos (Back et al. 1985, Hershey et al. 1995, Lagadic et al. 2014). Sin embargo, no hay estudios del potencial impacto que puede tener el formulado de *Bti* o el aceite esencial de *E. nitens* en los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis*. Futuros estudios podrían evaluar los efectos toxicológicos de estos larvicidas en la fauna asociada de este mosquito, para poder considerar estos larvicidas para su utilización en estrategias de manejo del vector.

Finalmente, es importante mencionar que en estos dos primeros capítulos se evaluó la actividad de nado de las larvas registrando sólo sus movimientos en sentido horizontal. Elegimos esta opción para cuantificar la actividad, ya que son movimientos muy simples de medir y han sido utilizados por varios autores (Liu et al. 2010, Tomé et al. 2014, Marriel et al. 2016). Además, en este experimento las larvas que no fueron capaces de hacer los movimientos verticales para respirar fueron consideradas muertas y descartadas para continuar ensayos de comportamiento. Sería necesario realizar nuevos estudios para evaluar los efectos de los larvicidas en la actividad de nado vertical para complementar y verificar los resultados de esta tesis.

3.6 Conclusiones

En conclusión, en esta sección se estudiaron la supervivencia, la intoxicación y los efectos comportamentales del temefós, la permetrina, un formulado de *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* en *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis*. Se determinaron por primera vez los valores toxicológicos de los cuatro larvicidas para *An. pseudopunctipennis*. También, se caracterizó el comportamiento de

intoxicación de las larvas frente a los cuatro larvicidas evaluando la evolución del patrón temporal de velocidad media de nado. En esa caracterización se observó que el temefós fue el larvicida que presentó mayor tiempo de latencia en ambas especies. Además, en casi todos los casos, identificamos una disminución en la actividad de nado de las larvas expuestas a los larvicidas. Esto podría generar una mayor mortalidad de las larvas en sus hábitats naturales. Sin embargo, son necesarios más estudios para verificar y cuantificar los efectos de los larvicidas en el comportamiento de alimentación y la respuesta antipredatoria de las larvas de mosquito. El trabajo actual solo ha examinado los efectos subletales sobre el comportamiento de nado de aquellas larvas que sobrevivieron a una exposición a larvicidas. Futuras investigaciones pueden concentrarse en el estudio de los efectos subletales de los larvicidas en otras etapas del ciclo de vida como pupas o adultos emergidos.

Efecto repelente del aceite esencial de *E. nitens* en *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti*

4.1 Introducción

El uso de repelentes es un método eficiente de protección personal para prevenir picaduras de mosquitos y el control de muchas enfermedades transmitidas por ellos (Pohlit et al. 2011). Sin embargo, el repelente más utilizado, la DEET, se está poniendo en discusión por sus posibles efectos adversos (Corbel et al. 2009, Weeks et al. 2012, Almeida et al. 2018). Además, algunas especies de mosquitos, como ciertas hembras de *Ae. aegypti*, no son sensibles a la DEET, ya sea por exposiciones previas o por base genética (Stancsyk et al. 2010, 2013). Estas cuestiones evidencian la necesidad de estudiar nuevos repelentes con mejor eficacia, mayor tiempo de protección y menos problemas para la salud humana (Tsisanou et al. 2012).

Entre los métodos de laboratorio *in vivo* más recientes para evaluar el efecto repelente de nuevos compuestos se encuentra la prueba de antebrazo en jaula (Schreck 1977, Lupi et al. 2013). En este método el antebrazo de un voluntario es tratado con el potencial repelente y el número de mosquitos que se posan sobre el antebrazo tratado es comparado con el que se posan en el antebrazo control. Sin embargo, la atracción diferencial de los mosquitos a los distintos voluntarios genera resultados muy variables (Carlson et al. 1992). Además, solo se pueden evaluar compuestos con perfiles toxicológicos y dermatológicos conocidos (Sharpington et al. 2000). Entonces, para identificar nuevos agentes repelentes, se requiere desarrollar otros métodos que no necesiten tener en cuenta estas consideraciones.

Para evitar estos problemas, se han desarrollado métodos *in vitro* para, por ejemplo, realizar evaluaciones preliminares de compuestos novedosos. Entre

estos métodos el de repelencia en placa es ampliamente utilizado por muchos autores para evaluar el efecto repelente en varios insectos como moscas, cucarachas, vinchucas, chinches de cama y mosquitos (Bar-Zeev 1960, Mullens et al. 2009, Sfara et al. 2008, Alzogaray et al. 2016). Este método combinado con el uso de un software de seguimiento permite no solo obtener información sobre el efecto repelente de compuestos novedosos, sino también caracterizar su efecto sobre el comportamiento del organismo estudiado (Moretti et al. 2013, Sfara et al. 2013, Zermoglio et al. 2015, Mengoni y Alzogaray 2018). Este tipo de metodologías pueden resultar útiles para obtener información comportamental de especies que son difíciles de criar en condiciones de laboratorio, y que por ende no existe información sobre su respuesta a ningún tipo de repelentes, como *An. pseudopunctipennis* (Lardeux et al. 2007).

Finalmente, si bien muchos de los problemas de los ensayos *in vivo* suelen ser solucionados por los ensayos *in vitro*, las condiciones de los ensayos *in vitro* son artificiales y no representan las condiciones naturales del mosquito. Entonces, cuando los resultados son positivos en los ensayos *in vitro* es importante validar los resultados obtenidos con metodologías *in vivo* (Deng et al. 2014).

4.2 Objetivos

Los objetivos de este capítulo son:

- Evaluar el efecto repelente de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y el 1,8-cineol sobre *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* utilizando la metodología de repelencia en placa.

- Estudiar los efectos sobre el comportamiento de locomoción de los mosquitos adultos en ambas especies que tienen los compuestos evaluados en el objetivo anterior.
- Evaluar el efecto repelente de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y el 1,8-cineol sobre *Ae. aegypti* utilizando la técnica de brazo en jaula.

Y se plantearon las siguientes hipótesis:

- El DEET y el el aceite esencial de *E. nitens* son repelentes para hembras de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* pero el 1,8-cineol no.
- Las sustancias que resulten afectaran el comportamiento de locomoción de las hembras de ambas especies.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1. Material vegetal y extracción de aceites esenciales

Las plantas de *E. nitens* se obtuvieron comprando plantines de 1 año de edad de un vivero forestal (Vivero Forestal Bosques Patagónicos, Bariloche, Argentina). Cada planta fue certificada por calidad y origen. Se plantaron nueve plantines en junio de 2013 en un lote experimental ubicado en nuestro centro de investigaciones en Buenos Aires, Argentina (34° 33' 92,20" S, 58° 30' 9,20" O). Para obtener el aceite esencial se cosecharon hojas de árboles (3-6 años de edad) en siete oportunidades entre septiembre y marzo de 2014 a 2018, se realizó una extracción por cosecha. En cada extracción, se recolectaron hojas frescas y se secaron a temperatura ambiente durante 24 hs. Luego, las muestras de hojas (200 g) se hidrodestilaron durante 90 minutos usando un aparato de tipo Clevenger modificado (Clevenger 1928). Los aceites esenciales

se separaron del agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se mantuvieron a -4 °C hasta su uso. La media del rendimiento de aceite esencial se estimó utilizando el rendimiento de cada extracción calculado con la fórmula $\text{Rendimiento (\%)} = \text{masa de aceite esencial (g)} \times 100 / \text{masa de hojas (g)}$.

4.3.2. Verificación de la composición del aceite esencial: Análisis mediante GC/MS

En esta sección se confirmó la composición química del aceite esencial de *E. nitens* caracterizada por Naspi et al (2015). Para ello se realizó un análisis cromatográfico de las muestras extraídas. Las muestras de aceites esenciales se diluyeron en hexano (1 mg/ml) y se analizaron en un cromatógrafo de gases interconectado a un espectrómetro de masas cuadrupolo Shimadzu (GCMS-QP 2010 Ultra). Las condiciones GC-MS para la columna no polar DB-5MS fueron las siguientes: temperatura inicial 60 °C (se mantuvo por 3 minutos), luego aumentada a 100 °C (2 °C/min) y finalmente hasta 240 °C (7 °C/min, tiempo de espera 3 minutos). La temperatura del inyector y del detector fueron 270 y 280 °C respectivamente. Se usó helio como gas *carrier* (fase móvil), a una presión de columna constante de 100 kPa y un flujo de columna de 1,6 ml/min. La presión de entrada de la columna se estableció a 35 kPa (53,6 cm/seg), el flujo de columna a 2,2 ml/min. Se utilizó una relación de *split* de 1:30. Los espectros de masas se registraron entre 40 y 350 a.m.u., con energía de ionización de 70 eV.

Los componentes del aceite esencial se verificaron con los obtenidos por Naspi (2015) comparando su índice de retención lineal y su espectro de masa con los disponibles en la base de datos (Adams 1995; *Wiley mass spectral database*

versión 7, base de datos del libro web NIST) cuando el índice de similitud fue mayor o igual a 90%.

4.3.3. *Compuestos químicos*

La N, N-dietil-m-toluamida (DEET, 97%) y el 1,8-cineol (99 %) se compraron a Sigma-Aldrich (Argentina). La acetona (para análisis, 99,5 %) y el hexano (para análisis, 99,5 %) se compraron en Sintorgan®, Argentina.

4.3.4. *Repelencia en placa*

Para evaluar la repelencia en placa se impregnó la mitad de un papel de filtro (9 cm de diámetro) con 0,5 ml de distintas concentraciones de una solución de los compuestos a testear y la otra mitad con 0,5 ml del solvente (acetona). En el caso de los tratamientos control se impregnaron ambas mitades del papel de filtro con solvente. Los papeles impregnados se dejaron 1 hora bajo campana para que se evapore el solvente y luego se colocaron en una caja de Petri de 9 cm de diámetro y 3 cm de alto. Se colocó una hembra dentro de la caja de Petri y rápidamente se la tapó, luego se grabó su comportamiento durante 10 minutos con una cámara de video (Panasonic Lumix DMS-LS 80). Las pruebas se realizaron en las mismas condiciones utilizadas para la cría. Se utilizó luz colgante sobre arena experimental para asegurar un contraste suficiente entre los insectos y el fondo. Se evaluaron hembras de 5 a 10 días de ambas especies en este ensayo y se realizaron diez réplicas por tratamiento para *An. pseudopunctipennis* y quince para *Ae. aegypti*.

Los videos grabados se digitalizaron y se evaluó la actividad de las larvas de mosquito utilizando el software de seguimiento (EthoVision® XT10.1) para

calcular las variables de comportamiento (Noldus et al. 2001). Se utilizó sustracción dinámica para identificar las hembras de su fondo. Los compuestos evaluados fueron la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y su componente principal, el 1,8-cineol.

Para evaluar la repelencia se obtuvo el tiempo acumulado (en segundos) en el cual los mosquitos recorrían el área tratada y control. A partir de esos tiempos acumulados se calculó el índice de repelencia (IR) utilizando la siguiente fórmula:

$$IR = \frac{Tr}{Tr + Tc}$$

Tr: Tiempo acumulado en la zona tratada

Tc: Tiempo acumulado en la zona control

Este índice toma valores entre 0 y 1, siendo 0 cuando el mosquito pasa todo el tiempo en la zona control y 1 cuando el mosquito pasa todo el tiempo en la zona tratada. Y toma el valor de 0,5 cuando el mosquito pasa la mitad del tiempo del ensayo en cada zona.

Además, para evaluar de que manera la exposición a repelentes puede afectar la actividad de locomoción de las hembras se evaluaron las variables de actividad explicadas en el capítulo 2, velocidad media, distancia recorrida, AAV y tiempo acumulado en tres estados de movilidad: HMt, Mt e It.

4.3.5. Antebrazo en jaula

El ensayo de antebrazo en jaula se basó en el protocolo de la OMS (2009) con ligeras modificaciones, siguiendo a Gleiser et al. (2011). Los mosquitos

utilizados para este ensayo se criaron en una jaula separada de la cámara de cría principal. Se utilizaron hembras de 5 a 10 días que se mantuvieron sin ingesta de sangre y en conjunto con los machos, para asegurar la cópula y el comportamiento de búsqueda del hospedador. El ensayo de repelencia se realizó en una jaula de policarbonato (30 cm de ancho, 30 cm de altura, 38 cm de profundidad) con un hueco frontal en forma de círculo (diámetro de 15 cm) cubierto con una funda de nailon; los lados laterales de la jaula presentan una red tipo mosquitero de aluminio. Sobre el antebrazo de un voluntario, en un área de 30 cm² delimitada por un molde de papel de forma redondeada, se aplicó 100 µl de soluciones al 20 % en etanol de DEET, 1,8-cineol o el aceite esencial de *E. nitens*. El área restante del antebrazo estaba cubierta por una manga hecha de etil vinil acetato y la mano estaba protegida por tres guantes de látex (Figura 4.1). Antes de cada prueba, se realizó un control (solo etanol) para garantizar el comportamiento de búsqueda de hospedero (Figura 4.2). Si la cantidad de hembras que aterrizaban en el área expuesta era más de 10, en un período de 1 minuto, se continuaba con el ensayo.

Para las pruebas de repelencia, los voluntarios introdujeron el antebrazo en la jaula que contenía entre 50 y 100 hembras cada 10 minutos durante un período de 1 minuto (Figura 4.3). Se utilizó la duración, en minutos, de repelencia completa para medir la actividad repelente y se expresó como Tiempo de Protección Total (TPT) (Trongtokit et al. 2005). Se registró como TPT el tiempo en el que dos mosquitos picaban en el área expuesta o que se observaba una picada en dos períodos de tiempo consecutivos (Schreck y McGovern 1989). Además, durante el ensayo los mosquitos fueron sopladados para prevenir su

alimentación con sangre, tanto en el control como en el tratado. Para cada tratamiento se realizaron cuatro réplicas, cada réplica con un voluntario distinto.



Figura 4.1 Antebrazo de un voluntario, preparado para el ensayo de repelencia.

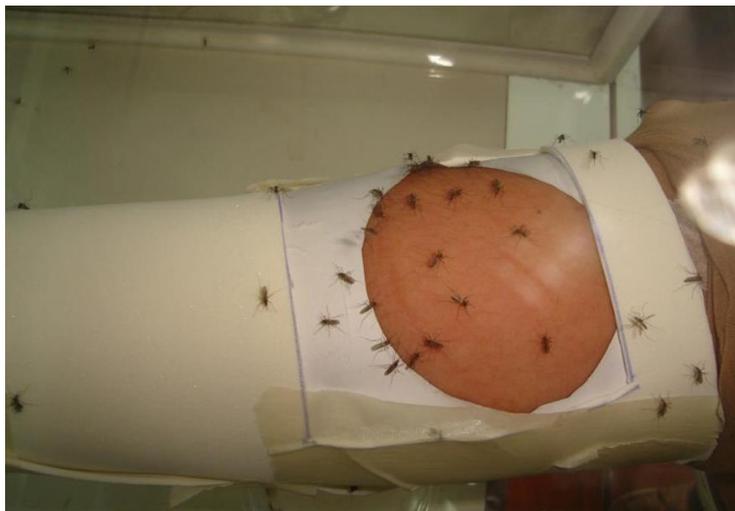


Figura 4.2 Antebrazo de un voluntario, control (etanol) de ensayo de repelencia.



Figura 4.3 Antebrazo de voluntario, ensayo de repelencia con aceite esencial.

