

Insecticida natural para el control de
Musca domestica en base a aceites esenciales y sus componentes

Bioquímico y Farmacéutico Alberto Oscar Bertoni

2013

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Director de Tesis

Dra. Sara María Palacios

Comité evaluador

Dra. Erika Banchio

Dr. Daniel Ducasse

Dr. Daniel Lerda

RESUMEN

Se estudió la composición de 30 aceites esenciales (AEs), obtenidos por hidrodestilación de plantas usadas como alimentos, condimentos o con fines medicinales. Ellos fueron analizados por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS).

Se investigó la actividad insecticida de cada aceite contra moscas domésticas, (*Musca domestica*) y se determinó la dosis necesaria para matar el 50% de las moscas (DL₅₀) en 30 minutos.

El AE de *Minthostachys verticillata* fue el de mayor poder insecticida, seguido en eficacia por el AE de *Hedeoma multiflora*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* y *Eucalyptus cinerea*.

También se determinó la DL₅₀ de 20 terpenos (Ts), componentes mayoritarios de los AEs estudiados. Entre los Ts, (4*R*)-(+)-pulegona, 1,8 cineol, γ -terpineno y (4*R*)(+)-limoneno, resultaron ser los más activos contra *M. domestica*.

Se seleccionaron los AEs de *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinerea* y sus respectivos Ts mayoritarios (4*R*)-(+)-pulegona, (4*R*)(+)-limoneno y 1,8-cineol, como los más promisorios para el desarrollo de un fumigante debido a sus bajas dosis letal 50 (DL₅₀).

Se estudió la influencia de la quiralidad en la actividad insecticida de algunos Ts. Los AEs que contenían limoneno y los que contenían pulegona, como componente principal fueron analizados por CG-MS con una columna quiral. En ambos casos los isómeros detectados fueron (4*R*)(+)-limoneno y (4*R*)(+)-pulegona.

Se calcularon los tiempos letales 50, (TL₅₀) de los AEs y los Ts mayoritarios, para evaluar su efectividad como insecticida. El menor tiempo lo mostró el AE de *M. verticillata*, seguida por el AE de *H. multiflora* y de *C. sinensis*.

Se realizaron mezclas entre AEs y luego mezclas entre sus Ts mayoritarios, midiendo el sinergismo entre ellas. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios en las mezclas de *M. verticillata* / *C. sinensis*; *E. cinerea* / *C. sinensis* y la mezcla de *M. verticillata* / *E. cinerea*.

Se realizaron bioensayos en un sistema abierto con 100 moscas, logrando resultados muy alentadores con una formulación a base de los AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis*, con la muerte del 75% de individuos, a los 10 minutos de la fumigación.

En un análisis preliminar, los costos de producción de los formulados serían factibles económicamente.

Palabras claves: insecticida natural, *Musca domestica*, aceites esenciales, terpenos, productos naturales.

SUMMARY

Natural insecticide for the control of *Musca domestica* based on essential oils and their components

We studied the composition of 30 essential oils (AEs), obtained by hydrodistillation of plants used as food, condiments or with medicinal purposes. They were analyzed by Gas Chromatography with Mass Spectrometry detector (GC-MS).

We investigated the insecticidal activity of each oil against houseflies (*Musca domestica*) and determined the dose needed to kill 50% of the flies (LD₅₀) in 30 minutes.

The AE *Minthostachys verticillata* was the most powerful insecticide, followed in effectiveness by AE *Hedeoma multiflora*, *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium* and *Eucalyptus cinerea*.

We also determined the LD₅₀ of 20 terpenes (Ts), major components of the AEs studied. Among the Ts, (4*R*)-(+)-pulegone, cineol 1.8, γ -terpinene and (4*R*)(+)-limonene, were the most active against *M. domestica*.

We selected AEs from *M. verticillata*, *C. sinensis* and *E. cinerea* and their Ts respective majority (4*R*)(+)-pulegone, (4*R*)(+)-limonene and 1,8-cineol as the most promising for the development of a fumigant due to their low lethal dose 50 (LD₅₀).

We studied the influence of the chirality on the insecticidal activity of some Ts. AEs containing limonene and those containing pulegone, as their main component were analyzed by GC-MS with a chiral column. In both cases the isomers detected were (4*R*)(+)-limonene and (4*R*)(+)-pulegone.

We calculated lethal time 50 (LT₅₀) of AEs and the majority Ts, to evaluate their effectiveness as an insecticide. The least time was shown by AE of *M. verticillata*, followed by AE *H. multiflora* and *C. sinensis*.

Mixtures were made between AEs and then among its major Ts measuring the synergism among them. The results were satisfactory in the mixtures *M. verticillata* / *C. sinensis*; *E. cinerea* / *C. sinensis* and *M. verticillata* / *E. cinerea*.

Bioassays were conducted in an open system with 100 flies, achieving very encouraging results with a formulation based on the AEs *M. verticillata* and *C. sinensis*, with the death of 75% of individuals, within 10 minutes of spraying.

In a preliminary analysis, the costs of production would be economically feasible.

Keywords: natural insecticide, *Musca domestica*, essential oils, terpenes, pulegone, limonene, natural products.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis doctoral a quien fuera mi profesor de las materias Química Analítica y Análisis Instrumental, durante mi carrera de grado, me refiero al Dr. Jean Durigneux (1924 – 1997).



Llega a Córdoba, en el año 60, procedente de Bélgica, luego de un tiempo en Montevideo.

Con el castellano, que recién estaba conociendo y con el fuerte acento de su francés natal, comienza el dictado de sus clases a un grupo de quienes serían luego los primeros egresados de esta Facultad, por entonces Escuela de Farmacia y Bioquímica.

Metódico y organizado imprime en el dictado de sus clases una sistemática distinta a la que hasta entonces se aplicaba en esta Universidad.

Impone su fuerte personalidad frente al alumno que desde los comienzos le demuestra un marcado respeto, incluso diría temor. Temor que con el correr de los años se va desacralizando como consecuencia de un conocimiento más profundo de su persona y a su vez, porque también él, va comprendiendo un estilo de vida muy distinto al que estaba acostumbrado.

La consecuencia de este cambio se manifiesta en que si bien exige y demanda lo mejor del alumno, este comienza a estimarlo, quererlo y termina admirándolo.

AGRADECIMIENTOS

A las personas que me acompañaron en la realización de éste trabajo:

- a mí esposa Graciela.
- a mis hijos, Pablo y Guillermo, siempre presentes.
- a mis compañeros de trabajo quienes me alentaron siempre.

A la Universidad Católica de Córdoba, donde estudié y desarrollé este trabajo doctoral.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas que supieron alentarme en todo momento.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agropecuarias por la colaboración que supieron prestarme.

A la Dra. Sara María Palacios quien me dirigió en la tesis, supo sacar de mí todo lo mejor y me animó permanentemente para que llegara hasta el final.

Por ello quisiera agradecer en forma muy especial su confianza en mí, lo que ha supuesto un gran estímulo.

"En los momentos de crisis sólo la creatividad es más importante que el conocimiento."

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

TITULO	i
RESUMEN.....	ii
PALABRAS CLAVES.....	iii
SUMMARY.....	iv
KEY WORDS.....	v
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
INDICE GENERAL.....	ix
INDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xv
INDICE DE TABLAS.....	xvi
INDICE DE ABREVIACIONES.....	xviii
CAPITULO I. INTRODUCCION y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. La mosca doméstica	1
1.1. Clasificación zoológica.....	1
1.2. Descripción de la mosca doméstica adulta.....	2
1.3. Hábitat.....	4
1.4. Ciclo biológico de la mosca doméstica.....	5
1.5. Huevos.....	5
1.6. Larvas.....	6
1.7. Pupa	6
1.8. Estado adulto.....	6

2. La <i>Musca domestica</i> como transmisor de enfermedades.....	7
3. Control de la <i>M. domestica</i>	8
3.1. Métodos de control de la población de <i>Musca domestica</i>	9
3.1.1. Métodos mecánicos	9
3.1.2. Métodos químicos	10
3.1.2.1. Insecticidas de origen sintético	10
4. Resistencia a los insecticidas.....	12
4.1. Intoxicación por insecticidas	13
4.2. Biodegradabilidad de los insecticidas	16
5. Nuevas alternativas para el control de insectos	16
6. Los aceites esenciales	17
6.1. Fuentes de los AEs	18
6.2. Componentes de los AEs	18
6.3. Usos de los AEs	23
6.3.1. Acción de AEs contra distintos insectos	24
6.3.2. Acción de Ts contra distintos insectos	25
6.4. Sinergismo de los AEs	26
7. Objetivos	27
7.1. Objetivo general.....	27
7.2. Objetivos específicos.....	27
8. Bibliografía del capítulo	28
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. Material vegetal	34
2. Extracción de los aceites esenciales.....	34
3. Análisis de los componentes de los AEs.....	35
4. Reactivos químicos	35
5. Cría de moscas	36

6. Bioensayos con moscas.....	36
7. Bioensayos en sistemas abiertos con 100 moscas	38
8. Análisis estadístico	40
9. Bibliografía del capítulo	41
CAPITULO III. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	42
1. Criterios para la selección de las sustancias a ensayar	42
2. Plantas seleccionadas.....	42
3. Obtención de AEs y análisis de sus componentes.....	46
4. Determinación de DL ₅₀ de AEs contra <i>M. domestica</i>	52
5. Determinación de DL ₅₀ de Ts contra <i>M. domestica</i>	55
6. Análisis multivariado.....	60
7. Estudio de la influencia de la quiralidad en la actividad insecticida de algunos Ts.....	61
8. Determinación de los TL ₅₀ de AEs y Ts contra <i>M. domestica</i>	62
9. Selección de tres AEs con mayor potencialidad como fumigante para <i>M. domestica</i>	66
10. Estudio del sinergismo	66
10.1. Determinación de la toxicidad de mezclas de AE de <i>M. verticillata</i> y <i>C. sinensis</i> o de sus terpenos mayoritarios	66
10.2. Determinación de la toxicidad de mezclas de AE de <i>M. verticillata</i> y <i>E. cinerea</i> o de sus terpenos mayoritarios.....	72
10.3. Determinación de la toxicidad de mezclas de AE de <i>E. cinerea</i> y <i>C. sinensis</i> o de sus terpenos mayoritarios	76
11. Formulación del producto	81
12. Ensayos en sistema abierto	82

13. Evaluación del costo económico del producto.....	83
14. Toxicidad de <i>M. verticillata</i> , <i>C. sinensis</i> y <i>E. cinérea</i>	85
15. Bibliografía del capítulo	87
CAPITULO IV. CONCLUSIONES	97
CAPITULO V. ANEXOS	98
Anexo 1	98
1. Tipos de resistencia a los insecticidas	98
1.1. La resistencia de comportamiento	98
1.2. Resistencia metabólica.....	98
1.2.1. La resistencia basada en esterasa.....	99
1.2.2. Resistencia basada en la Glutación S-transferasa.....	99
1.2.3. Resistencia basada en la monooxigenasa	100
1.2.4. La resistencia por los receptores del ácido gamma aminobutírico.....	100
1.2.5. Resistencia en los canales de sodio	101
1.3. Las mutaciones en los genes estructurales.....	101
1.4. Amplificación de genes.....	102
1.5. La regulación de las esterasas transcripcionales	102
1.6. Resistencia alterando el blanco u objetivo.....	102
1.7. Resistencia a la penetración.....	103
2. Bibliografía	103
Anexo 2	104
1. Identificación de componentes de los aceites esenciales	104
2. Bibliografía	104

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Correlación entre la DL ₅₀ de AEs y su contenido de pulegona, (R ² = 0,88).....	57
Gráfico 2: Correlación entre la DL ₅₀ de AEs y su contenido de 1,8-cineol, (R ² = 0,25).....	58
Gráfico 3: Correlación entre la DL ₅₀ de AEs y su contenido de γ -terpineno, (R ² = 0,01).....	59
Gráfico 4: Correlación entre la DL ₅₀ de AEs y su contenido de (4R)(+)-limoneno, (R ² = 0,14).....	59
Gráfico 5. Mortalidad de <i>Musca domestica</i> expuesta a AEs de <i>M.</i> <i>verticillata</i> (0,25 mg/dm ³ de aire), <i>C. sinensis</i> (1,85 mg/dm ³ de aire), mezcla de ambos AEs y la sumatoria de ambos AEs	68
Gráfico 6. Isoblograma de referencia	69
Gráfico 7: Isoblograma entre los AEs de <i>Minthostachys verticillata</i> y <i>Citrus sinensis</i>	70
Gráfico 8. Mortalidad de <i>Musca domestica</i> expuesta a terpenos (4R)(+)-pulegona (0,85 mg/dm ³ de aire) y (4R)(+)-limoneno (2,70 mg/dm ³ de aire), la mezcla de ambos terpenos y la sumatoria de ambos Ts	71
Gráfico 9. Isoblograma entre los Ts (4R)(+)-pulegona y (4R)(+)-limoneno a 240 minutos.....	72
Gráfico 10. Mortalidad de <i>Musca domestica</i> expuesta AEs de <i>Minthostachys</i> <i>verticillata</i> (0,25 mg/dm ³ de aire) y <i>Eucalyptus cinerea</i> (1,89 mg/dm ³ de aire), la mezcla de ambos AEs y la sumatoria de ambos AEs	74

Gráfico 11: Mortalidad de <i>Musca domestica</i> expuesta a los terpenos (4 <i>R</i>)(+)-pulegona (0,85 mg/dm ³ de aire) y 1,8-cineol (2,61 mg/dm ³ de aire), mezcla de ambos terpenos y la sumatoria de ambos Ts	75
Gráfico 12: Isobograma entre los Ts (4 <i>R</i>)(+)-pulegona y 1,8-cineol.....	76
Gráfico 13. Mortalidad de <i>Musca domestica</i> expuesta AEs de <i>Eucalyptus cinerea</i> (1,89 mg/dm ³ de aire), <i>Citrus sinensis</i> (1,85 mg/dm ³ de aire), la mezcla de ambos AEs y la sumatoria de ambos AEs	78
Gráfico 14. Isobograma entre los AEs de <i>E. cinerea</i> y <i>C. sinensis</i>	79
Gráfico 15: Mortalidad de <i>Musca domestica</i> expuesta a los terpenos 1,8-cineol (2,61 mg/dm ³ de aire), (4 <i>R</i>)(+)-limoneno (2,70 mg/dm ³ de aire), mezcla de ambos terpenos y la sumatoria de ambos Ts	79
Gráfico 16: Isobograma entre los Ts 1,8-cineol y (4 <i>R</i>)(+)-limoneno a 240 minutos.....	80
Gráfico 17: Cantidad de moscas muertas por minuto de ensayo según dos formulaciones de AEs.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Musca domestica</i>	1
Figura 2: Partes de la mosca doméstica	2
Figura 3: Detalles de la cabeza de la mosca doméstica	3
Figura 4: Ciclo biológico de la <i>Musca domestica</i>	5
Figura 5: Relación de tamaños entre la <i>Musca domestica</i> adulta, su huevo, larva y pupa	7
Figura 6: Estructura molecular del isopreno.....	19
Figura 7: Ejemplos de monoterpenos.....	19
Figura 8: Ejemplos de sesquiterpenos.....	22
Figura 9: Esquema del destilador por arrastre de vapor	34
Figura 10: Frascos utilizados en los bioensayos para las moscas control	37
Figura 11: Frascos utilizados en los bioensayos para las moscas con aceite esencial.....	37
Figura 12: Detalle de moscas muertas con aceite esencial	38
Figura 13: Caja entomológica para los bioensayos.....	39
Figura 14: Caja entomológica en el momento de la fumigación.....	40
Figura 15: Hojas de Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).....	44
Figura 16: Frutos del limonero (<i>Citrus limon</i>)	45
Figura 17: Hojas de Eucalyptus medicinal (<i>Eucalyptus cinerea</i>).....	45
Figura 18: Hojas de peperina (<i>Minthostachys verticillata</i>)	46
Figura 19: Frutos del naranjo (<i>Citrus sinensis</i>).....	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Insecticidas contra <i>Musca domestica</i> , autorizados por SENASA y Organización Mundial de la Salud.....	10
Tabla 2. Plantas o sus partes utilizadas para la obtención de los aceites Esenciales.....	43
Tabla 3. Rendimiento y principales componentes de los AEs estudiados.....	48
Tabla 4. Componentes de los AEs estudiados, expresado en % del volumen total.....	51
Tabla 5. DL ₅₀ (mg/dm ³) de aceites esenciales a 30 minutos y 26° C contra <i>Musca domestica</i>	53
Tabla 6. DL ₅₀ (mg/dm ³) de terpenos determinada a 30 minutos y 26° C contra <i>Musca domestica</i>	56
Tabla 7. TL ₅₀ determinados a 10 µl/dm ³ de aceites esenciales contra <i>Musca domestica</i> a 26 °C.....	62
Tabla 8. TL ₅₀ rango y dosis (10 µl/dm ³) de terpenos contra <i>Musca domestica</i> a 26°	64
Tabla 9. TL ₅₀ de AE de <i>M. verticillata</i> y <i>C. sinensis</i> y sus respectivos T mayoritarios frente a <i>Musca domestica</i>	66
Tabla 10. Valores calculados de TL ₅₀ , FIC y FICI para los AEs de <i>Minthostachys verticillata</i> , <i>Citrus sinensis</i> y la mezcla de ambos AEs	70
Tabla 11. Valores calculados de TL ₅₀ , FIC y FICI para de los Ts (4 <i>R</i>)(+)-pulegona, (4 <i>R</i>)(+)-limoneno y la mezcla de ambos Ts	71

Tabla 12. TL ₅₀ de AE de <i>Minthostachys verticillata</i> y <i>Eucalyptus cinerea</i> y sus respectivos T mayoritarios frente a <i>Musca domestica</i>	73
Tabla 13. Valores calculados de TL ₅₀ , FIC y FICI de los Ts (4 <i>R</i>)(+)-pulegona, 1,8-cineol y la mezcla de ambos Ts	75
Tabla 14. TL ₅₀ de AE de <i>Eucalyptus cinerea</i> , <i>Citrus sinensis</i> y sus respectivos T mayoritarios frente a <i>Musca domestica</i>	76
Tabla 15. Valores calculados de TL ₅₀ , FIC y FICI para los AEs de <i>Eucalyptus cinerea</i> , <i>Citrus sinensis</i> y la mezcla de ambos AEs.....	78
Tabla 16. Valores calculados de TL ₅₀ , FIC y FICI para los Ts 1,8-cineol, (4 <i>R</i>)(+)-limoneno y la mezcla de ambos Ts	80
Tabla 17. Formulaciones propuestas para realizar un desarrollo comercial.....	81
Tabla 18. Resultados del relevamiento de insecticidas en aerosol, contra mosca domestica	83
Tabla 19. Resultados del relevamiento de insecticidas en pulverizadores manuales a gatillo, contra mosca domestica.....	83

INDICE DE ABREVIACIONES USADAS

µl: microlitro

AE: aceite esencial

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

cm: centímetro

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Ministerio de Ciencia y Técnica de la Nación

cont: contenido

comp: composición

DDT: Dicloro Difenil Tricloroetano

DDVP: 2,2-dimetil diclorovinil

DL₅₀: dosis letal media, es la dosis de un determinado compuesto que provoca la muerte del 50% de la población tratada

EEUU: Estado Unidos de Norteamérica

EPA: por las siglas en inglés de U.S. Environmental Protection Agency, Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica

FDA: por las siglas en inglés de Food and Drug Administration, Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norteamérica

FIC: de sus siglas en inglés de fractional inhibitory concentration, índice de concentración inhibitoria fraccionada

FICI: de sus siglas en inglés, sumatoria de valores de FIC correspondiente a cada AE o T

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GC-MS: de las siglas en inglés de cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas

GRAS: por las siglas en inglés de Generally Recognized as Safe, reconocidas generalmente como seguras

GST: enzima Glutación S-transferasa

hrs: horas

InfoStat: software para análisis estadístico de aplicación general (Harvard Programming; Hg1, 2)

IR: Índice de retención de Kovats

IUPAC: por las siglas en inglés de International Union of Pure and Applied Chemistry, Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

m: metro

mL: mililitro

mg/dm³: miligramo por decímetro cúbico

mg/kg: miligramo por kilogramo

mm: milímetro

min: minuto

ng: nanogramo

Na₂SO₄: sulfato de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: análisis del componente principal

Probit: nombre del programa de Software que permite calcular DL₅₀ y LT₅₀

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SHBG: de las siglas en inglés de Globulina transportadora de hormonas sexuales

T: terpeno

TL₅₀: tiempo letal medio es el tiempo en que la dosis de un determinado compuesto provoca la muerte del 50% de la población tratada

WHO: por las siglas en inglés de World Health Organization, Organización Mundial de la Salud

CAPITULO I. INTRODUCCION Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. La mosca doméstica

El médico y naturalista sueco Carlos Linneo publicó su obra *Systema naturae* en el año 1735, donde expone la clasificación jerárquica del mundo natural, dividiéndola en reino animal, reino vegetal y reino de las piedras o mineral (Tibell, 2008). Pero fue recién en la décima edición de este libro, en 1758, donde comienza la clasificación zoológica (Hewitt, 2011). Allí, por primera vez, se clasifica la mosca doméstica y se le da el nombre científico de *Musca domestica* L. (Figura 1)

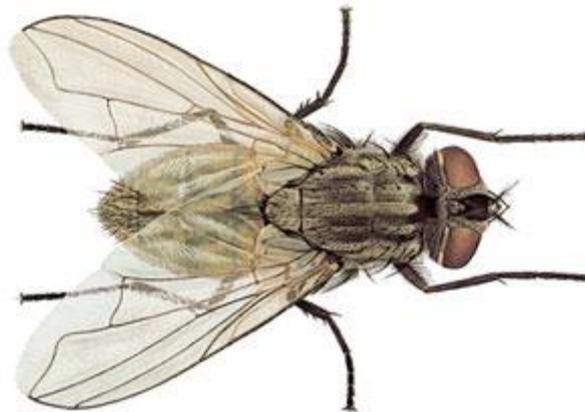


Figura 1. *Musca domestica*

La mosca doméstica, es uno de los insectos más comunes y habituales en la mayoría de los climas de la tierra, íntimamente asociados con los asentamientos humanos, los alimentos y utensilios. Estos insectos se alimentan y se reproducen en la materia en descomposición, desechos domésticos y en residuos de la industria alimenticia.

1.1. Clasificación zoológica

Musca domestica pertenece a la clase Insecta, al orden Diptera y a la familia Muscidae. Se clasifican en el orden Diptera porque poseen dos alas.

1.2. Descripción de la mosca doméstica adulta

Las moscas domésticas pueden llegar a medir cerca de 4 a 7,5 mm de longitud. Poseen un cuerpo dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen (Figura 2).

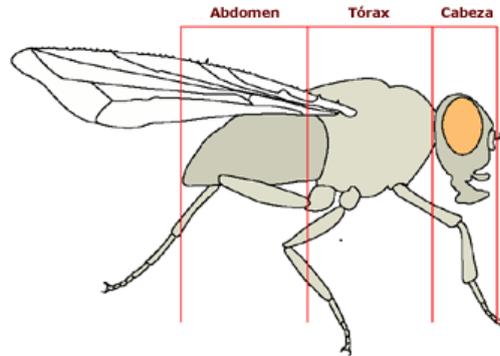


Figura 2. Partes de la mosca doméstica.

La cabeza de la mosca es fuertemente convexa en el frente, mientras que la cara posterior es casi plana y ligeramente cónica. El área frontal de la cabeza se denomina frons y ocupa la parte superior de la cara por debajo y entre las antenas. En la cabeza tiene una trompa, dos antenas, un par de ojos compuestos y tres ojos simples. La trompa o proboscis se compone de dos partes principales, una membranosa proximal y cónica, llamada rostrum, y una porción distal que tiene los lóbulos orales y que se ha denominado haustellum. La proboscis termina en un labio que tiene una esponja, llamada labelo, en sus piezas bucales, lo que les permite succionar alimentos líquidos o solubles en su saliva. Por lo tanto, no pueden morder animales ni seres humanos (Capinera, 2008; Hewitt, 2011). Las moscas poseen en la cabeza una bomba llamada bomba cibarial que les permite succionar líquidos llevándolos a través del prestomum al canal alimentario (Hewitt, 2011).

Poseen dos antenas, en la cabeza, por debajo del borde inferior de la frons, que son apéndices móviles multiarticulados. Están formadas por tres articulaciones denominados antenómeros o antenitas. Siendo las dos primeras únicas y uniarticuladas y la tercera comprende un número variable de antenómeros y se denominan respectivamente: escapo, pedicelo y flagelo o funículo. La función de las antenas es eminentemente sensorial, desempeñando varias funciones, donde la función táctil es la principal, gracias a los pelos táctiles que recubren casi todos los antenómeros; también desempeñan una función olfativa, proporcionada por áreas olfativas en forma de placas cribadas de poros microscópicos distribuidas sobre la superficie de algunos antenómeros terminales. También poseen una función auditiva

y a veces una función prensora durante la cópula, al sujetar a la hembra (Daly *et al.*, 1998; Gullan & Cranston, 2010).

En la cabeza tienen un par de ojos compuestos relativamente grandes, de color rojo, localizados dorso-lateralmente. La superficie de cada ojo compuesto está dividida en un cierto número de áreas circulares o hexagonales llamadas facetas u omatidios; cada faceta es una lente de una única unidad visual. En adición a los ojos compuestos, tres ojos simples u ocelos localizados en la parte superior de la cabeza, entre los ojos compuestos (Hewitt, 2011).

La hembra suele ser más grande que el macho y se distingue de él, por el espacio relativamente amplio entre los ojos, ya que en los machos, los ojos casi se tocan (Capinera, 2008; Hewitt, 2011).



Figura 3. Detalles de la cabeza de la mosca doméstica (Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series).

El tórax es gris, con cuatro bandas longitudinales oscuras de igual ancho en el dorso. Del tórax emergen las patas y las alas.

Las patas, compuestas por tres pares, son de color marrón negruzco. Cada una consta de coxa, trocánter, fémur, tibia, y tarso. Las coxas son los únicos segmentos que mostraron una considerable diferencia en los tres pares de patas.

Los tarsos constan de cinco articulaciones, al final de las mismas hay un par de garras o uñas, curvadas lateralmente, también llamadas ungues. En el ápice del segmento tarsal, en la base de cada garra, hay un par de membranas en forma almohadillas, llamada pulvilli. Estas almohadillas están cubiertas en su lado ventral con innumerables, pelos secretores mediante el cual la mosca es capaz de caminar en cualquier posición, en superficies muy pulidas (Hewitt, 2011).

Poseen dos alas transparentes, excepto sus venas o nervaduras que son oscuras, que le permiten volar y por detrás de estas se encuentran dos estructuras en forma de maza o pesa (llamadas halterios o balancines), que son órganos de equilibrio durante el vuelo. Las alas están cubiertas de pelos muy finos.

El abdomen presenta costados amarillentos en la mitad basal, la parte posterior es de color negro marronáceo y una línea longitudinal oscura se extiende a lo largo del límite medio del dorso y su cuerpo cubierto de pelos.

1.3. Hábitat

Cualquier sistema de producción agropecuario (haras, tambos, criaderos de cerdos, conejos, aves, etc.) o industrias derivadas de la actividad agropecuaria (frigoríficos, mataderos, plantas de silos, plantas de chacinados, lácteos, etc.) o los desechos domiciliarios (basurales municipales) son focos generadores de este insecto.

La tolerancia de las moscas depende en gran medida de las circunstancias. En ambientes sensibles, como aquellos en los que se elaboran alimentos y las instalaciones de envasado de los mismos, restaurantes, hospitales, un pequeño número de moscas no pueden ser toleradas. En el contexto de la ganadería o la producción de aves de corral, sin embargo, algunas moscas son inevitables. Se generan problemas graves, cuando se producen aves de corral, en zonas suburbanas de grandes ciudades, ya que los residentes, por lo general, no toleran la gran cantidad de moscas que emanan de esas instalaciones (Capinera, 2008).

No solo al ser humano le produce las molestias ya nombradas, sino que se han reportado casos en que la alta densidad de población de moscas domésticas en granjas avícolas provoca una reducción en la producción de huevos por parte de gallinas ponedoras (Malik *et al.*, 2007). De igual manera cuando estas poblaciones de moscas están fuera de control, provocan reducciones en la producción de leche al molestar a las vacas en los tambos. El costo anual invertido en los Estados Unidos en el control de la mosca doméstica en granjas de aves de corral, criaderos de cerdos, lecherías, etc. mediante insecticidas, ha sido estimado en 1,6 millones de dólares (Malik *et al.*, 2007).

1.4. Ciclo biológico de la mosca doméstica

Las moscas presentan una metamorfosis completa y su ciclo biológico presenta los siguientes estadios: huevo, larva o gusano, pupa y adulto. La larva muda dos veces, de modo que hay tres estadios larvarios y cada uno de ellos de mayor tamaño que el precedente (Figura 4).

En promedio el ciclo de vida alcanza unas 3 semanas, permitiendo la aparición de 10 a 12 generaciones por verano. Debido a su rápido desarrollo y al gran número de huevos producidos por las hembras, las poblaciones crecen rápidamente desde principios de la primavera hasta alcanzar su máximo a fines del verano.

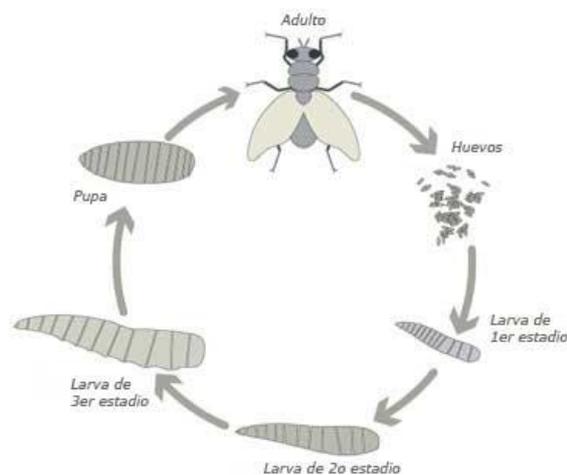


Figura 4. Ciclo biológico de la *Musca domestica*

Las pautas de desarrollo de cada estadio dependen de la temperatura, siendo 26° C la óptima. Por debajo de los 14° C, la ovoposición se detiene. Ellas prefieren la luz del sol, y son voladoras activas durante los días cálidos. Están inactivas por la noche, y por lo general puede ser vista posadas en los techos (Capinera, 2008).

