



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

Leonart, Tamara Luján

Evaluación de la actividad letal y repelente de extractos de Cannabis sativa en combinación con inhibidores de enzimas detoxificantes en ninfas de Triatoma infestans

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica

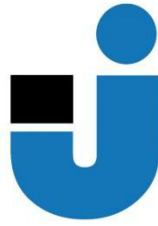


Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – No comercial – Sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Leonart, T. L. (2023). *Evaluación de la actividad letal y repelente de extractos de Cannabis sativa en combinación con inhibidores de enzimas detoxificantes en ninfas de Triatoma infestans* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2774>



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Trabajo final para la obtención del título de Bioquímica.

***“Evaluación de la actividad letal y
repelente de extractos de Cannabis
sativa en combinación con inhibidores
de enzimas detoxificantes en ninfas de
Triatoma infestans”***

Autora: Leonart, Tamara Luján.

Director: Dr. Dadé, Martin.

Universidad Nacional Arturo Jauretche.

Instituto de Ciencias de la Salud

Florencio Varela, Noviembre 2023

Agradecimientos

Inicio dedicando todo este esfuerzo al salto de fe de mi abuelo Adiles que emigró a un país con educación pública y por eso hoy soy parte de la primera generación de estudiantes universitarios de nuestra familia. Aunque no esté físicamente, su orgullo y amor me guiarán en la vida.

Gracias UNAJ por ser el lugar físico de este sueño. A las y los profesores que me dieron el conocimiento y las herramientas para desarrollarme como estudiante y como persona. En este punto, agradezco a Martín Dadé por aceptarme cuando le dije que me interesaba trabajar con marihuana, incentivarme y responder mis preguntas a cualquier hora, me dio el ejemplo de la predisposición a la enseñanza y una mirada única sobre la investigación. Gracias a Cris, Juani y Dani que hicieron de esta carrera un camino que amé transitar juntos, tanto que me importó más el recorrido que el final, espero que sean mis amigos muchos años más.

Gracias a mis amigos del grupo de jóvenes de La Paz, es inmensa mi gratitud por enseñarme a cuidar al otro, no sería la persona que soy sin ustedes. A mis mejores amigos: Elii, Fer, Yami, Vane, Emma y Franco, gracias por soportar mis quejas y mis nervios, fueron un apoyo y un alivio estos años. Guadi y Flor, sin ustedes nada de todo esto sería posible. Gracias también a los amores que han pasado en estos años, se que muchos compartirán mi alegría a lo lejos.

Gracias a mi familia, mis padrinos y mis tías locas, mis primas con las que la diversión nunca es poca. Todos son seres excepcionales, me dieron amor y aunque ninguno sepa bien de qué me recibo, siempre me impulsaron y me ayudaron a continuar.

Gracias a Ariel, por ser un padre y un amigo, por todos los consejos que algunos no escuché y por cuidarme como si fuera su hija. A mi hermano Ramiro, por ser mi compañero y mi motor de todos los días, mi persona favorita. A mis perros Quirón, Tobi, Cuca y Nugget, los que se quedaban conmigo hasta la madrugada estudiando, si supieran leer también serían licenciados. Gracias a mi mamá, cuna y refugio de este sueño, desde que me regaló mi primer libro me enseñó el valor de la palabra y el estudio. Con su amor y ejemplo me mostró lo que es la fuerza de voluntad y me dio la posibilidad de construir un futuro mejor. En esta y mil vidas más, ojalá que aprendamos una de la otra de la mano. También esta alegría me da tristeza porque mi papá Tito no está para verme, pero tengo la certeza de que cuando sentía que no podía más me dio fuerzas. Toda mi vida profesional va a estar marcada por el ejemplo y el gran valor que me inculcó al verlo irse a trabajar todos los días y no puedo estar más agradecida por eso.

Por último, me agradezco y me dedico este título, porque en él invertí mucho tiempo y espero que me devuelva mucha felicidad. Gracias Tamara, por no rendirte.