4.3.6. Análisis estadísticos

Para evaluar la actividad repelente del ensayo de repelencia en placa se realizó un ANOVA utilizando el IR como variable respuesta. Además, para evaluar cómo la exposición a repelentes puede afectar la actividad de locomoción de las hembras se realizó un análisis indirecto de las variables comportamentales obtenidas. Para ello, se realizó un ANOVA utilizando el primer Componente Principal (CP1) obtenido de los Análisis de Componentes Principales (ACP) para cada tratamiento. En este estudio, todos los CP1 dieron como resultado un eje de actividad, entonces las hembras que tengan valores más altos en ese eje fueron las que presentaron un mayor movimiento general y las que mostraron valores más bajos fueron las que presentaron un movimiento general menor. Para ambos ANOVAs se utilizó la prueba *a posteriori* de LSD Fischer para comparar las diferencias de las medias. Los supuestos de los ANOVAs se testearon con la prueba de Levene (para probar la

homocedasticidad), con la prueba de Shapiro-Wilks (para probar la normalidad) y gráficamente. En este caso, el valor de $p < 0,025$ se consideró estadísticamente significativo para mantener un error global de 0,05 (Corrección de Bonferroni).

Finalmente, para analizar las diferencias en el parámetro tiempo de protección total obtenido en el ensayo de antebrazo en jaula, realizamos un Modelo Lineal Generalizado (GLM), con la función identidad (*VarIdent*) para modelar la varianza de cada repelente, y los repelentes fueron los factores. Luego, se utilizó una prueba de LSD Fischer *a posteriori* para comparar las diferencias de las medias. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente diferente. Para todos los análisis estadísticos se utilizaron RStudio e Infostat (Di Rienzo et al. 2014).

4.4 Resultados

4.4.1. Composición química

Durante todos los ensayos se realizaron 7 extracciones independientes del aceite esencial de *E. nitens* y la eficiencia promedio de esas extracciones fue de 0,17 % (error estándar: 0,01 %). Los principales componentes del aceite fueron los monoterpenos 1,8-cineol, p-cimeno, γ -terpineno y α -terpineol. También se confirmó la presencia de tres componentes identificados como β -tricetonas cíclicas: flavesona, leptospermona e isoleptospermona.

4.4.2. Repelencia en placa

En los todos los ensayos de repelencia en placa los tratamientos control presentaron valores de IR cercanos a 0,5, indicando que no hay una

preferencia por alguna zona específica de la arena experimental. Debido a eso se identificaron como repelentes a los tratamientos que presentaron un IR significativamente menor al obtenido en el tratamiento control. En particular, se observaron diferencias significativas para los tratamientos con DEET en ambas especies ($F_{Ae}: 3,27$, $GL_{Ae}: 4$, $p\text{-valor}_{Ae}: 0,015$, $F_{An}: 3,74$, $GL_{An}: 3$, $p\text{-valor}_{An}: 0,021$). Además, en ambas especies se observó repelencia significativa a partir de la concentración 0,01 mg/ml de DEET, ya que los valores de IR para esas concentraciones son significativamente menores a los obtenidos para el tratamiento control (Figura 4.4 A y B).

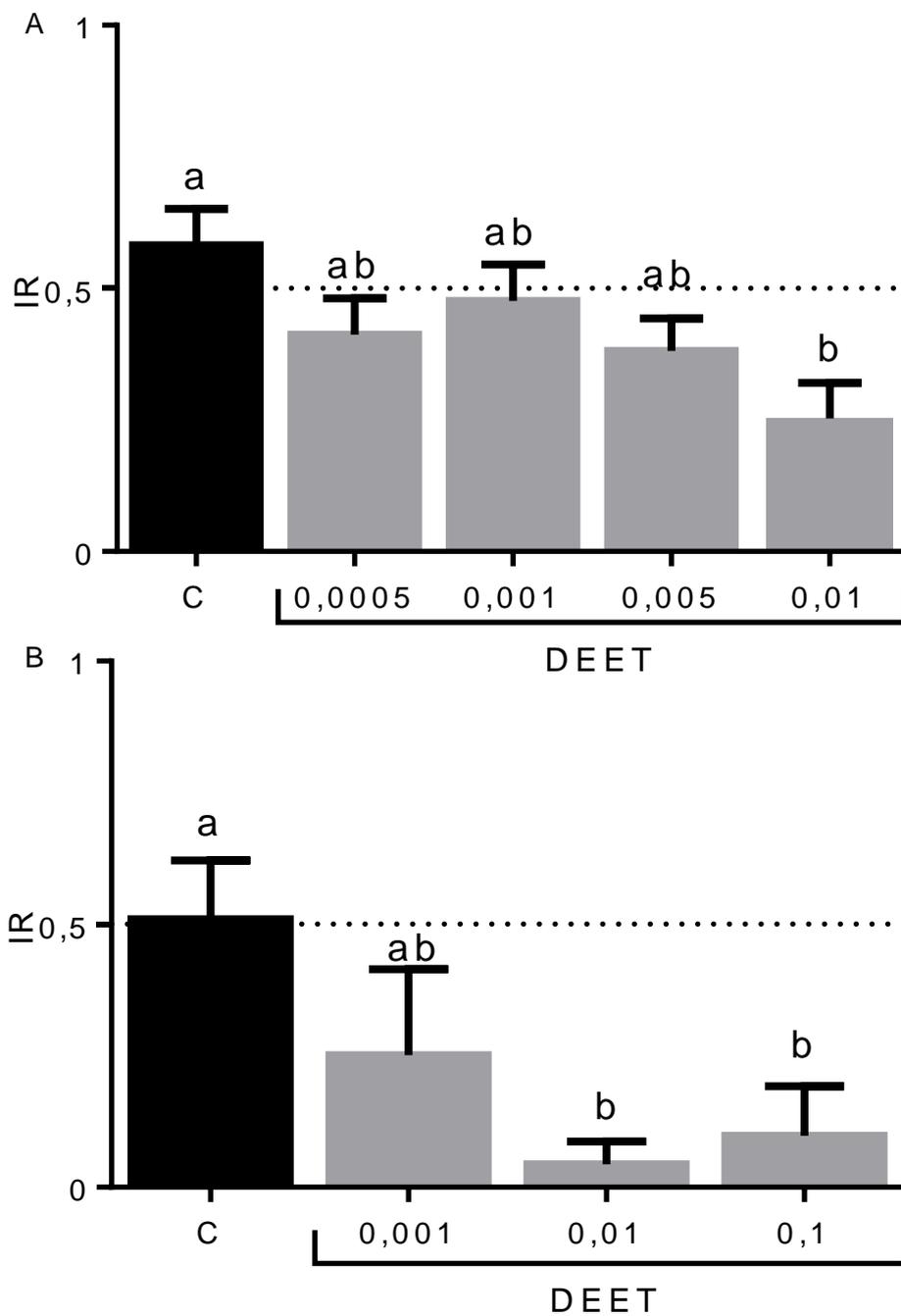


Figura 4.4 Índice de repelencia en placa (IR, media + error estándar) de distintas concentraciones de DEET (mg/ml) en *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,025$).

Al evaluar el efecto del aceite esencial de *E. nitens* también se observaron diferencias significativas en el IR para ambas especies de mosquitos (F_{Ae} : 3,12, GL_{Ae} : 6, $p\text{-valor}_{Ae}$: 0,008, F_{An} : 3,44, GL_{An} : 8, $p\text{-valor}_{An}$: 0,003). Si bien en el aceite esencial de *E. nitens* también se obtuvieron valores de IR significativamente menores al control, este fenómeno recién se observó a partir de la concentración de 1 mg/ml para ambas especies (Figura 4.5 A y B). Sin embargo, el componente principal del *E. nitens*, el 1,8-cineol, no se observaron diferencias significativas con el control en las concentraciones evaluadas para ninguna de las dos especies de mosquitos (Figura 4.5 A y B).

Por otro lado, para evaluar el comportamiento de locomoción de los mosquitos expuestos a estos tratamientos se trabajó con los CP1 obtenidos de los ACPs de cada tratamiento para cada especie. En este caso, todos los CP1 absorbieron gran parte de la variabilidad, entre 64,5% y 77,72%. Además, como todos los CP1 obtenidos presentaron correlaciones positivas con la velocidad media, la distancia recorrida, los tiempos en estado de movilidad alta y media (HMT y Mt) y correlaciones negativas con el tiempo en estado inmóvil y la velocidad angular absoluta (AAV), se definieron como ejes de actividad en todos los tratamientos (Tabla 4.1).

Con respecto a los tratamientos con DEET, no se observaron diferencias significativas en la actividad de los mosquitos en ninguna de las dos especies (Figura 4.6, F_{Ae} : 1,35, GL_{Ae} : 4, $p\text{-valor}_{Ae}$: 0,26, F_{An} : 0,31, GL_{An} : 3, $p\text{-valor}_{An}$: 0,82). En cambio, los tratamientos con el aceite esencial de *E. nitens* y el 1,8-cineol los resultados fueron diferentes en las distintas especies evaluadas. No se observaron diferencias significativas en la actividad de los mosquitos para *An. pseudopunctipennis* (Figura 4.7 B, F_{An} : 0,60, GL_{An} : 8, $p\text{-valor}_{An}$: 0,78),

mientras que sí se observaron para *Ae. aegypti* (Figura 4.7 A, F_{Ae} : 2,59, GL_{Ae} : 6, p -valor $_{Ae}$: 0,023). Las diferencias en la actividad de las hembras en *Ae. aegypti* se observaron solamente en los tratamientos con el aceite esencial y no para su componente principal, el 1,8-cineol. Estas diferencias se produjeron en las mismas concentraciones que presentaron un IR significativo en esta especie, 1 mg/ml y 10 mg/ml del aceite esencial de *E. nitens* (Figura 4.7 A).

Tabla 4.1 Porcentaje de variabilidad (%) explicada por el CP1, obtenido de los ACPs, y la correlación de Spearman, con las variables comportamentales medidas. Dis: Distancia recorrida, Vel: Velocidad media, AAV: Velocidad Angular Absoluta, HMT: tiempo en alta movilidad, Mt: tiempo en movilidad media y It: tiempo Inmóvil.

	Variabilidad Explicada (%)	Dist	Vel	HMT	Mt	It	AAV
<i>Ae. aegypti</i>							
DEET	69,97	0,94	0,94	0,65	0,82	-0,80	-0,84
<i>E. nitens</i>	70,26	0,94	0,93	0,66	0,82	-0,90	0,74
<i>An. pseudopunctipennis</i>							
DEET	77,72	0,97	0,98	0,93	0,95	-0,44	-0,13
<i>E. nitens</i>	64,51	0,96	0,96	0,67	0,84	-0,75	-0,86

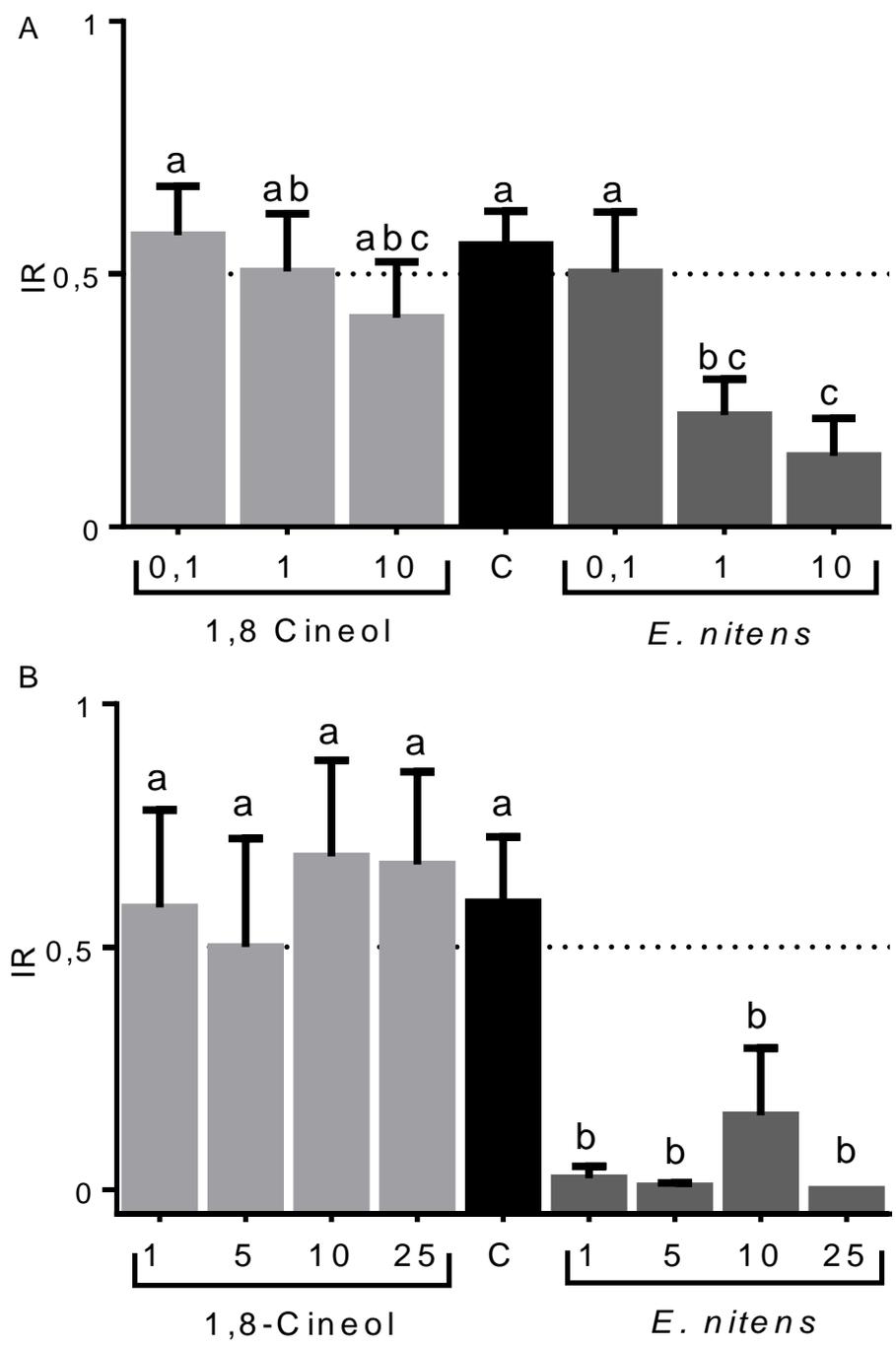


Figura 4.5 Índice de repelencia (IR, media + error estándar) en placa de distintas concentraciones (mg/ml) del aceite esencial de *E. nitens* y su componente mayoritario (1,8-cineol) en *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,025$).