1.5. Huevos

El huevo es de color blanco, elíptico, de aproximadamente 1 mm de longitud por 0,26 mm de anchura, con ambos extremos arredondados, y la parte anterior ligeramente ahusada.

Cada hembra es capaz de poner 5-8 mil huevos, que a 25° C aproximadamente, eclosionan en 24 horas y las larvas comienzan a devorar los restos orgánicos donde fueron depositados. El sustrato donde la hembra ha colocado los huevos, es por lo general estiércol acumulado en criaderos intensivos

de aves, cerdos, etc., desechos de basura, excrementos humanos y materia orgánica en descomposición, todos ricos en nutrientes para las larvas (figura 5).

1.6. Larvas

Dependiendo de la temperatura, aproximadamente entre 5 y 7 días, de haber sido puesto los huevos, aparecen las larvas. Las larvas son blancas, cilíndricas, con el extremo posterior ancho y aplastado, ahusándose hacia la parte anterior.

Carecen de ojos o apéndices aunque se observan algunas crestas espinosas ventrales que facilitan la locomoción. Las larvas presentan 13 segmentos, aunque los dos primeros aparecen parcialmente fusionados, de modo que sólo se ven 12. Las larvas pasan tres estadios, con modificaciones en su estructura y tamaño (figura 5).

1.7. Pupa

Dependiendo de la temperatura y la cantidad de alimento, las larvas del tercer estadio, pasan al estado de pupa. En el proceso de pupación tiene lugar una contracción general de la larva dentro de su propio tegumento, de modo que éste se convierte en un pupario cilíndrico de aproximadamente 6,3 mm de longitud. El color de la pupa pasa de color amarillento a color marrón rojizo y luego a color marrón oscuro o negro en el transcurso de la fase de pupa. Las pupas completan su desarrollo en 2-6 días a temperaturas superiores a 26° C, pero requieren de 17 a 27 días a unos 14° C (Hewitt, 2011) (figura 5).

1.8. Estado adulto

Al abrirse las pupas, de cada una nacerá una mosca ya de tamaño adulto. Ellas pueden aparearse y comenzar a poner huevos a los 3 a 4 días después de su emergencia. Los adultos pueden vivir hasta 2 meses, pero por lo general viven de 2-3 semanas. Sin alimentos, sobreviven sólo 2-3 días. La longevidad se ve reforzada por la disponibilidad de alimentos adecuados, especialmente el azúcar (Capinera, 2008).

Como hemos indicado, las tasas de desarrollo de cada estadio dependen de la temperatura. El número de moscas que prosperarán está determinado por factores abióticos (factores ambientales tales como la temperatura, la humedad del hábitat de cría, la humedad atmosférica) y factores bióticos (enemigos naturales incluyendo los parasitoides, predadores y patógenos).

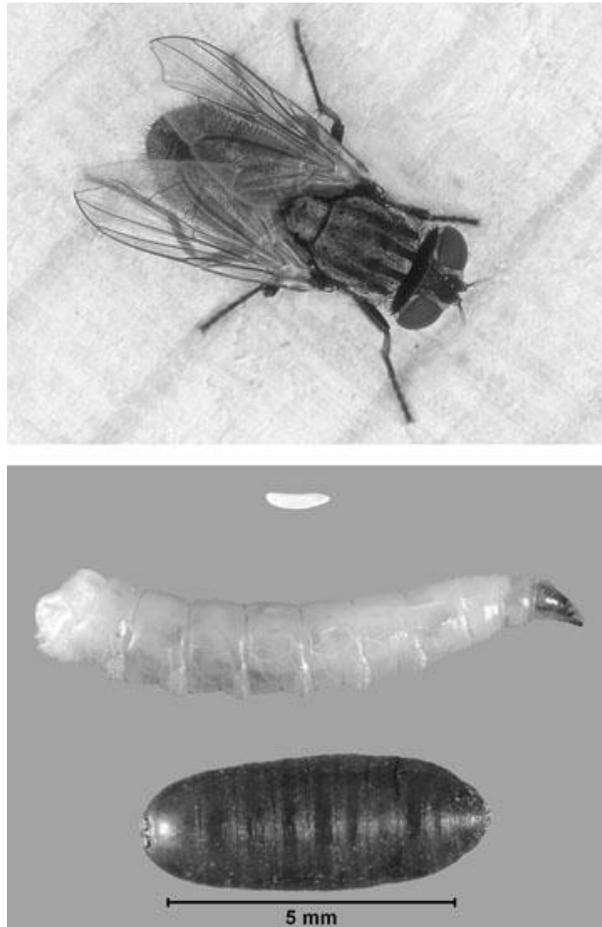


Figura 5. Relación de tamaños entre la *Musca domestica* adulta, su huevo, larva y pupa. (de arriba hacia abajo) (Capinera, 2008).

2. *Musca domestica* como transmisor de enfermedades

Está demostrado que las moscas adultas transmiten patógenos a través de su aparato bucal, de su cuerpo, sus patas y el tracto intestinal, (De Jesús *et al.*, 2004) de esta forma contaminan los alimentos y colaboran en la propagación de enfermedades. La transmisión se produce cuando la mosca se pone en contacto ya sea con el ser humano o con alimentos (Malik *et al.*, 2007) a través de su aparato bucal, de su cuerpo, pelos, de la parte pegajosa de las patas y por el tracto intestinal (De Jesús *et al.*, 2004).

Las moscas son transporte mecánico de más de 100 enfermedades intestinales en humanos y en animales (Forster *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2007). Han sido identificadas como vectores de parásitos protozoarios como *Sarcocystis* spp., *Toxoplasma gondii*, *Isospora* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica*, *Endolimax nana*, *Trichomonas* spp., *Hammondia* spp., y *Cryptosporidium parvum* (Graczyk *et al.*, 2001).

También han sido implicadas en la transmisión de las bacterias *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas* spp., *Chlamydia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp. y *Acinetobacter* spp. (Bidawid *et al.*, 1978; Khan & Huq, 1978; Fukushima *et al.*, 1979; Echeverría *et al.*, 1983; Olsen, 1998; Graczyk *et al.*, 2001) las cuales están relacionadas a la descomposición de los alimentos y su contaminación.

Las moscas también transmiten enfermedades oculares como el tracoma, inflamación de la conjuntiva e infecciones de la piel y enfermedades como la difteria cutánea, micosis, el pian (infección crónica que afecta principalmente a la piel, huesos y cartílagos) y la lepra. Por la ingestión de larvas con los alimentos, estas a veces sobreviven en el intestino del ser humano, causando una parasitosis conocida como miasis, con síntomas de dolor, náuseas y vómitos (Hill, 2002).

Se han informado casos de patógenos virales transmitidos por las moscas como son el virus de la poliomiелitis (*Enterovirus poliovirus*), el virus de Coxsackey, (que produce entre otras enfermedades miocarditis, pericarditis y conjuntivitis hemorrágica aguda) y el enterovirus (*Human enterovirus C*) (Manrique-Saide & Delfín-González, 1997; Graczyk *et al.*, 2001). Recientemente, bacterias como los *Enterococos* (resistentes a los antibióticos) y *Estafilococos* se han aislado de moscas recogidas en cercanías de instalaciones para cría de aves de corral (Graham *et al.*, 2009).

La mosca doméstica es considerada por la Food and Drug Administration (FDA) como un importante factor en la difusión de diversas enfermedades infecciosas transmitidas por los alimentos como el cólera, la shigelosis y la salmonelosis (Olsen & Hammack, 2000; Olsen *et al.*, 2001; De Jesús *et al.*, 2004).

De Jesús *et al.*, (2004) y otros autores citan un estudio realizado por Pepler en 1944, debido a un caso de contaminación, donde éste había observado, que individuos de *M. domestica* habían contaminado una cocina transportando *Salmonella enteritidis*, tomada de aguas residuales ubicado a casi 5 kilómetros de distancia.

3. Control de la *M. domestica*

Teóricamente, una población de moscas domésticas alcanzaría cifras astronómicas si el hombre no utilizara factores limitantes a su crecimiento. A título de ejemplo, se puede citar que partiendo de una hembra, en sólo nueve generaciones

(más o menos seis meses) y considerando que no haya mortalidad, sus descendientes dan lugar a la fantástica cifra de 324,000,000,000,000 (324 billones) de individuos (Hewitt, 2011).

En consecuencia, en los últimos años, se ha puesto énfasis a las medidas de control de este insecto. En los países en desarrollo este problema afecta a la mayoría de la población residente en los barrios pobres y en muchas zonas rurales durante el tiempo caluroso y seco.

Se conocen distintos métodos y para controlar la proliferación de moscas. Algunos se aplica desde hace muchos años, otros son más modernos.

Históricamente, las primeras observaciones o registros sobre las poblaciones de moscas domésticas, fueron hechas durante la Primera y Segunda Guerras Mundiales ya que por primera vez se relacionó la abundancia de moscas con la prevalencia de enfermedades diarreicas (Manrique-Saide & Delfín-González, 1997). Las operaciones militares en áreas tropicales y subtropicales revivieron consideraciones acerca de las moscas como vectores de enfermedades. Con la disponibilidad del DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) durante la Segunda Guerra Mundial, se relacionó por primera vez la regulación de epidemias con el control de moscas. La disentería fue reconocida como una enfermedad de transmisión mecánica de microorganismos por parte de las moscas (Manrique-Saide & Delfín-González, 1997). El DDT fue prohibido por su toxicidad en humanos y animales en los Estados Unidos de Norteamérica en el año 1972.

Un efectivo control de la mosca doméstica en ambientes rurales y urbanos debiera tener como principal objetivo, reducir la población de larvas e individuos adultos mediante la sanidad ambiental. Lograr una buena higiene doméstica, además de acciones en este sentido, depende de una muy buena campaña de educación y además demanda una inversión e infraestructura, tales como manejo, almacenaje, recolección y sistemas de tratamiento de residuos sólidos y líquidos. En muchas ocasiones esto es difícil de instrumentar, generándose así ámbitos propicios para el desarrollo de éste insecto (Manrique-Saide & Delfín-González, 1997).

3.1. Métodos de control de la población de *Musca domestica*

3.1.1. Métodos mecánicos

Existen métodos mecánicos para controlar la población de moscas. Estos consisten en metodologías tendientes a impedir que las moscas ingresen a un

determinado recinto o bien una vez que hayan ingresado, queden atrapadas o se eliminen por algún dispositivo adecuado. Dentro de esta técnica se encuentran la utilización de mallas mosquiteras, cortinas, etc. También existen trampas viscosas y trampas de luz ultravioleta ubicadas alrededor de viviendas y negocios que reducen las poblaciones de moscas domésticas. Se cuelgan tiras de resina (papel atrapamoscas) en áreas infectadas en las que no existe o hay poca corriente de aire. Estos métodos se utilizan para matar, repeler o atrapar en vuelo a las moscas.

Si bien no dañan el entorno, las tiras de resina, no son muy eficaces en la lucha contra una alta densidad de moscas. Otros dispositivos como las redes de electrocución presentan el inconveniente de que al utilizarlas, aumentan las partículas en el aire y con ello, la liberación de los agentes de las enfermedades infecciosas (Manrique-Saide & Delfín-González, 1997; Malik *et al.*, 2007).

3.1.2. Métodos químicos

Los insecticidas utilizados para el control de las poblaciones de moscas domésticas, pueden ser de origen natural o sintético.

3.1.2.1. Insecticidas de origen sintético

Los insecticidas de origen sintético son los más utilizados en la actualidad, los mismos pertenecen a distintos grupos químicos como se muestra en la tabla 1.

Los insecticidas piretroides sintéticos son análogos de una sustancia química natural, la piretrina, aislada del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Los piretroides, son más lipofílicos y foto estables que el compuesto natural, creando así un eficaz plaguicida.

Tabla 1. Insecticidas contra *Musca domestica*, autorizados por SENASA (2011) y Organización Mundial de la Salud (2009)

Grupo	Nombre	DL ₅₀ (mg/Kg) ^a Oral en rata	Autorizado por SENASA ^b	Autorizado por OMS ^a
Piretroides:	aletrina	685	No	Si, clase II
	cipermetrina	250	Si	Si, clase II
	deltametrina	135	Si	Si, clase II
	permetrina	500	Si	Si, clase II

	cifenotrina	318	No	Si, clase II
	tetrametrina	5000	No	Si, clase III
Organofosforados:	clorpirifos	135	Si	Si, clase II
	diclorvos (DDVP)	56	No	Si, clase 1b
	dimetoato	150	Si	Si, clase II
	azametifos	1010	No	Si, clase II
	fenitrothion	503	Si	Si, clase II
Nicotinoides:	imidacloprid	450	Si	Si, clase II
Otros:	tiametoxam	>310 ^c	Si	No
	ciromazin	3300	No	Si, clase III

^a: (Organización Mundial de la Salud, 2009)

^b: (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2011)

^c: (Syngenta, 2009)

En todo el mundo, está aprobado el uso de piretroides como insecticidas contra moscas (Go *et al.*, 1999; Fortin *et al.*, 2008), entre otros insectos.

Los insecticidas tetrametrina, deltametrina, aletrina y permetrina (marcas Fuyi, Selton y Raid, entre otras) están entre los más utilizados en nuestro país, a nivel domiciliario. También se utiliza la cipermetrina para combatir moscas y otros insectos en establos, criaderos de cerdos, criaderos de pollos, tambos, aplicándolos además sobre los animales. El imidacloprid además de su aplicación contra insectos de jardín en cultivos familiares y comerciales, se aplica para combatir las moscas domesticas aplicándolo en forma granulada (mezclada con azúcar como atrayente) como cebo de dispersión o bien pulverizándolos como una pintura en spray para cubrir paredes y puertas de instalaciones ganaderas, entre otras. (Pospischil *et al.*, 2005)

Mientras que, como antiparasitario externo en animales, se recurre a la deltametrina, con lo cual las moscas no depositan sus huevos ni producen molestias al ganado en el establo.

Muchos insecticidas, como los organoclorados y organofosforados y más recientemente, los piretroides y el spinosad, se han utilizado para el control de *M. domestica*. Sin embargo, las moscas han desarrollado resistencia a estos plaguicidas (Scott *et al.*, 2000; Shono & Scott, 2003). Estos insecticidas químicos también producen la mortalidad no deseada de otros organismos, pueden afectar negativamente la fertilidad del suelo, persisten en el medio ambiente y se propagan en la cadena alimentaria de los seres humanos (Malik *et al.*, 2007). Por lo tanto, el uso de insecticidas químicos no es respetuoso del medio ambiente ni del equilibrio ecológico (Ishaaya *et al.*, 2007).

4. Resistencia a los insecticidas

Los insectos sometidos a reiteradas aplicaciones de insecticidas, desarrollan resistencia a estos compuestos. Se define como resistencia a insecticidas a una habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o de un conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida, por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia, sobrevivir a la exposición, que para otros individuos de la especie sería letal (Silva Aguayo & Rodríguez M., 2004).

A medida que un producto va perdiendo eficacia, por la aparición de resistencia, es necesario aumentar la cantidad que se aplica. Esto, a su vez, hace que se desarrollen más rápidamente mecanismos de resistencia, lo cual produce una progresiva pérdida de eficacia de las sustancias activas aplicadas.

Los resultados de un estudio realizado por Acevedo *et al.* (2009), indican que algunas poblaciones de mosca doméstica en Argentina, son altamente resistentes al larvicida ciromazina y a los insecticidas DDVP y permetrina. En dicho trabajo, han encontrado valores de relación de resistencia de 62,5 para la ciromazina y el DDVP y de 94,4 para la permetrina, comparadas con lotes testigo de moscas que nunca habían sido expuestas a insecticidas. En este estudio se encontró un patrón de resistencia múltiple, en individuos colectados en granjas avícolas de Buenos Aires, lo que sugiere un uso intensivo y continuo en contra de poblaciones de mosca doméstica. Este es el primer informe de que la mosca doméstica de Argentina es resistente a varios insecticidas simultáneamente.

Para más detalles de los mecanismos de de resistencia, ver anexo 1.

4.1. Intoxicación por insecticidas

Si bien los insecticidas sintéticos logran buenos resultados, el uso de estos no son totalmente satisfactorios, en particular por poner en riesgos la salud humana, por interferir con la supervivencia de especies benéficas (Zhu *et al.*, 2003), y por la toxicidad que presentan. Las consecuencias sobre la salud de seres humanos, incluye efectos supresores del sistema inmune, alteraciones endocrinas, nódulos linfáticos, daño esplénico, carcinogénesis y ginecomastia (Shan *et al.*, 2004). Además, varios de los compuestos piretroides, a altas concentraciones, parecen inhibir la unión de la testosterona a los receptores de andrógenos y a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), pudiendo causar trastornos a éste nivel (Go *et al.*, 1999). También se ha indicado que algunos compuestos piretroides son capaces de alterar otras funciones endocrinas (Go *et al.*, 1999).

Los piretroides son ampliamente utilizados, son frecuentes en el medio ambiente, y que puede alterar la homeostasis del estrógeno. Por lo tanto, sus efectos sobre el sistema endocrino de los seres humanos y la vida silvestre es motivo de preocupación. Estos piretroides tienen componentes estructurales similares a los metabolitos del estrógeno y polifenoles que pueden explicar su respuesta estrogénica. Los estudios de Go *et al.*, 1999, sugieren que los piretroides deben ser considerado como disruptores hormonales y su potencial de afectar a la función endocrina en seres humanos y animales deben ser investigadas.

Varios estudios sobre los efectos de piretroides sobre la regulación de la hormona tiroidea y la función de los andrógenos han sido reportados. Kaul *et al.*, 1996, mostraron mediante el uso de modelos en rata, que el fenvalerato aumenta la triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) circulante, induciendo a la disfunción tiroidea (Kaul *et al.*, 1996). La elevación de los niveles de las hormonas tiroideas, así como las reservas de calcio podrían ser juntos responsable de deterioro de la actividad motora mediante la alteración de varios procesos neuronales (Kaul *et al.*, 1996).

El uso de piretroides para el control de plagas agrícolas, pareciera una práctica menos riesgosa, debido a las DL₅₀ relativamente altas que presentan estos compuestos, pero debido a las extensas áreas de aplicación, que implica utilizar grandes volúmenes, trae graves consecuencias como contaminación de fuentes de agua potable y alimentos de origen vegetal, que luego son incorporados por la población, a través del consumo, provocando intoxicaciones crónicas (Fortin *et al.*, 2008).

El uso de éstos plaguicidas en el interior de las viviendas trae el riesgo de pulverizar en zonas donde hay alimentos para uso humano y la exposición indirecta a través de ingestión, inhalación y absorción cutánea, especialmente para niños de escasa edad, donde puede agudizarse el problema.

Por ejemplo, se usa habitualmente en nuestro medio, el aerosol Raid "Casa y Jardín" que contiene fenotrina ($DL_{50} = 5000$ mg/Kg) y praletrina ($DL_{50} = 460$ mg/Kg) ambos del grupo de los piretroides. Así como el Raid "exterminador" o "doble acción" que contiene tetrametrina ($DL_{50} = 5000$ mg/Kg) y cipermetrina ($DL_{50} = 250$ mg/Kg). También se obtiene en el mercado, productos en polvo en base a deltametrina (nombre comercial: K-O-trina) ($DL_{50} = 324$ mg/Kg en ratas) (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Se ha demostrado la presencia de piretroides en alimentos de origen vegetal que han sido tratados durante su cultivo con estos insecticidas (Jaggi *et al.*, 2001). Todo esto nos recuerda que para proteger la salud de los consumidores, es necesaria la evaluación periódica de los residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal, o bien el uso de sustancias menos riesgosas para la salud humana.

En un estudio realizado por Kolaczinski & Curtis, en 2004, éstos autores revelan un reciente debate en Alemania, sobre posibles efectos crónicos por la exposición a bajos niveles de residuos de piretroides (deltametrina, cipermetrina y fenvalerato), particularmente en el hogar. Según indican éstos autores, en Alemania, como en otros lugares del mundo, el uso de insecticidas piretroides por parte de la población es práctica común. Otros trabajos, sobre el mismo tema, indican, que el uso generalizado de piretroides daría lugar a trastornos del sistema nervioso, debido a la acumulación de pequeñas dosis en el cuerpo.

Y continúan asegurando Kolaczinski & Curtis, que actualmente es una práctica común en Alemania, vender productos insecticidas que contienen piretroides, etiquetados como "productos biológicos completamente inofensivos que se asemejan a compuestos naturales" y se cree que este mensaje incrementa el riesgo de exposición por parte de los consumidores, ya que conducen a aplicar insecticida a su propia discreción y no de acuerdo a las instrucciones del producto, por lo tanto, los autores sugieren que se debieran realizar cambios en estos productos hasta que todos los efectos secundarios adversos se puedan descartar.

Los piretroides de tipo II, (cipermetrina, deltametrina) con un grupo ciano en el carbono alfa producen despolarización y bloqueo de la membrana nerviosa que

conduce a la parálisis e inhiben la acción del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en su receptor. Estos piretroides son más peligrosos; en humanos, han producido parestesias, náuseas, vómitos, fasciculaciones, convulsiones, coma y edema de pulmón. Su toxicidad aguda se potencia si se asocia a insecticidas organofosforados que bloquean su hidrólisis. La DL₅₀ de deltametrina en ingesta oral en ratones Albino Swiss es de 130 mg/Kg. Se ha informado que dosis orales de 10 mg/kg de deltametrina en seres humanos adultos y de 2 mg/kg en niños, han causado convulsiones (O'Malley, 1997).

Deltametrina es uno de los componentes más frecuentes en las formulaciones más empleadas en todo el mundo y se ha convertido en un compuesto muy aplicado por las compañías de desinsectación y por los agricultores. Su impacto ambiental es notable, al igual que todos los piretroides, la deltametrina es escasamente selectiva, por ello es particularmente nocivo para toda la entomofauna benéfica en los cultivos. Su uso debe ser, por tanto, limitado y circunscrito de modo que su efecto nocivo sobre los insectos benéficos sea bajo o nulo. Si bien persiste poco en el ambiente, es altamente tóxico para los peces (DL₅₀ de 0,001 mg/L), organismos acuáticos y abejas (Organización Mundial de la Salud, 1998).

El diclorvos (DDVP), es un organofosforado, utilizado como insecticida acaricida, adulticida y larvicida de contacto y oral. Se lo aplica en el ganado y animales domésticos contra moscas, ácaros, piojos, mosquitos, pulgas y otros insectos. Este producto es inhibidor de la colinesterasa; por lo tanto actúa también sobre el sistema nervioso de los seres humanos, pudiendo provocar problemas en él y déficit en la función cognitiva, además de otra sintomatología comprobada (García del Pino *et al.*, 2009; Binikumar & Gill, 2010)

Por disposición N° 2659/2008 la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) prohibió el uso del principio activo diclorvos en formulaciones de productos en aerosol y la venta libre de formulaciones de productos desinfectantes domisanitarios (formulaciones destinadas a la higiene ambiental y a la salud pública) que contengan DDVP como principio activo (ANMAT, 2008).

El clorpirifós es un insecticida, órganofosforado, que se ha usado ampliamente en viviendas, en agricultura, para el ganado y animales de corral. En el hogar, se usa para controlar moscas, cucarachas, pulgas, y termitas; también se usa en ciertos collares de animales domésticos para controlar pulgas y garrapatas. En agricultura, se usa para controlar garrapatas en ganado y en forma de rocío para el control de

plagas de cosechas (Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 1997). Actúa eficazmente sobre cucarachas resistentes a piretroides y otros invertebrados de difícil control como arañas y escorpiones. También controla insectos voladores como mosquitos, moscas, tábanos, avispas, polillas, insectos rastreros, como cucarachas, termitas, chinches, hormigas, pulgas, piojos, garrapatas, gusanos de suelo, plagas de jardín, insectos de la madera.

El clorpirifós, otro organofosforado, puede producir neuropatía retardada por inhibición de la colinesterasa, provocando neuropatías en el sistema nervioso, como consecuencia de exposiciones agudas o crónicas (ANMAT, 2008).

Por disposición del ANMAT N° 2659/2008, se prohíbe el uso del principio activo clorpirifós en formulaciones de productos desinfectantes domisanitarios (ANMAT, 2008).

La U.S. Environmental Protection Agency (EPA) ha demostrado que la exposición a bajas concentraciones de clorpirifós puede interferir en el desarrollo del sistema nervioso de los mamíferos y que existe relación entre la exposición al clorpirifós y el bajo peso y tamaño reducido de la cabeza, en los recién nacidos. Por lo que, ese organismo del gobierno de los EEUU, prohibió el uso del clorpirifós en los productos de uso doméstico debido al alto riesgo que representa para la salud de los niños (EPA, 2006).

4.2. Biodegradabilidad de los insecticidas

Los insecticidas sintéticos persisten en el medio ambiente debido a su baja degradabilidad. Los compuestos organoclorados son los que exhiben una mayor persistencia la cual puede llegar a ser de varios años. Los siguen los carbamatos, los piretroides y los más rápidos en degradar son los organofosforados. Por ejemplo, el clorpirifós posee una vida media en el suelo de 80 - 270 días. La degradación se produce principalmente por hidrólisis y fotólisis. En el agua su vida media es de 23-63 días dependiendo del pH de la misma (Organización Mundial de la Salud, 2009).

5. Nuevas alternativas para el control de insectos

Debido a los problemas expuestos, los investigadores continúan la búsqueda de nuevos métodos para el control de la mosca. En consecuencia, se estudian distintas alternativas entre ellas los insecticidas botánicos, los cuales se basan en compuestos naturales sintetizados por las plantas. Mediante el uso de insecticidas

naturales se dispondría de insecticidas selectivos, eficaces y amigables con el medio ambiente. Varios informes han demostrado la eficacia de los compuestos naturales sobre los insectos, permitiendo el control de plagas, utilizando distintas sustancias, incluidos los aceites esenciales (Regnault-Roger, 1997; Isman, 2000; Isman & Machial, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).

Se ha estudiado la acción de AEs sobre muchos insectos, como los mosquitos *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) y *Aedes aegypti* (L.) (Pathak *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2002; Gillij *et al.*, 2008; Pavela *et al.*, 2009), la isoca *Spodoptera litura* (Hummelbrunner & Isman, 2001), la cucaracha *Blattella germanica* (Jang *et al.*, 2005), las termitas *Reticulitermes speratus* (Seo *et al.*, 2009) y *Coptotermes formosanus* (Zhu *et al.*, 2003), y los piojos *Pediculus humanus capitis* (Tolozza *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2009), etc.

La larga historia de uso de los AEs, ha facilitado los mecanismos de aprobación de productos en países como EE.UU., lo cual ha contribuido a que sean considerados como una importante alternativa a los plaguicidas sintéticos (Isman & Machial, 2006). Por otra parte, los AEs son fácilmente biodegradables en el medio ambiente (Misra & Pavlostathis, 1997) y poseen poco o nada de toxicidad contra peces, aves y mamíferos (Stroh *et al.*, 1998). Estas propiedades benignas de los AEs permiten su uso incluso en áreas sensibles, tales como escuelas, restaurantes, hospitales y hogares (Batish *et al.*, 2008).

En este sentido, los AEs son posibles alternativas de un insecticida más compatible con el cuidado del medio ambiente y la salud humana (Regnault-Roger, 1997; Isman & Machial, 2006).

6. Los aceites esenciales

Los AEs son líquidos de consistencia oleosa, lípidos y generalmente incoloros, solubles en lípidos y en disolventes orgánicos preferentemente apolares, con una densidad menor a la del agua, en la mayoría de los casos. Fueron obtenidos por primera vez en la edad media por los Árabes (Bakkali *et al.*, 2008).

Los AEs son compuestos complejos, volátiles, caracterizados por un fuerte aroma y formados por metabolitos secundarios aromáticos. Estos metabolitos son en su gran mayoría monoterpenos (Ts) y sesquiterpenos. Existen varios métodos para la extracción de aceites esenciales. Estos pueden incluir el uso de dióxido de carbono líquido o microondas, pero principalmente

se emplea el vapor de agua para realizar el “arrastre” de éstos compuestos volátiles (Bakkali *et al.*, 2008).

6.1. Fuentes de los AEs

La producción de AEs no está restringida a ningún grupo específico taxonómico y se encuentra muy extendido en todo el reino vegetal. Incluso en las angiospermas, los aceites esenciales están distribuidos casi por igual entre las dicotiledóneas y monocotiledóneas que crecen en zonas de temperatura templada así como en el hábitat tropical, abarcando un gran número de plantas que van desde la familia de las gramíneas (Poaceae) o pastos aromáticos a la familia de las rosas o Rosáceas (Rosaceae) (Sangwan *et al.*, 2001).

Ellos pueden ser sintetizados por todos los órganos de las plantas, estando presente en las yemas, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza.

La acumulación de monoterpenos se asocia a menudo con complejas estructuras secretoras como son los tricomas glandulares, cavidades secretoras o conductos de resina (Gershezon *et al.*, 2000).

6.2. Componentes de los AEs

Los AEs están compuestos por una cantidad variable de Ts, según su origen.

En un mismo AE, tan solo dos o tres Ts, están presentes en cantidades importantes, mayores al 70%. Mientras que el resto, que son a veces más de cincuenta y que pueden llegar hasta cien Ts, se encuentran en pequeñas proporciones, menores al 20% del total del AE.