Resumen

En la actualidad, la enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública en el territorio nacional. Esta zoonosis es transmitida por insectos triatomíneos. En Argentina, el principal vector de la enfermedad es *Triatoma infestans*, popularmente conocida como vinchuca. Este vector pica en zonas expuestas de la piel y defeca, permitiendo la entrada al torrente sanguíneo del parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Mientras que en etapas tempranas puede tratarse con antiparasitarios y curarse, una vez instalada la cronicidad del cuadro es muy difícil tratarlo y son más frecuentes las complicaciones, por lo tanto, es indispensable el diagnóstico temprano. Como es una enfermedad asociada a zonas rurales y pobres, el acceso del personal de salud es complejo, en consecuencia, desde hace años las políticas públicas apuntan al control vectorial, entre otras estrategias, para disminuir la cantidad de infectados. En la actualidad, la principal herramienta para el control de los triatomíneos es el uso de insecticidas sintéticos del grupo químico piretroides. Los reportes publicados sobre la presencia de poblaciones de vinchucas resistentes a este químico pone en juego el éxito final del control del vector. En este contexto, se plantea el requerimiento de nuevos métodos efectivos para disminuir las poblaciones del insecto. La alternativa que se explora en estudios recientes es el uso de bioinsecticidas. En este trabajo se evaluó la letalidad y repelencia de los extractos acetónicos y etanólicos de *Cannabis sativa* y el D-limoneno sobre *T. infestans*, evaluando su interacción con inhibidores de enzimas detoxificantes, butóxido de piperonilo (PBO) y trifetil fosfato (TEPP). Los resultados apuntaron a una efectividad mayor cuando los extractos y el limoneno se pre incubaron con PBO, mientras que TEPP no tuvo acción sobre el extracto etanólico. La repelencia fue de 100% para los tres compuestos evaluados a 50µg/cm² sostenidos durante 48 hs. El extracto acetónico tuvo mejor performance en relación a los parámetros del tiempo y potencia repelente. Del mismo modo, fue el mejor sinergista de la deltametrina, frente a JET y el D-limoneno con un IC de 0.35.

Palabras Claves: Enfermedad de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. *Triatoma infestans*. Bioinsecticidas, *Cannabis Sativa* variante Juanita. Inhibidores de enzimas detoxificantes.

Índice

1. -INTRODUCCIÓN	4
1.1 -Enfermedad de Chagas	4
1.2 -El parásito y el vector.....	6
1.3 -Prevención y vigilancia.....	8
1.3.1 -Insecticidas y bioinsecticidas.....	9
1.3.2 - <i>Cannabis sativa</i> variante Juanita.....	10
1.3.3 -Resistencia, el papel de las enzimas detoxificantes.....	12
1.4 - Tipos de interacción entre sustancias.....	15
2. -HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
2.1 -Hipótesis.....	17
2.2 -Objetivos generales.....	17
2.3 -Objetivos específicos.....	17
3. -MATERIALES.....	17
4. -MÉTODOS.....	18
4.1 -Ensayo de aplicación tópica de componentes.....	18
4.2 -Ensayo de preferencia de área.....	19
4.3 -Análisis estadístico.....	20
5. -RESULTADOS.....	22
5.1 -Evaluación de la letalidad.....	22
5.2 -Evaluación de la repelencia.....	26
6. -DISCUSIÓN.....	27
7. -CONCLUSIONES.....	31
8. -BIBLIOGRAFÍA.....	32

1 - Introducción

1.1 - Enfermedad de chagas

La enfermedad de chagas es una infección parasitaria zoonótica y vectorial. El parásito causante de la enfermedad es *Trypanosoma cruzi* que está presente en las heces y orina de insectos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae). La Organización Mundial de la Salud estima que en el mundo hay entre seis y siete millones de personas infectadas con *T. cruzi*. Se da principalmente en zonas endémicas de América Latina, sin embargo, debido a la movilización de las poblaciones humanas el vector está colonizando más regiones, por lo que aumentan los casos urbanos y en distintos continentes como Europa y África (WHO, 2023).

Si hablamos en números, tiene una incidencia anual por transmisión vectorial de 30000 casos además de 9000 niños positivos nacidos de madres chagasicas. En el mundo provoca unas 14000 muertes al año (PAHO, 2023). La enfermedad de Chagas es clasificada por la OPS como una *enfermedad desatendida* en las Américas, ya que su mayor impacto es en poblaciones pobres con bajos recursos y de difícil acceso a la salud. Para todas estas enfermedades la OPS busca motivar la vigilancia, prevención y control con un manejo integral y multidisciplinario, haciendo hincapié en la eliminación de los vectores como vía principal para evitar contraer las infecciones. Una vez contraído el parásito, la atención médica es defectuosa en función de las dificultades diagnósticas y terapéuticas que conlleva esta enfermedad (PAHO, 2023).