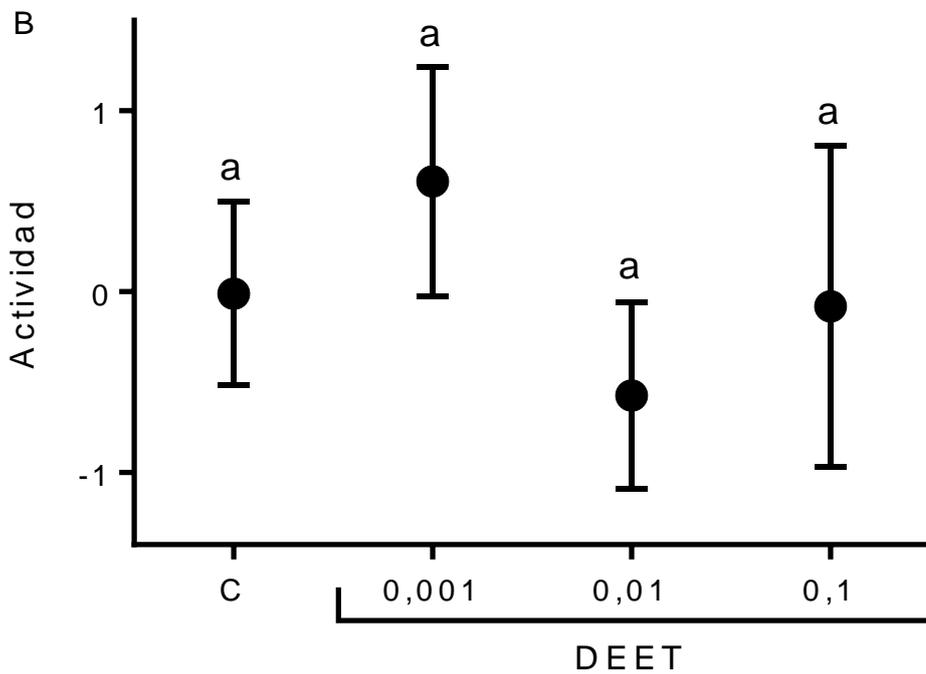
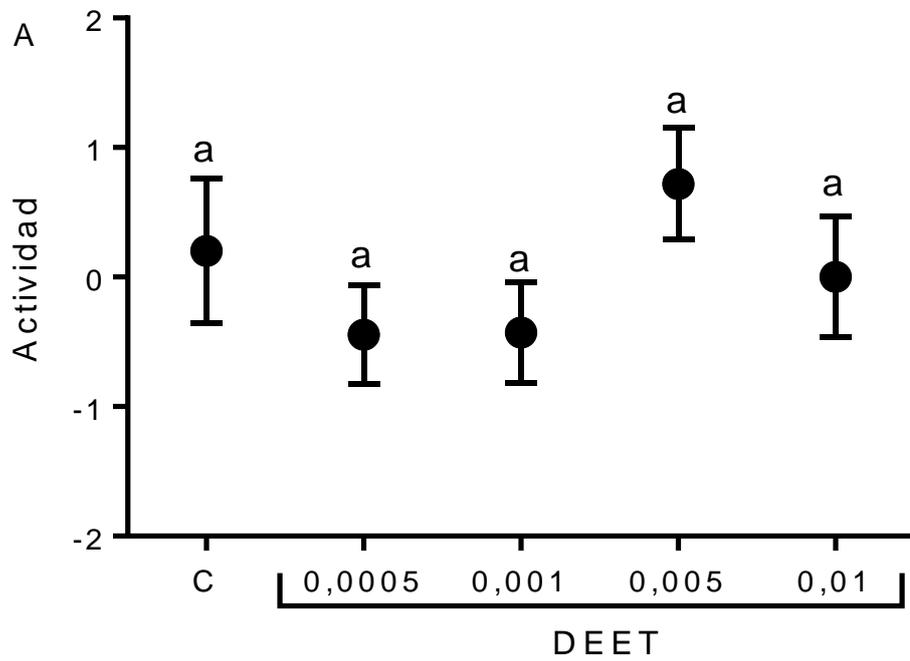


Figura 4.6 Eje de actividad (media \pm error estándar) de distintas concentraciones (mg/ml) de DEET en *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,025$).

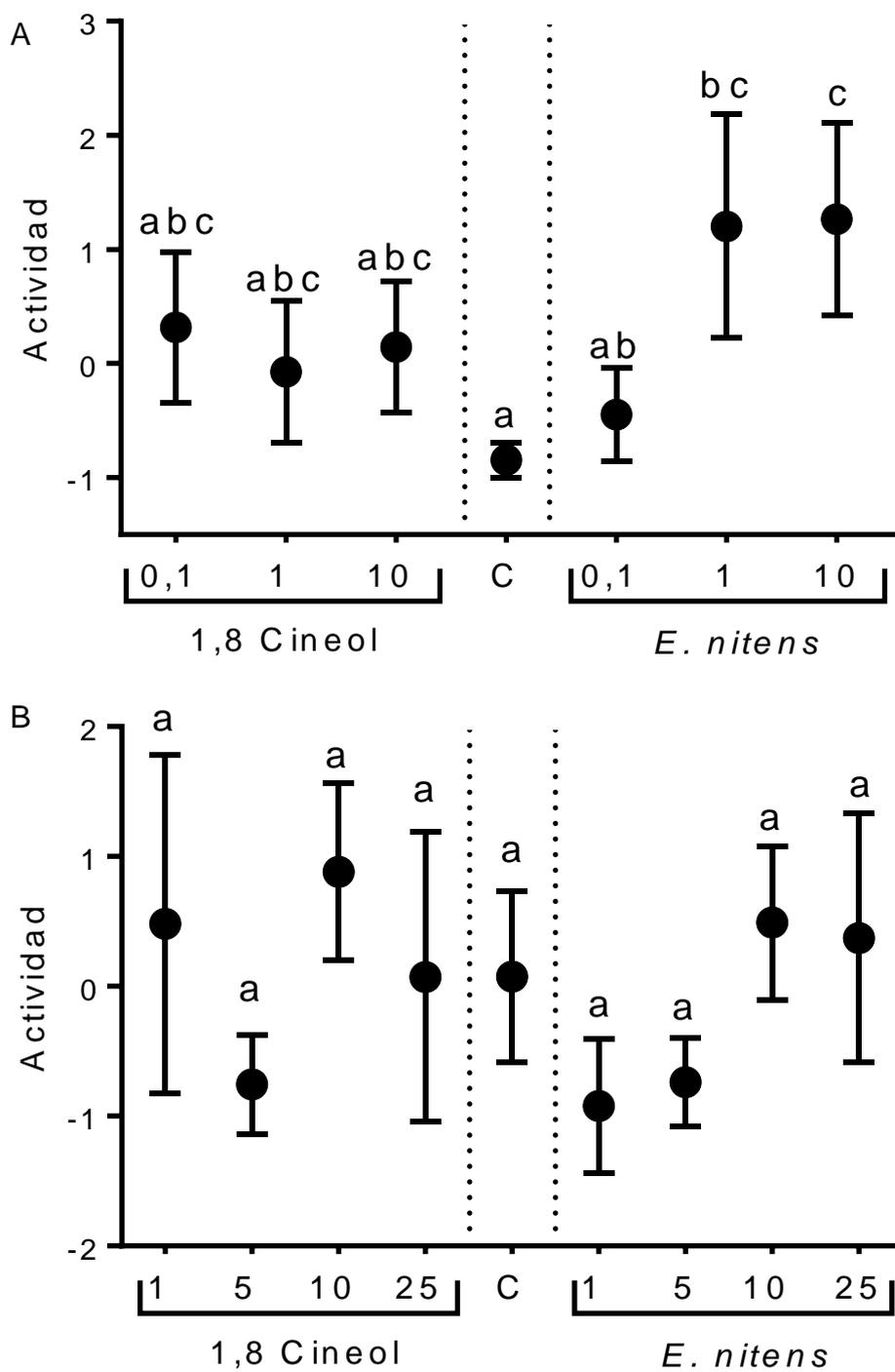


Figura 4.7 Eje de actividad (media \pm error estándar) de distintas concentraciones (mg/ml) del aceite esencial de *E. nitens* y su componente mayoritario (1,8-cineol) en *Ae. aegypti* (A) y *An. pseudopunctipennis* (B). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,025$).

4.4.3. Repelencia en antebrazo

En el ensayo de repelencia en antebrazo, la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y su componente principal, 1,8-cineol, presentaron un efecto repelente contra *Ae. aegypti* (Figura 4.8). Sin embargo, estos tratamientos presentaron diferencias significativas en su Tiempo de Protección Total (TPT). Los valores de TPT de DEET ($196,67 \pm 41,77$ minutos) fueron significativamente mayores que los del aceite esencial y el 1,8-cineol. Además, el aceite esencial de *E. nitens* presentó un TPT ($97,50 \pm 10,31$ minutos) significativamente mayor al de su del 1,8-cineol ($5 \pm 2,89$ minutos, Figura 4.8).

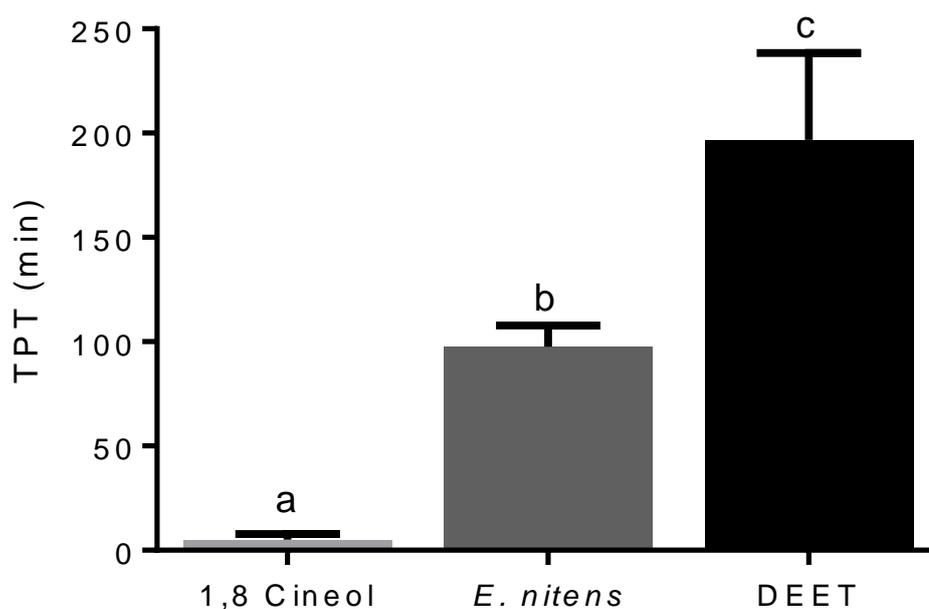


Figura 4.8 Actividad repelente de soluciones (al 20%) de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y 1,8-cineol frente a adultos de *Ae. aegypti*. Cada barra representa la media del Tiempo de protección Total (TPT) + error estándar estimado (en minutos). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.5 Discusión

4.5.1. Composición química

En primer lugar, se confirmó la composición química del aceite esencial de *E. nitens* descrita por Naspi et al. (2015). En un estudio similar, Li y Madden (1995) también informaron que los terpenos 1,8-cineol y p-cimeno son componentes principales del aceite esencial de *E. nitens*, pero no encontraron ninguna β -tricetona cíclica. En el aceite evaluado, el porcentaje de 1,8-cineol fue bajo en comparación con otras especies de eucalipto, y esto podría estar relacionado con el bajo valor del rendimiento de aceite esencial (Lucia et al. 2008). Hasta ahora, las β -tricetonas cíclicas se identificaron en aceites esenciales de varias especies de la familia de Myrtaceae: *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Xanthostemon*, *Melaleuca* y otros (Hellyer 1968, Ghisalberti 1996, Van Klink et al. 1999). En particular, la flavesona fue descrita en muchas especies de *Eucalyptus*, tales como *Eucalyptus decorticans* (Bick et al. 1965, Hellyer 1968), *E. grandis* (Batista-Pereira et al. 2006) y *E. oblonga* (Hellyer 1968). Como parte del trabajo de Naspi et al. (2015), y fue corroborado también en esta tesis, también se identificaron ésteres no terpénicos como el isobutirato de isobutilo e isobutirato de isoamilo. Hay varios estudios que muestran que estos ésteres alquílicos y otros compuestos similares generalmente están presentes en aceites esenciales de eucaliptos: *E. grandis* (Menut et al. 1992), *E. goniocalyx*, y *E. patens* (Menut et al. 1992, 1995). Los resultados de nuestro trabajo indican que el aceite esencial de *E. nitens* tiene una composición química compleja, con algunos monoterpenos, ésteres no terpénicos y β -tricetonas cíclicas.

4.5.2. Repelencia en placa

En el ensayo de repelencia en placa se observó el efecto repelente de la DEET y del aceite esencial de *E. nitens* en ambas especies de mosquitos, mientras que no se detectó ningún efecto para el 1,8-cineol en las concentraciones evaluadas. Para la DEET se observó repelencia significativa a partir de 0,1 mg/ml (1,75 µg/cm²) en ambas especies, este resultado es un orden de magnitud menor al encontrado en ensayos similares para *Triatoma infestans*, *Blatella germanica* y *Cimex lectularius* (Alzogaray et al. 2000, Sfara et al. 2013, Cáceres et al. en prep.). Esto podría indicar que estos mosquitos son más sensibles a la DEET que *T. infestans*, *B. germanica* y *C. lectularius* probablemente debido a diferencias propias de cada especie. Entre las posibles explicaciones se encuentra la posibilidad de que presenten un mayor desarrollo del sistema olfativo, sin embargo para poder confirmar esta hipótesis son necesarios más ensayos que lo evalúen por ejemplo utilizando la metodología de ablación de porciones de las antenas.

El aceite esencial de *E. nitens* presentó actividad repelente a partir de la concentración 1 mg/ml en ambas especies, mientras que su principal componente, el 1,8-cineol, no. Esta diferencia entre el aceite de *E. nitens* y el 1,8-cineol indicaría que el 1,8-cineol no sería el responsable de la actividad repelente del aceite esencial. Por ende, los compuestos responsables del efecto repelente del aceite podrían ser otros monoterpenos, los sesquiterpenos y/o las β-tricetonas cíclicas (Alzogaray et al. 2013). Para discernir cual/es de los compuestos son responsables de este efecto sería interesante evaluar cada compuesto por separado, empleando el ensayo repelencia en placa, debido a que este ensayo es una manera económica de realizar una primera

aproximación de la actividad repelente de un compuesto ya que requiere bajas cantidades de activo.

Si bien existen muchos trabajos que estudiaron el efecto repelente de la DEET en *Ae. aegypti* utilizando metodologías más representativas de la realidad (Barnard y Xue 2004, Lupi et al. 2013), estas metodologías requieren grandes cantidades de hembras que son difíciles de obtener para las especies en las que desarrollar una cría laboratorio es más problemático. Por ello, estudiar el efecto de repelencia en placa de la DEET en *Ae. aegypti* nos permite validar un ensayo para evaluar la repelencia de compuestos desconocidos. Además, esta metodología también permite evaluar la repelencia sobre otras especies menos estudiadas, como *An. pseudopunctipennis*. En particular, este trabajo es el primero que evalúa el efecto repelente de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y el 1,8-cineol en *An. pseudopunctipennis*. A pesar de que los adultos de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* presentan rasgos ecológicos muy distintos, los resultados de repelencia obtenidos son similares (Lugo Villalta 1991, Clements, 1999). Por lo tanto, este trabajo puede ser el puntapié inicial para entender las posibles implicancias que pueden tener las características específicas de *An. pseudopunctipennis* en su respuesta a los compuestos repelentes.

Por otro lado, el ensayo de repelencia en placa permitió evaluar el efecto de los repelentes en la actividad de los mosquitos. En particular, en este trabajo, no se observaron diferencias en la actividad de ambas especies para los tratamientos con DEET. Resultados similares fueron obtenidos por Sfara et al. (2013) y Zermoglio et al. (2015) para *B. germanica* y *Rhodnius prolixus* respectivamente, expuestos a concentraciones de DEET parecidas a las

utilizadas en nuestro trabajo. Esto indicaría que en estas especies el efecto repelente de la DEET observado a las concentraciones evaluadas no está relacionado con un aumento en la actividad locomotora. Este resultado no condice con lo observado en el capítulo 2, en el que se observa un aumento en la actividad de nado de las larvas de estas especies expuestas a la DEET. Sin embargo, los requisitos sensoriales de las larvas son más limitados que los de los adultos, por lo tanto, el comportamiento de las etapas inmaduras de los insectos holometábolos suele ser muy distinto al del estado adulto (Merritt et al. 1992, Armistead et al. 2008, Awasthi et al. 2015, Baglan et al. 2017). Sumado a las diferencias en la exposición al activo, ya que las larvas estuvieron expuestas continuamente a la DEET disuelto en el agua y los adultos no porque solo la mitad de la arena estaba impregnada con el repelente. Ensayos futuros podrían evaluar el comportamiento de los adultos en una arena impregnada completamente con DEET.