Excepcionalmente pueden acompañar a los Ts compuestos que contienen nitrógeno o azufre, cumarinas y homólogos de fenilpropanoides (Dorman & Deans, 2000), y éstos componentes menores pueden jugar un papel importante en la fragancia y la actividad biológica del aceite (Ishaaya *et al.*, 2007).

Los Ts son una familia de diversos compuestos que tienen esqueletos formados por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno).

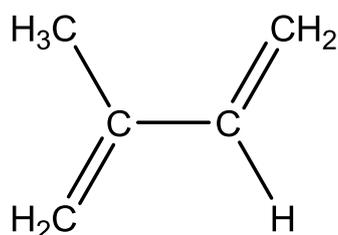


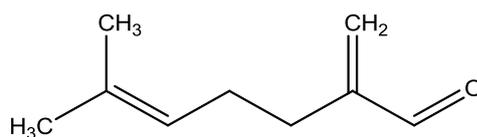
Figura 6. Estructura molecular del isopreno

Los Ts se clasifican por el número de átomos de carbono, si el terpeno posee 5 átomos de carbono (una unidad de isopreno), se lo llama hemiterpeno, con 10 átomos de carbono (dos unidades isopreno) monoterpeno, con 20 átomos de carbono (cuatro unidades isopreno) se lo llama diterpeno y así sucesivamente. A los Ts con 15 átomos de carbono (tres unidades de isopreno), se los denomina sesquiterpenos. Existen también terpenos de 30 y 40 átomos de carbono (triterpenos y tetraterpenos) y otros aún mayores (Regnault-Roger, 1997; Wade, 2004).

Los terpenos pueden clasificarse también según sus grupos funcionales como hidrocarburos alifáticos (lineales, ramificados, saturados e insaturados) ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres acíclicos o lactonas.

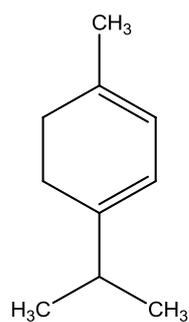
Figura 7. Ejemplos de monoterpenos

Hidrocarburos acíclicos

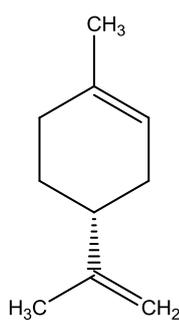


mirceno

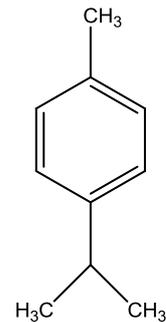
Hidrocarburos monocíclicos



α -terpineno

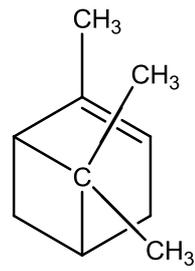


limoneno

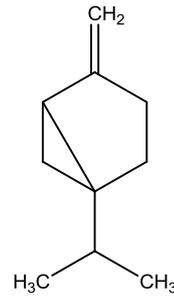


cimeno

Hidrocarburos bicíclicos

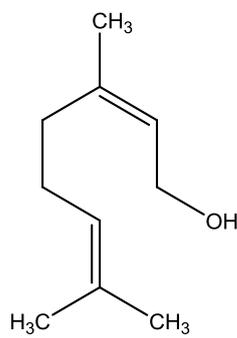


α -pineno

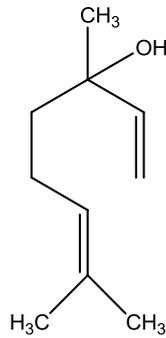


sabineno

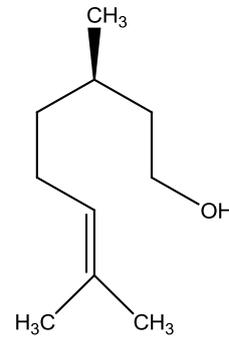
Alcoholes acíclicos



geraniol

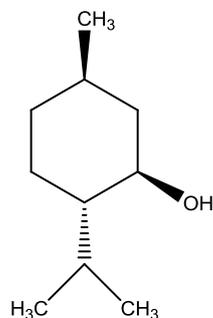


linalol

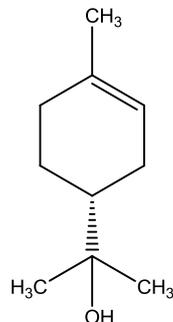


citronelol

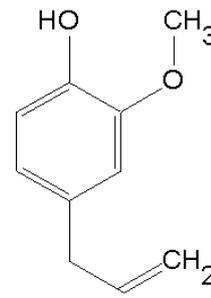
Alcoholes monocíclicos



mentol

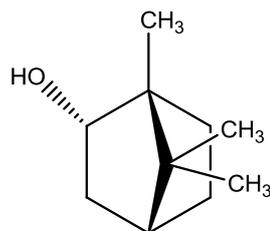


α -terpineol



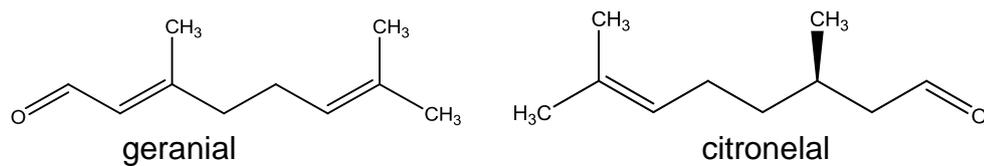
eugenol

Alcoholes bicíclicos

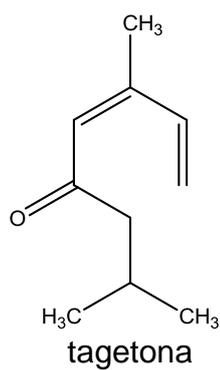


borneol

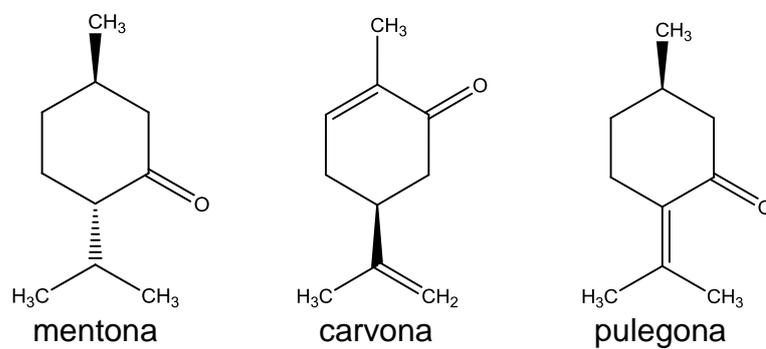
Aldehídos acíclicos



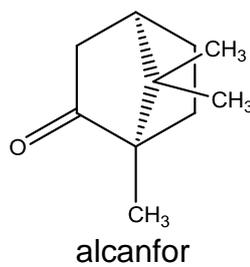
Cetonas acíclicas



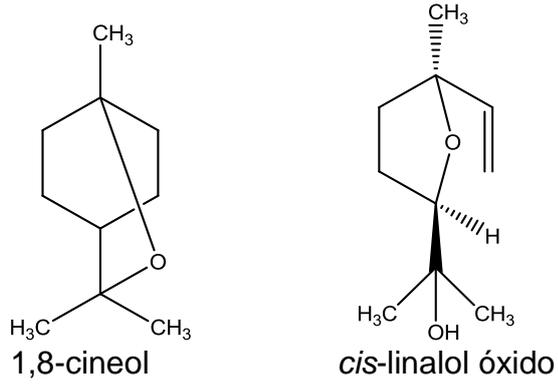
Cetonas monocíclicas



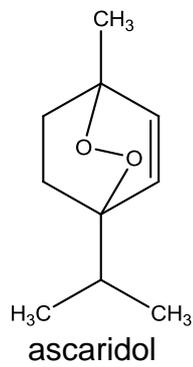
Cetonas bicíclicas



Éteres



Peróxidos



Fenoles

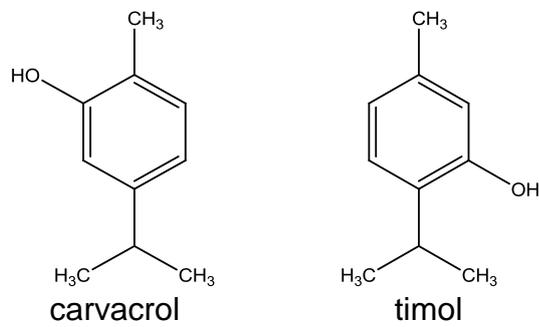
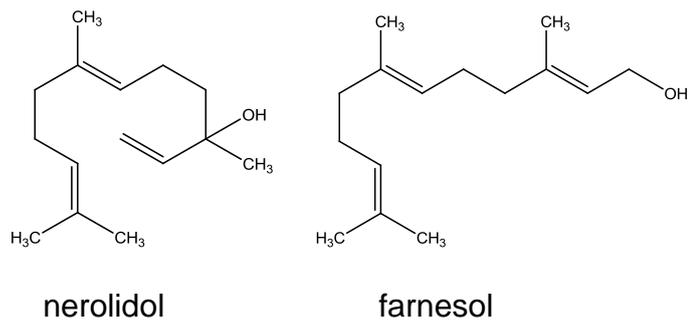
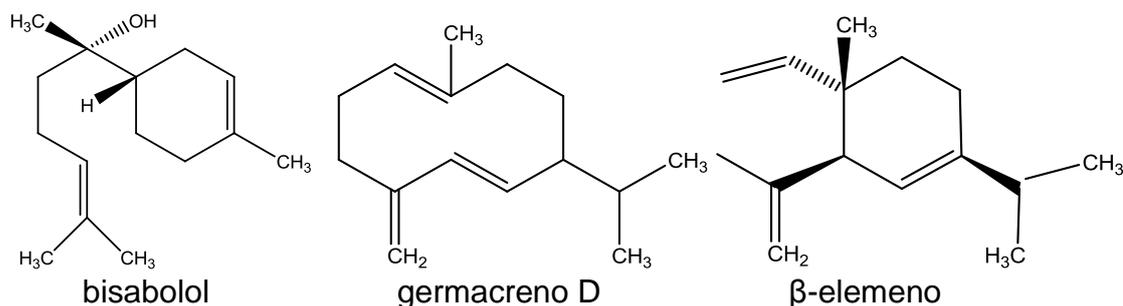


Figura 8. Ejemplos de sesquiterpenos

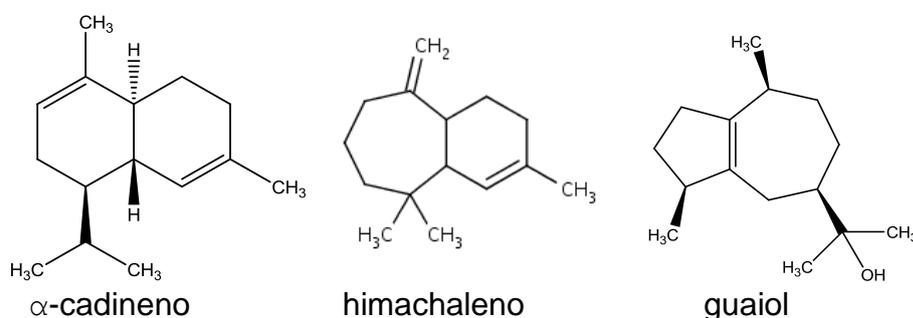
Sesquiterpenos acíclicos



Sesquiterpenos monocíclicos



Sesquiterpenos bicíclicos



6.3. Usos de los AEs

Las plantas aromáticas y sus AEs se han utilizado ampliamente para muchas actividades y aplicaciones de uso humano, tales como sabores y fragancias, condimentos o especias, medicamentos (Bakkali *et al.*, 2008), como agentes antimicrobianos (Dorman & Deans, 2000) y para repeler insectos o proteger los productos almacenados (Lee *et al.*, 1997; Isman & Machial, 2006).

Es un hecho que el consumo de orégano y sus aceites esenciales en los alimentos (en pizzas, salsas, ensaladas, etc.) es continuamente creciente (Karpouthis *et al.*, 1998), también que el aceite de menta es usado para saborizar a una amplia gama de productos de panadería, de confitería, dulces, licores como así también para enmascarar sabores en la industria farmacéutica. El aceite de las hojas de eucalyptus ha sido ampliamente utilizado como aceites de perfumería, elaboración de caramelos, aditivos industriales, medicamentos en forma de inhaladores, jabones y repelentes de insectos. Se considera el uso de estos AEs en el área de los alimentos y cosméticos como seguro (Yang *et al.*, 2009). Tal es así, que varios terpenos, como el anetol, *d*- o *l*-carvona, citral, eugenol, geraniol, acetato

de geranilo, limoneno, linalol, acetato de linalol, y piperonal, son considerados por FDA en su lista de aditivos alimentarios como sustancias GRAS, es decir reconocido como sustancia generalmente segura (Food and Drug Administration, 2009).

6.3.1. Acción de AEs contra distintos insectos

En la década de 1990, renació el interés en los AEs y sus constituyentes los Ts, debido a que se demostró su actividad insecticida.

Se ha documentado efectos tóxicos agudos de varios aceites esenciales contra insectos. Entre ellos se indicó la toxicidad de una serie de Ts contra el gusano de la raíz del maíz, *Diabrotica virgifera virgifera*, del ácaro conocido como “araña roja” *Tetranychus urticae* y la mosca doméstica común, *Musca domestica* (Lee et al., 1997).

Gillij et al., (2008), han evaluado la repelencia de AEs de plantas aromáticas que crecen en Argentina, contra *Aedes aegypti* encontrando que la mayoría de esos AEs eran efectivos. En ese estudio se vio que los AEs de *Baccharis spartioides*, que contiene alcanfor (50%), *Rosmarinus officinalis*, que contiene alcanfor (34%) y *Aloysia citriodora*, con un contenido de limoneno (20%), fueron los más prometedores como repelentes. Estos resultados sugieren que los Ts alcanfor y limoneno, que son los componentes principales de esos AEs, son los responsables del efecto repelente. También es de rescatar la eficacia del AE de *Minthostachys verticillata* (ex *mollis*) que contiene pulegona (51,2%), mentona (30,7%) y limoneno (10,1%), con resultados que indican repelencia contra el *Aedes aegypti* incluso en las concentraciones más bajas probadas.

Yang et al., (2009) publicaron un bioensayo de contacto con *Pediculus humanus capitis*, demostrando que la actividad pediculicida fue más acentuada con aceite esencial de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) que utilizando piretro o fenotrina (piretroide sintético) y el 1,8-cineol, componente principal de dicho AE, fue 2,2 y 2,3 veces más tóxico a piojos que fenotrina y piretro, respectivamente.

Investigaciones realizadas en la mosca blanca de la fruta (*Bemisia argentifolii*) con AE extraído del *Vanillosmopsis pohlii*, árbol del noreste de Brasil, concluyeron que posee marcados efectos insecticidas debido a su contenido en α -bisabolol (de Andrade et al., 2004).

Los datos actuales sobre la actividad tópica y fumigante de AEs contra *M. domestica* son escasos (Malik et al., 2007). Los AEs de *Matricaria chamomilla* y

Clerodendron inerme tienen un DL_{50} de 76 y 84 $\mu\text{g}/\text{mosca}$, respectivamente (Shoukry, 1997).

Los AEs de la cáscara de *Citrus sinensis* y de *C. aurantifolia*, mostraron un 70% de eficacia para matar moscas de una habitación, después de 60 minutos de realizada la pulverización (Ezeonu *et al.*, 2001). Se han investigado las propiedades insecticidas de aceites de cítricos como cáscara de limón, pomelo y naranja contra adultos y larvas de *M. domestica* (Shalaby *et al.*, 1998) comprobando que el aceite de cáscara de pomelo fue tóxico para los adultos de *M. domestica*, mientras que el aceite de limón fue tóxico para las larvas. El AE de *Piper betle* mostró una DL_{50} fumigante de $10,3 \text{ mg}/\text{dm}^3$ en un período de 24 h de exposición (Mohottalage *et al.*, 2007). Más recientemente, 34 AEs se ensayaron contra la mosca doméstica y el AE de *Pogostemon cablin* (nombre vulgar: patchuli) fue el insecticida tópico más potente, con una DL_{50} de $3 \mu\text{g}/\text{mosca}$ y el aceite de *Mentha pulegium*, el fumigante (24 hrs.) más potente (DL_{50} de $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) (Pavela, 2008).

6.3.2. Acción de Ts contra distintos insectos

Yang *et al.* (2009) concluyó que los terpenos 1,8-cineol, (-)- α -pineno, (*E*)-pinocarveol, y 1- α -terpineol fueron efectivos contra las hembras de *Pediculus humanus capitis*. Estos resultados indican que la modalidad de acción de estos monoterpenos sea probablemente por la acción del vapor a través del sistema respiratorio.

La toxicidad de los Ts contra *M. domestica*, ha sido un poco más estudiada (Coats *et al.*, 1991) que la toxicidad de los AEs, lográndose demostrar su actividad insecticida a través de la aplicación tópica. Entre 33 Ts probados por vía tópica en *M. domestica*, timol y pulegona resultaron ser los más activos con DL_{50} de 29 y 39 $\mu\text{g}/\text{mosca}$, respectivamente (Lee *et al.*, 1997).

Sin embargo, *d*-limoneno fue más activo que pulegona ($DL_{50} = 90$ y $166 \mu\text{g}/\text{mosca}$, respectivamente) cuando se aplicó tópicamente en moscas hembras (Coats *et al.*, 1991). En un estudio en el que se ensayaron ésteres derivados de terpenos, éstos fueron generalmente menos activos que los terpenos que los originaron, frente a *M. domestica* (Rice & Coats, 1994).

Está demostrada la toxicidad de contacto del eugenol para la cucaracha americana, (*Periplaneta americana*) (Hummelbrunner & Isman, 2001; Jang *et al.*, 2005) y del carvacrol para la cucaracha alemana (*Blattella germanica*) (Hummelbrunner & Isman, 2001) y muchos otros insectos. También se ha indicado

que el anetol es muy tóxico en contra de una variada cantidad de especies, incluyendo escarabajos, gorgojos, mosquitos y polillas (Hummelbrunner & Isman, 2001).

6.4. Sinergismo de los AEs

Se conoce como sinergismo a la acción combinada de varias sustancias químicas, las cuales producen un efecto total más grande que el efecto de cada sustancia química separadamente.

Aunque a la actividad repelente de AEs se debería generalmente a la acción de algunos Ts en particular, un fenómeno sinérgico entre estos metabolitos pueden dar lugar a una actividad biológica mayor en comparación a los componentes aislados (Hummelbrunner & Isman, 2001; Omolo *et al.*, 2004; Gillij *et al.*, 2008). A menudo se observa que los aceites esenciales son considerablemente más eficaces que los compuestos puros derivados de ellos. Los ejemplos incluyen aceite de anís (del que se deriva el *trans*-anetol), aceite de romero y varios aceites cítricos (Hummelbrunner & Isman, 2001).

Hummelbrunner & Isman (2001), también encontraron una sinergia importante en términos de disuasión de alimentación, en algunas de las mezclas binarias como *trans*-anetol más timol, timol más citronellal y α -terpineol más citronellal, que fueron mejores disuasorios para *Spodoptera litura* que los compuestos puros.

Esto indica que los componentes de menor importancia también contribuyen a la actividad repelente y refleja la importancia de la composición de la mezcla de terpenos. Se ha sugerido que esto se debe al hecho de que las plantas generalmente presentan defensas como un conjunto de compuestos, no como unidades individuales (Nerio *et al.*, 2010). En consecuencia, los constituyentes menores que se encuentran en un bajo porcentaje pueden actuar como sinergistas, para mejorar la eficacia de los principales componentes a través de una variedad de mecanismos (Nerio *et al.*, 2010).

La investigación de nuevos plaguicidas busca descubrir productos potentes y con acción rápida, viéndose estas cualidades reflejadas en sus valores de DL₅₀, criterio usual para evaluar la toxicidad de un producto. Está confirmado que en la naturaleza, las sustancias que utilizan las plantas para su defensa, suelen estar presentes sólo en concentraciones subletales (Hummelbrunner & Isman, 2001). En consecuencia, los componentes menores pueden actuar como sinergistas, es

decir, pueden aumentar la eficacia de los componentes principales a través de una variedad de mecanismos (Berenbaum & Neal, 1985).

El estudio de los efectos sinérgicos entre los componentes de los AEs, así como la búsqueda de nuevos aditivos que pueden prolongar los tiempos de protección, representa una herramienta importante para reemplazar los productos sintéticos utilizados en la actualidad (Nerio *et al.*, 2010).

Muchos estudios han evaluado el uso de Ts para el control de larvas y de moscas adultas en las zonas donde este insecto se desarrolla, pero es relativamente poco el esfuerzo realizado para evaluar los Ts o AEs como fumigantes. Sobre el tema, la literatura ofrece poca orientación a la hora de elegir o seleccionar el mejor AE para su uso en un entorno humano. Por ejemplo, la mayoría de los estudios son sobre aplicación tópica, lo cual no indica necesariamente que puedan servir como fumigantes. Además los valores de DL₅₀ de AEs o Ts informados, se determinaron al cabo de 24 horas de exposición o más. Con el fin de controlar las moscas que amenazan contaminar los alimentos elaborados, los AEs deben ser efectivos en un plazo más corto. Además, en la mayoría de los estudios anteriores no se informa la temperatura del bioensayo, siendo éste un parámetro que puede tener mucha influencia en la presión de vapor de los compuestos volátiles.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, en esta tesis se evaluó la eficacia de 30 AEs extraídos de plantas aromáticas y frutos comestibles contra *M. domestica* después de 30 minutos de exposición a 26° C, con el fin de seleccionar al mejor candidato para la formulación de nuevos productos para el hogar.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

- Desarrollar un insecticida de origen natural para el control de *Musca domestica*.

7.2. Objetivos específicos

- Obtener aceites esenciales de plantas aromáticas seleccionadas.
- Separar e identificar sus componentes principales.
- Detectar las sustancias más activas contra *M. domestica*, de un grupo de 30 aceites esenciales (AEs) y 20 Terpenos (Ts).
- Analizar la relación entre los componentes del aceite esencial y la mortalidad de las moscas mediante el uso de estadística multivariada.

- Determinar sinergismo entre los AEs y entre los Ts más activos.
- Seleccionar el aceite esencial y los terpenos más activos, en vista a su uso en ambientes domésticos.
- Proponer un producto insecticida para mosca en base a las sustancias más activas.

8. Bibliografía del capítulo

- Acevedo, G. R. *et al.* (2009). Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitol Res* 105: 489 - 493.
- Adams, T. S. & Holt, G. G. (1987). Effect of pheromone components when applied to different models on male sexual behaviour in the housefly, *Musca domestica* *Journal of Insect Physiology* 33 (1): 9-11, 13-18.
- ANMAT, A. N. d. M. A. y. T. M. (2008) Productos domisanitarios Disposición 2659/2008. On line.
http://www.anmat.gov.ar/retiros/mayo/Disposicion_ANMAT_2659-2008.pdf.
- Badii, M. H. & Almanza, V. G. (2007). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *CULCyT* 4 (18): 9 - 25.
- Bakkali, F. *et al.* (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446-475.
- Batish, D. R. *et al.* (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256 (12): 2166-2174.
- Berenbaum, M. & Neal, J. (1985). Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally co-occurring plant toxicant. *J. Chem. Ecol.* (11): 1349 -1358.
- Bidawid, S. P. *et al.* (1978). The role of non-biting flies in the transmission of enteric pathogens (*Salmonella* species and *Shigella* species) in Beirut, Lebanon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 117-121.
- Capinera, J. L. (2008). House Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) *Encyclopedia of Entomology*, Springer Science+Business Media B.V. On line.
<http://books.google.com.ar/>.
- Coats, J. R. *et al.* (1991). Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. *ACS Symposium Series* 449. *Naturally Occuring Pest Bioregulators*. Hedin, P. A. Washington, DC, USA: 306-316.
- Comité Internacional de Expertos del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2001) Fichas Internacionales de Seguridad Química (Fichas Internacionales de Seguridad Química) Cipermetrina.

- Daly, H. V. *et al.* (1998). Introduction to insect biology and diversity. Oxford New York, Oxford University Press
- de Andrade, I. L. *et al.* (2004). Chemical Composition and Insecticidal Activity of Essential Oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (19): 5879-5881.
- De Jesús, A. J. *et al.* (2004). Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) *Int. J. Food Microbiol.* 93: 259-262.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308–316.
- Echeverria, P. *et al.* (1983). Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 46: 32-36.
- EPA, E. P. A. (2006). Interim Reregistration Eligibility Decision for Dichlorvos (DDVP) On line. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/ddvp_ired.pdf
- Ezeonu, F. C. *et al.* (2001). Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Biores. Technol.* 76: 273-274.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra, España.* 26 (1): 155-172.
- Ffrench-Constant, R. H. *et al.* (1993). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363 (6428): 449-451.
- Food and Drug Administration, F. D. A. (2009) CFSAN/Office of Food Additive Safety disponible en: <http://www.foodsafety.gov/~rdb/opa-gras.html>.
- Forster, M. *et al.* (2007). Pilot studies on synantropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fania*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms *Parasitol Res* 101: 243-246.
- Fortin, M. *et al.* (2008). Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environmental Research* 107: 343–350.
- Fukushima, H. *et al.* (1979). Role of the fly in the transport of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* 38: 1009–1010.
- Gershezon, J. *et al.* (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of Peppermint. *Plant. Physiology* 122: 205–213.
- Gillij, Y. G. *et al.* (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99 (7): 2507-2515.

- Go, V. *et al.* (1999). Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ. Health Perspect.* 107: 173-177.
- Graczyk, T. *et al.* (2001). The role of nonbiting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect* 3: 231-235.
- Graham, J. P. *et al.* (2009). Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Sci Total Environ* 407: 2701-2710.
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2010). *The insects, an outline of entomology.* Hong Kong, Willey Blackwell
- Hemingway, J. & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 371 - 391.
- Hewitt, C. G. (2011). *The House-Fly : Musca domestica Linn.* New York, Cambridge University Press. On line. <http://books.google.com.ar>
- Hill, D. S. (2002). *Pests of stored food stuffs and their controls.* Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers
- Hummelbrunner, L. A. & Isman, M. B. (2001). Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- IPCS, I. P. o. C. S. (1986). *Organophosphorus insecticides.* WHO, W. H. O. Geneva. On line. <http://www.wpro.who.int/nr/rdonlyres/fc89617a-1db8-4ab6-82ad-75197cc7d67c/0/organophosphorouspesticides.pdf>
- Ishaaya, I. *et al.* (2007). *Insecticides Design Using Advanced Technologies*
- Isman, M. B. & Machial, C. M. R., M., Carpinella, M.C., Eds.; Elsevier (2006). *Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. Advances in Phytomedicine.* Amsterdam, The Netherlands: 29-44.
- Jaggi, S. *et al.* (2001). Leaching of Pesticides in Tea Brew. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5479-5483.
- Jang, Y.-S. *et al.* (2005). Vapor Phase Toxicity of Marjoram Oil Compounds and Their Related Monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (20): 7892-7898.
- Jiang, Y. *et al.* (2002). Semiochemicals from ovaries of gravid females attract ovipositing female houseflies, *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology* 48: 945–950.

- Karpouthis, I. *et al.* (1998). Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 46 (4): 1694.
- Khan, A. R. & Huq, F. (1978). Disease agents carried by flies in Dacca city. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 4: 86-93.
- Koul, O. *et al.* (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.* 4 (1): 63 - 84
- Lee, S. *et al.* (1997). Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and housefly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 883-892.
- Malik, A. *et al.* (2007). House Fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. *J Environ Sci Health Part B* 42: 453-469.
- Manrique-Saide, P. C. & Delfín-González, H. (1997). Importancia de las moscas como vectores potenciales de enfermedades diarreicas en humanos. *Rev Biomed* 8: 163-170.
- Misra, G. & Pavlostathis, S. G. (1997). Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and in soil-slurry system. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 572–577.
- Mohottalage, S. *et al.* (2007). Components from Sri Lankan Piper betle L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. *Flavour Frag. J.* 22: 130-138.
- Nerio, L. S. *et al.* (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101 (1): 372-378.
- O'Malley, M. (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet* 349: 1161–1166.
- Olsen, A. R. (1998). Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric diseases. *Regul Toxicol Pharmacol* 28: 199-211.
- Omolo, M. O. *et al.* (2004). Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* 65: 2797–2802.
- Organizacion Mundial de la Salud (2009) Chlorpyrifos. On line. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/154.htm>.
- Organización Mundial de la Salud (1998) Deltamethrin. On line. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/205.htm>.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2009). The WHO recommended classification of pesticides by hazard, International Programme on Chemical Safety. . On line. http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf.

- Pathak, N. *et al.* (2000). Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.). *Journal International Pest Control* 42 (2): 53-55.
- Pavela, R. (2008). Insecticidal properties of several essential oils to the House Fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Res.* 22: 274-278.
- Pavela, R. *et al.* (2009). Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 105: 1365 - 1370.
- Regnault-Roger, C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Rev.* 2: 25-34.
- Rice, P. J. & Coats, J. R. (1994). Structural requirements for monoterpenoid activity against insects. In: *Bioregulators for crop protection and pest control ACS Symposium Series 557*, s. E. H., P.A. Washington, D.C., USA.: 92-108.
- Sangwan, N. S. *et al.* (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3 - 21.
- Scott, J. G. *et al.* (2000). Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. *Pest Manag. Sci.* 56: 147-153.
- Seo, S.-M. *et al.* (2009). Fumigant Antitermitic Activity of Plant Essential Oils and Components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*), Caraway (*Carum carvi*), Dill (*Anethum graveolens*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), and Litsea (*Litsea cubeba*) Oils against Japanese Termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15): 6596-6602.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, S. (2011). Activos registrados aprobados por empresas a Junio de 2011. On line. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=524&io=2956>.
- Shalaby, A. A. *et al.* (1998). Insecticidal properties of citrus oils against *Culex pipiens* and *Musca domestica*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 28: 595-606.
- Shan, G. *et al.* (2004). A Sensitive Class Specific Immunoassay for the Detection of Pyrethroid Metabolites in Human Urine. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2): 218-225.
- Shono, T. & Scott, J. G. (2003). Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pest. Biochem. Physiol.* 75: 1-7.