En latinoamérica una de las formas principales de transmisión es la vectorial, la especie más común de vector en Argentina es *Triatoma infestans*. Sin embargo, no es la única forma de contraer la infección, ya que se suma el consumo de alimentos contaminados, transfusiones de sangre o trasplante de órganos y accidentes de laboratorio. Otra de las principales transmisiones que preocupan al sistema de salud es la vertical, de madre a hijo durante el embarazo o parto, ya que el niño puede sufrir graves consecuencias en el crecimiento (WHO, 2023). En Argentina, la enfermedad es endémica, no obstante, hay provincias con mayor riesgo de transmisión vectorial (Figura 1). Según la Guía de Chagas para el equipo de Salud elaborada por el Ministerio de Salud de la Nación, en zonas endémicas no controladas con insecticidas la mayor cantidad de nuevos casos de la enfermedad de Chagas se produce antes de los

de pobreza y marginalidad. Métodos rápidos y moderadamente económicos como ELISA se recomiendan en estudios poblacionales para evaluar prevalencia de la enfermedad, mientras que para el tamizaje en servicios de hemoterapia se sugiere mayor sensibilidad como métodos quimioluminiscentes por el riesgo que implica transfundir sangre chagásica a un individuo sano (obligatorio según la ley nacional de sangre 22.990/1983). El tratamiento tripanocida consta de benznidazol o nifurtimox, en cada caso se debe realizar una evaluación de costo/beneficio del tratamiento tripanocida, en etapas tempranas de la enfermedad puede curarse.

1.2 - El parásito y el vector

Trypanosoma cruzi

Este parásito, de la Familia Trypanosomatidae, cuyo ciclo natural de transmisión incluye un huésped vertebrado (incluyendo más de 100 especies de mamíferos) cuya piel y/o mucosas entran en contacto con heces de vinchuca infectadas con *T. cruzi* en la forma tripomastigote, luego es fagocitado por macrófagos de la región, cuando escapa del fagosoma, se transforma en amastigote en el citoplasma donde se divide intensamente. Más tarde vuelve a diferenciarse a tripomastigote y rompen la célula parasitada para volver a los vasos sanguíneos desde donde se diseminan e inician nuevos ciclos (Figura 2). Esto coincide con la fase aguda de la enfermedad en humanos, mientras que la forma crónica se asocia a la reproducción de los amastigotes en los tejidos. Si una vinchuca se alimenta de un vertebrado con parasitemia elevada, se infectará con la forma tripomastigote. En el estómago del triatomino, el parásito se transforma en epimastigote y se multiplica intensamente por división binaria y en el recto vuelve a su forma infectante para el huésped vertebrado (Figura 2). Es importante remarcar que este paso por el insecto es indispensable y no es inmediato, se requiere entre 10 a 30 días para que la vinchuca sea infectiva y lo es durante toda su vida. (CDC, 2023)