En contraste, las hembras de *Ae. aegypti* expuestas al aceite esencial de *E. nitens* mostraron un aumento significativo en la actividad locomotora para las concentraciones en las que se observó un efecto repelente. Este aumento de la actividad junto con el efecto repelente, podría estar asociado con un modo de acción de éxito-repelencia por parte del aceite esencial. Este modo de acción de los repelentes fue observado con insecticidas piretroides, como deltametrina, a concentraciones subletales en otras especies de mosquitos (Mohammad et al. 2011, Tananchai et al. 2012, Nikpour et al. 2017). Además, ese aumento en la actividad también se observó en *R. prolixus* expuestos a monoterpenos (Moretti et al. 2013). En cambio, en *An. pseudopunctipennis* no se observó un aumento de la actividad a ninguna de las dosis evaluadas del

aceite esencial de *E. nitens*. Para determinar con mayor precisión cual podría ser el modo de acción repelente del aceite esencial de *E. nitens* es necesario realizar más estudios que evalúen si la repelencia de los componentes de este aceite está relacionada con una actividad tóxica, como se ha descrito con los piretroides, o con su interacción con el correceptor *orco*, como el citronellal (Dickens y Bohbot 2013).

En este trabajo se evaluó la respuesta locomotora de hembras de ambas especies a potenciales repelentes en una placa de Petri. Utilizar un ambiente confinado para evaluar el movimiento de mosquitos adultos tiene sus limitaciones, ya que el movimiento del mosquito se encuentra restringido a vuelos y caminatas cortas, que no son representativos del comportamiento en condiciones naturales. Esta condición de confinamiento pudo afectar diferencialmente a las especies estudiadas, ya que *Ae. aegypti* al ser una cepa de laboratorio está habituada a ambientes más pequeños, a diferencia de *An. pseudopunctipennis*, la cual al ser una cepa de campo no. Esta diferencia podría ser la causa de no haber encontrado un patrón de aumento de actividad en *An. pseudopunctipennis*. Futuros ensayos podrían permitir evaluar la modulación de la actividad de los adultos *An. pseudopunctipennis* en arenas experimentales de mayores dimensiones.

Con respecto al abordaje estadístico descrito en los capítulos 2, 3 y 4, se consideró solo un eje de actividad/inactividad (CP 1) para cuantificar el movimiento de los mosquitos construido a partir de ACPs realizados con las variables obtenidas con el software de seguimiento. Este CP 1 resume e integra la información de las variables obtenidas, en lugar de considerar los valores de cada variable por separado. Se eligió este enfoque por cuatro

razones, la primera es que las variables de comportamiento evaluadas en este documento presentaron altos niveles de correlación con un valor absoluto del coeficiente de Pearson que varió desde 0,3 a 1, y siempre fue significativo (p-valor <0,05). Esta alta correlación entre las variables indica que representan información redundante pero no idéntica. Por lo tanto, condensamos la información redundante en una variable construida (PC 1) que es una combinación lineal de estas variables, y explica la mayor parte de la varianza en las originales (Quinn y Keough 2002). En segundo lugar, el enfoque elegido en este estudio contempla las interacciones multivariadas entre las variables. Por lo tanto, consideramos que la nueva variable obtenida (PC 1) representa mejor los patrones del comportamiento de natación que cada variable sola (Quinn y Keough 2002). En tercer lugar, este enfoque multivariado tiene mayor poder estadístico que el enfoque univariado, porque al realizar un análisis univariado con las siete variables obtenidas implica una penalización en el p-valor de cada análisis para mantener el error global en 0,05. Esta penalización podría comprometer la significancia entre los tratamientos y no hacer visibles los efectos detectados por el otro enfoque. Finalmente, Quinn and Keough (2002) recomiendan un enfoque multivariado para resolver los problemas descritos anteriormente y, en particular, como una alternativa al MANOVA, ya que análisis está restringido a supuestos que son difíciles de satisfacer.

4.5.3. *Repelencia en antebrazo*

La DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y su componente principal, el 1,8-cineol, mostraron efecto repelente contra de *Ae. aegypti*. Los valores de TPT de la DEET fueron significativamente mayores a los del aceite esencial y el 1,8-cineol. Sin embargo, los valores de TPT de la DEET en nuestro trabajo fueron

similares a los obtenidos por Frances et al. (1993) y (2009) pero más bajos que los encontrados en otros estudios (Barnard y Xue 2004, Lupi et al. 2013). Sin embargo, Barnard y Xue (2004) y Lupi et al. (2013) utilizaron una menor cantidad de hembras en las jaulas, por lo tanto consideramos que la cantidad de hembras utilizadas es una variable importante para poder interpretar el parámetro TPT.

Por otro lado, encontramos una diferencia significativa en el TPT para el aceite esencial de *E. nitens* evaluado sobre *Ae. aegypti* en comparación con su componente mayoritario, el 1,8-cineol. Esta diferencia nos permite suponer que la protección del *E. nitens* no se debe a la elevada cantidad de 1,8-cineol en su composición, y que otros compuestos pueden ser los responsables de este efecto. En otras especies de *Eucalyptus* estudiadas en nuestro laboratorio, se demostró que los aceites esenciales con una alta cantidad de 1,8-cineol y p-cimeno, como *E. tereticornis*, mostraron un TPT similar al del 1,8-cineol solo (Naspi et al. 2015). Además, Klocke et al. (1987) estudiaron el efecto repelente sobre *Ae. aegypti* del 1,8-cineol utilizando una solución al 10 %, y éste fue de 16 minutos; este valor es similar al rango de 0 a 10 minutos encontrado en esta tesis. Si bien varios aceites esenciales con un alto contenido de 1,8-cineol mostraron un efecto repelente contra *Ae. aegypti* (Gillij et al. 2008) y *Cx. pipiens pallens* (Choi et al. 2002), el tiempo de protección total nunca fue mayor a 30 min. La baja persistencia del efecto repelente observado para los monoterpenos podría explicarse por su alta volatilidad y presión de vapor, lo que significa que el efecto se pierde rápidamente a medida que pasa el tiempo (Gleiser et al. 2011). Los sesquiterpenos también son activos como repelentes contra los mosquitos, con la ventaja de tener menos volatilidad y un efecto de

larga duración (Paluch et al. 2009, Garcia-Domenech et al. 2010). Sumado a esto, los compuestos oxigenados desempeñan un papel importante en el efecto repelente de los terpenos: se ha encontrado que las moléculas con dos sustituyentes, como el grupo hidroxilo, los ésteres y los éteres, son buenos repelentes contra los mosquitos (Wang et al. 2008). Sin embargo, no estarían relacionados con la buena actividad repelente del aceite de *E. nitens* observada, ya que los terpenos oxigenados y los sesquiterpenos están presentes en muy bajas concentraciones, pero sí podría atribuirse a la presencia de cetonas no terpenoides y compuestos ésteres, como se observa en los trabajos de Conti et al. (2013) y Jaleta et al. (2016).

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad repelente del aceite esencial de *E. nitens* se debe parcialmente a los ésteres (isobutirato de isobutilo e isobutirato de isoamilo) y principalmente al alto contenido de β -tricetonas cíclicas. Este es el primer estudio que muestra la actividad repelente de un aceite esencial con alto contenido de β -tricetonas cíclicas como la flavesona, leptospermona e isoleptospermona en *Ae. aegypti*. Hasta la fecha, la repelencia de los aceites esenciales con un alto contenido de estas cetonas y ésteres no se ha estudiado para ninguna especie de mosquitos, siendo importante estudiar estas cetonas ya que además de ser buenos candidatos como repelentes alternativos presentan otras actividades biológicas importantes. Entre ellas se encuentran su actividad herbicida (Dayan et al. 2007, Owens et al. 2013), antibacteriana (Christoph et al. 2001), viricida (Reichling et al. 2005), acaricida (Jeong et al. 2009) y antitumoral (Riley 1994, Porter 2001). Además, estas tricetonas también se han reportado para uso cosmético (The Good Scents Company 2018). En la búsqueda de nuevas

moléculas de origen natural con actividad repelente, estos compuestos podrían ser buenos candidatos o alternativas potenciales de repelentes contra los mosquitos.

En este capítulo se estudió la repelencia utilizando dos metodologías diferentes, la repelencia en placa y la repelencia en antebrazo. Estas metodologías son complementarias y presentan distintas ventajas y desventajas. Una de las desventajas del método de repelencia en placa es que se realiza en condiciones más artificiales que el de repelencia en antebrazo ya que el espacio de movimiento libre de los mosquitos en la placa es mucho menor. Además, en el ensayo de repelencia en placa solo se observa el efecto del compuesto en el comportamiento del mosquito, no combinado con los olores del hospedero. Finalmente, en el ensayo de repelencia en placa no es posible determinar si la respuesta del mosquito se debe a una detección olfativa o gustativa (de contacto) del compuesto, ya que el mosquito suele estar en contacto con el papel impregnado con el compuesto a testear (Tabla 3.2). Sin embargo, el método de repelencia en placa, presenta importantes ventajas. Una de las principales es que es un ensayo rápido y que requiere poco material biológico (Tabla 3.2). Además, como el compuesto a evaluar no se aplica sobre un ser vivo permite evaluar la repelencia de compuestos novedosos de los que no se cuenta con información sobre su toxicidad dérmica. Estas dos últimas ventajas lo hace un ensayo ideal para realizar *screenings* de nuevas moléculas repelentes (Bar-Zeev 1962, Mullens et al. 2009). Si a este tipo de ensayo se le suma la posibilidad que da un software de seguimiento, de obtener variables relacionadas con la actividad del mosquito nos podría aportar información sobre el mecanismo de acción del compuesto a evaluado (Tabla 3.2). Por

último, el método de repelencia en placa nos permitió obtener el primer registro sobre la respuesta comportamental de hembras de *An. pseudopunctipennis* frente a la DEET, al aceite esencial de *E. nitens* y al 1,8-cineol.

Por otro lado, si bien el método de repelencia en antebrazo representa mejor las condiciones naturales a las se expone un mosquito frente a un repelente también presenta sus limitaciones. Estas limitaciones están relacionadas con el uso de voluntarios, ya que la exposición a picaduras de mosquito dificulta la predisposición de las personas a participar en este ensayo (Tabla 3.2). Sumado a esto, no es posible evaluar compuestos de los que no se cuente con información de toxicidad dérmica, y que los voluntarios pueden presentar reacciones alérgicas específicas a los compuestos utilizados. Además, este ensayo es muy costoso en cuanto al tiempo y material biológico requerido (Tabla 3.2). Estas limitaciones no fueron las únicas razones por las cuales no se realizó el ensayo de repelencia en antebrazo en *An. pseudopunctipennis*, ya que los individuos de esta especie utilizados en los experimentos fueron colectados como larvas en el campo. Entonces, no sería ético exponer a voluntarios a un riesgo de infección, exponiéndolos a mosquitos obtenidos de campo que potencialmente pueden estar infectados. Sin embargo, es claro que el método de repelencia en antebrazo presenta importantes ventajas. Entre ellas están las condiciones más representativas del ensayo, ya que es importante poder estudiar el efecto del compuesto a evaluar combinado con los olores del hospedero. Además, el tener un mayor espacio de movimiento libre hace el comportamiento de búsqueda de hospedador sea más cercano al observado en condiciones naturales. Y en los ensayos realizados en esta tesis consideramos que el principal mecanismo de detección del repelente fue

olfativo, ya que se observó que en general el comportamiento de posada de las hembras iba seguido al de alimentación. Finalmente, a la hora de estudiar repelentes alternativos a la DEET es vital considerar variables como el tiempo de protección total, ya que brinda información, por ejemplo, sobre la frecuencia recomendada de aplicación de un repelente (Tabla 4.2). Debido a estas razones, se eligió realizar el ensayo de repelencia en brazo en *Ae. aegypti* para evaluar el efecto repelente del aceite de *E. nitens* en condiciones más representativas, y de esta manera validar los resultados obtenidos en el ensayo de repelencia en placa.

Tabla 4.2 Tabla comparativa entre las condiciones de los ensayos de repelencia en placa y las de repelencia en antebrazo.

	Repelencia en placa	Repelencia en antebrazo
<i>Variable respuesta</i>	Índice de Repelencia (IR)	Tiempo de Protección Total (TPT)
<i>Número de hembras (por réplica)</i>	1	50-100
<i>Tiempo del ensayo (por réplica)</i>	10 minutos	Hasta 280 minutos
<i>Voluntarios</i>	No	Si
<i>Espacio de movimiento libre</i>	95,43 cm ³	34200 cm ³
<i>Detección del compuesto</i>	Olfativa y gustativa	Principalmente olfativa

4.6 Conclusiones

En este capítulo se estudió el efecto repelente de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y su componente principal, el 1,8-cineol, utilizando el método de

repelencia en placa para *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* y el de antebrazo en jaula sólo para *Ae. aegypti*. En los ensayos de repelencia en placa se identificó la repelencia de la DEET y el aceite esencial de *E. nitens* en ambas especies. Este es el primer estudio que muestra la actividad repelente de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y el 1,8-cineol en *An. pseudopunctipennis*. Además, se observó un aumento en la actividad de los adultos de *Ae. aegypti* expuestos al aceite esencial de *E. nitens*, y esto podría indicar que el mecanismo de repelencia de este aceite está asociado a la exitorrepelencia. Por otro lado, se evaluó si el efecto repelente del aceite esencial estaba asociado con la presencia de su componente principal el 1,8 cineol, encontrando que no es el responsable de su actividad repelente, ya sea en placa o en antebrazo. Finalmente, el aceite esencial de *E. nitens* presentó un alto tiempo de protección total contra *Ae. aegypti*, lo que haría de este aceite un posible repelente alternativo de origen natural a la DEET.

Conclusiones finales

En esta tesis se caracterizó la entomofauna asociada a sitios de cría de *An. pseudopunctipennis* y se estudió el efecto de agentes ecológicos en el comportamiento sus larvas. Además, se evaluó el comportamiento basal y la respuesta a moduladores de comportamiento de larvas de *An. pseudopunctipennis* y *Ae. aegypti* (Capítulo 2). También, se estudiaron la supervivencia, la intoxicación y los efectos del temefós, la permetrina, el formulado de *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* sobre el comportamiento de las larvas de ambas especies (Capítulo 3). Finalmente, se estudió el efecto repelente de la DEET, el aceite esencial de *E. nitens* y su componente principal, el 1,8-cineol, utilizando el método de repelencia en placa en adultos de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* y se validó con el método de antebrazo en jaula utilizando solo hembras de *Ae. aegypti* (Capítulo 4). Las conclusiones más relevantes de este trabajo son:

1. En la región, los sitios de cría de *An. pseudopunctipennis* presentan una gran diversidad de taxones (26), 15 de los cuales podrían ser predadores de sus larvas. Entre ellos, los candidatos a evaluar en futuros trabajos son las larvas de *Tropisternus noa*, las larvas de Libellulidae, los adultos de *Liodessus sp.*, *Microvelia sp.* y las larvas de *Toxorhynchites sp.*
2. Las larvas de *Ae. aegypti* de diferentes cepas, campo y laboratorio, se comportaron de manera similar, lo que indica que el origen de la cepa no afecta el comportamiento basal en esta especie. Además, las larvas de *An. pseudopunctipennis* presentan menor movimiento y presentaron

mayor velocidad angular absoluta que las de *Ae. aegypti*. Esto podría ser una respuesta comportamental a la alta presión de predación que sufren las larvas de *An. pseudopunctipennis* en sus sitios de cría.