- Shoukry, I. F. (1997). Toxicological deteriorations of two volatile oils of *Matricaria chamomilla* and *Clerodendron inerme* on the adult house fly *Musca domestica* L. . J. Egypt. Soc. Parasitol. 27: 893-904.
- Silva Aguayo, G. & Rodríguez M., J. C. (2004) Manejo de la resistencia a insecticidas. Ciencia ahora. Universidad de Concepción, Chile 14.
- Stroh, J. *et al.* (1998). Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. Bull Environ Contam Toxicol 60: 923-930.
- Syngenta (2009) Engeo (tiametoxam) Hoja de seguridad. On line. http://www.jedys.com.ar/data/HojaDeSeguridad_1462.pdf.
- Tolosa, A. C. *et al.* (2006). The fumigant and repellent activity of aliphatic lactones against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. J. Med. Entomol. 43 (5): 889-895.
- Yang, Y. C. *et al.* (2009). Ovicidal and Adulticidal Activity of *Eucalyptus globulus* Leaf Oil Terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). J. Agric. Food Chem. (52): 2507-2511.
- Yang, Y. C. *et al.* (2002). A Piperidine Amide Extracted from *Piper longum* L. Fruit Shows Activity against *Aedes aegypti* Mosquito Larvae. J. Agric. Food Chem. 50 (13): 3765-3767.
- Zhu, B. C. R. *et al.* (2003). Toxicity and Repellency of Patchouli Oil and Patchouli Alcohol against Formosan Subterranean Termites *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (16): 4585-4588.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Las plantas aromáticas de uso medicinal se recolectaron en las sierras de Córdoba y fueron identificadas por el Ing. Agr. Gustavo Ruiz, además se realizó el depósito de una muestra de cada planta en el Herbario Marcelino Sayago, de la Universidad Católica de Córdoba. Las plantas aromáticas comestibles o sus partes se adquirieron a productores o en negocios del rubro.

2. Extracción de los aceites esenciales

Las partes de las plantas se desecaron a la sombra y luego fueron fraccionadas a un tamaño menor para su posterior hidrodestilación por arrastre de vapor (Figura 9).

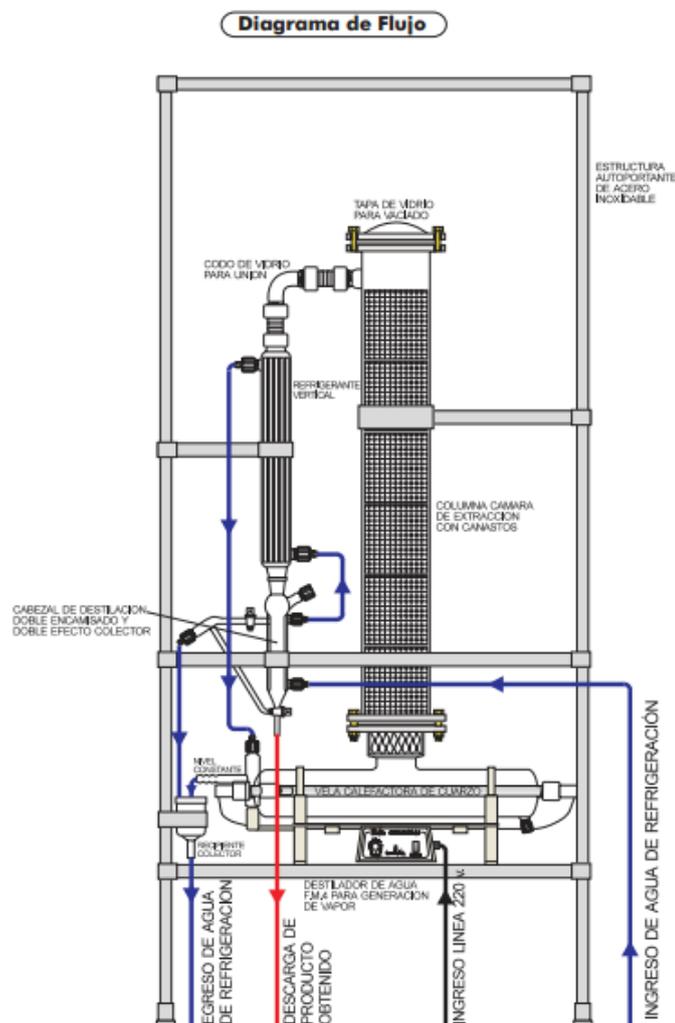


Figura 9. Esquema del destilador por arrastre de vapor.

El aceite obtenido fue desecado mediante sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro, separado en frascos de pequeño tamaño color caramelo, rotulado y almacenado en freezer para su mejor conservación.

3. Análisis de los componentes de los AEs

Los componentes de los aceites esenciales se determinaron mediante cromatografía gaseosa adosada a espectrometría de masa (Dong *et al.*, 2007) utilizando un equipo Hewlett Packard serie II 5890. Para efectuar las corridas cromatográficas se utilizó una columna capilar HP-5MS de diámetro interno 0,25 mm y 30 m de longitud. La identificación de los componentes se realizó mediante la comparación de su espectro de masa con los de la biblioteca del equipo y mediante el cálculo de los índices de retención de Kovats (Dong *et al.*, 2007). En el anexo 2 se amplía sobre este tema.

Mediante cromatografía gaseosa, se separaron algunos terpenos quirales como son limoneno, pulegona y α -pineno, con la finalidad de identificar sus isómeros ópticos, utilizando para ello la columna quiral Supelco β DEX 120, de 0,32 mm por 60 m de longitud.

Adecuando las condiciones del cromatógrafo con la columna quiral descrita, corrimos de a uno, los AEs y Ts, con la siguiente metodología: primero corrimos por separado los estándares de los Ts (4*R*)(+)-limoneno, (4*S*)(-)-limoneno y la mezcla de ambos (1/1), variando las condiciones del instrumento hasta lograr una separación evidente de sus picos. De esta manera establecimos el tiempo de retención exacto para cada uno de los estándares. Posteriormente al correr cada AE que contenía limoneno (*A. citriodora*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. reticulata* y *C. sinensis*), identificamos con la información que habíamos obtenido, el enantiómero que estaba presente en el aceite. Con igual proceder se resolvió pulegona y α -pineno, y se determinaron los mismos en los AEs de *M. verticillata*, *H. multiflora* y *M. fragans* y *S. molle*.

4. Reactivos químicos

Se utilizó como estándares y como material para los bioensayos: trans-anetol, carvacrol, citronellal, 1,8-cineol, eugenol, (4*R*)(+)-limoneno, (4*S*)(-)-limoneno, linalol, mentona, mentol, (\pm)- α -pineno, (1*R*)(+)- α -pineno, (1*S*)(-)- α -pineno, (1*S*)(-)- β -pineno, (4*R*)(+)-pulegona, (4*S*)(-)-pulegona, α -terpineno, γ -terpineno, terpineol y timol, que fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.); acetona grado HPLC

adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania); y el dimetil 2,2-diclorovinil fosfato (DDVP), fue un regalo del Profesor H. Masuh, del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, CITEFA/CONICET, Argentina.

5. Cría de moscas

Mediante una red, se atraparon individuos de *M. domestica* en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en el Campus de la Universidad Católica de Córdoba, Avenida Armada Argentina N° 3555, Córdoba.

Se las colocó en jaulas entomológicas de 30 x 30 x 30 cm recubiertos de tela mosquitera, con una manga de gasa, para poder manipular en el interior de las jaulas. Se colocaron las jaulas entomológicas en un bioterio, con una temperatura controlada de 26°C +/- 1°C, una humedad del 70 % y un fotoperíodo de 12/12 hrs. Como alimento de las moscas adultas, se utilizó leche en polvo seca, ubicada en una cápsula abierta. Se les colocó potes plásticos de 8 cm de diámetro con un medio adecuado, para que depositen allí sus huevos. Este medio ovopositor estuvo compuesto por salvado, azúcar, leche, harina, levadura y agua hasta formar una pasta, no muy espesa. Las larvas aparecen a las 24-72 hrs posteriores a la ovoposición. En ese momento, los recipientes se retiraron y se colocaron en otra jaula del mismo tamaño y en iguales condiciones, pero sin la presencia de moscas adultas. En aproximadamente 7 días, se obtuvieron las pupas y en otro lapso de tiempo similar, nacieron las moscas. Parte de las mismas se utilizaron para continuar la crianza y otra parte fueron usadas para los bioensayos.

6. Bioensayos con moscas

Se colocaron grupos de 10 moscas en frascos de vidrio de 9 cm. de diámetro y 17 cm. de alto, de 1 litro de capacidad. En la tapa de cada frasco se sujetó un hilo de algodón, pendiendo hacia el interior, llegando hasta la mitad de frasco (Figuras 10, 11 y 12).

Una vez introducidas las moscas en cada frasco, se aplicó al extremo inferior del hilo de algodón, una cantidad conocida del aceite esencial o del terpeno, según corresponda, mediante jeringas del tipo Hamilton. Se cerraron inmediatamente los frascos y se comenzó a medir el tiempo necesario para el volteo y muerte de las moscas. Un frasco sin aceite esencial, se utilizó como control. Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento y control. Los AEs que presentaron alta toxicidad, como los correspondientes a *M. verticillata*, y *H. multiflora*, se disolvieron en acetona para

su dosificación sobre el hilo, en estos casos al control se le aplicó acetona (10 μ l). Luego de 30 minutos se determinó el número de moscas muertas en los tratamientos y en el control. Se calculó el porcentaje de muertes respecto al control y con éste dato, para cada concentración, se calculó la DL_{50} y el TL_{50} .



Figura 10. Frascos utilizados en los bioensayos para las moscas control.



Figura 11. Frascos utilizados en los bioensayos para las moscas con aceite esencial.

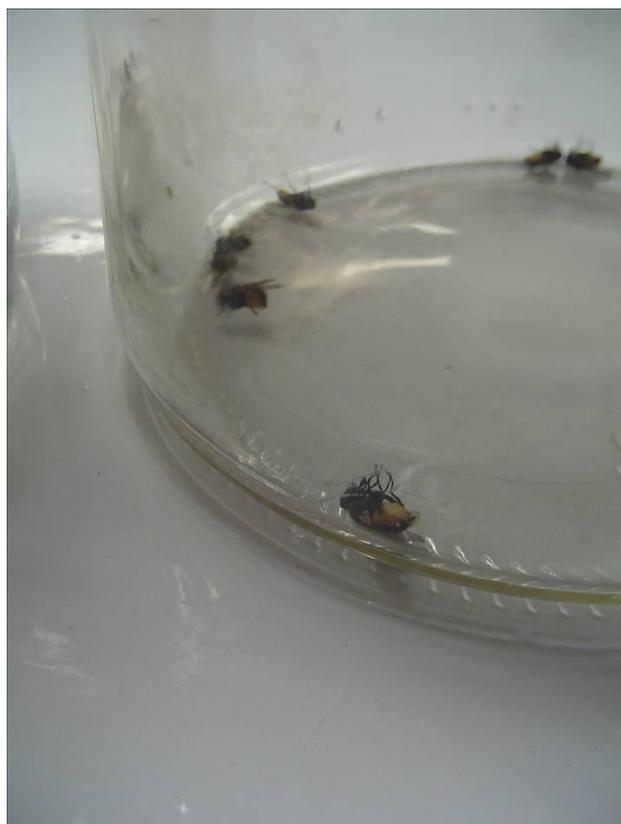


Figura 12. Detalle de moscas muertas con aceite esencial.

7. Bioensayos en sistemas abiertos con 100 moscas

A los efectos de evaluar la efectividad de una formulación, a base de los AEs que han evidenciado mayor potencialidad contra las moscas, realizamos bioensayos con un número considerablemente mayor de moscas.

En una caja entomológica de 30 x 30 x 30 cm recubierta con tela mosquitera plástica se colocaron 100 moscas (Figura 13) y esta jaula se ubicó en un laboratorio a una temperatura controlada de 26°C. La jaula fue fumigada con 2,5 ml de una solución que contenía AE de *M. verticillata* 500 µl y alcohol isopropílico hasta un volumen final de 2,5 ml.

Se realizó otro bioensayo con una formulación que contenía AE de *M. verticillata* 250 µl y AE de *C. sinensis* 500 µl y alcohol isopropílico hasta un volumen final de 2,5 ml.

Simultáneamente, se efectuaron ensayos testigos con otras 100 moscas en una jaula limpia alejada de la anterior, sin recibir ninguna fumigación. Los ensayos se realizaron por triplicado. Además se realizaron ensayos fumigando con alcohol isopropílico puro, como control del solvente.

Ante la imposibilidad de realizar pruebas con aerosoles, ya que los mismos se fabrican solo en cantidades industriales, hemos recurrimos a utilizar pulverizadores manuales a gatillo, con el cual realizamos nuestros bioensayos. Probando distinto tipos y tamaños de pulverizadores manuales a gatillo, concluimos en que un volumen de 2 a 3 mL es adecuado para una pulverización localizada para ahuyentar y/o eliminar las moscas.



Figura 13. Caja entomológica para los bioensayos

La experiencia se realizó con cada formulado en tres oportunidades en idénticas condiciones y se grabó un vídeo de cada una de ellas (Figura 14). Esto permitió que además del conteo visual de moscas muertas quedara un registro que permite revisar el experimento. Se registró la cantidad de moscas muertas en intervalos de un minuto y hasta un tiempo final de 30 minutos.



Figura 14. Caja entomológica en el momento de la fumigación

8. Análisis estadístico

Para calcular la dosis letal del 50% (DL_{50}) y el tiempo letal del 50% (TL_{50}), se utilizó la relación dosis-respuesta de la mortalidad media mediante el método de Probit (programa de la Universidad de Harvard, HG1, 2).

La relación entre el o los principios activos del aceite esencial y la mortandad de las moscas, se analizó mediante la aplicación de estadística multivariada (programa InfoStat).

Los resultados de los bioensayos de sinergismo con las formulaciones, se analizaron por ANOVA (test no paramétrico de Kruskal Wallis).

9. Bibliografía del capítulo

- Dong, L. *et al.* (2007). Gas chromatography-mass spectrometry following pressurized hot water extraction and solid-phase microextraction for quantification of eucalyptol, camphor and borneol in *Chrysanthemum* flowers. *J. Sep. Sci.* 30: 86-89.
- Vázquez, A. M. & Bertoni, A. (2010). *Análisis Instrumental*. Córdoba, EDUCC Editorial de la Universidad Católica de Córdoba.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Criterios para la selección de las sustancias a ensayar

De acuerdo a los objetivos planteados, el interés de esta tesis fue detectar compuestos naturales capaces de controlar a *Musca domestica*, en su estadio adulto. También incluimos en este objetivo la condición de que la sustancia que se busca, pueda aplicarse en ambientes domésticos o en lugares de trabajo, de forma tal que el uso del insecticida no impida, por ejemplo, el procesamiento de alimentos en los lugares fumigados, el uso de utensilios que hubieran sido alcanzados con estas sustancias, o la permanencia prolongada de personas en el lugar fumigado, etc. (cabe aclarar que si bien el propósito es la utilización de sustancias menos tóxicas en ambientes domésticos o de trabajo, esto no significa abandonar completamente los cuidados recomendados para el uso y aplicación de insecticidas). Por lo tanto las sustancias a evaluar debieran cumplir *a priori* las siguientes características: *i*) ser natural, es decir, ser extraída de un organismo natural para garantizar su biodegradabilidad. *ii*) presentar baja toxicidad con el fin de aumentar su margen de seguridad *iii*) ser lo suficientemente volátil como para entrar en contacto con las moscas a través del aire.

La respuesta a la primera condición fue buscar derivados de plantas, mientras que en la segunda nos llevó a buscar plantas comestibles, utilizadas ya sea como alimentos, condimentos y/o medicinales y por último la condición de volatilidad indica que los aceites esenciales serían los compuestos más adecuados para ser evaluados como insecticidas para moscas. De esta forma, la búsqueda se orientó hacia AEs derivados de plantas usadas como alimentos, condimentos y con fines medicinales.

2. Plantas seleccionadas

Se seleccionaron 30 plantas productoras de AEs, las cuales se encuentran listadas en la Tabla 1. Las mismas pertenecieron a distintas familias botánicas, como Anacardiaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Rutaceae y Verbenaceae.

De ellas, 9 especies pertenecieron a alimentos, 11 a plantas medicinales y 10 a especias. El material vegetal usado para obtener los AEs fueron las partes aéreas en el 33,3 % de los casos, en el 30 % se utilizaron solo las hojas, el 20 % de

los AEs se obtuvo del epicarpio fresco de frutos, mientras que el 10% y 6,6% de los AEs fueron extraídos de frutos y flores, respectivamente.

Tabla 2. Plantas o sus partes utilizadas para la obtención de los aceites esenciales.

Familia	Nombre vulgar	Nombre científico	Nº de depósito	Parte utilizada
Anacardiaceae	Aguaribay	<i>Schinus molle</i> L.	UCCOR0060	hojas
Amaranthaceae	Paico	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin et Clemants	UCCOR0331	parte aérea
Apiaceae	Anís	<i>Pimpinella anisum</i> L.	**	frutos
	Coriandro	<i>Coriandrum sativum</i> L.	**	frutos
Asteraceae	Artemisia	<i>Artemisia annua</i> L.	UCCOR0363	parte aérea
	Tagetes	<i>Tagetes minuta</i> L.	UCCOR0138	parte aérea
Lamiaceae	Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i> L.	UCCOR0355	parte aérea
	Lavanda	<i>Lavandula officinalis</i> Chaix	UCCOR0362	flores
	Lepechinia	<i>Lepechinia floribunda</i> (Benth.) Epling	UCCOR0195	parte aérea
	Melisa	<i>Melissa officinalis</i> L.	UCCOR0240	parte aérea
	Menta piperita	<i>Mentha piperita</i> L.	*	parte aérea
	Orégano	<i>Origanum sp</i>	UCCOR0356	hojas
	Peperina	<i>Minthostachys verticillata</i> (Griseb.) Epling	UCCOR0125	parte aérea
	Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	UCCOR0361	hojas
	Salvia blanca	<i>Salvia officinalis</i> L.	UCCOR0386	hojas
	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i> L.	UCCOR0387	hojas
	Tomillo de las sierras	<i>Hedeoma multiflora</i> Benth.	UCCOR0222	parte aérea
Lauraceae	Laurel comestible	<i>Laurus nobilis</i> L.	UCCOR0238	hojas
Monimiaceae	Boldo	<i>Peumus boldus</i> Molina	**	hojas
Myrtaceae	Clavo de olor	<i>Syzygium aromaticum</i> (L) Merr. & Perry.	**	brote floral
	Eucalyptus medicinal	<i>Eucalyptus cinerea</i> F. v. Muell.	UUCOR0411	hojas
Myristicaceae	Nuez moscada	<i>Myristica fragans</i> Houtt.	**	frutos
Rutaceae	Lima o limón sutil	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	UCCOR0241	epicarpio fresco del fruto
	Limón	<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck	UCCOR0358	epicarpio fresco del fruto
	Mandarino	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	*	epicarpio fresco del

				fruto
	Naranja amargo	<i>Citrus aurantium</i> L.	*	epicarpio fresco del fruto
	Naranja dulce	<i>Citrus sinensis</i> L.	UCCOR0383	epicarpio fresco del fruto
	Pomelo	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	UCCOR0385	epicarpio fresco del fruto
Verbenaceae	Cedrón	<i>Aloysia citriodora</i> Palau	UCCOR0262	hojas
	Poleo	<i>Lippia turbinata</i> Gris.	UCCOR0206	parte aérea

* Plantas o partes de plantas, recolectadas de huertas familiares, siendo su cultivo en condiciones orgánicas. ** Especies adquiridas en negocios confiables del rubro.



Figura 15. Hojas de albahaca (*Ocimum basilicum*)



Figura 16. Frutos del limonero (*Citrus limon*)



Figura 17. Hojas de eucalyptus medicinal (*Eucalyptus cinerea*)



Figura 18. Hojas de peperina (*Menthastachys verticillata*)



Figura 19. Frutos del naranjo (*Citrus sinensis*)

3. Obtención de AEs y análisis de sus componentes

Los AEs a estudiar se obtuvieron por hidrodestilación por arrastre de vapor siendo variable la cantidad obtenida, de acuerdo a la especie. Los rendimientos oscilaron entre 0,15 y 4,62 % correspondiendo el menor valor a *Lepechinia floribunda* y el mayor valor a *Dysphania ambrosioides* (Tabla 3).

Con el fin de determinar los componentes de los AE se analizaron los mismos mediante cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas.

También se analizaron algunos AEs utilizando columna quiral a fin de determinar la isomería óptica de algunos terpenos.

Nuestro interés en determinar la quiralidad de los Ts presentes en los AEs, se debió a que, a nivel biológico un enantiómero puede tener una determinada actividad mientras que el otro, su imagen especular, no presente ningún efecto o efectos distintos (Sheldon, 1993).

Los AEs de *A. citriodora*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. reticulata* y *C. sinensis* que contenían limoneno como componente principal en todos los casos correspondió al isómero (4*R*)(+)-limoneno mientras que el (4*S*)(-)-limoneno no se detectó (menos de 100 ng/μl). Debemos tener en cuenta que el criterio para determinar el límite de detección se fijó como la relación entre el área del pico del compuesto en estudio y el área de una señal de la línea de base del cromatograma, el cual debe ser mayor o igual a 3 (≥ 3).

Los AEs de *H. multiflora* y de *M. verticillata* que contenían pulegona fueron analizados de igual manera pudiendo comprobar que dichos AEs solo contienen (4*R*)(+)-pulegona dentro de los límites de detección anteriormente expresados. Lo mismo ocurrió con los AEs de *M. fragans* y de *S. molle* que contenían α -pineno, donde detectamos (1*R*)(+) α -pineno, y no encontramos (1*S*)(-) α -pineno.

El primero y segundo componente mayoritario de cada AE se encuentran descritos en la Tabla 3, como así también se hace referencia a la cita bibliográfica con la cual se comparó nuestro resultado. Haciendo un análisis de los T que componen los AE bajo estudio, podemos observar que el T más frecuente fue (4*R*)(+)-limoneno, presente en siete AEs, lo sigue en menor frecuencia, 1,8-cineol y linalol, los cuales estuvieron presentes en seis y cinco AEs, respectivamente. En menor frecuencia aún se encontró γ -terpineno presente en cuatro aceites; α -terpineno y mentona, en tres casos; β -mirceno, (1*R*)(+) α -pineno, timol, geranial, terpinen-4-ol y (4*R*)(+)-pulegona, en dos AEs; mientras que el resto de los Ts: artemisia cetona, ascaridol, globulol, oxido de cariofileno, borneol, citronelal, citronelol, mentol, *p*-cimeno, *trans*-anetol, α -himachaleno, β -tuyona, alcanfor, β -cariofileno, dihidrotagetona, *Z*-tagetona, *m*-cimeno, aparecen en solo uno de los AEs estudiados.

Respecto a la cantidad relativa de los Ts en sus respectivos AE, podemos destacar que el T que presentó una mayor proporción fue el (4*R*)(+)-limoneno con un 94,97, 94,07, 92,47, 82,83 y 74,39% en los AEs de *C. paradisi*, *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. reticulata* y *C. aurantifolia*, respectivamente. Le siguen en menor

cantidad relativa el (4*R*)(+)-pulegona con un 69,70% en el AE de *M. verticillata*, el *trans*-anetol con un 68,76% en el AE de *P. anisum*, el linalol con un 64,93% en el AE de *L. officinalis* y con un 63,56% en el AE de *C. sativum*, luego en menor cantidad sigue el eugenol con un 63,26% en el AE de *S. aromaticum*. Otros Ts con menor cantidad relativa, se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento y principales componentes de los AEs estudiados

Nombre científico	Rendimiento del AE %	Los dos componentes mayoritarios más abundantes (%)	Referencia
<i>Aloysia citriodora</i>	0,45	geranial (12,99) (4 <i>R</i>)(+)-limoneno (12,60)	(Argyropoulou <i>et al.</i> , 2007)
<i>Artemisia annua</i>	2,30	artemisia cetona (22,36) 1,8-cineol (16,67)	(Viuda-Martos <i>et al.</i> , 2010)
<i>Dysphania ambrosioides</i>	4,62	ascaridol (34,69) α -terpineno (22,70)	(Gillij <i>et al.</i> , 2008; Viuda-Martos <i>et al.</i> , 2010)
<i>Citrus aurantifolia</i>	0,34	(4 <i>R</i>)(+)-limoneno (74,39) citronelol (4,74)	(Veriotti & Sacks, 2001)
<i>Citrus aurantium</i>	1,40	(4 <i>R</i>)(+)-limoneno (94,07)	(Njoroge <i>et al.</i> , 2003)
<i>Citrus limon</i>	1,80	(4 <i>R</i>)(+)-limoneno (49,56) γ -terpineno (10,18)	(Veriotti & Sacks, 2001; Hyang-Sook, 2006)
<i>Citrus paradisi</i>	0,60	(4 <i>R</i>)(+)-limoneno (94,97) β -micerno (2,62)	(Njoroge <i>et al.</i> , 2005)
<i>Citrus reticulata</i>	1,10	(4 <i>R</i>)(+)-limoneno (82,83) γ -terpineno (10,89)	(Hyang-Sook, 2006)
<i>Citrus sinensis</i>	0,70	(4 <i>R</i>)(+)-limoneno (92,47) linalol (1,43)	(Hyang-Sook, 2006) (Ruberto <i>et al.</i> , 1997)
<i>Coriandrum sativum</i>	0,38	linalol (63,56) γ -terpineno (6,55)	(Frank <i>et al.</i> , 1995)
<i>Eucalyptus cinerea</i>	1,28	1,8-cineol (56,86) canfeno (19,88)	(Babu & Singh, 2009; Lucia <i>et al.</i> , 2009)

<i>Hedeoma multiflora</i>	1,0	(4R)(+)-pulegona (52,80) mentona (24,33)	(Fernández <i>et al.</i> , 2007)
<i>Laurus nobilis</i>	0,69	1,8-cineol (21,66) linalol (11,90)	(Kilic <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lavandula officinalis</i>	1,33	linalol (64,93) terpinen-4-ol (13,08)	(Adam <i>et al.</i> , 1998)
<i>Lepechinia floribunda</i>	0,15	globulol (17,74) 1,8-cineol (12,43)	(Viturro <i>et al.</i> , 2005)
<i>Lippia turbinata</i>	1,20	Oxido de cariofileno (19,92) borneol (11,84)	(Gleiser & Zygadlo, 2007)
<i>Melissa officinalis</i>	1,29	citronelal (43,20) geranial (24,84)	(Mimica-Dukic <i>et al.</i> , 2004)
<i>Mentha piperita</i>	1,0	mentol (41,51) mentona (20,88)	(Rohloff, 1999; İşcan <i>et al.</i> , 2002)
<i>Minthostachys verticillata</i>	2,20	(4R)(+)-pulegona (69,70) mentona (12,17)	(Banchio <i>et al.</i> , 2005; Banchio <i>et al.</i> , 2007)
<i>Myristica fragans</i>	4,45	terpinen-4-ol (13,69) (1R)(+)α-pineno (8,25)	(Misharina <i>et al.</i> , 2009)
<i>Ocimum basilicum</i>	2,56	p-cimeno (37,37) linalol (35,76)	(Lachowicz <i>et al.</i> , 1996)
<i>Origanum sp.</i>	2,46	timol 18,95% γ-terpineno 5,47%	(Adam <i>et al.</i> , 1998)
<i>Peumus boldus</i>	2,77	α-terpineno 35,85% 1,8-cineol 31,63%	(Verdeguer <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pimpinella anisum</i>	2,43	trans-anetol 68,76% α-himachaleno 11,88%	(Rodrigues, 2003)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2,62	β-micerno 17,83% 1,8-cineol 17,39%	(Angioni <i>et al.</i> , 2004)
<i>Salvia officinalis</i>	0,90	β-tuyona 20,62% alcanfor 19,38%	(Ben Farhat <i>et al.</i> , 2009)
<i>Schinus molle</i>	2,0	(1R)(+)α-pineno 19,92% α-terpineno 6,95%	(Santos <i>et al.</i> , 2010)
<i>Syzygium aromaticum</i>	2,85	eugenol 63,26% β-cariofileno 22,62%	(Lopez <i>et al.</i> , 2005; Bluma & Etcheverry, 2008)

<i>Tagetes minuta</i>	1,10	dihidrotagetona 24,51% Z-tagetona 6,80%	(Chamorro <i>et al.</i> , 2008)
<i>Thymus vulgaris</i>	0,93	<i>m</i> -cimeno 17,74% timol 17,21%	(Díaz-Maroto <i>et al.</i> , 2005)

La totalidad los componentes detectados para cada AE se enumeran en la Tabla 4. Las composiciones de todos los AEs fueron coherentes con las composiciones reportadas con anterioridad.

Entre estos componentes algunos fueron monoterpenos como: alcanfor, artemisia cetona, ascaridol, borneol, 1,8-cineol, *p*-cimeno, citronelal, citronelol, geranial, geraniol, limoneno, linalol, mentol, mentona, mirceno, terpinen-4-ol, timol, pulegona, pineno, terpineno, tujona, carvacrol, tagetona y α -terpineol. Otros fueron sesquiterpenos, como por ejemplo: oxido de cariofileno, globulol, e himachaleno.

Todo este análisis revela la diversidad de sustancias químicas ensayadas, lo cual abre la posibilidad de encontrar sustancias ampliamente efectivas contra *M. domestica* dentro de plantas comestibles.