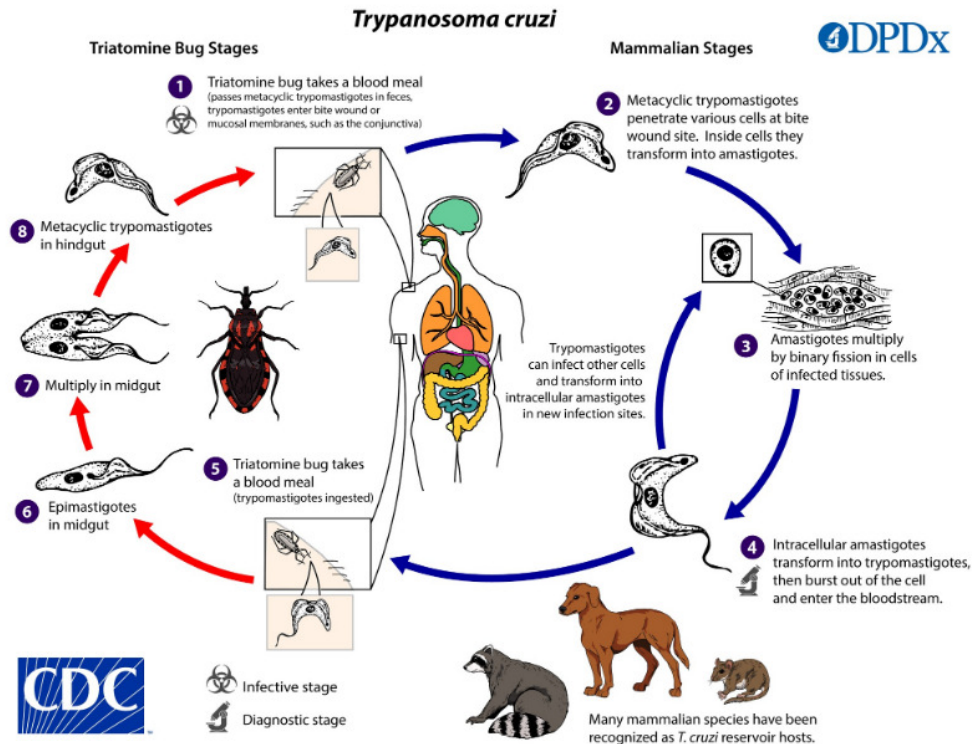


Figura 2: Ciclo de vida de T. Cruzi. Fuente: CDC (Centers for Disease Control and Prevention)

Triatoma infestans

Es el principal vector de *T. cruzi* en el Cono Sur, en Argentina recibe se conoce con el nombre popular de vinchuca, que proviene del quechua y significa “la que se deja caer”, mientras que en otros países donde también es endémico tiene nombres como chinche en Colombia y barbieros en Brasil. Las vinchucas pertenecen al Orden de los Hemípteros (Hemi=mitad, pteron= ala). Tienen alas anteriores formadas por una parte rígida y otra membranosa, están sobrepuestas horizontalmente sobre el abdomen, sin embargo, vuela poco. El conxivo se encuentra en los bordes externos del abdomen, aumenta su volumen varias veces para contener sangre, que le permite soportar meses de ayuno. (Cuba e Hidalgo, 2018)

Esta especie habita ambientes domésticos, peridomésticos y silvestres, por lo que puede transmitir *T. cruzi* a muchas especies incluyendo al hombre y sus animales. Las infecciones en humanos se dan por vinchucas que viven en las grietas y hendiduras de las casas rurales. Su actividad es mayor en la noche, ya que, se aprovechan de que los habitantes están dormidos para alimentarse. Si un insecto que contiene el parásito en las heces u orina se alimenta de una persona u animal, defeca al instante, este se rasca instintivamente e ingresa el agente al organismo por arrastre. El ciclo de vida

comprende el paso de huevo a adulto, pasando por las ninfas que tienen 5 estadios diferentes (Figura 3). Cada hembra puede poner en un año y medio más de mil huevos. El tiempo de desarrollo en laboratorio de *T. infestans* es de 303 días. Las ninfas se diferencian de las adultas en tamaño, por su falta de alas e indiferenciación sexual. Las vinchucas son insectos hematófagos obligados en todas sus fases, es decir, necesitan alimentarse de la sangre de un mamífero para evolucionar y completar su ciclo. Sin embargo, puede mantenerse hasta 6 meses sin alimento disminuyendo su metabolismo al mínimo, estos insectos hambreados pueden llegar a volar en busca de alimento (Sfara y col., 2006).

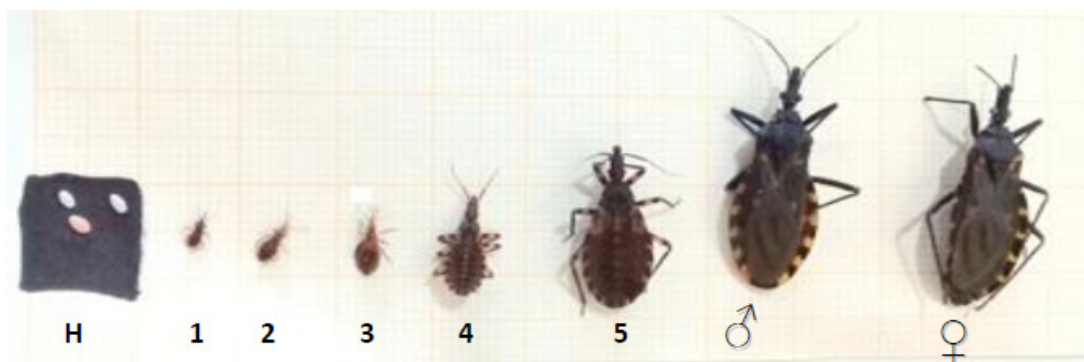


Figura 3: Estadios de huevo, ninfas y adultos macho y hembra de *T. infestans*. Fuente: Imagen de la Facultas de Ciencias Médicas, UNLP.