3. Los cebos repelentes (DEET e IR3535) aumentaron la actividad de nado de las larvas de ambas especies estudiadas pero los cebos atractantes (prolina y levadura) solo disminuyeron la actividad de nado en larvas de *Ae. aegypti*. Esto podría deberse a que estos compuestos no son atractantes a esas concentraciones o a que no son atractantes porque no están relacionados con el sitio de cría de *An. pseudopunctipennis*.
4. No se detectaron efectos de las sustancias emitidas por los distintos agentes ecológicos evaluados sobre el comportamiento de larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esto podría ser debido a la escasa difusión de los componentes del agente ecológico a la arena experimental o a las condiciones de confinamiento del ensayo.
5. Se determinaron por primera vez los parámetros toxicológicos de los larvicidas temefós, permetrina, *Bti* y el aceite esencial de *E. nitens* sobre larvas de *An. pseudopunctipennis*. Esta especie resultó más tolerante a estos larvicidas que *Ae. aegypti*.
6. Al evaluar el comportamiento de intoxicación de las larvas se observó que el temefós fue el que presentó mayor tiempo de latencia. Esto indicaría que el temefós es el larvicida con el modo de acción más lento de los evaluados.
7. En larvas de ambas especies se registró una disminución en la actividad de nado expuestas a temefós y permetrina que podría estar relacionado con la especificidad del modo de acción de estos larvicidas, que es el

similar en todos los insectos. Mientras que esta disminución sólo se observó en las larvas de *Ae. aegypti* en el caso del formulado de *Bti* y del aceite esencial de *E. nitens* podría estar relacionado a una acción diferencial de estos larvicidas entre estas especies de mosquito.

8. Se registró el efecto repelente de la DEET y el aceite esencial de *E. nitens* en hembras de *Ae. aegypti* y *An. pseudopunctipennis* utilizando el método de repelencia en placa. Además, el aceite de *E. nitens* generó un aumento de la actividad locomotora de hembras de *Ae. aegypti*, esto podría estar relacionado con un modo de acción relacionado con la exitorrepelencia.
9. El alto tiempo de protección total encontrado para el aceite esencial de *E. nitens* lo hacen un buen candidato como repelente alternativo de origen natural a la DEET. El tiempo de protección detectado podría estar relacionado con su composición compleja, en particular, con las β -tricetonas cíclicas presentes en un importante porcentaje en el aceite.

Los resultados de esta tesis aportan información muy valiosa para ser utilizada en los programas de control de los mosquitos estudiados, y es el primer estudio detallado sobre los comportamientos de las larvas y adultos de *An. pseudopunctipennis*.

Trabajos publicados

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se publicaron los siguientes trabajos:

1. **Gonzalez, P. V., Alvarez Costa, A., Harburguer, L. V., y H. M. Masuh. 2019.** Quantitative Evaluation of the Behavioral Response to Attractant and Repellent Compounds in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. Journal of Economic Entomology. En Prensa.

Journal of Economic Entomology, XX(XX), 2019, 1–8

doi: 10.1093/jee/toz004

Research

Medical Entomology

OXFORD

Quantitative Evaluation of the Behavioral Response to Attractant and Repellent Compounds in *Anopheles pseudopunctipennis* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae

P. V. Gonzalez, A. Alvarez Costa, L. V. Harburguer, and H. M. Masuh¹

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CONICET- CITEDEF), Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina

¹Corresponding author, e-mail: hmasuh@gmail.com

Subject Editor: Alec Gerry

Received 26 September 2018; Editorial decision 27 December 2018

2. **Alvarez Costa, A., Gonzalez, P. V., Harburguer, L. V., y H. M. Masuh. 2018.** Effects of Temephos, Permethrin, and *Eucalyptus nitens* Essential Oil on Survival and Swimming Behavior of *Aedes aegypti* and *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) Larvae. Journal of medical entomology, 55(5):1098-1104.

Effects of Temephos, Permethrin, and *Eucalyptus nitens* Essential Oil on Survival and Swimming Behavior of *Aedes aegypti* and *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) Larvae

Agustín Alvarez Costa, Paula V. Gonzalez, Laura V. Harburguer, and Héctor M. Masuh¹

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (UNIDEF-CONICET- CITEDEF), Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina and ¹Corresponding author, e-mail: hmasuh@gmail.com

Subject Editor: Timothy Lysyk

Received 5 March 2018; Editorial decision 10 May 2018

3. Alvarez Costa, A., Naspi, C. V., Lucia, A., y H. M. Masuh. 2017. Repellent and larvicidal activity of the essential oil from *Eucalyptus nitens* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology, 54(3), 670-676.

Repellent and Larvicidal Activity of the Essential Oil From *Eucalyptus nitens* Against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)

Agustín Alvarez Costa, Cecilia V. Naspi, Alejandro Lucia, and Héctor M. Masuh¹

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-UNIDEF-CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO, Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina (aalvarezcosta@citedef.gob.ar; cnaspi@citedef.gob.ar; alucia@citedef.gob.ar; hmasuh@citedef.gob.ar), and ¹Corresponding author, e-mail: hmasuh@citedef.gob.ar

Subject Editor: Roberto Barrera

Received 8 August 2016; Editorial decision 30 November 2017

4. Gonzalez, P. V., Alvarez Costa, A., y H. M. Masuh. 2017. A video-tracking analysis-based behavioral assay for larvae of *Anopheles pseudopunctipennis* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Journal of medical entomology, 54(3), 793-797.

A Video-Tracking Analysis-Based Behavioral Assay for Larvae of *Anopheles pseudopunctipennis* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Paula V. Gonzalez, Agustín Alvarez Costa, and Héctor M. Masuh¹

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (UNIDEF-CITEDEF-CONICET-CIPEIN), Juan Bautista de La Salle 4397 (B1603ALO), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina (pgonzalez@citedef.gob.ar; aalvarezcosta@citedef.gob.ar; hmasuh@citedef.gob.ar), and ¹Corresponding author, e-mail: hmasuh@citedef.gob.ar

Subject Editor: Lars Eisen

Received 22 June 2016; Editorial decision 2 December 2016

Referencias

- Abdel-Rahman, A., A. K. Shetty, y M. B. Abou-Donia. 2001.** Subchronic dermal application of N,N-Diethyl m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and the hippocampus, and purkinje neuron loss i. *Exp. Neurol.* 172: 153–171.
- Abdi, H. 2010.** Holm's sequential Bonferroni procedure. *Encyclopedia of research design*, 1(8), 1-8.
- Achee, N. L., y J. P. Grieco. 2018.** A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control, pp. 25–42. *In ACS Symp. Ser.*
- Achee, N. L., M. J. Bangs, R. Farlow, G. F. Killeen, S. Lindsay, J. G. Logan, S. J. Moore, M. Rowland, K. Sweeney, S. J. Torr, L. J. Zwiebel, y J. P. Grieco. 2012.** Spatial repellents: From discovery and development to evidence-based validation. *Malar. J.*
- Adams, R. P. 1995.** Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured, Carol Stream, IL.
- Almeida, R. M., Han, B. A., Reisinger, A. J., Kagemann, C., and Rosi, E. J. 2018.** High mortality in aquatic predators of mosquito larvae caused by exposure to insect repellent. *Biology letters*, 14(10), 20180526.
- Alzogaray, R. A., y E. N. Zerba. 2001.** Behavioral response of fifth instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to pyrethroids. *Acta Trop.* 78: 51–57.
- Alzogaray, R. A. 2016.** Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the insect repellents DEET and IR3535. *J. Med. Entomol.* 53: 387–393.
- Alzogaray, R. A., A. Fontan, y E. N. Zerba. 2000.** Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 1-6.
- Alzogaray, R. A., V. Sfara, A. N. Moretti, y E. N. Zerba. 2013.** Behavioural and toxicological responses of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) to monoterpenes. *Eur. J. Entomol.* 110: 247–252.
- Amer, A., y H. Mehlhorn. 2006.** Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitol. Res.* 99: 478–490.
- Antwi, F. B., y G. V. P. Reddy. 2015.** Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40: 915–923.
- Armistead, J. S., J. R. Arias, N. Nishimura, y L. P. Lounibos. 2008.** Interspecific larval competition between *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) in northern Virginia. *J. Med. Entomol.* 45: 629–37.
- Armsworth, C. G., D. A. Bohan, S. J. Powers, D. M. Glen, y W. O. C. Symondson. 2005.** Behavioural responses by slugs to chemicals from a generalist predator. *Anim. Behav.* 69: 805–811.
- Arredondo-Jiménez, J. I., y K. M. Valdez-Delgado. 2006.** Effect of Novaluron (Rimon® 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 20: 377–387.
- Ault, S.K. 1994.** Environmental management: a re-emerging vector control strategy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50 Suppl.: 35–59.
- Awasthi, A. K., J. C. Molinero, C. H. Wu, K. H. Tsai, C. C. King, y J. S. Hwang. 2015.** Behavioral changes in mosquito larvae induced by copepods predation. *Hydrobiologia.* 749: 113–123.

- Back, C., J. Boisvert, J. O. Lacoursiere, y G. Charpentier. 1985.** High-dosage treatment of a Quebec stream with *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*: Efficacy against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) and impact on non-target insects. *Can. Entomol.* 117: 1523–1534.
- Baerg, D. C. 1971.** Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* in Panama. *J. Med. Entomol.* 8: 180–182.
- Baglan, H., C. Lazzari, y F. Guerrieri. 2017.** Learning in mosquito larvae (*Aedes aegypti*): Habituation to a visual danger signal. *J. Insect Physiol.* 98: 160–166.
- Banerjee, S., S. H. Yalkowsky, y C. Valvani. 1980.** Water solubility and octanol/water partition coefficients of organics. Limitations of the solubility-partition coefficient correlation. *Environ. Sci. Technol.* 14: 1227–1229.
- Barnard, D. R. 1999.** Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 36: 625–9.
- Barnard, D. R., y R.-D. Xue. 2004.** Laboratory Evaluation of Mosquito Repellents Against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 41: 726–730.
- Barnard, D. R., U. R. Bernier, K. H. Posey, y R.-D. Xue. 2002.** Repellency of IR3535, KBR3023, *para*-menthane-3,8-diol, and Deet to Black Salt Marsh Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Everglades National Park. *J. Med. Entomol.* 39: 895–899.
- Bar-zeev, M. 1960.** A rapid method for screening and evaluating mosquito repellents. *Bulletin of Entomological Research*, 53(3): 521-528.
- Batista-Pereira, L. G., J. B. Fernandes, A. G. Corrêa, M. F. G. F. Da Silva, y P. C. Vieira. 2006.** Electrophysiological responses of eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* to essential oils of seven *Eucalyptus* species. *J. Braz. Chem. Soc.* 17: 555–561.
- Becker, N., M. Zgomba, M. Ludwig, D. Petric, y F. Rettich. 1992.** Factors influencing the activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* treatments. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8: 285–9.
- Bejarano, J. F. R. 1957.** Distribución geográfica de Anophelini de la República Argentina. *Rev Sanid Militar Argent.* 56: 307-348.
- Berón, C. M., L. M. Díaz-Nieto, J. N. Lazarte, y R. P. Lopez. 2016.** Bacterias como agentes de control biológico de poblaciones de mosquitos, pp. 251–268. *In* Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Berti, J., R. Zimmerman, y J. Amarista. 1993.** Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in Sucre State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88: 353–362.
- Berti, J., González, J., Vanegas, C., y J Amarista. 1998.** *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald 1901 (Diptera: Culicidae) en dos ríos de Santa Fé, estado Sucre, Venezuela. *Bol Entomol Venez*, 13(1), 1-15.
- Bick, I.R.C., A. J. Blackman, R. O. Hellyer y D.H.S. Horn. 1965.** The isolation and structure of flavesone. *J. Chem. Soc.* 3690–3693.
- Blaustein, L. 1998.** Influence of the predatory backswimmer, *Notonecta maculata*, on invertebrate community structure. *Ecol. Entomol.* 23: 246–252.
- Blaustein, L., B. P. Kotler, y D. Ward. 1995.** Direct and indirect effects of a predatory backswimmer (*Notonecta maculata*) on community structure of desert temporary pools. *Ecol. Entomol.* 20: 311–318.
- Boffi, R. 2002.** Erradicación y reinfestación por el *Aedes aegypti* en la Republica Argentina. Tesis para optar por el título de Magíster en Control de plagas y su impacto ambiental.

- Bond, J. G. 1999.** Dinámica de criaderos larvarios de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae) en el sur de Chiapas, México. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Bond, J. G., J. C. Rojas, J. I. Arredondo-Jimenez, H. Quiroz-Martinez, J. Valle, y T. Williams. 2004.** Population control of the malaria vector *Anopheles pseudopunctipennis* by habitat manipulation. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 271: 2161–2169.
- Bond, J. G., Novelo-Gutiérrez, R., Ulloa, A., Rojas, J. C., Quiroz-Martínez, H., y T. Williams. 2006.** Diversity, abundance, and disturbance response of Odonata associated with breeding sites of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) in southern Mexico. Environmental entomology, 35(6), 1561-1568.
- Bowman, L. R., S. Donegan, y P. J. McCall. 2016.** Is Dengue Vector Control Deficient in Effectiveness or Evidence?: Systematic Review and Meta-analysis. PLoS Negl. Trop. Dis. 10: 1–24.
- Brackenbury, J. 2001.** Locomotion through use of the mouth brushes in the larva of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 268: 101–106.
- Braga, I. A. y D. Valle. 2007.** *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol. e Serviços Saúde. 16: 279–293.
- Briassoulis, G., M. Narlioglou, y T. Hatzis. 2001.** Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children. Hum. Exp. Toxicol. 20: 8–14.
- Burešová, O., J. J. Bolhuis, y J. Bureš. 1986.** Differential Effects of Cholinergic Blockade on Performance of Rats in the Water Tank Navigation Task and in a Radial Water Maze. Behav. Neurosci. 100: 476–482.
- Burrioni, N. E., L. Peresan, y C. Ocampo Mallow. 2016.** *Aedes aegypti* y virus Dengue: saberes y prácticas para el control, pp. 339–348. In Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), Investig. Sobre Mosquitos Argentina. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Campos, R. E., y R. M. Gleiser. 2016.** Mosquitos que crían en microambientes acuáticos naturales, pp. 119–141. In Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), Investig. Sobre Mosquitos Argentina. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Campos, R. E., L. A. Fernández, y V. E. Sy. 2004.** Study of the insects associated with the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and their possible predators in Buenos Aires Province, Argentina. Hydrobiologia. 524: 91–102.
- Cantrell, C. L., F. E. Dayan, y S. O. Duke. 2012.** Natural products as sources for new pesticides. J. Nat. Prod. 75: 1231–1242.
- Carlson, D. A., C. E. Schreck, y R. J. Brenner. 1992.** Carbon dioxide released from human skin: effect of temperature and insect repellents. J. Med. Entomol. 29: 165–170.
- Casida, J. E., y G. B. Quistad. 2004.** Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects. J. Pestic. Sci. 29: 81–86.
- Chavasse, D. C. y H. H. Yap. 1997.** Chemical methods for the control of vectors and pests of public health importance. World Health Organization(WHO), Ginebra, Suiza.
- Chen, C. D., H. L. Lee, C. K. Chan, C. L. Ang, A. H. Azahari, K. W. Lau, y M. Sofian-Azirun. 2009.** Laboratory bioefficacy of nine commercial formulations of temephos against larvae of *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* Skuse and *Culex quinquefasciatus* Say. Trop. Biomed. 26: 360–365.
- Cheng, S. S., H. T. Chang, C. Y. Lin, P. S. Chen, C. G. Huang, W. J. Chen, y S. T. Chang. 2009.** Insecticidal activities of leaf and twig essential oils from *Clausena excavata* against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae. Pest Manag. Sci. 65: 339–343.