4. Determinación de DL₅₀ de AEs contra *M. domestica*

El efecto insecticida de los 30 AEs fue evaluado contra individuos de *M. domestica* adultos, mediante la determinación de los valores de la dosis letal 50 (DL₅₀) a 25° C, en un período de 30 minutos. Se eligió a éste como tiempo límite de la determinación de la DL₅₀ ya que buscamos sustancias que puedan actuar rápidamente para el control de *M. domestica* a diferencia de algunos trabajos que lo hacen a 24 hrs (Pavela, 2008). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.

Analizando las DL₅₀ de los AEs, observamos que los AEs de *M. verticillata*, *H. multiflora*, *C. sinensis* y *C. aurantium* fueron activos entre 0,5 a 5 mg/dm³. En orden de eficacia les siguen los AEs de *A. annua*, *C. aurantifolia*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. reticulata*, *C. sativum*, *E. cinerea*, *L. nobilis*, *M. fragans*, *R. officinalis* y *T. vulgaris*, que fueron activos entre 5,1 y 10 mg/dm³.

Los AEs de *D. ambrosioides*, *L. officinalis*, *Origanum sp.*, *S. officinalis*, fueron activos entre 10,1 y 20 mg/dm³, mientras que los AEs de *A. citriodora*, *L. floribunda*, *M. piperita* y *P. anisum*, que fueron activos entre 20,1 y 30 mg/dm³. Por último los AEs de *L. turbinata*, *M. officinalis*, *S. molle*, *S. aromaticum* y *T. minuta*, fueron los menos activos mostrando DL₅₀ mayores a 30 mg/dm³.

Como se desprende de estos datos, algunos AEs fueron muy efectivos mientras que otros mostraron una baja eficacia como insecticida contra moscas, sin embargo, todos los AEs fueron capaces de producir la muerte de algunos individuos adultos de *M. domestica* en 30 minutos.

El AE de *M. verticillata* presentó una DL₅₀ de 0,5 mg/dm³ siendo el aceite más activo de los ensayados en este estudio. Le sigue en capacidad insecticida, el AE de *H. multiflora* que presentó una DL₅₀ de 1,3 mg/dm³; *C. sinensis* con una DL₅₀ de 3,9 mg/dm³; *C. aurantium* (DL₅₀ de 4,8 mg/dm³) y *E. cinerea* (DL₅₀ de 5,5 mg/dm³). Los AEs derivados de otras especies de cítricos también fueron muy eficaces contra *M. domestica*, con valores de DL₅₀ que van desde 6,5 hasta 7,9 mg/dm³.

En un estudio realizado por (Pavela, 2008), la DL₅₀ para *C. aurantifolia* medida en 24 horas fue de 5,8 mg/dm³. Este valor guarda relación con la DL₅₀ a 30 minutos obtenidos en nuestro estudio (DL₅₀ = 7,9 mg/dm³) En el trabajo citado (Pavela, 2008)

también se ensayaron otros AEs como los correspondientes a *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* mostrando DL₅₀ menores o muy cercanas a nuestros valores lo cual sería lógico ya que es de esperar una dosis mayor para matar las moscas a 30 min, que la que se necesita a 24 h.

Por lo expuesto, los AEs de las cinco plantas cuyas DL₅₀ se encuentran entre 0,5 y 5,5 mg/dm³, presentan potencialidad como insecticidas y pueden constituirse en candidatos para el desarrollo de formulaciones de los mismos. Estos cinco AEs son los de *M. verticillata*, *H. multiflora*, *C. sinensis*, *C. aurantium* y *E. cinerea*.

Tabla 5. DL₅₀ de aceites esenciales a 30 minutos y 26° C
contra *Musca domestica*

Aceite esencial	DL₅₀ en mg/dm³ (95% de CI)5
<i>Aloysia citriodora</i>	26,7 (0,9 - 78,7)
<i>Artemisia annua</i>	6,5 (3,9 - 10,9)
<i>Dysphania ambrosioides</i>	12,8 (8,0 - 20,6)
<i>Citrus aurantifolia</i>	7,9 (1,6 - 37,5)
<i>Citrus aurantium</i>	4,8 (3,7 - 6,3)
<i>Citrus limon</i>	6,5 (1,5 - 27,4)
<i>Citrus paradisi</i>	6,8 (2,9 - 15,7)
<i>Citrus reticulata</i>	7,0 (2,7 - 18,3)
<i>Citrus sinensis</i>	3,9 (1,2 - 13)
<i>Coriandrum sativum</i>	6,9 (3,7 - 13)
<i>Eucalyptus cinerea</i>	5,5 (4,1 - 7,4)
<i>Hedeoma multiflora</i>	1,3 (0,4 - 5,0)
<i>Laurus nobilis</i>	6,2 (1,8 - 21,1)
<i>Lavandula officinalis</i>	11,1 (3,5 - 35,3)
<i>Lepechinia floribunda</i>	20,6 (1,8 - 243)
<i>Lippia turbinata</i>	> 38,3
<i>Melissa officinalis</i>	34,8 (15,8 - 76,7)
<i>Mentha piperita</i>	24,1 (5,9 - 98,7)
<i>Minthostachys verticillata</i>	0,5 (0,02 - 2,8)
<i>Miristica fragrans</i>	8,8 (3 - 26)
<i>Ocimum basilicum</i>	10,4 (3,9 - 27,4)
<i>Origanum sp.</i>	18 (9,6 - 33,6)

<i>Peumus boldus</i>	7,3 (3,38 – 15,6)
<i>Pimpinella anisum</i>	22,4 (3,4 - 148,9)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	7,8 (2,3 - 26,5)
<i>Salvia officinalis</i>	16,3 (0,5 - 53,3)
<i>Schinus molle</i>	46,9 (23,8 - 92,5)
<i>Syzygium aromaticum</i>	85,2 (2,6 - 276,8)
<i>Tagetes minuta</i>	> 24,2
<i>Thymus vulgaris</i>	9,1 (4,8 - 17)
deltametrina	0,6 (0,23 - 1,42)
dimetil 2,2-diclorovinil fosfato (DDVP)	0,5 (0,11 - 2,06)

En la Tabla 5 agregamos la DL₅₀ de dos controles positivos; uno de ellos fue dimetil 2,2-diclorovinil fosfato (DDVP), insecticida órganofosforado volátil, utilizado para el control de plagas con una DL₅₀ inhalatoria en ratas de 0,23 mg/ dm³ (Organización Mundial de la Salud, 2009). Si bien se lo utilizó por muchos años, incluso en insecticidas de uso doméstico, actualmente está clasificado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (M.A.G. y P) como insecticida Clase 1 b, lo cual significa que se trata de un producto muy peligroso (tóxico) y prohibido su uso (Ministerio de Agricultura Ganaderia y Pesca, 2005).

El otro control positivo fue el piretroide deltametrina. Este último es el insecticida más usado en las formulaciones comerciales actuales para el control de insectos. Según la Organización Mundial de la Salud, (1998) su DL₅₀ inhalatoria en mamíferos (ratas) es de 0,6 mg/dm³.

En nuestros ensayos el DDVP y deltametrina mostraron una DL₅₀ de 0,5 y 0,6 mg/dm³, respectivamente contra *M. domestica*.

Si comparamos la actividad insecticida de DDVP y deltametrina con la del AE de *M. verticillata* se observa que éste último mostró una actividad igual a la del DDVP y mejor que la deltametrina. Éste hecho no es menor, ya que acrecienta la posibilidad de usar éste AE como fumigante de moscas, con un nivel de toxicidad para los insectos similar a los insecticidas sintéticos, pero con efectos ambientales mucho menores o nulos. No se han reportado sustancias naturales que hayan sido encontradas con tales perspectivas contra *M. domestica*. Otros AEs como el de *H. multiflora*, *C. sinensis*, *C. aurantium* y *E. cinerea* con actividades hasta 10 veces

menores que dichos insecticidas sintéticos tendrían también posibilidad de ser usados como fumigantes contra mosca debido principalmente a su baja toxicidad, a su compatibilidad con el medio ambiente y a la posibilidad de que un insecticida a base de algunos de estos AEs, podrían aceptarse para su uso en ambientes relacionados a la preparación, almacenamiento y dispensación de alimentos. El hecho de que algunos de los AEs más activos sean hasta 10 veces menos efectivos que los insecticidas de referencia (DDVP y deltametrina), sugiere que debiera usarse hasta 10 veces más sustancias para igual control. Si bien siempre es preferible usar menores dosis, consideramos que este aumento de dosis puede estar dentro de un margen aceptable, especialmente por una importante disminución de toxicidad, de problemas de residualidad y de alteraciones al medio ambiente.

Comparando la DL_{50} del AE más activo de plantas medicinales, *M. verticillata* ($DL_{50} = 0,5 \text{ mg/dm}^3$) con el más activo de las plantas comestibles, *C. sinensis*, ($DL_{50} = 3,9 \text{ mg/dm}^3$), se encontró que el AE de *M. verticillata* fue 7,8 veces más activo que el AE de la planta comestible.

De acuerdo al análisis cromatográfico, los componentes principales del AE de *M. verticillata* fueron: (4*R*)(+)-pulegona (69,70%) y mentona (12,17%). Mientras que en el AE de *H. multiflora* encontramos como componente principal la (4*R*)(+)-pulegona, en un 52,80% y en los AEs de *C. aurantium* y *C. sinensis* encontramos como componentes principales el (4*R*)(+)-limoneno, en un 94,07% y en un 92,47%, respectivamente. El componente principal del AE de *E. cinerea* fue 1,8-cineol en un 56,86 %.

5. Determinación de DL_{50} de Ts contra *M. domestica*

Como ya se dijo anteriormente, los AEs son mezclas de varios Ts. Teniendo en cuenta que la actividad biológica se debe a la interacción de un receptor o enzima, del organismo a controlar, con un compuesto activo, (Sheldon, 1993) podríamos esperar que uno o unos pocos Ts sean los responsables de la actividad mostrada por un determinado AE. Con la inquietud de poder determinar cual o cuales Ts están involucrados en la actividad de los AEs ensayados, nos propusimos evaluar la DL_{50} de los Ts mayoritarios a fin de compararlos luego con la actividad de sus correspondientes AE.

Se eligió el componente mayoritario por el simple hecho de que la probabilidad de encuentro de estos Ts con el blanco (la mosca) será mayor para el T mayoritario que para los demás componentes. De allí se deduce que es posible

que la actividad del T mayoritario pueda explicar la mayoría de la actividad del AE correspondiente. Por lo tanto se determinó la DL₅₀ de éstos y otros Ts con el fin de demostrar cual/es es/son el/los principio/s activo/s que opera/n en cada AE.

La toxicidad de los Ts¹ ensayados a 26° C y 30 minutos se muestra en la Tabla 6. Entre dichos Ts se encuentran también los isómeros ópticos de algunos Ts con el fin de tener una idea de la influencia de la quiralidad en la acción en estudio.

Tabla 6. DL₅₀ de terpenos determinada a 30 minutos y 26° C contra *Musca domestica*

Terpeno	DL ₅₀ en mg/dm ³ (95% CI)
<i>trans</i> -anetol	20,5 (3,9 - 107,1)
carvacrol	45,4 (17,1 - 120,8)
citronellal	8,1 (2,8 - 23,5)
1,8-cineol	3,3 (1,1 - 10,4)
eugenol	98,4 (0,2 - 55137,1)
(4 <i>R</i>)(+)-limoneno	6,2 (1,7 - 23)
(4 <i>S</i>)(-)-limoneno	5,0 (2,4 - 10,4)
linalol	13,6 (0,5 - 348,6)
mentona	8,6 (3,4 - 21,4)
mentol	> 100
(±)-α-pineno	11,5 (3,6 - 37,3)
(1 <i>R</i>)(+)α-pineno	12,1 (9,5 - 15,5)
(1 <i>S</i>)(-)α-pineno	8,9 (2,6 - 30,8)
(1 <i>S</i>)(-)β-pineno	6,4 (2,4 - 17,4)
(4 <i>R</i>)(+)-pulegona	1,7 (0,6 - 5,0)
(4 <i>S</i>)(-)-pulegona	1,8 (0,18 - 18,89)
α-terpineno	6,2 (2,8 - 13,7)
γ-terpineno	4 (1,5 - 10,9)
terpineol	36,8 (21,1 - 63,9)
timol	13 (2,4 - 28,7)

¹ Si bien *trans*-anetol y eugenol, químicamente no son considerados terpenos, han sido incluidos en los ensayos realizados por ser componentes principales de los AEs de *Pimpinella anisum* y *Syzygium aromaticum*, respectivamente. Esta justificación no se volverá a repetir en el resto de la tesis.

Los terpenos más activos fueron (4*R*)(+)-pulegona, (4*S*)(-)-pulegona, 1,8 cineol, (4*S*)(-)-limoneno y (4*R*)(+)-limoneno con una DL₅₀ de 1,7; 1,8; 3,3; 5 y 6,2 mg/dm³ respectivamente. Entre ellos, (4*R*)(+)-pulegona, 1,8 cineol y (4*R*)(+)-limoneno son los Ts mayoritarios de los AEs de *M. verticillata*, *E. cinerea* y *C. sinensis*, respectivamente.

Comparando la toxicidad de (4*R*)(+)-pulegona con la del AE de *M. verticillata*, observamos que la acción de este T explica parcialmente la actividad del AE, el cual es 3,4 veces más tóxico que su T mayoritario.

(4*R*)(+)-pulegona estuvo presente en los AEs de *M. verticillata* y *H. multiflora* en una importante proporción (69,7% y 52,8%, respectivamente) y en menor cantidad en los AEs de *L. turbinata* y *M. piperita* (3,6% y 2,6%, respectivamente). La proporción de pulegona en dichos AEs, mostró una buena correlación ($R^2 = 0,88$) (Graf. 1) con sus correspondientes DL₅₀ indicando que este compuesto está involucrado en la toxicidad de los aceites que lo contienen. Por lo tanto sugiere que pulegona es el componente activo principal en los AEs de *M. verticillata* y *H. multiflora* y contribuye a la toxicidad de *L. turbinata* y *M. piperita*, aún cuando su DL₅₀ es mayor que la de los AEs de *M. verticillata* y *H. multiflora*.

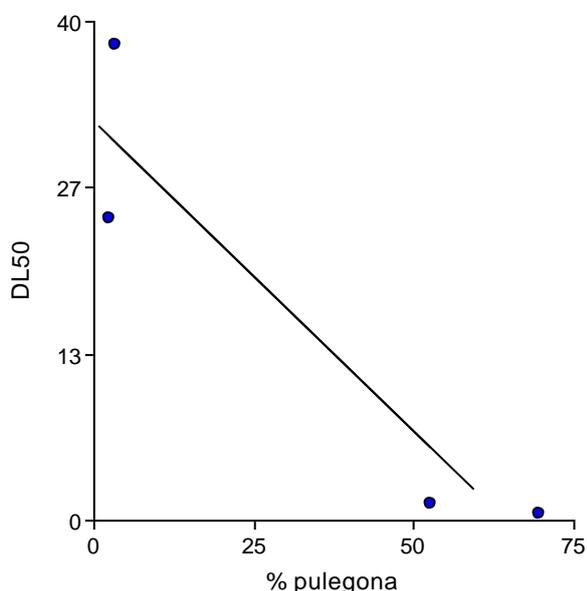


Gráfico 1. Correlación entre la DL₅₀ de AEs y su contenido de pulegona ($R^2 = 0,88$)

Pavela (2008) ha obtenido una DL₅₀ de 4,7 mg/dm³ (24 h) fumigando individuos de *M. domestica* con AE de *Menta pulegium* con un contenido de 83,3%

de pulegona, un valor elevado respecto a la DL_{50} de $0,5 \text{ mg/dm}^3$ que hemos encontrado para *M. verticillata* con casi un 70% de (4*R*)(+)-pulegona.

1,8-Cineol está presente en el AE de *E. cinerea*, *L. nobilis*, *P. boldus*, *R. officinalis*, *A. annua*, *L. floribunda*, *S. officinalis*, *M. piperita*, *L. officinalis* y *T. vulgaris* (en orden descendente de concentración). La proporción de 1,8-cineol en *E. cinerea* fue 56,86%, lo que significa que la DL_{50} de AE de *E. cinerea* contiene aproximadamente 3,14 mg de 1,8-cineol valor cercano a su $DL_{50} = 3,3 \text{ mg/dm}^3$. Esto sugiere que el 1,8-cineol es el componente activo principal en el AE de *E. cinerea*. Sin embargo, la presencia de 1,8-cineol en otros AEs no parecen influir en gran medida en la magnitud de sus respectivas DL_{50} , ya que la proporción de 1,8-cineol en los AEs no correlacionó ($R^2 = 0,25$) con las DL_{50} correspondientes (Graf. 2).

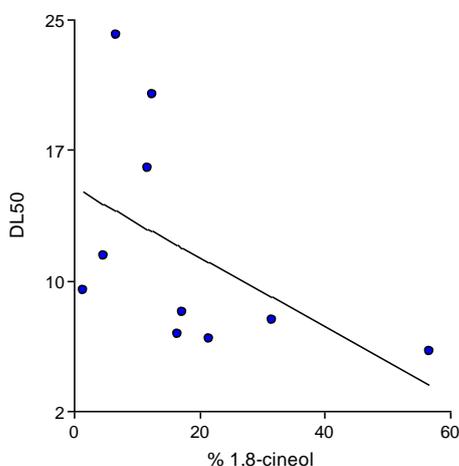


Gráfico 2. Correlación entre la DL_{50} de AEs y su contenido de 1,8-cineol ($R^2 = 0,25$)

γ -terpineno no es un componente mayoritario en alguno de los AEs estudiados, y a pesar de tener una DL_{50} baja, su presencia no parece influir en la acción de los AEs que los contienen ($R^2 = 0,01$), como son los AE derivados de *C. reticulata*, *C. limon*, *T. vulgaris*, *M. fragans*, *C. sativum*, *Origanum sp.*, *R. officinalis* y *L. nobilis* (Graf. 3).

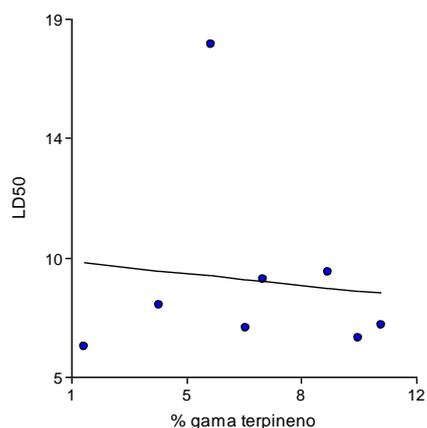


Gráfico 3. Correlación entre la DL_{50} de AEs y su contenido de γ -terpineno ($R^2 = 0,01$)

Comparando la DL_{50} del AE de los cítricos con la DL_{50} de (4*R*)(+)-limoneno, se desprende que el (4*R*)(+)-limoneno, podría ayudar a explicar la actividad de algunos de estos AEs, pero no de todos. Por ejemplo el AE de *C. sinensis* y de *C. aurantium* son más activos que el T aún cuando éste se encuentra en un 92,47 y 94,07%, respectivamente. El AE de *C. paradisi* con un 94,97% de (4*R*)(+)-limoneno presenta una DL_{50} de 6,8 mg/dm³; esta dosis contiene 6,55 mg de dicho T la cual es similar a la dosis letal media de (4*R*)(+)-limoneno. Por otra parte, no encontramos correlación entre la proporción de (4*R*)(+)-limoneno en los AEs que lo contienen y su DL_{50} ($R^2 = 0,14$) (Graf. 4).

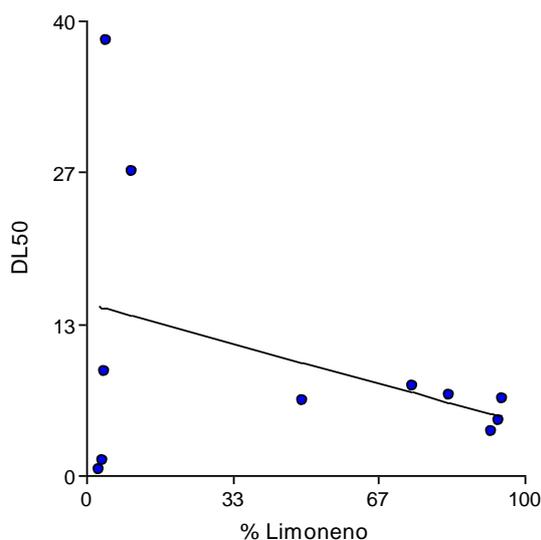


Gráfico 4. Correlación entre la DL_{50} de AEs y su contenido de (4*R*)(+)-limoneno ($R^2 = 0,14$)

La actividad de (1S)(-) β -pineno, citronelal, mentona, (1S)(-) α -pineno, (\pm) α -pineno, (1R)(+) α -pineno, timol, y linalol, se encuentra entre DL₅₀ entre 6,4 y 13,6 mg/dm³ (Tabla 6).

(1R)(+) α -pineno (DL₅₀ de 12,1 mg/dm³) es el componente mayoritario en el AE de *S. molle* (con un 19,92%) y además pareciera ser el responsable de la toxicidad de éste frente a moscas (LD₅₀ de 46,9 mg/dm³), ya que la cantidad de (1R)(+) α -pineno en la dosis letal 50 es de 9,34 mg, valor muy cercano al hallado en el cálculo de la DL₅₀ del T.

La DL₅₀ determinada para timol (13,0 mg/dm³) en éste estudio fue menor que la reportada por Rice & Coats, (1994), que encontró que la toxicidad fumigante de dicho T contra *M. domestica* a las 14 hs fue de 142 mg/dm³. El AE de *T. vulgaris* mostró una DL₅₀ relativamente baja (9,1 mg/dm³), mientras que el AE de orégano, que también contiene timol, fue mucho menos activo (DL₅₀ = 18 mg/dm³).

Si comparamos la DL₅₀ de los distintos Ts ensayados con la dosis letal media de deltametrina, (DL₅₀ = 0,6 mg/dm³) vemos que (4R)(+)-pulegona, es cerca de tres veces menos tóxica que deltametrina, lo cual habla del fuerte efecto que causa este T en las moscas. Si comparamos la DL₅₀ del 1,8-cineol con la DL₅₀ de deltametrina, observamos que aquella fue cinco veces mayor que la del producto sintético.

Este análisis se puede repetir con el DDPV, llegando a las mismas conclusiones dado las similitudes entre las DL₅₀ de deltametrina y de DDPV (0,5 y 0,6 mg/dm³ respectivamente).

6. Análisis multivariado

Como se mostró anteriormente, la actividad del T más abundante de la mayoría de los AE y en especial el T de los AEs más activos, no pudieron explicar la toxicidad mostrada por los AEs que salvo en el caso de *E. cinerea*, fueron más tóxicos que su terpeno más abundante. Esto puede deberse a que más de un T puede contribuir a la toxicidad de los AEs. También puede deberse a que algunos Ts minoritarios sinergizan a los mayoritarios. Como cada AE está constituido por más de 4 y hasta 18 o más Ts y sesquiterpenos, resulta difícil discernir cual de las otras sustancias están colaborando con la toxicidad del T mayoritario. Esto se podría medir en ensayos de componente por componente y sus combinaciones. Estos bioensayos serían muy numerosos y posiblemente requerirían la realización de ensayos de mezclas complejas lo cual aumenta más el número de experiencias.

Una alternativa que nos puede llevar a conocer si combinaciones de compuestos, son los responsables de provocar la muerte de las moscas, es el uso de herramientas estadísticas como el análisis multivariado.

El análisis multivariado es un método estadístico utilizado para determinar la contribución de varios factores en un simple evento o resultado (Johnson, 2000). En nuestro caso los factores serían los componentes de los AEs y el resultado es la mortalidad de las moscas. Dentro de las técnicas multivariadas elegimos el análisis del componente principal para analizar si algún T o grupo de Ts tenían mayor influencia en el efecto tóxico del AE. El análisis del componente principal (PCA) se utiliza para reducir el número de dimensiones de un conjunto de datos, y sirve para hallar las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia.

Para la realización del PCA correlacionamos las DL_{50} de cada AE con los componentes de los mismos. También se correlacionó las DL_{50} con los componentes ponderados según sus proporciones porcentuales, o reuniendo los AEs por sus familias botánicas.

En ningún caso encontramos correlación entre los componentes o grupos de ellos con la actividad presentada por los AEs. Por lo tanto interpretamos que la toxicidad de los AEs contra moscas, no necesariamente correlaciona con los componentes mayoritarios o minoritarios. No se observaron agrupaciones respecto a los componentes de los AEs, por lo que podemos pensar que no habría grupos de compuestos en los AEs, asociados con la mortalidad de las moscas. Agradecemos a la Ing. Agr. Gabriela Molina por su colaboración en este estudio.

7. Estudio de la influencia de la quiralidad en la actividad insecticida de algunos Ts

Del análisis de las DL_{50} de distintos pares de enantiómeros (Tabla 6) se desprende que el isómero (4S)(-)-pulegona, fue levemente menos activo que el isómero presente en el AE de *M. verticillata* y *H. multiflora*, (4R)(+)-pulegona. En el caso de limoneno, (4S)(-)-limoneno, fue un poco más activo que el isómero (4R)(+)-limoneno siendo este último el encontrado en los AEs de cítricos. Esta similitud en toxicidad indicaría que el sitio de acción de estos terpenos tendría una pobre discriminación enantiomérica.

(1S)(-)- α -pineno fue casi un 50% más activo que (1R)(+)- α -pineno. (DL de 8,9 y 12,1 mg/dm³, respectivamente) es decir que este T actuaría posiblemente en otro centro con mayor enantioselectividad.

8. Determinación de los TL₅₀ de AEs y Ts contra *M. domestica*

Otro parámetro que sirve para evaluar la efectividad de un insecticida es el tiempo letal 50 ya que informa la capacidad de volteo y/o la toxicidad del compuesto en función del tiempo. En consecuencia calculamos los TL₅₀ de los AEs los cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. TL₅₀ determinados a 10 µL/dm³ de aceites esenciales contra *Musca domestica* a 26 °C

AEs	TL ₅₀ en minutos (95% CI) a una dosis de 10 µL/dm ³
<i>Aloysia citriodora</i>	39 (28 – 54) ¹
<i>Artemisia annua</i>	27 (20 – 35)
<i>Dysphania ambrosioides</i>	40 (31 – 52)
<i>Citrus aurantifolia</i>	34 (24 – 47)
<i>Citrus aurantium</i>	18 (14 - 22)
<i>Citrus limon</i>	24 (15 - 38)
<i>Citrus paradisi</i>	27 (19 - 36)
<i>Citrus reticulata</i>	35 (23 - 52)
<i>Citrus sinensis</i>	13 (4 - 35)
<i>Coriandrum sativum</i>	34 (23 - 47)
<i>Eucalyptus cinerea</i>	17 (8 - 36)
<i>Hedeoma multiflora</i>	12 (9 - 15)
<i>Laurus nobilis</i>	24 (19 - 31)
<i>Lavandula officinalis</i>	35 (25 - 47)
<i>Lepechinia floribunda</i>	37 (29 - 45) ¹
<i>Lippia turbinata</i>	38 (29 - 50) ³
<i>Melissa officinalis</i>	31 (10 - 95) ³
<i>Mentha piperita</i>	35 (28 - 42) ¹
<i>Minthostachys verticillata</i>	11 (3 - 32)
<i>Myristica fragans</i>	30 (18 – 48)
<i>Ocimum basilicum</i>	31 (23 - 40)
<i>Origanum sp.</i>	32 (25 - 42) ¹
<i>Peumus boldus</i>	21 (10 - 42)
<i>Pimpinella anisum</i>	37 (24 - 57) ¹
<i>Rosmarinus officinalis</i>	39 (28 - 54)

<i>Salvia officinalis</i>	28 (19 - 42) ¹
<i>Schinus molle</i>	37 (25 - 54) ³
<i>Syzygium aromaticum</i>	75 (0.2 - 28000) ²
<i>Tagetes minuta</i>	30 (25 - 37) ³
<i>Thymus vulgaris</i>	54 (12 - 232)

¹ se determinó TL₅₀ a una dosis de 20 µL/dm³; ² se determinó TL₅₀ a una dosis de 35 µL/dm³; ³ se determinó TL₅₀ a una dosis de 50 µL/dm³.

Los TL₅₀ determinados a dosis de 10 µL/dm³ (que para la mayoría de los AEs equivalen a un valor entre 8 y 9 mg/dm³) mostraron valores de entre 11 y 18 minutos para los 5 AEs más activos. El menor tiempo lo mostró el AE de *M. verticillata* con un TL₅₀ de 11 minutos, seguida por el AE de *H. multiflora* y *C. sinensis* con un TL₅₀ igual a 12 y 13 minutos, respectivamente. Luego se encuentran el AE de *E. cinerea* y *C. aurantium* siendo efectivos a 17 y 18 minutos respectivamente. Los AEs restantes mostraron los siguientes TL₅₀: *P. boldus* 21 minutos, *C. limon* y *L. nobilis* 24 minutos, *C. paradisi* y *A. annua* 27 minutos, *M. fragans* 30 minutos, *O. basilicum* 31 minutos, *C. aurantifolia* y *C. sativum* 34 minutos, *L. officinalis* y *C. reticulata* 35 minutos, *R. officinalis* 39 minutos, *D. ambrosioides* 40 minutos, *T. vulgaris* 54 minutos.

Debido a que algunos AEs no fueron lo suficientemente efectivos para matar moscas, a 10 µL/dm³, realizamos experimentos a dosis más elevadas.

Utilizando una dosis de 20 µL/dm³ el AE de *S. officinalis*, *Origanum sp.*, *M. piperita*, *L. floribunda* y *P. anisum* y *A. citriodora*, mostraron un valor de 28, 32, 35, 37 y 39 minutos respectivamente.