1.3 - Prevención y vigilancia

Teniendo en cuenta que no existe vacuna, y el tratamiento no es completamente eficaz y depende de la etapa de la enfermedad, la prevención es la herramienta fundamental para evitar los contagios. Actualmente, las estrategias más útiles son el tamizaje serológico de embarazadas y donantes de sangre, sumado al control de las vinchucas en el domicilio y peridomicilio (Gürtler y col., 1986). En este sentido, se busca un abordaje integral que involucre a las comunidades de las zonas endémicas y principalmente al Estado. Este es responsable de orientar a las poblaciones susceptibles, de acercar a ellos los centros de salud junto a las herramientas tecnológicas para el diagnóstico y tratamiento y de realizar periódicamente el saneamiento de zonas donde habita el insecto vector.

El control vectorial consiste en el uso de distintos insecticidas por rociado y fumigación en las viviendas. En las provincias existe un programa de control de la enfermedad que debe garantizar la distribución de estos, además hay programas

nacionales y municipales, del mismo modo que inversiones privadas. El agente del Estado debe preparar a los habitantes para que la descontaminación sea de la forma más sencilla y menos riesgosa posible. Se debe sacar alimentos y elementos de la cocina, descolgar cuadros, adornos, vaciar cajas, alacenas, armarios y cualquier lugar donde se pueda esconder la vinchuca, también ventilar la ropa personal y de cama. Estas acciones facilitan y aumentan la eficacia del rociado. La población es educada para que identifique las formas del *T. infestans*, los rastros de materia fecal que se ve en las paredes y las cutículas que se desprenden al mudar a su forma adulta, esto permite que las familias soliciten la fumigación. Las vinchucas encontradas deben ser estudiadas para ver si están infectadas o no con *T. cruzi*. (Cuba e Hidalgo, 2018)

1.3.1 - Insecticidas y bioinsecticidas

Desde la década del '80, el grupo químico de los piretroides son los insecticidas de elección para el control y erradicación de los triatominos, particularmente en nuestro país el más utilizado es deltametrina (Figura 4). Los piretroides son compuestos sintéticos lipofílicos (lo que les permite penetrar la cutícula de los insectos) y tiene alto punto de ebullición y baja presión de vapor (Ruigt, 1985). El mecanismo de acción es neurotóxico, cuyo sitio de acción primario son los canales de sodio dependiente de voltaje en los nervios del sistema central y periférico, donde modifican la velocidad de cierre y altera la conducción normal del impulso (Heinzow y Andersen, 2006). El uso continuo de estos insecticidas podría ser uno de los motivos de la presencia de vinchucas resistentes a piretroides (Picollo y col., 2005). También, los piretroides presentan como desventaja toxicidad para los peces y alta permanencia en el medio ambiente porque son estables a la luz solar y el calor.

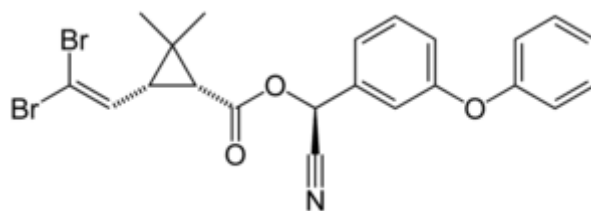


Figura 4: Estructura de la deltametrina. Fuente: Wikipedia.

Frente a este escenario, el uso de bioinsecticidas, es decir, compuestos a base de plantas u organismos vivos, ha ido en aumento para distintos tipos de insectos. La mayoría de las plantas tienen compuestos que previenen el ataque de fitófagos. Se pueden clasificar en cinco tipos principales de sustancias químicas: (1) compuestos de nitrógeno (principalmente alcaloides) (2) terpenoides (3) fenoles (4) inhibidores de proteínasa y (5) reguladores del crecimiento. El uso de plantas como repelentes es milenario y el humano ha ido explorando distintas especies, esto se debe a los beneficios medioambientales, económicos y además son libres de crueldad animal, también los compuestos son fáciles de obtener y purificar (Maia y Moore, 2011). Para triatominos se pueden destacar algunos trabajos realizados, sin embargo, también hay en mosquitos y ácaros. En 2013, Moretti y col. demostraron que los monoterpenos 1,8-cineol, linalool, 7-mentol, α -terpineol y timol resultaron estimulantes de la hiperactivación de ninfas de *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*. En esta especie de triatmino también se demostró que eucaliptol posee una buena actividad como fumigante, mientras que otros monoterpenos como geraniol y acetato de mentilo presentan un importante efecto repelente (V. Sfara y col, 2009). En una investigación reciente, se demostró la capacidad de hiperactivación del monoterpeno eugenol en ninfas de tercer estadio de *T. infestans* (Reynoso y col., 2018).