- Choi, W. S., B. S. Park, S. K. Ku, y S. E. Lee. 2002.** Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. *J Am Mosq Control Assoc.* 18: 348–351.
- Christoph, F., P.-M. Kaulfers, y E. Stahl-Biskup. 2001.** In vitro evaluation of the antibacterial activity of β -triketones admixed to melaleuca oils. *Planta Med.* 67: 768–771.
- Cilek, J. E., J. L. Petersen, y C. E. Hallmon. 2004.** Comparative efficacy of IR3535 and deet as repellents against adult *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20: 299–304.
- Clements AN. 1999.** The biology of mosquitoes. Wallingford: CABI Publishing.
- Clevenger, J. F. 1928.** Apparatus for volatile oil determination, description of new type. *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.* 467–503.
- Coats, J. R. 1994.** Risks From Natural Versus Synthetic Insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 489–515.
- Cohnstaedt, L. W., y S. A. Allan. 2011.** Effects of sublethal pyrethroid exposure on the host-seeking behavior of female mosquitoes. *J. Vector Ecol.* 36: 395–403.
- Conti, B., A. Canale, A. Bertoli, F. Gozzini, y L. Pistelli. 2010.** Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 107: 1455–1461.
- Conti, B., M. Leonardi, L. Pistelli, R. Profeti, I. Ouerghemmi, y G. Benelli. 2013.** Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), an arbovirus vector. *Parasitol. Res.* 112: 991–999.
- Contigiani, M. S., L. A. Diaz, L. I. Spisanti, y L. B. Tauro. 2016.** Arbovirus, pp. 157–178. *In* Berón, C.M., Campos, R.E., Gleiser, R.M., Díaz-Nieto, L., Salomon, O., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Cook, S. M., Z. R. Khan, y J. A. Pickett. 2007.** The Use of Push-Pull Strategies in Integrated Pest Management. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 375–400.
- Corbel, V., M. Stankiewicz, C. Pennetier, D. Fournier, J. Stojan, E. Girard, M. Dimitrov, J. Molgó, J. M. Hougard, y B. Lapied. 2009.** Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol.* 7: 47.
- Corbett, J. R., K. Wright, y A. C. Baillie. 1984.** The Biochemical Mode of Action of Pesticides. 2da ed. Academi Press. London.
- Curtis, C., B. L. J. Lines, y A. Renz. 1990.** Natural and synthetic repellents. Appropriate technology in vector control. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dambolena, J. S., M. P. Zunino, J. M. Herrera, R. P. Pizzolitto, V. A. Areco, y J. A. Zygadlo. 2016.** Terpenes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health—A Structure-Activity Relationship Study. *Psyche A J. Entomol.* 2016: 1–17.
- Dantur Juri, M. J. 2016.** Mosquitos que crían en cuerpos de agua permanentes Subfamilia Anophelinae, pp. 85–93. *In* Berón, C.M., Campos, R.E., Gleiser, R.M., Díaz-Nieto, L.M., Salomón, O.D., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Dantur Juri, M. J., y M. Zaidenberg. 2016.** Malaria en Argentina, pp. 179–191. *In* Berón, C.M., Campos, R.E., Gleiser, R.M., Díaz-Nieto, L.M., Salomón, O.D., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Dantur Juri, M. J., G. B. Galante, M. Zaidenberg, W. R. Almirón, G. L. Claps, y M. Santana. 2014.** Longitudinal Study of the Species Composition and Spatio-Temporal Abundance of *Anopheles* Larvae in a Malaria Risk Area in Argentina. *Florida Entomol.* 97: 1167–1181.

- Dantur Juri, M. J., G. L. Claps, M. Santana, M. Zaidenberg, y W. R. Almirón. 2010.** Abundance patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* and *Anopheles argyritarsis* in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 115: 234–241.
- Dantur Juri, M. J., M. Moreno, M. J. Prado Izaguirre, J. C. Navarro, M. O. Zaidenberg, W. R. Almirón, G. L. Claps, y J. E. Conn. 2014.** Demographic history and population structure of *Anopheles pseudopunctipennis* in Argentina based on the mitochondrial COI gene. *Parasit. Vectors.* 7: 423.
- Dantur Juri, M. J., M. Zaidenberg, y W. Almirón. 2005.** Spatial distribution of *Anopheles pseudopunctipennis* in the Yungas de Salta rainforest, Argentina. *Rev. Saude Publica.* 39: 565–570.
- Dantur Juri, M. J., W. R. Almirón, y G. L. Claps. 2010.** Population fluctuation of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in forest and forest edge habitats in Tucumán Province, Argentina. *J. Vector Ecol.* 35: 28–34.
- Darsie R. F. 1985.** Mosquitoes of Argentina. Part I. Keys for identification of adult females and fourth stage larvae in English and Spanish (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics* 17: 153-253.
- Darsie, R. F. y G. A. Lopez. 1980.** Studies of colonization of El Salvador strains of *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis*. *Mosquito News*, 40(2), 194-199.
- Darsie, R. J., y R. Ward. 2005.** Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America, north of Mexico., *Mosq. Syst.*
- Dayan, F. E., S. O. Duke, A. Sauldubois, N. Singh, C. McCurdy, y C. Cantrell. 2007.** p-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase is a herbicidal target site for β -triketones from *Leptospermum scoparium*. *Phytochemistry.* 68: 2004–2014.
- Delgado Gallardo, M. D. L. L. 1994.** Diversidad ecológica de la comunidades acuáticas cohabitando con *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) en el arroyo La Ciudadela, en el municipio de Benito Juárez, Nuevo León, México. *Southwestern Entomologist.* 19: 77-81.
- Deng, W., N. Zhu, y J. Mo. 2014.** In vitro bioassay methods for laboratory screening of novel mosquito repellents. *Entomol. Sci.* 17: 365–370.
- Desneux, N., A. Decourtye, y J.-M. Delpuech. 2007.** The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81–106.
- Dethier, V. G. y B. L. BROWNE. 1960.** The Designation of Chemicals in Terms of the Responses They Elicit from Insects 1. *Journal of Economic Entomology*, 53(1), 134-136.
- Dethier, V. J. 1948.** Chemical insect attractants and repellents. *Soil Science*, 65(2), 204.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. W. Robledo. 2014.** InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz-Nieto, L. M., A. Maciá, M. A. Perotti, y C. M. Berón. 2013.** Geographical Limits of the Southeastern Distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: 1–6.
- Dickens, J. C. y J. D. Bohbot. 2013.** Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 106: 149-155.
- Domínguez, E. y H. R. Fernández. 2009.** Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos. *Sistemática y Biología.* Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.
- Elango, G., A. Bagavan, C. Kamaraj, A. Abduz Zahir, y A. Abdul Rahuman. 2009.** Oviposition-deterrent, ovicidal, and repellent activities of indigenous plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 105: 1567–1576.
- Eldridge, K., J. Dawidson, C. H. Hardwood y G. Van Wyk. 1994.** *Eucalyptus* domestication and breeding. Clarendon Press, United Kingdom.

- Elumalai, D., M. Hemavathi, P. Hemalatha, C. V. Deepaa, y P. K. Kaleena. 2016.** Larvicidal activity of catechin isolated from *Leucas aspera* against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 115: 1203–1212.
- Estrada-Franco, J. G., G. C. Lanzaro, M. C. Ma, A. Walker-Abbey, P. Romans, C. Galvan-Sanchez, J. L. Cespedes, R. Vargas-Sagarnaga, A. Laughinghouse, I. Columbus, y R. W. Gwadz. 1993.** Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49: 735–745.
- Fahmy, M. A. H., N. M. Mallipudi, y T. R. Fukuto. 1978.** Selective Toxicity of N,N'-Thiodicarbamates. *J. Agric. Food Chem.* 26: 550–557.
- Fernandez-Salas, I., D. R. Roberts, M. H. Rodriguez, y C. F. Marina-Fernandez. 1994.** Bionomics of larval populations of *Anopheles pseudopunctipennis* in the Tapachula foothills area, southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc.* 10: 477–486.
- Ferrari, M. C. O., F. Messier, y D. P. Chivers. 2007.** Variable predation risk and the dynamic nature of mosquito antipredator responses to chemical alarm cues. *Chemoecology.* 17: 223–229.
- Fischer, S., B. Byttebier, y R. Campos. 2016.** Predadores de mosquitos, pp. 284–311. In Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Fischer, S., M. C. Marinone, M. S. Fontanarrosa, M. Nieves, y N. Schweigmann. 2000.** Urban rain pools: Seasonal dynamics and entomofauna in a park of Buenos Aires. *Hydrobiologia.* 441: 45–53.
- Fleming, G. 1986.** Biology and ecology of malaria vectors in die Americas. Pan American Health Organization. Washington, D. C. 51 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1981.** El *Eucalyptus* en la repoblacion forestal. Serie Montes 11. Roma, Italia.
- Fradin, M. S., y J. F. Day. 2002.** Comparative Efficacy of Insect Repellents against Mosquito Bites. *N. Engl. J. Med.* 347: 13–18.
- Frances, S. P., D. O. Mackenzie, J. A. Klun, y M. Debboun. 2009.** Laboratory and Field Evaluation of SS220 and Deet Against Mosquitoes in Queensland, Australia ⁴. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 25: 174–178.
- Frances, S. P., N. Eikarat, B. Sripongsai, y C. Eamsila. 1993.** Response of *Anopheles dirus* and *Aedes albopictus* to repellents in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc.* 9: 474–476.
- Frick, E. K. 1949.** the Biology of *Microvelia Capitata* Guerin, 1857, in the Panama Canal Zone and Its Role As a Predator on Anopheline Larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 42: 77–100.
- Galante, G., M. Santana, C. Veggiani-Aybar, y M. Dantur-Juri. 2014.** Survival of the Immature Stages of the Malaria Vectors *Anopheles pseudopunctipennis* and *Anopheles argyritarsis* (Diptera: Culicidae) in Northwestern Argentina. *Florida Entomol.* 97(1): 191–202.
- Garcia-Domenech, R., P. Garcia-Mujica, U. Gil, C. Casanova, J. M. Beltran, y J. Galvez. 2010.** Search of QSAR models for natural sesquiterpenes repellent activity against the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Afinidad.* 67: 187–192.
- Ghisalberti, E. L. 1996.** Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. *Phytochemistry.* 41: 7–22.
- Gillij, Y. G., R. M. Gleiser, y J. A. Zygodlo. 2008.** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour. Technol.* 99: 2507–2515.

- Jimonneau, G., M. Pombi, R. K. Dabiré, A. Diabaté, S. Morand, y F. Simard. 2012.** Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto M and S molecular form larvae to an aquatic predator in Burkina Faso. *Parasit. Vectors.* 5: 65.
- Gleiser, R. M., M. A. Bonino, y J. A. Zygadlo. 2011.** Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 108: 69–78.
- Gómez, A., E. Seccacini, E. Zerba, y S. Licastro. 2011.** Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 106: 993–996.
- Gonzalez, P. V., A. Alvarez Costa, L. Harburguer, y H. M. Masuh. 2016.** Modificadores del comportamiento aplicados al control de mosquitos, pp. 302–315. *In* Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Gonzalez, P. V., L. Harburguer, P. A. González-Audino, y H. M. Masuh. 2016.** The use of *Aedes aegypti* larvae attractants to enhance the effectiveness of larvicides. *Parasitol. Res.* 115: 2185–2190.
- Gonzalez, P. V., P. A. González Audino, y H. M. Masuh. 2015.** Behavioral Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae to Synthetic and Natural Attractants and Repellents. *J. Med. Entomol.* 52: 1315–1321.
- Govindarajan, M., A. Jebanesan, T. Pushpanathan, y K. Samidurai. 2008.** Studies on effect of *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae) leaf extracts on the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 103: 691–695.
- Gregg, W. W., y F. L. Rose. 1982.** The effects of aquatic macrophytes on the stream microenvironment. *Aquat. Bot.* 14: 309–324.
- Grieco, F., L. Loijens, O. E. Krips, S. G. A. J. Spink y P. Zimmerman. 2010.** EthoVision XT reference manual. Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands.
- Grieco, J. P., Achee, N. L., Chareonviriyaphap, T., Suwonkerd, W., Chauhan, K., Sardelis, M. R. y D. R. Roberts. 2007.** A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. *PLoS One* 2 (8), e716, 1-11.
- Guedes, R. N. C., y G. C. Cutler. 2014.** Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Manag. Sci.*
- Hall, T. F. 1972.** The influence of plants on anopheline breeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- Hao, H., J. Wei, J. Dai, y J. Du. 2008.** Host-seeking and blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) exposed to vapors of geraniol, citral, citronellal, eugenol, or anisaldehyde. *J. Med. Entomol.* 45: 533–539.
- Harburguer, L., P. V. Gonzalez, E. N. Zerba, S. Licastro, y H. M. Masuh. 2016.** Control químico de poblaciones de mosquitos, pp. 223–232. *In* Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), *Investig. Sobre Mosquitos Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Harburguer, L., S. Licastro, H. Masuh, y E. Zerba. 2016.** Biological and chemical characterization of a new larvicide ovitrap made of plastic with pyriproxyfen incorporated for *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae) control. *J. Med. Entomol.* 53: 647–652.
- Hellyer, R. O. 1968.** The occurrence of β -triketones in the steam-volatile oils of some Myrtaceous Australian plants. *Aust. J. Chem.* 21: 2825–2828.
- Herrera, J. V. 2003.** Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Rev. Peru. Epidemiol.* 11: 18.
- Hershey, A. E., L. Shannon, R. Axler, C. Ernst, y P. Mickelson. 1995.** Effects of methoprene and *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) on non-target insects. *Hydrobiologia.* 308:

- Isman, M. B., y M. L. Grieneisen. 2014.** Botanical insecticide research: Many publications, limited useful data. *Trends Plant Sci.* 19: 140–145.
- Jaleta, K. T., S. R. Hill, G. Birgersson, H. Tekie, y R. Ignell. 2016.** Chicken volatiles repel host-seeking malaria mosquitoes. *Malar. J.* 15.
- Janssens, L., y R. Stoks. 2012.** How does a pesticide pulse increase vulnerability to predation? Combined effects on behavioral antipredator traits and escape swimming. *Aquat. Toxicol.* 110: 91–98.
- Jeong, E. Y., M. G. Kim, y H. S. Lee. 2009.** Acaricidal activity of triketone analogues derived from *Leptospermum scoparium* oil against house-dust and stored-food mites. *Pest Manag. Sci.* 65: 327–331.
- Juliano S.A. 2007. Population dynamics.** En: Floore, T. G. (Ed.). *Biorational Control of Mosquitoes.* J. Am. Mosquito Control Association 23 (Suppl. to No 2): 265-275.
- Juliano, S. a, y M. E. Gravel. 2002.** Predation and the evolution of prey behavior: an experiment with tree hole mosquitoes. *Behav. Ecol.* 13: 301–311.
- Kasap, M. 1980.** Response of mosquitoes to mechanical stimuli. Response of the larvae and pupae of *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to surface disturbance. *Commun. Fac. Sci. Univ. Ankara Ser. C Zool.* 24: 43–55.
- Kasap, M. 1981.** Response of mosquitoes to mechanical stimuli. An observation on the response of the larvae and pupae of *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to taps at the edge of an experimental dish. *Commun. Fac. Sci. Univ. Ankara Ser. C Zool.* 25: 25–35.
- Kemabonta, K., y A. Nwankwo. 2013.** Larvicidal effectiveness of spinosad and temephos on *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Int. J. Sci. Nat.* 4: 214–222.
- Kembro, J. M., R. H. Marin, J. A. Zygodlo, y R. M. Gleiser. 2009.** Effects of the essential oils of *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) on the temporal pattern of locomotion of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitol. Res.* 104: 1119–1127.
- Killeen, G. F., U. Fillinger, y B. G. J. Knols. 2002.** Advantages of larval control for African malaria vectors: Low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage. *Malar. J.*
- Kitron, U. 1987.** Malaria, Agriculture, and Development: Lessons from Past Campaigns. *Int. J. Heal. Serv.* 17: 295–326.
- Klocke, J. A., M. V. Darlington y M. F. Balandyrin. 1987.** 1, 8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding y ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). *J. Chem. Ecol.* 13: 2131–2141.
- Kumar, S., R. Warikoo, M. Mishra, A. Seth, y N. Wahab. 2012.** Larvicidal efficacy of the Citrus limetta peel extracts against Indian strains of *Anopheles stephensi* Liston and *Aedes aegypti* L. *Parasitol. Res.* 111: 173–178.
- Lagadic, L., M. Roucaute, y T. Caquet. 2014.** Bti sprays do not adversely affect non-target aquatic invertebrates in French Atlantic coastal wetlands. *J. Appl. Ecol.* 51: 102–113.
- Lahkim-Tsrer, L., C. Pascar-Gluzman, J. Margalit, y Z. Barak. 1983.** Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, serovar H14 in *Aedes aegypti*: Histopathological studies. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 104–116.
- Lardeux, F., V. Quispe, R. Tejerina, R. Rodríguez, L. Torrez, B. Bouchité, y T. Chávez. 2007.** Laboratory colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) without forced mating. *Comptes Rendus - Biol.* 330: 571–575.
- Li, H., y J. L. Madden. 1995.** Analysis of leaf oils from a *Eucalyptus* species trial. *Biochem.*

Syst. Ecol. 23: 167–177.

- Libonatti, M. L., M. C. Michat, y P. L. M. Torres. 2014.** Key to the subfamilies, tribes and genera of adult Dytiscidae of Argentina (Coleoptera : Adephaga). Rev. la Soc. Entomológica Argentina. 70: 317–336.
- Linares M. A., Zamar M. I. y W. R. Almirón WR. 2014.** Diversidad de mosquitos (Diptera: Culicidae) en zonas periféricas de San Salvador de Jujuy. IX Jornadas Regionales sobre Mosquitos. 5 y 6 de septiembre. Resistencia. Chaco. Argentina. pp. 16-18.
- Litchfield, J. T. J., y F. Wilcoxon. 1949.** A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99–113.
- Little, E. E., y S. E. Finger. 1990.** Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. Environ. Toxicol. Chem. 9: 13–19.
- Liu, C., R. J. Pitts, J. D. Bohbot, P. L. Jones, G. Wang, y L. J. Zwiebel. 2010.** Distinct olfactory signaling mechanisms in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. PLoS Biol. 8: 27–28.
- Lucia, A., E. Zerba, y H. Masuh. 2013.** Knockdown and larvicidal activity of six monoterpenes against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and their structure-activity relationships. Parasitol. Res. 112: 4267–4272.
- Lucia, A., P. Gonzalez Audino, E. Seccacini, S. Licastro, E. Zerba, y H. Masuh. 2007.** Larvicidal Effect of *Eucalyptus Grandis* Essential Oil and Turpentine and Their Major Components on *Aedes Aegypti* Larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23: 299–303.
- Lucia, A., S. Licastro, E. Zerba, y H. Masuh. 2008.** Yield, chemical composition, and bioactivity of essential oils from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. Entomol. Exp. Appl. 129: 107–114.
- Lugo Villalta, E. del C. 1991.** Dinámica poblacional y patrón diario de alimentación de *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae). Tesis de maestría. Universidad de Nueva León, México.
- Lupi, E., C. Hatz, y P. Schlagenhauf. 2013.** The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes spp.* - A literature review. Travel Med. Infect. Dis. 11: 374–411.
- Manguin, S., D. R. Roberts, E. L. Peyton, E. Rejmankova, y J. Pecor. 1996.** Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* Larval Habitats. 12: 619–626.
- Mann, R. y P. Kaufman. 2012.** Natural product pesticides: Their development, delivery and use against insect vectors. Mini Rev. Org. Chem. 9: 185–202.
- Marriel, N. B., H. V. V. Tomé, R. C. N. Guedes, y G. F. Martins. 2016.** Deltamethrin-mediated survival, behavior, and oenocyte morphology of insecticide-susceptible and resistant yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*). Acta Trop. 158: 88–96.
- Mcdaniel, I. N., y W. R. Horsfall. 1957.** Induced copulation of aedine mosquitoes. Science (80-). 125: 745.
- Medina, A., E. E. Scheibler, y A. Paggi. 2008.** Distribución de Chironomidae (Diptera) en dos sistemas fluviales rítronicos (Andino-serrano) de Argentina. Rev. Soc. Entomológica Argentina. 67: 69–79.
- Melo-Santos, M. A. V., J. J. M. Varjal-Melo, A. P. Araújo, T. C. S. Gomes, M. H. S. Paiva, L. N. Regis, A. F. Furtado, T. Magalhaes, M. L. G. Macoris, M. T. M. Andrighetti, y C. F. J. Ayres. 2010.** Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. Acta Trop. 113: 180–189.
- Menger, D. J., B. Otieno, M. De Rijk, W. R. Mukabana, J. J. Van Loon, y W. Takken. 2014.** A push-pull system to reduce house entry of malaria mosquitoes. Malar. J. 13.
- Mengoni, S. L., y R. A. Alzogaray. 2018.** Deltamethrin-resistant German Cockroaches Are

Less Sensitive to the Insect Repellents DEET and IR3535 than Non-resistant Individuals. *J. Econ. Entomol.* 111: 836–843.

- Menut, C., G. Lamaty, G. Malanda-Kiyabou y J. M. Bessiere. 1992.** Aromatic plants of tropical central Africa. VIII. Individual selection of *Eucalyptus* for essential oil production in the Congo. *J. Essent. Oil Res.* 4: 427–429.
- Menut, C., T. Molangui, G. E. Lamaty, J. M. Bessiere y J. B. Habimana. 1995.** Aromatic plants of tropical Central Africa. 23. Chemical composition of leaf essential oils of *Eucalyptus goniocalyx* F. Muell. and *Eucalyptus patens* Benth. Growth in Rwanda. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1267–1271.
- Merritt R. W. y K. W. Cummins. 1984.** An introduction to the aquatic insects of North America (2nd ed.). Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa, 722 pp.
- Merritt, R. W., R. H. Dadd, y E. D. Walker. 1992.** Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 349–374.
- Michaelakis, A., D. Papachristos, A. Kimbaris, G. Koliopoulos, A. Giatropoulos, y M. G. Polissiou. 2009.** Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 105: 769–773.
- Mileson, B. E., J. E. Chambers, W. L. Chen, W. Dettbarn, M. Ehrich, A. T. Eldefrawi, D. W. Gaylor, K. Hamernik, E. Hodgson, A. G. Karczmar, S. Padilla, C. N. Pope, R. J. Richardson, D. R. Saunders, L. P. Sheets, L. G. Sultatos, y K. B. Wallace. 1998.** Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol. Sci.*
- Miller, J. R., P. Y. Siegert, F. A. Amimo, y E. D. Walker. 2009.** Designation of Chemicals in Terms of the Locomotor Responses They Elicit From Insects: An Update of Dethier et al. (1960). *J. Econ. Entomol.* 102: 2056–2060.
- Ministerio de Salud de la Nación (MSN). 2016.** Boletín integrado de Vigilancia. Nro. 340. Se51. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/boletin_integrado_vigilancia_n340-se51.pdf
- Ministerio de Salud de la Nación (MSN). 2018.** Boletín integrado de Vigilancia. Nro. 433. Se51. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_433_se_51.pdf
- Mohammad, A., S. Mansoreh, K. Mehdi, V. Hasan, A. M. Reza, y A. Kamran. 2011.** Persistence and residue activity of deltamethrin on indoor residual spraying surfaces against malaria vectors in southeastern Iran. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1 (2): 271-275.
- Moore, S. J., Lenglet, A. y N. Hill. 2006.** Plant-based insect repellents. En *Insect Repellents: Principles Methods, and Use.* (Ed. Debboun M, Frances SP, Strickman D.), CRC Press, Florida, pp. 275-303.
- Morales, M. E., D. M. Wesson, I. W. Sutherland, D. E. Impoinvil, C. M. Mbogo, J. I. Githure, y J. C. Beier. 2003.** Determination of *Anopheles gambiae* larval DNA in the gut of insectivorous dragonfly (Libellulidae) nymphs by polymerase chain reaction. *J Am Mosq Control Assoc.* 19: 163–165.
- Moretti, A. N., E. N. Zerba, y R. A. Alzogaray. 2013.** Behavioral and Toxicological Responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 Monoterpene Alcohols. *J. Med. Entomol.* 50: 1046–1054.
- Mulla, M. S., H. A. Darwazeh, y M. Zgomba. 1990.** Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus-sphaericus* 2362 and *Bacillus-thuringiensis* H-14 against mosquitoes. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 15: 166–175.
- Mullens, B. A., W. G. Reifenrath, y S. M. Butler. 2009.** Laboratory trials of fatty acids as repellents or antifeedants against houseflies, horn flies and stable flies (Diptera: Muscidae). *Pest Manag. Sci.* 65: 1360–1366.
- N'Guessan, R., M. Rowland, T. L. Moumouni, N. B. Kesse, y P. Carnevale. 2006.** Evaluation

of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100: 1091–1097.

- Narahashi, T. 1996.** Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides. *Pharmacology Toxicol.* 18: 1–14.
- Naspi, C. V. 2015.** Separación y caracterización enantiomérica de terpenos de aceites esenciales de *Eucalyptus*: hibridación interespecífica como fuente de repelentes de *Aedes albopictus*. Tesis doctoral. UNSAM. Argentina.
- Nerio, L. S., J. Olivero-Verbel, y E. Stashenko. 2010.** Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresour. Technol.* 101: 372–378.
- Nikpour, F., H. Vatandoost, A. A. Hanafi-Bojd, A. Raeisi, M. Ranjbar, A. A. Enayati, M. R. Abai, M. Shayeghi, A. R. Mojahedi, y A. Pourreza. 2017.** Evaluation of deltamethrin in combination of Piperonyl Butoxide (PBO) against pyrethroid resistant, malaria vector, *Anopheles stephensi* in IRS implementation: An experimental semi-field trial in Iran. *J. Arthropod. Borne. Dis.* 11: 469–481.
- Noldus, L. P., A. J. Spink y R. A. Tegelenbosch. 2001.** EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behav. Res. Method. Instrum. Comput.* 33: 398–414
- Okumu, F. O., G. F. Killeen, S. Ogoma, L. Biswaro, R. C. Smallegange, E. Mbeyela, E. Titus, C. Munk, H. Ngonyani, W. Takken, H. Mshinda, W. R. Mukabana, y S. J. Moore. 2010.** Development and field evaluation of a synthetic mosquito lure that is more attractive than humans. *PLoS One.* 5.
- Okumu, F. O., N. J. Govella, S. J. Moore, N. Chitnis, y G. F. Killeen. 2010.** Potential benefits, limitations and target product-profiles of odor-baited mosquito traps for malaria control in Africa. *PLoS One.* 5.
- Ordoñez Gonzalez, J. G., M. G. Vazquez Martinez, K. M. Valdez Delgado, R. P. Penilla Navarro, J. L. Torres Estrada y A. D. Rodriguez Ramirez. 2008.** Fundamentos y métodos de control químico integrado. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica, 1st ed. Inst. Nac. Salud Pública., Cuernavaca, México.
- Orr, B. K., y V. H. Resh. 1989.** Experimental test of the influence of aquatic macrophyte cover on the survival of *Anopheles* larvae. *J Am Mosq Control Assoc.* 5: 579–585.
- Orr, B. K., y V. H. Resh. 1992.** Influence of *Myriophyllum aquaticum* cover on *Anopheles* mosquito abundance, oviposition, and larval microhabitat. *Oecologia.* 90: 474–482.
- Osimitz, T. G., y J. G. Murphy. 1997.** Neurological effects associated with use of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 35: 435–441.
- Otieno, W. A., T. O. Onyango, M. M. Pile, B. R. Laurence, G. W. Dawson, L. J. Wadhams, y J. A. Pickett. 1988.** A field trial of the synthetic oviposition pheromone with *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in Kenya. *Bull. Entomol. Res.* 78: 463–470.
- Owens, D. K., N. P. D. Nanayakkara, y F. E. Dayan. 2013.** In planta Mechanism of Action of Leptospermon: Impact of Its Physico-Chemical Properties on Uptake, Translocation, and Metabolism. *J. Chem. Ecol.* 39: 262–270.
- Paggi, A. C. 1998.** Chironomidae. En: Morrone, J. J. y S. Coscarón (eds.), *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos: Una perspectiva biotaxonomica*, Ediciones Sur, La Plata, pp. 327-337.
- Paluch, G., J. Grodnitzky, L. Bartholomay, y J. Coats. 2009.** Quantitative structure-activity relationship of botanical sesquiterpenes: Spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7618–7625.
- Pan American Health Organization. 1991.** Status of malaria programs in the Americas, XXXIX Report Washington, D. C.