Otros AEs evaluados a 50 µL/dm³, como los de *T. minuta*, *M. officinalis*, *S. molle* y *L. turbinata*, mostraron una TL₅₀ de 30, 31, 37 y 38, minutos respectivamente.

De igual manera se determinó el TL₅₀ de los Ts, cuyos resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. TL₅₀ determinados a 10 µL/dm³ de terpenos contra *Musca domestica* a 26 °C

terpeno:	TL ₅₀ en minutos (95% CI) a una dosis de 10 µL/dm ³
<i>trans</i> -anetol	28 (21 - 36) ³
carvacrol	30 (21 - 41) ⁴
1,8-cineol	21 (9 - 46) ¹
citronellal	31 (21 - 45) ²
eugenol	67 (18 - 252) ⁴
(4 <i>R</i>)(+)-limoneno	29 (24 - 35)
(4 <i>S</i>)(-)-limoneno	16 (9 - 27)
mentona	32 (23 - 46)
linalol	33 (27 - 40)
mentol	60 (38 - 94) ⁵
(±)α-pineno	30 (9 - 100)
(1 <i>R</i>)(+)α-pineno	80 (29 - 221)
(1 <i>S</i>)(-)α-pineno	11 (0.47 - 246) ³
(1 <i>S</i>)(-)β-pineno	32 (22 - 47)
(4 <i>R</i>)(+)-pulegona	11 (6 - 22) ²
(4 <i>S</i>)(-)-pulegona	20 (15 - 26) ¹
α-terpineno	37 (18 - 76) ²
γ-terpineno	22 (19 - 26)
terpineol	78 (36 - 169)
timol	32 (21 - 48) ²

¹ se determinó el TL a una dosis de 3 µL/dm³; ² se determinó el TL a una dosis de 7 µL/dm³; ³ se determinó el TL a una dosis de 20 µL/dm³; ⁴ se determinó el TL a una dosis de 50 µL/dm³; ⁵ se determinó el TL a una dosis de 65 µL/dm³

Debido a que ciertos terpenos ensayados mostraron alto poder insecticida a dosis bajas, algunos fueron ensayados a 3 µL/dm³, luego fuimos aumentando la dosis en función de la actividad. Con esta dosis se ensayaron (4*S*)(-)-pulegona y 1,8-cineol, resultando el TL₅₀ igual a 20 y 21 minutos, respectivamente.

(4*R*)(+)-pulegona, citronellal, timol y α-terpineno, se ensayaron a 7 µL/dm³ manifestando un TL₅₀ de 11, 31, 32 y 37 minutos respectivamente.

Con una dosis de 10 $\mu\text{L}/\text{dm}^3$ resultó ser efectivo el terpeno (4S)(-)-limoneno, γ -terpineno, (4R)(+)-limoneno, (\pm) α -pineno, mentona, (1S)(-) β -pineno, linalol, terpineol y (1R)(+) α -pineno, siendo sus TL_{50} de 16, 22, 29, 30, 32, 32, 33 78 y 80 minutos respectivamente.

De igual manera, pero a una dosis de 20 $\mu\text{L}/\text{dm}^3$ se calculó el tiempo letal medio de (1S)(-) α -pineno y *trans*-anetol con 11 y 28 minutos, respectivamente.

Carvacrol y eugenol fueron efectivos a los 30 y 67 minutos respectivamente, a una dosis de 50 $\mu\text{L}/\text{dm}^3$.

Y por último el que demostró menor efectividad fue mentol con 60 minutos a una dosis de 65 $\mu\text{L}/\text{dm}^3$.

9. Selección de tres AEs con mayor potencialidad como fumigantes para *M. domestica*

Por todo lo expuesto podemos decir que los AEs más activos corresponden a *M. verticillata*, *H. multiflora*, *C. sinensis*, *C. aurantium* y *E. cinerea*. De ellos hemos seleccionado *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinerea* como los más promisorios y hemos descartado el AE de *H. multiflora* y el de *C. aurantium*, por los siguientes motivos. El tomillo de las sierras (*H. multiflora*), es una planta no cultivada, que crece espontáneamente en ciertos lugares de nuestras sierras y por lo tanto su obtención como materia prima para producir el AE es dificultosa; al no ser plantas domesticadas, no se las encuentra generalmente sembradas para la explotación comercial. Además es una planta de pequeño porte, tan solo unos 8 a 10 cm de altura, y con escasa masa foliar.

En el caso de la naranja amarga (*C. aurantium*) también se trata de una especie no cultivada para la explotación comercial, siendo su uso como ornamental. Muy diferente es el caso de la naranja dulce (*C. sinensis*) cuya importante producción es de público conocimiento. Debido a esto y ante la presencia de plantas cuyos AEs contengan un mismo T mayoritario, preferimos utilizar la que presenten más posibilidades para una futura explotación. Por lo tanto seleccionamos el AE de *M. verticillata*, de *C. sinensis* y el de *E. cinerea*, para realizar otras evaluaciones en vista a desarrollar un fumigante para moscas.

10. Estudio de sinergismo

Si bien en este estudio se han encontrado AEs (de *M. verticillata* y *C. sinensis* y *E. cinerea*) con DL₅₀ iguales o cercanas a la de los insecticidas sintéticos usados como referencia (deltametrina y DDPV), sería importante poder encontrar AEs o mezclas de éstos con mayor actividad a la ya encontrada en éste estudio. Un resultado de éste tipo tendría incidencia en la disminución de las dosis, lo cual significa una disminución en los costos de un insecticida en base a estos AEs, como así también una disminución en el efecto aromático que viene asociado a los AEs. Aunque el olor de la mayoría de los AEs resulta agradable, es de suponer que una permanencia sostenida en el tiempo de algún olor podría tornarse desagradable. Debemos tener en cuenta que los olores que nos rodean afectan nuestra comodidad, a lo largo de nuestras vidas, ya que pueden evocar instantáneamente escenas y emociones del pasado. Los olores activan la memoria episódica pues recrean un entorno del pasado que permite reconstruir escenas y episodios (Masaoka *et al.*, 2012).

Con el objeto de observar posibles sinergismos, se combinaron los AEs de *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinerea* a dosis inferiores a su DL₅₀ para facilitar la observación de posibles efectos sinérgicos. La variable usada para determinar la presencia de sinergismo, fue la TL₅₀ de la mezcla de AEs o Ts.

10.1. Determinación de la toxicidad de mezclas de AE de *M. verticillata* y *C. sinensis* o de sus terpenos mayoritarios

La TL₅₀ de AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis* a dosis iguales a la mitad de sus DL₅₀ fue >240 min para los dos casos (Tabla 9).

La mezcla de *M. verticillata* con el AE de *C. sinensis* en dosis de 0,25 y 1,85 mg/dm³ de aire, respectivamente, mostró un TL₅₀ de 65 minutos, notablemente menor al observado para ambos AEs por si solos, a sus respectivas dosis (Tabla 9).

Tabla 9. TL₅₀ de AE de *Minthostachys verticillata* y *Citrus sinensis* y sus respectivos T mayoritarios frente a *Musca domestica*

Fumigante	Dosis (mg/dm ³ de aire)	TL ₅₀ en minutos (interv. confianza)
<i>M. verticillata</i>	0,25	> 240

<i>C. sinensis</i>	1,85	> 240
<i>M. verticillata</i> / <i>C. sinensis</i>	0,25 / 1,85	65 (26 - 163)
(4 <i>R</i>)(+)-pulegona	0,85	32 (15 - 69)
(4 <i>R</i>)(+)-limoneno	2,70	> 240
(4 <i>R</i>)(+)-pulegona / (4 <i>R</i>)(+)-limoneno	0,85 / 2,70	22 (8 - 71)

En el gráfico 5 se presenta la mortalidad de las moscas causada por los AEs por separado y la mezcla de ellos en función del tiempo, como también la curva sumatoria de las mortalidades causadas por cada AE.

Si se analiza el nivel de mortalidad en función del tiempo para esta mezcla de AEs y la comparamos con la mortalidad provocada por los AEs por si solos, observamos que el efecto ejercido por cada AE es significativamente menor que la mortalidad provocada por la mezcla (Gráfico 5). También se puede observar que la suma de la mortalidad causada por cada AE (lo cual puede indicar el nivel del efecto si consideramos que la interacción es solo aditiva), es también menor a la que ocurre cuando se administran en conjunto los AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis*. El hecho de que la sumatoria de las mortalidades inducida por cada AE sea menor a la mortalidad observada para la mezcla, indica claramente una acción sinérgica entre ambos AEs.

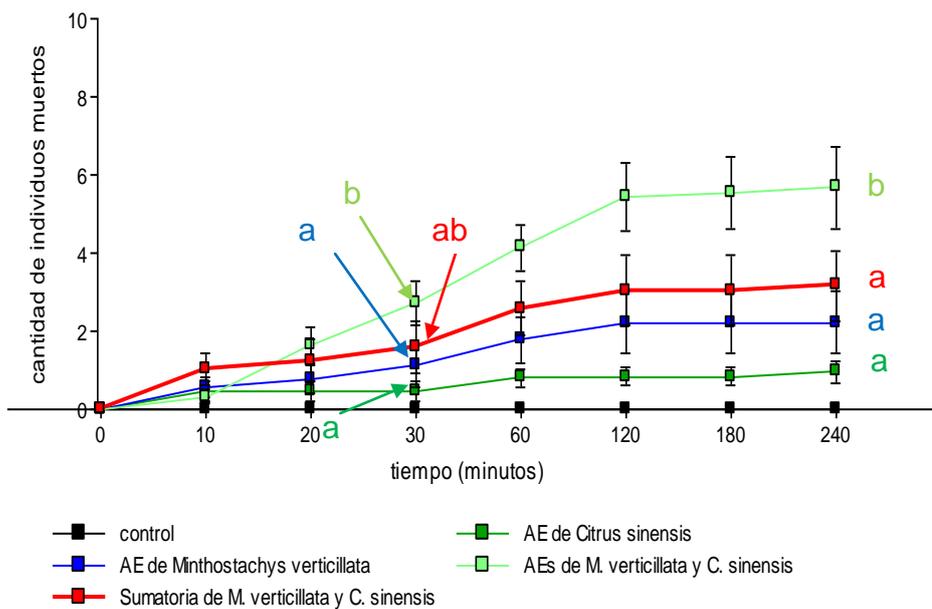


Gráfico 5. Mortalidad de *Musca domestica* expuesta a AEs de *Minthostachys verticillata* ($0,25 \text{ mg/dm}^3$ de aire), *Citrus sinensis* ($1,85 \text{ mg/dm}^3$ de aire), mezcla de ambos AEs y la sumatoria de ambos AEs. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$, test de Dunn)

El análisis de la varianza (ANOVA) a 30 y 240 minutos mostró diferencias significativas, indicando que la mezcla de ambos AEs es distinta, respecto a cada AE por separado y a la sumatoria de ambos AEs.

También se analizó el efecto sinérgico mediante la construcción de isobogramas. Los isobogramas, nos permiten visualizar e interpretar la actividad resultante de la asociación entre dos sustancias (AE_A y AE_B), indicando la sinergia entre ellas, si existiera (Gráfico 6). Primeramente se calcula los FIC (de sus siglas en inglés, índice de concentración inhibitoria fraccionada) de cada AE relacionando el TL_{50} de la mezcla de los AEs con el TL_{50} de cada uno de los AEs y se grafican las FIC una en función de la otra. Los puntos A y B indican los valores de FIC al 100% de AE_A y AE_B ($FIC = 1$) (Gráfico 6) mientras que la FIC de la mezcla puede tener distintas ubicaciones en el gráfico. Los resultados se interpretan de la siguiente manera, la línea continua (azul) es la línea de aditividad o de no interacción. Si el resultado cae sobre esta línea, estamos ante el caso de una mezcla que necesita tener la mitad de cada AE para ser efectiva (índice $FIC = 1$) y sugiere que cada AE actúa de manera independiente. Si el valor resultante coincide con la línea de puntos

cóncava y se acerca al origen de los ejes (índice FIC < 1) indica una interacción sinérgica de potenciación entre el AE_A y el AE_B e indica que cada AE acentúa mutuamente su actividad. Si el valor resultante coincide sobre la línea de puntos convexa y se aleja del origen de los ejes (índice FIC > 1) indica un isoblograma de interacción antagónica entre el AE_A y el AE_B. El índice FICI es la sumatoria de valores de FIC correspondiente a cada AE. Un índice FICI menor a 1 indica que existe sinergia de potenciación entre los AEs; si el FICI es cercano a 1, indica que no hay interacción entre los AEs, es decir, cada uno actúa como si estuviera solo; mientras que si el FICI tiene un valor cercano a 2, indica un antagonismo, es decir, la mezcla entre ellos reduce su actividad insecticida (López-Malo *et al.*, 2006).

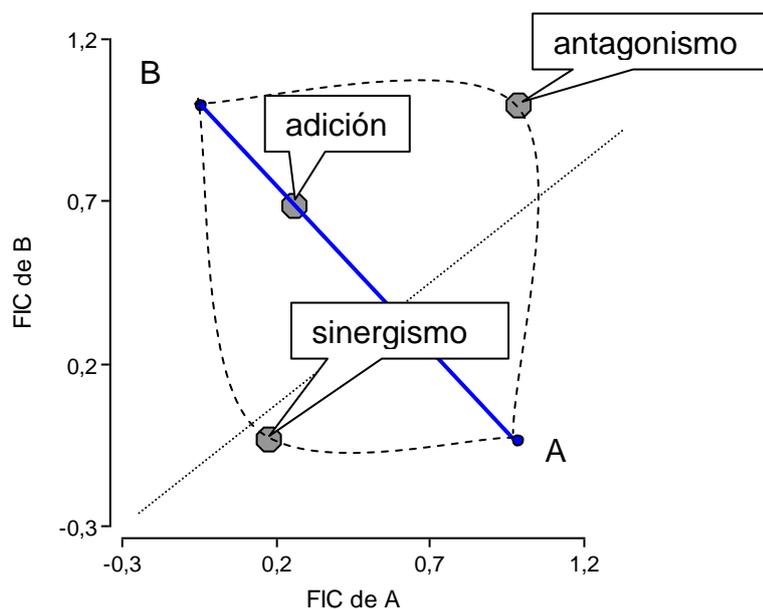


Gráfico 6. Isoblograma de referencia

Para visualizar si existe sinergismo en los AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis* se calcularon los FIC y FICI correspondientes y se graficó el isoblograma. Para calcular la FIC de los AE era necesario disponer de la TL₅₀ que, como ya indicamos, no se determinó exactamente debido a que el avance de la mortalidad era muy lento a la pequeña dosis usada en el ensayo. Por lo tanto se hizo una aproximación y se consideró a la TL₅₀ de los AEs igual a 240 min. Si bien este valor es menor al verdadero, nuestra estimación de sinergismo será en defecto, pero no en exceso lo cual sería engañoso. La FIC calculada para los AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis* fue de 0,025 en ambos casos correspondiendo un FICI de 0,050 (Tabla 10)

Tabla 10. Valores calculados de TL₅₀, FIC y FICI para los AEs de *Minthostachys verticillata*, *Citrus sinensis* y la mezcla de ambos AEs

AE	TL ₅₀ (minutos)	FIC	FICI
<i>M. verticillata</i>	240	0,025	0,050
<i>C. sinensis</i>	240	0,025	
mezcla de ambos AEs	65		

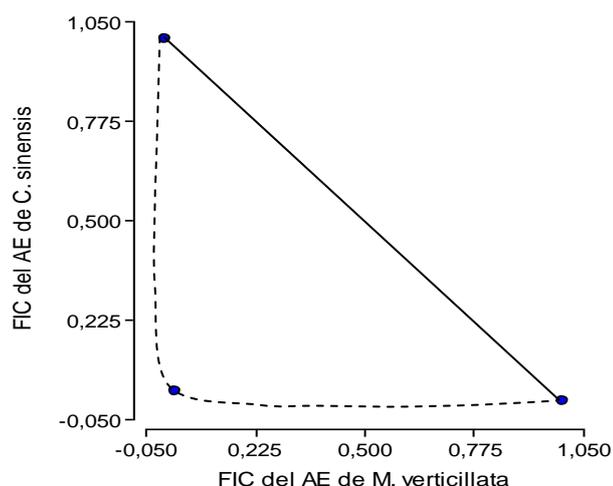


Gráfico 7. Isoblograma entre los AEs de *Minthostachys verticillata* y *Citrus sinensis*

Mediante el correspondiente isoblograma, se visualiza que la mezcla de ambos AEs muestra un claro sinergismo, respecto de los AEs por separado, indicando que cada AE acentúa mutuamente su actividad.

Podemos entonces asegurar que la cantidad de moscas muertas por la mezcla de AEs *M. verticillata* y *C. sinensis*, es significativamente mayor a la cantidad de moscas muertas por cada AE por separado a igual dosis lo cual es coherente con un efecto sinérgico.

Cuando se evaluó la mezcla de los Ts (4*R*)(+)-pulegona y (4*R*)(+)-limoneno se observó que en conjunto tienen un efecto insecticida levemente menor que la sumatoria de la mortalidad provocada por cada AE por separado (gráfico 8, línea roja).

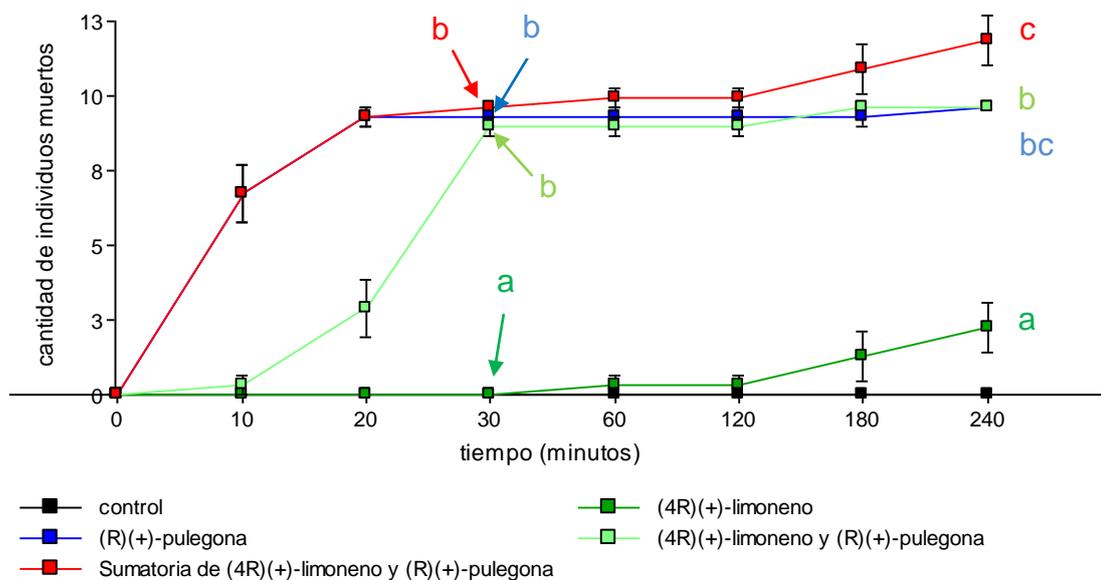


Gráfico 8. Mortalidad de *Musca domestica* expuesta a terpenos (4R)(+)-pulegona (0,85 mg/dm³ de aire) y (4R)(+)-limoneno (2,70 mg/dm³ de aire), la mezcla de ambos terpenos y la sumatoria de ambos Ts. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$, test de Dunn)

El análisis de la varianza a los 30 minutos indicó que el (4R)(+)-limoneno, tiene un comportamiento diferente al resto. Mientras que a 240 minutos la (4R)(+)-pulegona tiene un comportamiento similar a la mezcla y a la sumatoria de ambos Ts y ambos son distintos respecto a (4R)(+)-limoneno.

Al calcular los valores de FIC para este experimento se observa que (4R)(+)-limoneno sufre mayor influencia por la presencia de (4R)(+)-pulegona que esta última (Tabla 11) mientras que el valor de FICI fue 0,77.

Tabla 11. Valores calculados de TL₅₀, FIC y FICI para de los Ts (4R)(+)-pulegona, (4R)(+)-limoneno y la mezcla de ambos Ts

Terpeno	TL ₅₀ (minutos)	FIC	FICI
(4R)(+)-pulegona	32	0,6875	0,77
(4R)(+)-limoneno	240	0,09	
mezcla de ambos Ts	22		

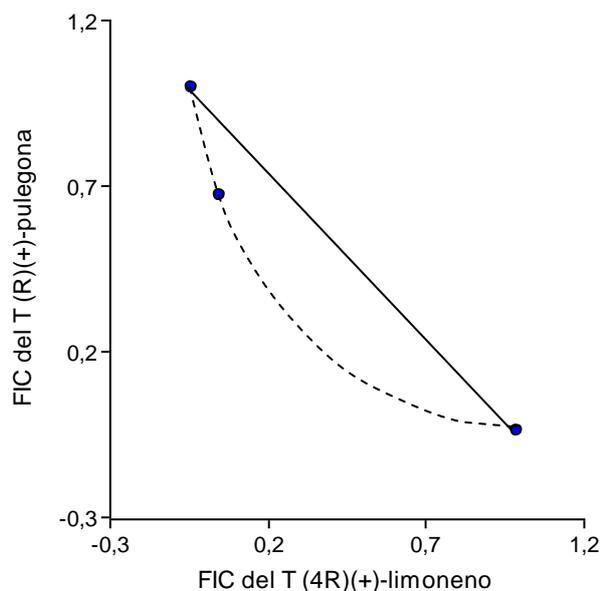


Gráfico 9. Isoblograma entre los Ts (4R)(+)-pulegona y (4R)(+)-limoneno a 240 minutos

Podemos observar mediante el correspondiente isoblograma, que los Ts (4R)(+)-pulegona y (4R)(+)-limoneno, muestran un leve efecto sinérgico, respecto de los Ts por separado. Podemos entonces asegurar que la cantidad de moscas muertas por la mezcla de (4R)(+)-pulegona / (4R)(+)-limoneno, es algo mayor a la cantidad de moscas muertas por (4R)(+)-pulegona, a igual dosis, aunque esta diferencia no es significativa.

10.2. Determinación de la toxicidad de mezclas de AE de *M. verticillata* y *E. cinerea* o de sus terpenos mayoritarios

El TL₅₀ del AE de *M. verticillata* a 0,25 mg/dm³ juntamente con el AE de *E. cinerea* a una dosis de 1,89 mg/dm³, fue mayor a 240 minutos, tiempo similar al observado para ambos AEs por si solos a sus respectivas dosis (Tabla 12).

De manera semejante ensayamos por separado y en conjunto los Ts (4R)(+)-pulegona y 1,8-cineol. 1,8-cineol presentó un TL₅₀ mayor de 240 minutos a 2,61 mg/dm³ de aire (Tabla 12). Mientras que la mezcla de estos dos Ts a las dosis indicadas mató el 50% de los individuos a los 16 minutos, siendo éste valor la mitad del observado para (4R)(+)-pulegona y mucho menor que el del 1,8-cineol (Tabla 12).

Tabla 12. TL₅₀ de AE de *Minthostachys verticillata* y *Eucalyptus cinerea* y sus respectivos T mayoritarios frente a *Musca domestica*

Fumigante	Dosis (mg/dm ³ de aire)	TL ₅₀ en minutos (interv. confianza)
<i>M. verticillata</i>	0,25	> 240
<i>E. cinerea</i>	1,89	> 240
<i>M. verticillata</i> / <i>E. cinerea</i>	0,25 / 1,89	>240
(4 <i>R</i>)(+)-pulegona	0,85	32 (15 - 69)
1,8-cineol	2,61	> 240
(4 <i>R</i>)(+)-pulegona / 1,8- cineol	0,85 / 2,61	16 (9 - 28)

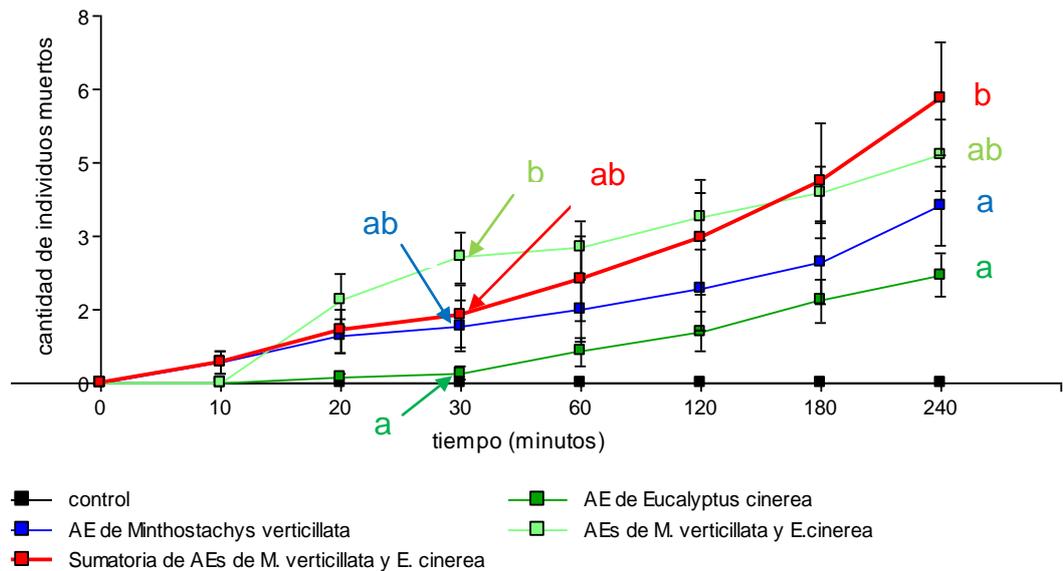


Gráfico 10. Mortalidad de *Musca domestica* expuesta AEs de *Minthostachys verticillata* (0,25 mg/dm³ de aire) y *Eucalyptus cinerea* (1,89 mg/dm³ de aire), la mezcla de ambos AEs y la sumatoria de ambos AEs. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$, test de Dunn)

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró que la mezcla de AEs de *M. verticillata* y *E. cinerea* tiene a los 30 minutos un comportamiento similar a la sumatoria de cada AE por separado (gráfico 10, línea roja), Mientras que la mezcla de ambos AEs se comporta distinto que cada AE por separado.

A 240 minutos mostró que hay una diferencia significativa entre cada AE y la mezcla y la sumatoria de ellos. Todo esto parece indicar una leve sinergia entre los AEs de *M. verticillata* y *E. cinerea*. Sin embargo, como no se pudo determinar la TL₅₀ de la mezcla no fue factible realizar el isoblograma correspondiente, que nos ayudaría a verificar esta sinergia.

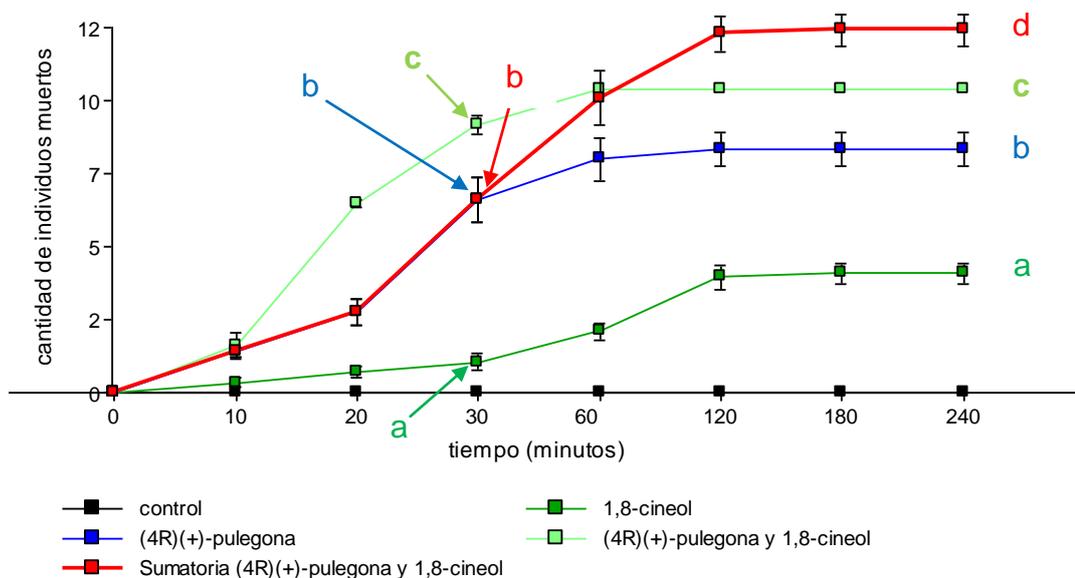


Gráfico 11. Mortalidad de *Musca domestica* expuesta a los terpenos (4R)(+)-pulegona (0,85 mg/dm³ de aire) y 1,8-cineol (2,61 mg/dm³ de aire), mezcla de ambos terpenos y la sumatoria de ambos Ts. Letras diferentes indican diferencias significativas (p>0,05, test de Dunn)

Se observó que la mezcla de los Ts (4R)(+)-pulegona y 1,8-cineol tiene un efecto insecticida mayor, que la sumatoria de la mortalidad provocada por cada T por separado (gráfico 12, línea roja) hasta los 30 minutos. A tiempos mayores (30-240 minutos) no es factible hacer esta comparación debido a que la sumatoria de la mortalidad provocada por cada T ($\Sigma = 12$), supera el número de moscas por ensayo (n = 10) resultando sin sentido la comparación de la curva sumatoria con la curva correspondiente a la mezcla de ambos aceites.

El análisis de ANOVA a 30 minutos nos muestra que la mezcla de ambos Ts tiene un comportamiento distinto al resto de los Ts y la sumatoria de ambos. Y a 240 minutos, indica que cada Ts y la mezcla de ambos Ts tienen un comportamiento diferente.

Tabla 13. Valores calculados de TL₅₀, FIC y FICI de los Ts (4R)(+)-pulegona, 1,8-cineol y la mezcla de ambos Ts

Terpeno	TL ₅₀ (minutos)	FIC	FICI
(4R)(+)-pulegona	32	0,5	0,506
1,8-cineol	240	0,006	
mezcla de ambos Ts	16		

Analizando el mismo ensayo mediante el isoblograma correspondiente, éste indica que los Ts (4R)(+)-pulegona y 1,8-cineol, muestran un efecto sinérgico, respecto de los dos Ts por separado.

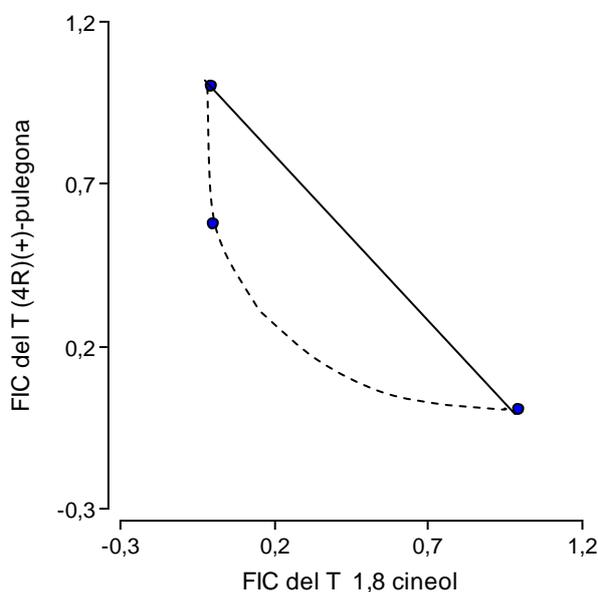


Gráfico 12. Isoblograma entre los Ts (4R)(+)-pulegona y 1,8-cineol

10.3. Determinación de la toxicidad de mezclas de AE de *E. cinerea* y *C. sinensis* o de sus terpenos mayoritarios

Al calcular el TL₅₀ de *E. cinerea* a una dosis de 1,89 mg/dm³ de aire, más el AE de *C. sinensis* en una dosis de 1,85 mg/dm³ de aire, se observó un TL₅₀ de 138 minutos, notablemente menor a la observada para ambos AEs por si solos a sus respectivas dosis (Tabla 14).

Tabla 14. TL₅₀ de AE de *Eucalyptus cinerea*, *Citrus sinensis* y sus respectivos T mayoritarios frente a *Musca domestica*

Fumigante	Dosis (mg/dm ³ de aire)	TL ₅₀ en minutos (interv. confianza)
<i>E. cinerea</i>	1,89	> 240

<i>C. sinensis</i>	1,85	> 240
<i>E. cinerea</i> / <i>C. sinensis</i>	1,89 / 1,85	138 (52 - 366)
1,8-cineol	2,61	> 240
(4 <i>R</i>)(+)-limoneno	2,70	> 240
1,8-cineol / (4 <i>R</i>)(+)-limoneno	2,61 / 2,70	76 (17 - 352)

De igual modo se ensayó por separado y en conjunto los Ts 1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno, obteniéndose para 1,8-cineol y para (4*R*)(+)-limoneno un TL₅₀ mayor a 240 minutos para ambos T a 2,61 y 2,70 mg/dm³ de aire, respectivamente (Tabla 14). Pero la mezcla de estos dos Ts, a las dosis indicadas, mató el 50% de los individuos a los 76 minutos (Tabla 14).

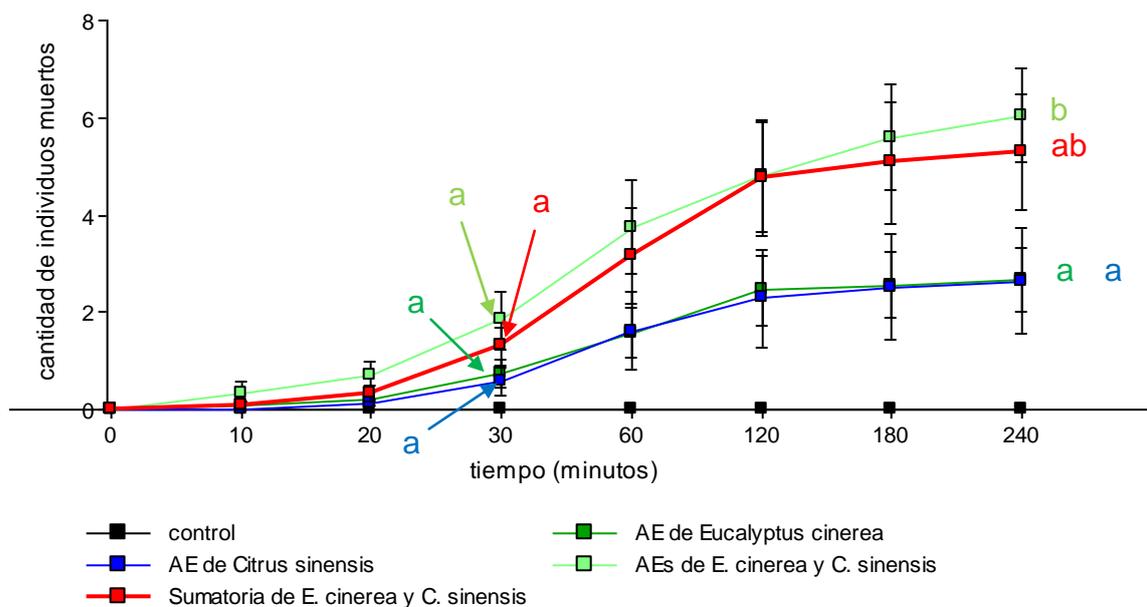


Gráfico 13. Mortalidad de *Musca domestica* expuesta AEs de *Eucalyptus cinerea* (1,89 mg/dm³ de aire), *Citrus sinensis* (1,85 mg/dm³ de aire), la mezcla de ambos AEs y la sumatoria de ambos AEs. Letras diferentes indican diferencias significativas (p>0,05 test de Dunn)

Se observa que la mezcla de AEs de *E. cinerea* y *C. sinensis*, tiene a los 240 minutos un efecto insecticida mayor que la sumatoria de la mortalidad provocada por cada AE por separado (gráfico 13, línea roja), aunque el análisis de ANOVA no indica que haya diferencias significativas.

Tabla 15. Valores calculados de TL₅₀, FIC y FICI para los AEs de *Eucalyptus cinerea*, *Citrus sinensis* y la mezcla de ambos AEs

AE	TL ₅₀ (minutos)	FIC	FICI
<i>E. cinerea</i>	240	0,575	1,150
<i>C. sinensis</i>	240	0,575	
mezcla de ambos AEs	138		

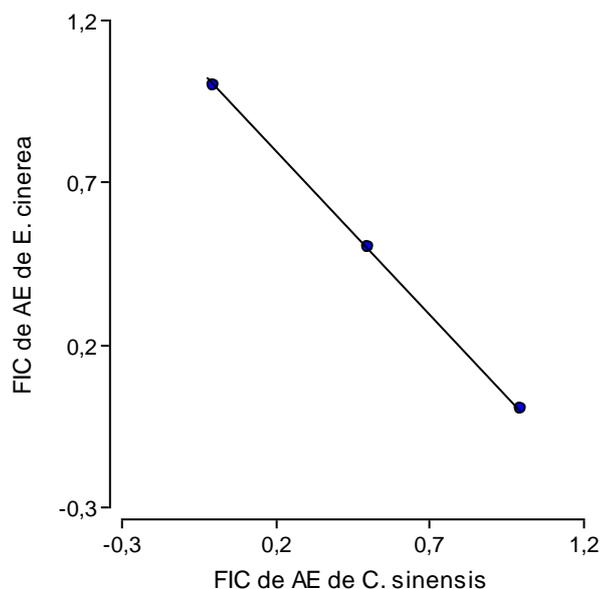


Gráfico 14. Isoblograma entre los AEs de *E. cinerea* y *C. sinensis*

De acuerdo al correspondiente isoblograma, la mezcla de ambas AEs muestra un efecto aditivo.

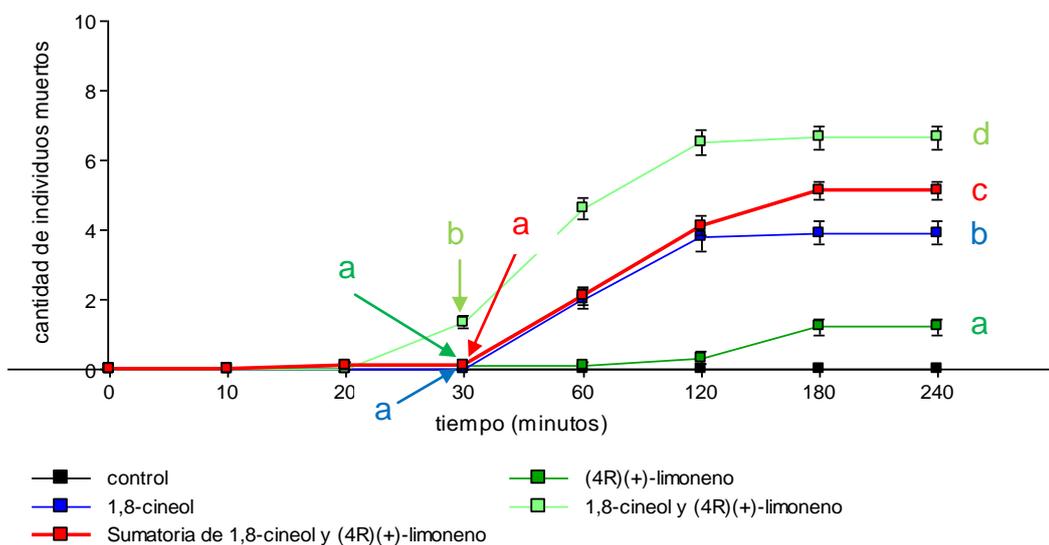


Gráfico 15. Mortalidad de *Musca domestica* expuesta a los terpenos 1,8-cineol ($2,61 \text{ mg/dm}^3$ de aire), (4R)(+)-limoneno ($2,70 \text{ mg/dm}^3$ de aire), mezcla de ambos terpenos y la sumatoria de ambos Ts. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p > 0,05$ test de Dunn)

Se observó que la mezcla de los Ts 1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno a los 30 minutos tiene un efecto insecticida mayor que la sumatoria de la mortalidad provocada por cada T por separado (gráfico 15, línea roja), manteniendo esta tendencia hasta el final del ensayo (240 minutos).

Estadísticamente observamos que a 30 minutos la mezcla de ambos Ts tiene un comportamiento distinto a 1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno y a la sumatoria de ambos. Mientras que a 240 minutos se observa que cada T estudiado, la mezcla de ambos y la sumatoria de ellos, se comportan de manera distinta.

Tabla 16. Valores calculados de TL₅₀, FIC y FICI para los Ts 1,8-cineol, (4*R*)(+)-limoneno y la mezcla de ambos Ts

Terpeno	TL ₅₀ (minutos)	FIC	FICI
1,8-cineol	240	0,29	0,58
(4 <i>R</i>)(+)-limoneno	240	0,29	
mezcla de ambos Ts	70		

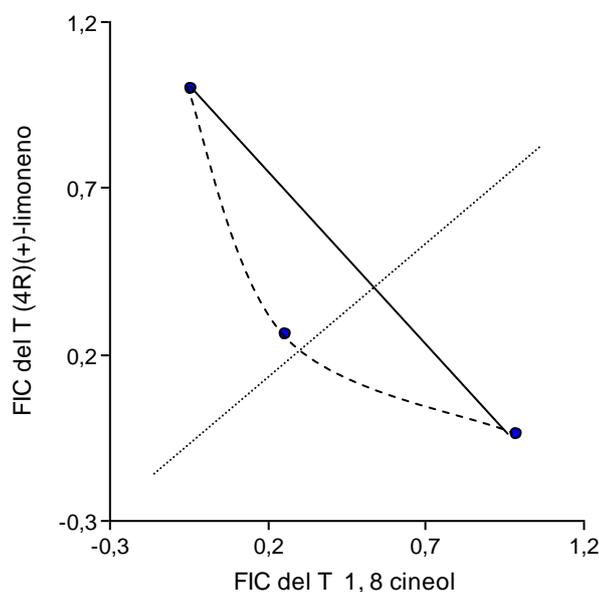


Gráfico 16. Isoblograma entre los Ts 1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno a 240 minutos

De acuerdo al correspondiente isoblograma, los Ts 1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno, muestran un efecto levemente sinérgico, respecto de los otros dos Ts por separado. Podemos entonces asegurar que la cantidad de moscas muertas por la

mezcla de los Ts 1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno, es mayor a la cantidad de moscas muertas por el T por separado a igual dosis.

Podemos resumir estos resultados diciendo que las mezclas de AEs de:

-*M. verticillata* y *C. sinensis*, muestran un claro sinergismo, respecto de los AEs por separado, indicando que cada AE acentúa la actividad del otro.

-*M. verticillata* y *E. cinerea* muestran una leve sinergia.

-*E. cinerea* y *C. sinensis* muestra un efecto aditivo.

En cuanto a las mezclas de terpenos nuestros estudios indican que:

-(4*R*)(+)-pulegona y (4*R*)(+)-limoneno, muestran un leve efecto sinérgico, respecto de los Ts por separado.

-(4*R*)(+)-pulegona y 1,8-cineol, muestran un claro efecto sinérgico.

-1,8-cineol y (4*R*)(+)-limoneno, muestran un efecto levemente sinérgico.

Estas conclusiones son validas solo para las dosis estudiadas.

11. Formulación del producto

Uno de los objetivos propuestos es esta tesis fue formular un producto insecticida que resulte factible de elaborar, aplicando todo lo investigado en la presente tesis doctoral.

Durante el desarrollo de éste estudio, luego de haber ensayado 30 aceites esenciales, tres de ellos fueron seleccionados debido a su poder insecticida, AEs de *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinérea*, siendo el AE de *M. verticillata* marcadamente superior a los otros dos.

También en el avance de la tesis demostramos la presencia de sinergia entre los AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis*, siendo esta una ventaja considerable al momento de efectuar una formulación, ya que nos permite utilizar menor cantidad de AE, para lograr un mismo efecto. Por tal motivo decidimos realizar dos formulaciones, una en base a AE de *M. verticillata*, y otra en base a mezclas entre los AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis* (Tabla 17)

Tabla 17. Formulaciones propuestas para realizar un desarrollo comercial

Formulación	AE de <i>M. verticillata</i>	AE de <i>C. sinensis</i>
A	20%	--
B	10%	5%

Se realizó una formulación simple donde los AEs se suspendieron en una solución de un emulsionante (polisorbato Tween 20) en agua. La preparación tiende a separarse en dos fase pero la emulsión se restablece al agitar la misma. Para salvar éste inconveniente los AEs se disolvieron solo en alcohol isopropílico. Esta solución resultó muy adecuada, logrando una disolución total de los AEs en forma estable.

Los ensayos realizados fumigando las moscas con alcohol isopropílico, como control del solvente, en todos los casos mostraron que ese solvente no afecta las moscas.

Nos avocamos luego a la evaluación de las mismas formulaciones en sistemas abiertos y con un mayor número de individuos de *M. domestica*.

12. Ensayos en sistema abierto

Las formulaciones A y B fueron ensayadas sobre 100 individuos de *M. domestica* en un sistema abierto. El mismo consistió en tener confinadas las 100 moscas en una jaula entomológica cuyas caras eran de *voile* para permitir el pasaje del aire. Los resultados obtenidos se representan en el gráfico 17.

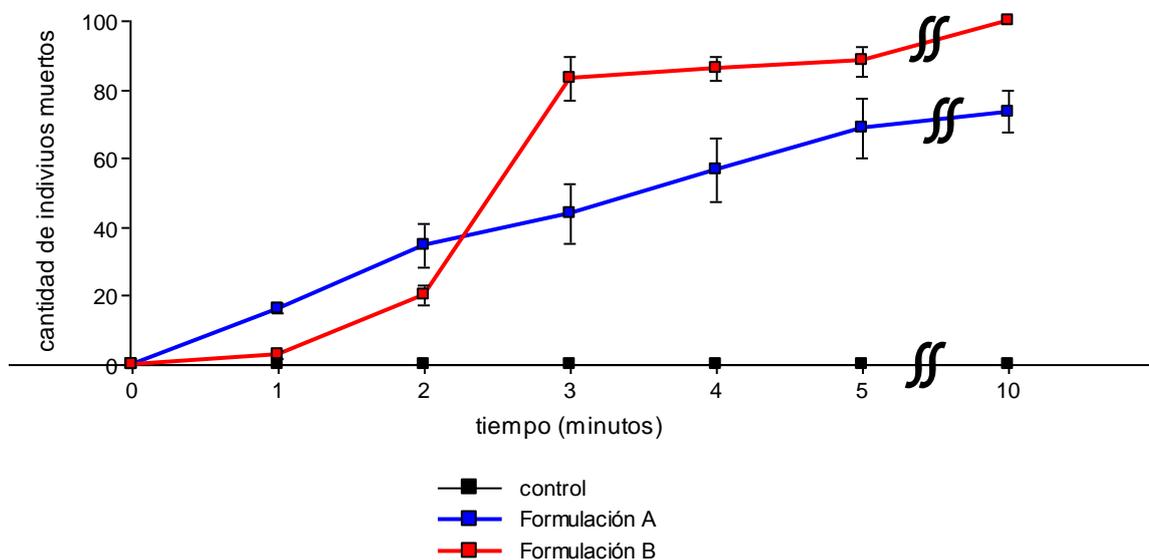


Gráfico 17. Cantidad de moscas muertas por minuto de ensayo según dos formulaciones de AEs

Como indican los resultados mostrados en el gráfico 17, ya al primer minuto después del tratamiento, se observa cerca del 20% de mortalidad de las moscas

fumigadas con la Formulación A, alcanzando la muerte del 75% de los individuos a los 10 minutos. La Formulación B si bien fue un poco más lenta en los dos primeros minutos para provocar la muerte de las moscas, a partir de los 3 minutos consigue matar un 80 % de las moscas. Llegando al 100% de muertes a los 10 minutos. La mezcla de AEs de *M. verticillata*/*C. sinensis* fue más efectiva que el AE de *M. verticillata*. Estos resultados muestran la eficiencia de los AEs para producir la muerte de las moscas también en sistemas abiertos.

13. Evaluación del costo económico del producto

Por último realicé una evaluación de la factibilidad económica para la producción de fumigantes a base de AE de *M. verticillata* y de AEs de *M. verticillata* y *C. sinensis*. Este análisis no pretende ser un estudio acabado de los costos de producción de los fumigantes propuestos sino simplemente evaluar la incidencia de los AE en un supuesto costo de los productos. Para ello consideramos que el producto final debería tener un valor cercano a la de los insecticidas domésticos que ofrece el mercado, lo cual lo estimamos realizando un relevamiento de los productos en venta.

Para determinar el precio de los AE de *M. verticillata* y *C. sinensis* se tomaron los precios internacionales citados por Lubbe & Verpoorte en 2011. Estos autores publicaron un artículo sobre el cultivo de plantas medicinales y aromáticas para uso industrial. Si bien en el mismo, no figura el AE de *M. verticillata*, por ser una planta sudamericana, de importancia regional, tomamos el precio del AE de pepermint (*Mentha piperita*) por la similitudes que presenta esta hierba con *M. verticillata* (cultivo, tamaño, rendimiento del AE) infiriendo que su costo podría llegar a ser similar en un futuro.

Para establecer el precio de insecticidas del mercado dirigidos al uso domiciliario, realizamos un relevamiento del precio y composición de los insecticidas disponibles contra moscas. El mismo fue hecho en Julio de 2012, en supermercados y ferreterías de la ciudad de Córdoba, buscándose productos comerciales para uso hogareño. Las marcas, contenido neto, composición química y precios, se detallan en la tabla 18 y 19.

Tabla 18. Resultados del relevamiento de insecticidas en aerosol, contra mosca domestica

Marcas	cont. neto (g)	% comp. insecticida (gramos totales)	precio
Fuyi	230	permetrina 0,0736% (0,17 g) d-tetrametrina 0,0752% (0,17 g)	11.-
Selton	307	d-tetrametrina 0,125% (0,38 g) permetrina 0,10% (0,31 g)	6,50
Raid	222	tetrametrina 0,35% (0,78 g) d-aletrina 0,10% (0,22 g) d-fenotrina 0,125% (0,28 g)	13.-
Raid doble acción	230	permetrina 0,10% (0,23 g) tetrametrina 0,35% (0,81 g) d-aletrina 0,10% (0,23 g)	12.-
Raid casa y jardín	313	d-fenotrina 0,125% (0,39 g) praletrina 0,10% (0,31 g) base acuosa	15.-
PROMEDIOS	260 gramos	0,14 % (0,36 g)	\$ 11,50

Tabla 19. Resultados del relevamiento de insecticidas en pulverizadores manuales a gatillo, contra mosca domestica

Huagro Ciper LPU	500 mL	cipermetrina 0,05 % (0,25 g)	\$ 55.-
K-othrina LPU	500 mL	deltametrina 2,5 % (12,59 g)	\$ 21.-

El promedio del costo del aceite de pepermint, que varía según su procedencia, es de 28 € (equivalente a 159,32\$; 1€ = 5,69 \$, febrero/2012) por Kg y el AE de *C. sinensis* en promedio figura con un valor de 3 € (equivalente a 17,07\$) por Kg (Lubbe & Verpoorte, 2011)

También consultamos con algunas empresas que se dedican a la obtención de aceites esenciales en nuestra provincia. Las mismas no siempre disponen de los

aceites esenciales solicitados, pero lo pueden producir a pedido. La droguería Todo Droga nos cotizó el AE de naranjas dulces a \$ 81.- el kg.

De producirse un insecticida, para su comercialización con estas formulaciones, se podría pensar en cultivar las plantas de peperina (*M. verticillata*), en forma intensiva, ya que está probado que su reproducción *in vitro* o mediante semillas tiene muchas posibilidades de éxito, logrando así un cultivo de forma sustentable en campo o bien en invernaderos (Ojeda, 2004). De esta manera, también se podría evitar depender de las fluctuaciones propias de la recolección de plantas silvestres en nuestras sierras. No ocurre lo mismo con el AE de naranja (*C. sinensis*) que tiene otras varias aplicaciones en la producción de bebidas, golosinas, etc. por lo que su mercado es mucho más estable.

Como hemos indicado, podríamos considerar el valor de un Kg de AE de peperina (*M. verticillata*) en 159 \$, en este caso los 20 gramos de AE de la formulación A (al 20%) tendría un costo de 3,18 \$. Mientras que en la formulación B la contribución de AE de *M. verticillata* (al 10%) tendría un costo de 1,59 \$. Si hacemos el mismo cálculo de costo para los 5 gramos de AE de *C. sinensis*, (al 5%), a un valor de 17 \$ el Kg nos proyecta un valor de 0,09 pesos por cada 100 ml del formulado.

O sea que el valor estimado para el ingrediente activo de un insecticida de 200 mL sería de 6,36 y 3,36 \$, para la formulación A y B respectivamente.

Estos costos de la materia prima sobre un producto final que oscila entre los 11 y 15 pesos permitirían perfectamente ofrecer al mercado un producto competitivo en calidad y precio para la formulación B. La formulación A podría resultar en un producto más caro respecto a los que se encuentran en el mercado o bien se deberá trabajar en la producción de peperina para abaratar sus costos.

14. Toxicidad de *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinerea*

Finalmente haré un pequeño resumen de lo conocido sobre la toxicidad de los AE seleccionados y de sus Ts

Hasta donde sabemos, no hay una determinación de la toxicidad oral del AE de *M. verticillata* en ratas, ni de su toxicidad por inhalación, lo que sería el parámetro más apropiado a considerar con el fin de evaluar el riesgo de usar AE de *M. verticillata* como fumigante.

El AE de *M. verticillata* no es citotóxica *in vitro* ni cito-genotóxico *in vivo*, tanto a concentraciones bajas y altas y por lo tanto parece ser seguro como agente terapéutico (Escobar *et al.*, 2012).

No se han determinado LC₅₀ de los AE de *C. sinensis* ni de *E. cinerea*.

Debido a los escasos trabajos científicos existentes que indiquen algún grado de toxicidad de estas plantas estudiadas, incluiremos información sobre algunos de sus terpenos constitutivos.

El Comité Científico Europeo en alimentos (2002) ha afirmado que pulegona, componente principal de *M. verticillata*, que posee una DL₅₀ oral aguda en ratas de 470 mg/Kg (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002). La Unión Europea ha establecido niveles máximos de pulegona en los productos alimenticios y fijó en 25 mg/kg en los productos alimenticios en general; 100 mg/kg en las bebidas; 250 mg/kg en las bebidas de menta o con sabor a menta y hasta 350 mg/kg en menta para confitería (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002). Además, pulegona es reconocido como seguro, al ser incluido como sustancia GRAS, por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002).

Limoneno, componente principal de *C. sinensis*, es reconocido como componente seguro por la International Agency for Research on Cancer (International Agency for Research on Cancer, 1993). También ha sido declarado sustancia GRAS (Food and Drug Administration, 2009). También posee una moderada toxicidad aguda siendo su DL₅₀ entre 100 y 6.000 mg/kg en ratas, dependiendo de la ruta de administración. Se ha publicado que concentraciones de hasta 100 µM, no tenían efectos adversos, mientras que concentraciones por encima de 500 µM eran altamente tóxicas para las células pulmonares humanas, ensayadas *in vivo* (Rolseth *et al.*, 2002).

La LD₅₀ oral en ratas para 1,8-cineol fue indicada en 1560 mg/kg y de 2480 mg/kg en un estudio del Comité Científico Europeo en Alimentos (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002). Otros estudios de toxicidad subaguda de 1,8-cineol comunicados hasta ahora en ratas y ratones sugieren que los ratones fueron menos susceptibles que las ratas a 1,8-cineol. De hecho, después de alimentación forzada, se encontró que este T era tóxico para las ratas macho a dosis superiores a 600 mg/kg, mientras que no se observó efecto en los ratones hasta 1200 mg/kg (De Vincenzi *et al.*, 2002).

Para 1,8-cineol, se ha asignado provisionalmente una ingesta diaria tolerable de 0,2 mg/kg de peso corporal (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002). Cuando se evaluó el 1,8-cineol como sustancia aromatizante, fue clasificada en la categoría B, que pertenece a la categoría de las sustancias aromatizantes que se pueden utilizar provisionalmente en los productos alimenticios, pero indicando que se necesitaba más información para fijar una opinión firme sobre su seguridad. El Comité Científico Europeo en Alimentos ha propuesto niveles superiores de 0,1 mg/kg en las bebidas y 5 mg/kg en el alimento con la excepción de 15 mg/kg en los dulces y confitería y 50 mg/kg en las bebidas alcohólicas (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002).

Además, 1,8-cineol ha sido considerado como sustancia GRAS por la Flavoring Extract Manufacturers' Association (FEMA) y ha sido aprobado por la FDA para uso alimentario (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002). Los paneles de asesores de la FDA para la revisión del exceso de medicamentos de venta libre, han concluido que 1,8-cineol es seguro para una variedad de productos, tales como pastillas tomadas cada 0,5 a 1 hora a 0,2 a 15 mg o tomadas cada 2 horas a 1 a 30 mg de 1,8-cineol (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002).

1,8-cineol administrado como un aerosol en ratas, induce el citocromo P-450 del hígado pero no de los pulmones (De Vincenzi *et al.*, 2002). Los mismos autores indican dosis para seres humanos, en administración oral, de 0,005 a 0,2 ml, (correspondientes a entre 46 y 184 mg, respectivamente, de aceite esencial); 1% gotas por vía intranasal; una cucharadita en un vaporizador de vapor caliente para la inhalación, como ungüento entre 0,5 y 3% y 0,3 a 0,6 g de aceite de eucalipto/día. Las concentraciones máximas de 1,8-cineol en los productos cosméticos de 0,4% de jabón, 0,04% en detergentes, 0,1% en cremas y lociones y 1,6% en perfume (Comité Científico Europeo en Alimentos, 2002).

De acuerdo a la información precedente los AE de *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinerea* serían sustancias de baja o nula toxicidad para humanos lo cual permite un amplio margen de seguridad al ser usados como insecticidas para moscas.