- Park, C. G., M. Jang, E. Shin, y J. Kim. 2017.** Myrtaceae plant essential oils and their β -triketone components as insecticides against *Drosophila suzukii*. *Molecules*. 22.
- Paul, A., L. C. Harrington, y J. G. Scott. 2006.** Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *J. Med. Entomol.* 43: 55–60.
- Pavela, R., y G. Benelli. 2015.** Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Ind. Crops Prod.* 76: 174–187.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. Deb Roy y D. Sarkar. 2006.** nlme: linear and nonlinear mixed effects models, R package version 3, pp. 1–76. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Pohlit, A. M., N. P. Lopes, R. A. Gama, W. P. Tadei, y V. F. De Andrade Neto. 2011.** Patent literature on mosquito repellent inventions which contain plant essential oils - A review. *Planta Med.*
- Polson, K. A., W. G. Brogdon, S. C. Rawlins, y D. D. Chadee. 2011.** Characterization of insecticide resistance in Trinidadian strains of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Acta Trop.* 117: 31–38.
- Porter, N. G. 2001.** Manuka - the good oil for New Zealand. *Herbalgram.* 53: 26–30.
- Powell, J. R., y W. J. Tabachnick. 2013.** History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 108: 11–17.
- Prado, J. A. y S. Barros. 1989.** *Eucalyptus*. Principios de silvicultura y manejo. Instituto Forestal-CORFO, Santiago, Chile.
- Pridgeon, J. W., R. M. Pereira, J. J. Becnel, S. A. Allan, G. G. Clark, y K. J. Linthicum. 2008.** Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Say, and *Anopheles quadrimaculatus* Say to 19 Pesticides with Different Modes of Action. *J. Med. Entomol.* 45: 82–87.
- Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard, y P. R. Carey. 1991.** The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals, *Biochem. J.*
- Pyke B., Rice M., Sabine B. y M. P. Zalucki. 1987.** The push-pull strategy behavioural control of *Heliothis*. *ACGR.* 9: 7-9.
- Quinn, G. P. y M. K. Keough. 2002.** Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press.
- Rahuman, A. A., Bagavan, A., Kamaraj, C., Saravanan, E., Zahir, A. A., y Elango, G. 2009.** Efficacy of larvicidal botanical extracts against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 104(6), 1365-1372.
- Ramirez, L., P. Medina, P. Fajardo, y R. González. 1986.** Ciclo biológico y establecimiento de una colonia de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald 1901, variedad bifoliata (Diptera: Culicidae) en Cali, Colombia. *Biomédica.* 6: 79–84.
- Ray, D. E., y J. R. Fry. 2006.** A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Ther.*
- Reichling, J., C. Koch, E. Stahl-Biskup, C. Sojka, y P. Schnitzler. 2005.** Virucidal activity of a β -triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Med.* 71: 1123–1127.
- Rejmankova, E., H. M. Savage, M. Rejmanek, J. I. Arredondo-Jimenez, y D. R. Roberts. 1991.** Multivariate Analysis of Relationships Between Habitats, Environmental Factors and Occurrence of Anopheline Mosquito Larvae *Anopheles albimanus* and *A. pseudopunctipennis* in Southern Chiapas, Mexico. *J. Appl. Ecol.* 28: 827.
- Reynaldi, S., M. Meiser, y M. Liess. 2011.** Effects of the pyrethroid fenvalerate on the alarm response and on the vulnerability of the mosquito larva *Culex pipiens molestus* to the predator *Notonecta glauca*. *Aquat. Toxicol.* 104: 56–60.

- Reynoso, M. M. N., E. A. Seccacini, J. A. Calcagno, E. N. Zerba, y R. A. Alzogaray. 2017.** Toxicity, repellency and flushing out in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) exposed to the repellents DEET and IR3535. *PeerJ*. 5: e3292.
- Riley, M. 1994.** Maori healing and herbal: New Zealand ethnobotanical sourcebook. Viking Sevenses NZ, Paraparaumu, New Zealand.
- Rodriguez Perez, M. A. 1990.** Estudios sobre cría, comportamiento sexual y tablas de vida de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald y *Anopheles punctipennis* (Say) (Diptera: Culicidae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de maestría. Universidad de Nueva León, Mexico.
- Rossi, G. C. 2015.** Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List*. 11.
- Sasse, B. E. y L. W. Hackett. 1950.** Note on the Host Preferences of *Anopheles pseudopunctipennis*. *Journal of the National Malaria Society*, 9(2).
- Satpute, K., R. Sarda, S. Dhanna y K. Bodas. 2015.** A review on plant based mosquito repellents. *J. Drug Deliv*. 1: 8–13.
- Savage, H. M., E. Rejmankova, J. I. Arredondo-Jim'enez, D. R. Roberts, y M. H. Rodr'iguez. 1990.** Limnological and botanical characterization of larval habitats for two primary malarial vectors, *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis*, in coastal areas of Chiapas State, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*. 6: 612–620.
- Schreck C. E. 1977.** Techniques for the evaluation of insect repellents: a critical review. *Annual Review of Entomology* 22, 101–119.
- Schreck, C. E., y T. P. McGovern. 1989.** Repellents and other personal protection strategies against *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc*. 5: 247–250.
- Schulz, R., y J. M. Dabrowski. 2001.** Combined effects of predatory fish and sublethal pesticide contamination on the behavior and mortality of mayfly nymphs. *Environ. Toxicol. Chem*. 20: 2537–2543.
- Sebastian, A., M. M. Sein, M. M. Thu, y P. S. Corbet. 1990.** Suppression of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using augmentative release of dragonfly larvae (Odonata: Libellulidae) with community participation in Yangon, Myanmar. *Bull. Entomol. Res*. 80: 223–232.
- Seccacini, E., A. Lucia, E. Zerba, S. Licastro, y H. Masuh. 2008.** *Aedes aegypti* Resistance to Temephos in Argentina. *J. Am. Mosq. Control Assoc*. 24: 608–609.
- Senthilkumar, A., M. Jayaraman, y V. Venkatesalu. 2013.** Chemical constituents and larvicidal potential of *Feronia limonia* leaf essential oil against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol. Res*. 112: 1337–1342.
- Setha, T., N. Chantha, y D. Socheat. 2007.** Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*, Vectobac® wg and dt, formulations against dengue mosquito vectors in cement potable water jars in Cambodia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 38: 261–268.
- Sfara, V., E. N. Zerba, y R. A. Alzogaray. 2008.** Decrease in DEET repellency caused by nitric oxide in *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 67: 1–8.
- Sfara, V., G. A. Mougabure-Cueto, E. N. Zerba, y R. A. Alzogaray. 2013.** Locomotor behaviour of *Blattella germanica* modified by DEET. *PLoS One*. 8: 1–5.
- Shannon, R. C., N. C. Davis y E. Del Ponte. 1927.** La distribución del *Anopheles pseudopunctipennis* y su relación con el paludismo, en la Argentina. *Rev. Inst. Bacteriológico*. Tomo IV(7): 679-705.
- Sharpington, P. J., T. P. Healy, y M. J. Copland. 2000.** A wind tunnel bioassay system for screening mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc*. 16: 234–240.
- Shi, X., L. Jiang, H. Wang, K. Qiao, D. Wang, y K. Wang. 2011.** Toxicities and sublethal effects of seven neonicotinoid insecticides on survival, growth and reproduction of

- imidacloprid-resistant cotton aphid, *Aphis gossypii*. Pest Manag. Sci. 67: 1528–1533.
- Sih, A. 1986.** Antipredator response and the perception of danger by mosquito larvae. Ecology. 67: 434–441.
- Sinka, M. E., Y. Rubio-Palis, S. Manguin, A. P. Patil, W. H. Temperley, P. W. Gething, T. Van Boeckel, C. W. Kabaria, R. E. Harbach, y S. I. Hay. 2010.** The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit. Vectors. 3: 72.
- Smock, L. A., y D. L. Stoneburner. 1980.** The Response of Macroinvertebrates to Aquatic Macrophyte Decomposition. Source: Oikos. 35: 397–403.
- Snyder, J. W., Poe, R. O., Stubbins, J. F. y L. K. Garrettson. 1986.** Acute manic psychosis following the dermal application of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) in an adult. Clinical Toxicology, 24(5), 429-439.
- Soares Pinheiro, V. C., y W. P. Tadei. 2002.** Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus , Amazonas State, Brazil. Cad. Saúde Pública. 18: 1529–1536.
- Spruijt, B. M., M. O. S. Buma, P. B. A. van Lochem, y J. B. I. Rousseau. 1998.** Automatic behavior recognition: what do we want to recognize and how do we measure it?, pp. 264–266. In Noldus, L.P.J.J. (ed.), Proc. Meas. Behav. University of Groningen, Groningen, the Netherlands.
- Sritabutra, D., y M. Soonwera. 2013.** Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). Asian Pacific J. Trop. Dis. 3: 271–276.
- Stanczyk, N. M., J. F. Y. Brookfield, L. M. Field, y J. G. Logan. 2013.** *Aedes aegypti* Mosquitoes Exhibit Decreased Repellency by DEET following Previous Exposure. PLoS One. 8.
- Stanczyk, N. M., J. F. Y. Brookfield, R. Ignell, J. G. Logan, y L. M. Field. 2010.** Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. Proc. Natl. Acad. Sci. 107: 8575–8580.
- Stein, M., G. Rossi, y W. Almirón. 2016.** Distribución geográfica de Culicidae de Argentina, pp. 47–56. In Berón, C., Campos, R., Gleiser, R., Díaz-Nieto, L., Salomón, O., Schweigmann, N. (eds.), Investig. Sobre Mosquitos Argentina. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Subramaniam, S., E. M. Aris, N. W. Ahmad, L. H. Lim, y A. A. Hadi. 2006.** The development of resistance and susceptibility of *Aedes aegypti* larvae and dult mosquitoes against selection ressure to malathion, permethrin and temephos insecticides and its cross-resistance relationship against propoxur. Malaysian J. Sci. 25: 1–13.
- Tananchai, C., R. Tisgratog, J. P. Grieco, y T. Chareonviriyaphap. 2012.** Pyrethroid induced behavioral responses of *Anopheles dirus*, a vector of malaria in Thailand. J. Vector Ecol. 37: 187–196.
- TGSC, T. G. S. C. 2018.** Flavesone. Physical proprieties. 2018. (<http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1567781.html>).
- Thomas, M. B., H. C. Godfray, A. F. Read, H. Van Den Berg, B. E. Tabashnik, J. C. van Lenteren, J. K. Wage y W. Takken. 2012.** Lessons from agriculture for the sustainable management of malaria vectors. PLoS Med. 9: e100126.
- Tisgratog, R., U. Sanguanpong, J. P. Grieco, R. Ngoen-Kluan, y T. Chareonviriyaphap. 2016.** Plants traditionally used as mosquito repellents and the implication for their use in vector control. Acta Trop. 157: 136–144.
- Tomé, H. V., T. V Pascini, R. A. Dângelo, R. N. Guedes, y G. F. Martins. 2014.** Survival and swimming behavior of insecticide-exposed larvae and pupae of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Parasit. Vectors. 7: 195.

- Torres, P. L. M., S. A. Mazzucconi, M. C. Michat, y A. O. Bachmann. 2008.** Los coleópteros y heterópteros acuáticos del Parque Nacional Calilegua (Provincia de Jujuy, Argentina) Aquatic Coleoptera and Heteroptera from Calilegua National Park (Jujuy Province, Argentina). 67: 127–144.
- Torres-Estrada, J. L., R. a Meza-Alvarez, L. Cruz-López, M. H. Rodríguez, y J. I. Arredondo-Jiménez. 2007.** Attraction of gravid *Anopheles pseudopunctipennis* females to oviposition substrates by *Spirogyra majuscula* (Zygnematales: Zygnemataceae) algae under laboratory conditions. J. Am. Mosq. Control Assoc. 23: 18–23.
- Traboulsi, A. F., S. El-Haj, M. Tueni, K. Taoubi, N. A. Nader, y A. Mrad. 2005.** Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). Pest Manag. Sci. 61: 597–604.
- Trongtokit, Y., Y. Rongsriyam, N. Komalamisra, y C. Apiwathnasorn. 2005.** Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phyther. Res. 19: 303–309.
- Tsitsanou, K. E., T. Thireou, C. E. Drakou, K. Koussis, M. V. Keramioti, D. D. Leonidas, E. Eliopoulos, K. Iatrou, y S. E. Zographos. 2012.** *Anopheles gambiae* odorant binding protein crystal complex with the synthetic repellent DEET: Implications for structure-based design of novel mosquito repellents. Cell. Mol. Life Sci. 69: 283–297.
- Turesson, H., A. Satta, y P. Domenici. 2009.** Preparing for escape: anti-predator posture and fast-start performance in gobies. J. Exp. Biol. 212: 2925–33.
- Van Klink, J. W., J. J. Brophy, N. B. Perry y R. T. Weavers. 1999.** β -Triketones from Myrtaceae: Isoleptospermone from *Leptospermum scoparium* and Papuanone from *Corymbia dallachiana*. J. Nat. Prod. 62: 487–489.
- Vezzani, D., y A. E. Carbajo. 2008.** *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103: 66–74.
- Von Ellenrieder, N. 2007.** Composition and structure of aquatic insect assemblages of Yungas mountain cloud forest streams in NW Argentina. Rev. la Soc. Entomológica Argentina. 66: 57–76.
- Wang, Z., J. Song, J. Chen, Z. Song, S. Shang, Z. Jiang, y Z. Han. 2008.** QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. Bioorganic Med. Chem. Lett. 18: 2854–2859.
- Weeks, J. A., P. D. Guiney, y A. I. Nikiforovz. 2012.** Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). Integr. Environ. Assess. Manag. 8: 120–134.
- Weinzierl, R. A. 2000.** Botanical insecticides, soaps, and oils. *Biological and biotechnological control of insect pests*, 101-21.
- Welling, W. y G. D. Paterson. 1985.** Toxicodynamics of insecticides, comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 12, Pergamon Press, Oxford, United Kingdom
- Wharton, R.H. 1953.** The habits of adult mosquitoes in Malaya IV. Swarming of Anopheline in nature. Med. J. Malaya 4, 260–271.
- White, G. B. y S. J. Moore. 2015.** Terminology of insect repellents, pp. 3–30. In M. Debboun, S. P. Frances, and D. Strickman (eds.), Insect repellent, handbook, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL
- Wigglesworth, V. B. 1974.** Insect physiology, 7th ed, pp. 163. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Wijit, A., K. Taai, W. Dedkhad, C. Hempolchom, S. Thongsahuan, W. Srisuka, Y. Otsuka, M. Fukuda, y A. Saeung. 2016.** Comparative studies on the stenogamous and eurygamous behavior of eight *Anopheles* species of the hyrcanus group (Diptera: Culicidae) in Thailand. Insects. 7: 1–21.

- World Health Organization (WHO). 1982.** Manual on environmental management for mosquito control. Ginebra, Suiza. Disponible en:
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37329/9241700661_eng.pdf
- World Health Organization (WHO). 1992.** Vector resistance to pesticides. Fifteenth report of the WHO expert committee on vector biology and control. World Heal. Organ. Tech. Rep. Ser. 818: 1–62.
- World Health Organization (WHO). 2008.** Guidelines drinking water quality. Incorporating 1st and 2nd addenda, Vol. 1, Recommendations. Third Edition. Ginebra, Suiza.
- World Health Organization (WHO). 2009.** Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Ginebra, Suiza. Disponible en:
http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
- World Health Organization (WHO). 2018.** Chemical control. Programme of dengue control. Ginebra, Suiza. Disponible en:
http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/chemical_control/en
- Xia, Y., G. Wang, D. Buscariollo, R. J. Pitts, H. Wenger, y L. J. Zwiebel. 2008.** The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in *Anopheles gambiae* larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 6433–8.
- Yoshida, K., T. Hirotsu, T. Tagawa, S. Oda, T. Wakabayashi, Y. Iino, y T. Ishihara. 2012.** Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. Nat. Commun. 3: 711–739.
- Zalom F. G. y Grigarick A. A. 1980.** Predation by *Hydrophilus triangulatis* and *Tropisternus lateralis* in California Rice Fields. Entomological Society of America 73: 167-171.
- Zeng, X.-N., J. J. Leyden, A. I. Spielman, y G. Preti. 1996.** Analysis of characteristic human female axillary odors: Qualitative comparison to males. J. Chem. Ecol. 22: 237–257.
- Zermoglio, P. F., H. Martin-Herrou, Y. Bignon, y C. R. Lazzari. 2015.** *Rhodnius prolixus* smells repellents: Behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors. J. Insect Physiol. 81: 137–144.
- Zhu, J., X. Zeng, Yanma, T. Liu, K. Qian, Y. Han, S. Xue, B. Tucker, G. Schultz, J. Coats, W. Rowley, y A. Zhang. 2006.** Adult repellency and larvicidal activity of five plant essential oils against mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22: 515–522.