15. Bibliografía del capítulo

Adam, K. *et al.* (1998). Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils

- against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (5): 1739-1745.
- Agency for Toxic Substance and Disease Registry, A. (1997) Clorpirifos.
- Angioni, A. *et al.* (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem.* 52 (11): 3530-3535.
- ANMAT, A. N. d. M. A. y. T. M. (2008) Productos domisanitarios Disposición 2659/2008. On line.
http://www.anmat.gov.ar/retiros/mayo/Disposicion_ANMAT_2659-2008.pdf.
- Argyropoulou, C. *et al.* (2007). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 831-837.
- Babu, G. D. K. & Singh, B. (2009). Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. *Biochemical Engineering Journal* 44 (2-3): 226-231.
- Bakkali, F. *et al.* (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2): 446-475.
- Banchio, E. *et al.* (2007). Changes in composition of essential oils and volatile emissions of *Minthostachys mollis*, induced by leaf punctures of *Liriomyza huidobrensis* *Biochemical Systematics and Ecology* 35 (2): 68-74.
- Banchio, E. *et al.* (2005). Quantitative Variations in the Essential Oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in Response to Insects with Different Feeding Habits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (17): 6903-6906.
- Batish, D. R. *et al.* (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256 (12): 2166-2174.
- Ben Farhat, M. *et al.* (2009). Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian Cultivated *Salvia officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (21): 10349-10356.
- Berenbaum, M. & Neal, J. (1985). Synergism between myristicin and xanthotoxin, a naturally co-occurring plant toxicant. *J. Chem. Ecol.* (11): 1349 -1358.
- Bidawid, S. P. *et al.* (1978). The role of non-biting flies in the transmission of enteric pathogens (*Salmonella* species and *Shigella* species) in Beirut, Lebanon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 117-121.
- Binikumar, B. K. & Gill, K. D. (2010). Cellular and molecular mechanisms of *dichlorvos* neurotoxicity: Cholinergic, noncholinergic, cell signaling, gene

- expression and therapeutic aspect. *Indian Journal of Experimental Biology* 48: 697 - 709.
- Bluma, R. V. & Etcheverry, M. G. (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25 (2): 324-334.
- Capinera, J. L. (2008). House Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) *Encyclopedia of Entomology*, Springer Science+Business Media B.V. On line. <http://books.google.com.ar/>.
- Coats, J. R. *et al.* (1991). Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. *ACS Symposium Series* 449. Naturally Occuring Pest Bioregulators. Hedin, P. A. Washington, DC, USA: 306-316.
- Comité Científico Europeo en Alimentos (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on eucalyptol. On line: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out126_en.pdf, 1 - 10.
- Comité Científico Europeo en Alimentos (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on pulegone and menthofuran. On line: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out133_en.pdf, 1 - 18.
- Chamorro, E. R. *et al.* (2008). Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers *Journal of the Argentine Chemical Society* 96 (1-2): 80-86.
- Daly, H. V. *et al.* (1998). *Introduction to insect biology and diversity*. Oxford New York, Oxford University Press
- de Andrade, I. L. *et al.* (2004). Chemical Composition and Insecticidal Activity of Essential Oils from *Vanillosmopsis pohlii* Baker against *Bemisia argentifolii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (19): 5879-5881.
- De Jesús, A. J. *et al.* (2004). Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) *Int. J. Food Microbiol.* 93: 259-262.
- De Vincenzi, M. *et al.* (2002). Constituents of aromatic plants: eucalyptol. *Fitoterapia* 73 (3): 269-275.
- Díaz-Maroto, M. C. *et al.* (2005). Volatile Components and Key Odorants of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oil Extracts Obtained by Simultaneous Distillation–Extraction and Supercritical Fluid Extraction. *J. Agric. Food Chem.* 53 (13): 5385–5389.

- Dong, L. *et al.* (2007). Gas chromatography-mass spectrometry following pressurized hot water extraction and solid-phase microextraction for quantification of eucalyptol, camphor and borneol in *Chrysanthemum* flowers. *J. Sep. Sci.* 30: 86-89.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308–316.
- Echeverria, P. *et al.* (1983). Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl Environ Microbiol* 46: 32-36.
- EPA, E. P. A. (2006). Interim Reregistration Eligibility Decision for Dichlorvos (DDVP) On line. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/ddvp_ired.pdf
- Escobar, F. M. *et al.* (2012). Lack of cytotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: Studies in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology* 50 (9): 3062-3067.
- Ezeonu, F. C. *et al.* (2001). Insecticidal properties of volatile extracts of orange peels. *Biores. Technol.* 76: 273-274.
- Fernández, E. A. *et al.* (2007). Estudio del aceite esencial de *Hedeoma multiflorum* Benth. (Lamiaceae) “Peperina de las lomas” obtenido de poblaciones naturales en la provincia de San Luis *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 6 (5): 246-247.
- Fichas Internacionales de Seguridad Química, F. I. N. d. S. e. H. e. e. T. (2001). Cipermetrina, ICSC: 0246.
- Food and Drug Administration, F. D. A. (2009) CFSAN/Office of Food Additive Safety disponible en: <http://www.foodsafety.gov/~rdb/opa-gras.html>.
- Forster, M. *et al.* (2007). Pilot studies on synantropic flies (e.g. *Musca*, *Sarcophaga*, *Calliphora*, *Fania*, *Lucilia*, *Stomoxys*) as vectors of pathogenic microorganisms *Parasitol Res* 101: 243-246.
- Fortin, M. *et al.* (2008). Biological monitoring of exposure to pyrethrins and pyrethroids in a metropolitan population of the Province of Quebec, Canada. *Environmental Research* 107: 343–350.
- Frank, C. *et al.* (1995). GC-IRMS in the Authenticity Control of the Essential Oil of *Coriandrum sativum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (6): 1634-1637.
- Fukushima, H. *et al.* (1979). Role of the fly in the transport of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* 38: 1009–1010.

- García del Pino, F. *et al.* (2009). Estudio de la utilización del insecticida organofosforado clorpirifós en espacios urbanos. *Revista de Salud Ambiental, Sociedad Española de Sanidad Ambiental. Volumen IX, Monográfico 1: 1-20.*
- Gershezon, J. *et al.* (2000). Regulation of monoterpene accumulation in leaves of Peppermint. *Plant. Physiology* 122: 205–213.
- Gillij, Y. G. *et al.* (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99 (7): 2507-2515.
- Gleiser, R. & Zygadlo, J. (2007). Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 101 (5): 1349-1354.
- Go, V. *et al.* (1999). Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ. Health Perspect.* 107: 173-177.
- Graczyk, T. *et al.* (2001). The role of nonbiting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect* 3: 231-235.
- Graham, J. P. *et al.* (2009). Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Sci Total Environ* 407: 2701-2710.
- Gullan, P. J. & Cranston, P. S. (2010). *The insects, an outline of entomology.* Hong Kong, Willey Blackwell
- Hewitt, C. G. (2011). *The House-Fly : Musca domestica Linn.* New York (USA), Cambridge University Press. On line. <http://books.google.com.ar>
- Hill, D. S. (2002). *Pests of stored food stuffs and their controls.* Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers
- Hummelbrunner, L. A. & Isman, M. B. (2001). Acute, Sublethal, Antifeedant, and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49: 715-720.
- Hyang-Sook, C. (2006). Lipolytic Effects of Citrus Peel Oils and Their Components. *J. Agric. Food Chem.* 54 (9): 3254–3258.
- International Agency for Research on Cancer (1993). d-Limonene. IARC: 307-327.
- İşcan, G. *et al.* (2002). Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils *J. Agric. Food Chem.* 50 (12): 3943–3946
- Ishaaya, I. *et al.* (2007). *Insecticides Design Using Advanced Technologies*

- Isman, M. B. & Machial, C. M. R., M., Carpinella, M.C., Eds.; Elsevier (2006).
Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in Phytomedicine*. Amsterdam, The Netherlands: 29-44.
- Jaggi, S. *et al.* (2001). Leaching of Pesticides in Tea Brew. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5479-5483.
- Jang, Y.-S. *et al.* (2005). Vapor Phase Toxicity of Marjoram Oil Compounds and Their Related Monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (20): 7892-7898.
- Johnson, D. E. (2000). Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Mexico, DF
- Karpouthis, I. *et al.* (1998). Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 46 (4): 1694.
- Kaul, P. P. *et al.* (1996). Fenvalerate-induced alterations in circulatory thyroid hormones and calcium stores in rat brain *Toxicology Letters* 89: 29-33.
- Khan, A. R. & Huq, F. (1978). Disease agents carried by flies in Dacca city. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 4: 86-93.
- Kilic, A. *et al.* (2004). Volatile Constituents and Key Odorants in Leaves, Buds, Flowers, and Fruits of *Laurus nobilis* L. *J. Agric. Food Chem.* 52 (6): 1601–1606.
- Lachowicz, K. J. *et al.* (1996). Characteristics of Essential Oil from Basil (*Ocimum basilicum* L.) Grown in Australia *J. Agric. Food Chem.* 44 (3): 877–881.
- Lee, S. *et al.* (1997). Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and housefly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 883-892.
- López-Malo, A. *et al.* (2006). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Hocking, A. D., Springer Ed. 571: 261-286.
- Lopez, P. *et al.* (2005). Solid- and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (17): 6939-6946.
- Lubbe, A. & Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products* 34: 785– 801.

- Lucia, A. *et al.* (2009). Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of Eucalyptus essential oils. *Bioresource Technology* 100 (23): 6083-6087.
- Malik, A. *et al.* (2007). House Fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. *J Environ Sci Health Part B* 42: 453-469.
- Manrique-Saide, P. C. & Delfín-González, H. (1997). Importancia de las moscas como vectores potenciales de enfermedades diarreicas en humanos. *Rev Biomed* 8: 163-170.
- Masaoka, Y. *et al.* (2012). Remembering the past with slow breathing associated with activity in the parahippocampus and amygdala. *Neuroscience Letters* 521 (2): 98-103.
- Mimica-Dukic, N. *et al.* (2004). Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (9): 2485-2489.
- Ministerio de Agricultura Ganaderia y Pesca (2005). Agroquímicos prohibidos o restringidos. disponible en:<http://www.minagri.gov.ar/SAGPyA/agricultura/tabaco/03=Informes/02-Publicaciones/ archivos/000004-Publicaciones y Estudios Especiales/000009 Agroquimicos%20prohibidos%20o%20restringidos.pdf?PHPSESSID=7402fd6c012d1fab1b499f4a5a92ca6e>
- Misharina, T. *et al.* (2009). Antioxidant properties of essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45 (6): 642-647.
- Misra, G. & Pavlostathis, S. G. (1997). Biodegradation kinetics of monoterpenos in liquid and in soil-slurry system. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 572–577.
- Mohottalage, S. *et al.* (2007). Components from Sri Lankan Piper betle L. leaf oil and their analogues showing toxicity against the housefly, *Musca domestica*. *Flavour Frag. J.* 22: 130-138.
- Nerio, L. S. *et al.* (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101 (1): 372-378.
- Njoroge, S. M. *et al.* (2005). Volatile Constituents of Redblush Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Pummelo (*Citrus grandis*) Peel Essential Oils from Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (25): 9790-9794.
- Njoroge, S. M. *et al.* (2003). Changes of the Volatile Profile and Artifact Formation in Daidai (*Citrus aurantium*) Cold-Pressed Peel Oil on Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (14): 4029-4035.

- O'Malley, M. (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet* 349: 1161–1166.
- Ojeda, M. S. (2004). Avances en la domesticación de la Peperina (*Minthostachys mollis*) una especie aromática de la Argentina. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) 9: 1-3
- Olsen, A. R. (1998). Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric diseases. *Regul Toxicol Pharmacol* 28: 199-211.
- Olsen, A. R. *et al.* (2001). Regulatory Action Criteria for Filth and Other Extraneous Materials V. Strategy for Evaluating Hazardous and Nonhazardous Filth. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33: 363–392.
- Olsen, A. R. & Hammack, T. S. (2000). Isolation of *Salmonella* spp. from the Housefly, *Musca domestica* L., and the Dump Fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at Caged-Layer Houses. *Journal of Food Protec* 63 (7): 958-960.
- Omolo, M. O. *et al.* (2004). Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* 65: 2797–2802.
- Organizacion Mundial de la Salud (2009) Chlorpyrifos. On line:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/154.htm>.
- Organización Mundial de la Salud (1998) Deltamethrin. On line.
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/205.htm>.
- Organización Mundial de la Salud (2010) Deltamethrin. On line:
http://www.who.int/whopes/quality/Deltamethrin_eval_specs_WHO_Jan_2010.pdf
- Organización Mundial de la Salud, O. (2009). The WHO recommended classification of pesticides by hazard, International Programme on Chemical Safety. . On line. http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf.
- Pathak, N. *et al.* (2000). Larvicidal action of essential oils from plants against the vector mosquitoes *Anopheles stephensi* (Liston), *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (L.). *Journal International Pest Control* 42 (2): 53-55.
- Pavela, R. (2008). Insecticidal properties of several essential oils to the House Fly (*Musca domestica* L.). *Phytotherapy Res.* 22: 274-278.
- Pavela, R. *et al.* (2009). Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 105: 1365 - 1370.

- Pospischil, R. *et al.* (2005). Proceedings of the Fifth International Conference on Urban Pests. Malaysia, Perniagaan Ph'ng @ P&Y Design Network
- Regnault-Roger, C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Rev.* 2: 25-34.
- Rice, P. J. & Coats, J. R. (1994). Structural requirements for monoterpenoid activity against insects. In: *Bioregulators for crop protection and pest control ACS Symposium Series 557*, s. E. H., P.A. Washington, D.C., USA.: 92-108.
- Rodrigues, V. M. R., P. T. V.; Marques, M. O. M.; Petenate, A. J.; Meireles, M. A. A. (2003). Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (6): 1518-1523.
- Rohloff, J. (1999). Monoterpene Composition of Essential Oil from Peppermint (*Mentha x piperita* L.) with Regard to Leaf Position Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47 (9): 3782–3786.
- Rolseth, V. *et al.* (2002). Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells. *Toxicology* 170 (1–2): 75-88.
- Ruberto, G. *et al.* (1997). Essential Oil of Two New Pigmented Citrus Hybrids, *Citrus clementina* x *Citrus sinensis*. *J. Agric. Food Chem.* 45 (2): 467-471.
- Sangwan, N. S. *et al.* (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3 - 21.
- Santos, A. C. A. d. *et al.* (2010). Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. *Rev. bras. farmacogn.* 20 (2): 154-159.
- Scott, J. G. *et al.* (2000). Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. *Pest Manag. Sci.* 56: 147-153.
- Seo, S.-M. *et al.* (2009). Fumigant Antitermitic Activity of Plant Essential Oils and Components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*), Caraway (*Carum carvi*), Dill (*Anethum graveolens*), Geranium (*Pelargonium graveolens*), and Litsea (*Litsea cubeba*) Oils against Japanese Termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15): 6596-6602.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, S. (2011). Activos registrados aprobados por empresas a Junio de 2011. On line.
<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=524&io=2956>.

- Shalaby, A. A. *et al.* (1998). Insecticidal properties of citrus oils against *Culex pipiens* and *Musca domestica*. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 28: 595-606.
- Shan, G. *et al.* (2004). A Sensitive Class Specific Immunoassay for the Detection of Pyrethroid Metabolites in Human Urine. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2): 218-225.
- Sheldon, R. A. (1993). *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds* New York, Dekker Marcel
- Shono, T. & Scott, J. G. (2003). Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. *Pest. Biochem. Physiol.* 75: 1-7.
- Shoukry, I. F. (1997). Toxicological deteriorations of two volatile oils of *Matricaria chamomilla* and *Clerodendron inerme* on the adult house fly *Musca domestica* L. . *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 27: 893-904.
- Silva Aguayo, G. & Rodríguez M., J. C. (2004) Manejo de la resistencia a insecticidas. *Ciencia ahora*. Universidad de Concepción, Chile 14.
- Stroh, J. *et al.* (1998). Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bull Environ Contam Toxicol* 60: 923-930.
- Syngenta (2009) Engeo (tiametoxam) Hoja de seguridad. On line. http://www.jedys.com.ar/data/HojaDeSeguridad_1462.pdf.
- Tibell, G. (2008) *Systema Naturae – an epoch-making book*. Linné on line, Uppsala Universitet On line: http://www.linnaeus.uu.se/online/animal/1_1.html.
- Tolosa, A. C. *et al.* (2006). The fumigant and repellent activity of aliphatic lactones against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 43 (5): 889-895.
- Verdeguer, M. *et al.* (2011). Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. *Molecules* 16: 403-411.
- Veriotti, T. & Sacks, R. (2001). High-speed GC and GC/time-of-flight MS of lemon and lime oil samples. *Anal Chem.* 73 (18): 4395-4402.
- Vituro, C. I. *et al.* (2005). Aceite esencial de *Lepechinia floribunda* de tres regiones del centro de Argentina. Castelar, I. INTA Castelar.
- Viuda-Martos, M. *et al.* (2010). Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Listeria Activities of Essential Oils Obtained from Some Egyptian Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (16): 9063-9070.
- Wade, L. G. (2004). *Química Orgánica*. Madrid, España, Pearson/Prentice Hall.

- Yang, Y. C. *et al.* (2009). Ovicidal and Adulticidal Activity of *Eucalyptus globulus* Leaf Oil Terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Agric. Food Chem.* (52): 2507-2511.
- Yang, Y. C. *et al.* (2002). A Piperidine Amide Extracted from *Piper longum* L. Fruit Shows Activity against *Aedes aegypti* Mosquito Larvae. *J. Agric. Food Chem.* 50 (13): 3765-3767.
- Zhu, B. C. R. *et al.* (2003). Toxicity and Repellency of Patchouli Oil and Patchouli Alcohol against Formosan Subterranean Termites *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (16): 4585-4588.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES

En base a lo anteriormente expuesto es posible concluir que:

- a) los AEs de *M. verticillata*, *H. multiflora*, *C. sinensis*, *C. aurantium*, y *E. cinerea* son altamente tóxicos para las moscas adultas (*Musca domestica*)
- b) , provocando la muerte en un corto período de tiempo.

b) en muchos casos, los AEs son más eficaces, como fumigantes contra las moscas, que sus componentes más abundantes.

c) Se seleccionaron los AEs de *M. verticillata*, *C. sinensis* y *E. cinérea* como los aceites con más posibilidades para la formulación de productos insecticidas por su efectividad y diferencia en componentes.

d) Hemos demostrado una interacción sinérgica de potenciación entre el AE de *M. verticillata* y el AE de *C. sinensis*, indicando que cada AE acentúa mutuamente su actividad.

e) Estos AEs son activos en sistemas abiertos.

f) En un análisis preliminar, los costos de producción de los formulados sería factible económicamente.

Todo esto culmina en que los AEs seleccionados son muy eficaces contra *Musca domestica* y pueden ser considerados buenos candidatos para el desarrollo de fumigantes que sean compatible con los alimentos, las pertenencias, y el hábitat humano.

CAPITULO V. ANEXOS

Anexo 1

1. Tipos de resistencia a los insecticidas

Se tiene conocimiento que la resistencia puede estar asociada a cambios genéticos o proteicos, pero hay también casos en que dos o más mecanismos de resistencia pueden actuar simultáneamente (Badii & Almanza, 2007).

Algunos de los mecanismos más conocidos y estudiados de resistencia de insectos a los insecticidas se describen a continuación:

1.1. La resistencia de comportamiento

Los insectos resistentes a un tipo de insecticida pueden evitarlo mediante un cambio de su actividad habitual o sea estos insectos pueden simplemente dejar de comer o pasar a la parte inferior de una superficie fumigada (Badii & Almanza, 2007).

1.2. Resistencia metabólica

Los insectos resistentes pueden detoxificar o destruir el insecticida más rápido que los insectos susceptibles o evitar que la toxina llegue a los lugares de destino mediante la unión a las proteínas en sus cuerpos. La resistencia metabólica es el mecanismo más común y a menudo se presenta como el mayor desafío. Los insectos resistentes pueden poseer niveles más altos o formas más eficientes de la(s) enzima(s) que descomponen los compuestos insecticidas no tóxicos.

Tres grupos de enzimas son los responsables más importantes de la resistencia metabólica basal a insecticidas órganoclorados, órganofosforados, carbamatos y piretroides. La DDT-dehidroclorinasa, una enzima que metaboliza DDT, fue reconocida por primera vez como la glutatión S-transferasa (GST) en *Musca domestica* (Hemingway & Ranson, 2000). Las esterases están a menudo involucradas en la resistencia a órganofosforados, carbamatos, y en menor medida, resistencia a los piretroides. Las monooxigenasas están involucrados en el metabolismo de los piretroides, la activación y / o detoxificación de los insecticidas órganofosforados y en menor medida, la resistencia a carbamatos (Hemingway & Ranson, 2000).

1.2.1. La resistencia basada en esterasa

Los mecanismos de resistencia basada en las esterasas se han estudiado más ampliamente a nivel bioquímico y molecular en los mosquitos *Culex sp.* y el áfido *Myzus persicae*. Se ha trabajado en mecanismos de resistencia relacionados a distintas esterasa en una amplia gama de especies de *Anopheles* y *Aedes*. La resistencia de organofosforados de amplio espectro, es conferida por la elevación de los niveles de las esterasas del mosquito *Culex sp.* Todas estas esterasas actúan uniéndose rápidamente al insecticida y transformándolo lentamente por lo tanto: lo secuestran rápidamente antes de metabolizarlo (Hemingway & Ranson, 2000).

La sobre-expresión de enzimas capaces de detoxificar insecticidas o la sustitución de aminoácidos en estas enzimas, que alteran la afinidad de la misma por el insecticida, pueden llevar ambos efectos a altos niveles de resistencia a los insecticidas. El aumento de expresión de los genes que codifican las principales enzimas del metabolismo de sustancias extrañas, son la causa más común de resistencia a insecticidas. Estas familias de enzimas, pueden estar formadas por múltiples enzimas con amplias especificidades de sustrato superpuestas y hay una alta probabilidad de que al menos un miembro de la familia será capaz de metabolizar uno o más insecticidas. La sobre-expresión de estas enzimas puede tener un menor costo metabólico que las alteraciones en la estructura de los genes que codifica para estas enzimas (Hemingway & Ranson, 2000; Badii & Almanza, 2007).

1.2.2. Resistencia basada en la Glutación S-transferasa

Muchos estudios han demostrado que los insectos resistentes a los insecticidas tienen elevados niveles de GST, lo que sugiere la existencia de un rol de ella en la resistencia. Las GST son enzimas diméricas (formada por dos cadenas de aminoácidos) multifuncionales que desempeñan un papel importante en la detoxificación de una gran variedad de sustancias no naturales en un organismo. Las enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutación reducido (GSH) en los centros electrofílicos de compuestos lipofílicos. Múltiples formas de estas enzimas han sido informadas para mosquitos, mosca doméstica y *Drosophila*.

La función principal de la GST de los mosquitos resistentes al DDT, consiste en transformarlo en productos no tóxicos, aunque también tiene un papel secundario en la resistencia a organofosforados. La resistencia a DDT mediada por GST, es común en las especies de *Anopheles*, hecho que refleja el intenso uso de este

insecticida para el control de la malaria durante varias décadas (Hemingway & Ranson, 2000).

1.2.3. Resistencia basada en la monooxigenasa

Las monooxigenasas son una compleja familia de enzimas que se encuentran en la mayoría de los organismos, incluidos los insectos. Estas enzimas están implicadas en el metabolismo endógeno y en la detoxificación de los compuestos no naturales al organismo. La monooxigenasa P450 es generalmente la enzima que limita los pasos subsiguientes en el metabolismo o excreción de xenobióticos. Estas enzimas son importantes en la adaptación de los insectos a los productos químicos tóxicos presentes o aplicados en plantas hospederas. La monooxigenasa P450 está involucrada en el metabolismo de casi todos los insecticidas, lo que lleva a la activación de moléculas en el caso de la presencia de insecticidas órganofosforados o en general para la detoxificación. El P450 se une al oxígeno molecular y recibe los electrones del NADPH para introducir una molécula de oxígeno en el sustrato cuando la monooxigenasa se encuentra en niveles elevados, se asocia con resistencia a los insecticidas.

La sobreexpresión del gen *CYP6D1* del citocromo P450, es responsable de la resistencia mediada por monooxigenasa a los piretroides en las moscas domésticas, por lo cual tiene un substancial desempeño en la detoxificación de xenobióticos y en la resistencia a los insecticidas, particularmente piretroides (Hemingway & Ranson, 2000).

1.2.4. La resistencia por los receptores del ácido gamma aminobutírico

El dieldrin, es un insecticida ampliamente utilizado desde 1950 y de reconocida resistencia por parte de los insectos, pero recién en la década de 1990 se relaciono su resistencia con el ácido gamma aminobutírico (GABA). El GABA es el mas importante neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso de vertebrados e invertebrados. Interviene a través de un receptor constituido por varias subunidades que, en conjunto, forman un complejo macromolecular con sitios de unión al GABA entre otras sustancias. Este complejo forma un canal en la membrana celular por el cual, al unirse el GABA al receptor, puede fluir una corriente de iones de cloro, modificando el potencial eléctrico de las células (Ffrench-Constant *et al.*, 1993). El receptor GABA en insectos es el sitio de acción de los piretroides y avermectinas,

mezcla de lactonas utilizadas como antiparasitario, así como los insecticidas órganoclorados, endosulfán y endrin (Hemingway & Ranson, 2000; Capinera, 2008).

1.2.5. Resistencia en los canales de sodio

El efecto farmacológico del DDT y los piretroides es causado por la persistente activación de los canales de sodio por anular el mecanismo dependiente de la tensión de inactivación. La falta de sensibilidad de los canales de sodio, inhibidos por insecticidas, fue registrada por primera vez en la *Musca domestica* (Hemingway & Ranson, 2000).

1.3. Las mutaciones en los genes estructurales

En muchos casos la resistencia es causada por el aumento del metabolismo del insecticida, el mecanismo genético exacto no se conoce. Hasta el momento no existen informes de validación de las mutaciones de las enzimas de detoxificación que lleva a la resistencia a los insecticidas en insectos.

La resistencia al insecticida órganofosforado malatión es causada por una sustitución de un solo aminoácido (Trp251-Leu) dentro de la esterasa E3 de la mosca, *Lucilia cuprina*. Una segunda sustitución de distintos aminoácidos (Gly137-Asp) en el sitio activo del enzima E3 de *L. cuprina* confiere amplia resistencia cruzada a muchos insecticidas órganofosforados, pero no al malatión. Esta misma mutación está presente en cepas resistentes de mosca domestica a insecticidas órganofosforados (Hemingway & Ranson, 2000).

1.4. Amplificación de genes

El mecanismo de resistencia metabólica estudiado con más detalle en los insectos vectores de enfermedades, es la elevación de los niveles de la esterasa, en el mosquito *Culex sp.* La resistencia a los insecticidas a través de la amplificación de genes implicados en la detoxificación es común en varios insectos. El mecanismo más común de la amplificación de la esterasa está estudiado en el mosquito *Culex sp.* y consiste en la co-amplificación de dos estererasas, $est\alpha_2$ y $est\beta_2$ en *C. quinquefasciatus* y *C. pipiens* en todo el mundo.

1.5. La regulación de las estererasas transcripcionales

Los niveles elevados de esterasas no siempre suelen ser el resultado de la amplificación del gen. Las esterasas amplificadas también puede expresarse en diferentes cantidades. Por ejemplo, hay cuatro veces más de β estearasa que α estearasa en *C. quinquefasciatus* resistentes, aunque los genes están presentes en una relación 1:1. Esta diferencia en la expresión se refleja en el nivel de proteína y ARNm.

1.6. Resistencia alterando el blanco u objetivo

Un insecticida, al ser aplicado, penetra en el insecto y alcanza el sitio de acción. La resistencia por alteración del blanco ocurre cuando, el sitio se modifica, para reducir los efectos de dicho insecticida, consecuentemente el sitio se hace insensible al insecticida. Un ejemplo de esto es el de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) la cual cambia, reduciendo su sensibilidad en el sitio de acción. En general, este mecanismo produce un amplio espectro de resistencia a la mayoría de los insecticidas órganofosforados y carbamatos, aunque es más pronunciada a los carbamatos y este mecanismos no se ha reportado en *Aedes aegypti*, pero si en un número de especies de *Anopheles* y *Culex* (Badii & Almanza, 2007).

Los órganofosforados y los carbamatos tienen como objetivo la acetilcolinesterasa. La AChE hidroliza al neurotransmisor excitatorio acetilcolina en la membrana post-sináptica de los nervios. En los insectos resistentes a órganofosforados y carbamatos se han encontrado alteraciones en la AChE resultando una sensibilidad disminuida de la enzima por estos insecticidas (Hemingway & Ranson, 2000; Badii & Almanza, 2007).

1.7. Resistencia a la penetración

Los insectos resistentes al insecticida pueden modificar la velocidad con que lo absorben, para que ésta sea más lenta que los insectos susceptibles. Este tipo de resistencia a la penetración se produce cuando la cutícula externa del insecto desarrolla barreras que pueden disminuir la absorción de los productos químicos en su cuerpo. Este mecanismo se presenta con frecuencia junto con otros tipos.

Se ha indicado que el gen responsable de la resistencia al DDT en moscas domésticas, influye en la penetración del insecticida e incrementa el contenido total de lípidos. Este aumento puede provocar que la liberación de los compuestos liposolubles en el cuerpo del insecto sea lenta, lo que permite un mayor tiempo para

que ocurra la detoxificación del insecticida por parte del insecto (Badii & Almanza, 2007).

2. Bibliografía

Badii, M. H. & Almanza, V. G. (2007). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. CULCyT 4 (18): 9 - 25.

Capinera, J. L. (2008). House Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) Encyclopedia of Entomology, Springer Science+Business Media B.V. On line. <http://books.google.com.ar/>.

Ffrench-Constant, R. H. *et al.* (1993). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363 (6428): 449-451.

Hemingway, J. & Ranson, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 371 - 391.

Anexo 2

1. Identificación de componentes de los aceites esenciales

Los tiempos de retención o los datos de espectrometría de masa no son información suficiente para asegurar una identificación positiva de algunos terpenos en el caso de mezclas complejas como lo son los AEs. Una aproximación adicional consiste en combinar la especificidad y/o reproductibilidad de los índices de retención con los patrones de fragmentación obtenidos por espectrometría de masa, para el componente correspondiente al tiempo de retención considerado (Adams, 2001).

Los índices de retención de Kovats, IR, se definen de modo tal de asignar un valor de 100 veces el número de carbonos de cada uno de los hidrocarburos lineales. En este sistema el hexano tiene un valor de 600 y el heptano de 700, en todas las fases líquidas. Para la determinación de los IR, se usó una serie homóloga de *n*-hidrocarburos (Sigma-Aldrich), de alcanos saturados entre C7 y C30, y a continuación sin variar las condiciones del instrumento, se realizó la corrida cromatográfica del AE en estudio.

El cromatograma que se obtiene muestra una relación logarítmica entre el número de carbonos y los tiempos de retención, reflejando la tendencia en los puntos de ebullición entre los miembros de una serie homóloga. De esta forma, se obtiene una relación lineal cuando se grafica el logaritmo de los tiempos de retención versus los índices de Kovats (Vázquez & Bertoni, 2010).

2. Bibliografía

- Adams, R. P., Ed. (2001). Identification of Essential Oil components by Gas Chromatography / quadropole Mass Spectroscopy Carol Stream, IL, USA, Allured Pub Corp.
- Vázquez, A. M. & Bertoni, A. (2010). Análisis Instrumental. Córdoba, EDUCC Editorial de la Universidad Católica de Córdoba