1.3.2 -*Cannabis sativa* variante Juanita

Cannabis sativa es una planta herbácea de la familia Cannabaceae, conocida ordinariamente como marihuana. Es originaria de Asia Central y con una gran capacidad de adaptación se extiende por todo el mundo. Es de rápido crecimiento, con un tallo que puede alcanzar de 1 a 4 metros de alto y 1 a 3 cm de diámetro, estos parámetros varían dependiendo de la subespecie y las condiciones de cultivo como suelo y clima (Figura 4, a). Cuando está floreciendo se puede diferenciar en macho y hembra, de acuerdo a las características de ésta. Es en las glándulas de las flores femeninas donde se encuentra una mayor cantidad de cannabinoides, principalmente THC (Hourfane y col, 2023).



Figura 4: a) Cannabis sativa vista general. b) flor. c) semillas. d) hojas. e) tallo. Fuente: Hourfane y col, 2023.

Desde la antigüedad ha sido utilizada por las civilizaciones con un gran abanico de industrias, desde fuente de alimento, fibra y aceites, hasta el cuidado de la piel y el cabello. En la actualidad está prohibido su cultivo y comercialización en muchos países por sus propiedades psicoactivas que conllevan el uso recreativo como narcótico, particularmente del extracto de sus flores y semillas (figura 4, b y c). Sin embargo, en países como Argentina, se legalizó el uso medicinal e investigación lo que permite realizar estudios sobre su efecto farmacológico contra el dolor y la inflamación, incluso en el área oncológica (Hourfane y col, 2023).

En este trabajo nos interesa la capacidad insecticida y repelente de los aceites esenciales de *C. sativa* variante Juanita. El mecanismo de acción está asociado a la inhibición de la colinesterasa que provoca falla en la transmisión del impulso nervioso induciendo la mortalidad del insecto. Karimi y col., (2021) demostraron in vitro que *C. sativa* y los principales componentes incluyendo todos los cannabinoides, beta-sitosterol, campesterol, apigenina, alfa-bisaboleno, Δ 8-THC y Δ 9-THC, entre otros, tienen efectos inhibidores de la colinesterasa.

En este trabajo se utilizará D-limoneno, ya que, mediante el análisis de terpenos en muestras de extracto etanólico y acetónico de *C. sativa* variante Juanita se obtuvo que es el monoterpeno principal en el extracto acetónico y uno de los principales en el etanólico (Tabla 1). Este compuesto es un aceite incoloro poco

soluble en agua, con olor a naranja dulce, utilizado principalmente en industrias alimenticias y cosméticas (figura 5). En EEUU, durante el año 1958 se registró como uno de los primeros ingredientes de insecticidas amigables con el medio ambiente, ya que tiene baja toxicidad oral y dérmica para mamíferos, aves, peces, y no daña a las abejas. Actualmente forma parte de formulaciones en plaguicidas para el control de pulgas y garrapatas en mascotas, insecticida en aerosoles, larvicidas de mosquitos y repelentes de insectos (Ciriminna R. y col, 2014).

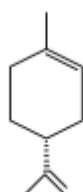


Figura 5: Estructura del D-limoneno. Fuente: Wikipedia.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)
Alfa-Pineno	9,7	4,6
Beta-Myrceno	11,9	9,2
d-Limoneno	13,3	21,7
Linalol	16,1	2,8
Fenchil_alcohol	16,6	6,1
a-Terpineol	19,5	5,3
beta-Caryopilleno	27,0	18,4
alfa-Humuleno	28,1	6,5
Guaiol	32,5	17,7

a)

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)
Alfa-Pineno	9,75	4,0
Beta-Myrceno	11,9	8,5
d-Limoneno	13,3	18,5
Linalol	16,1	3,8
Fenchil_alcohol	16,6	7,5
a-Terpineol	19,5	6,8
beta-Caryopilleno	27,0	16,9
alfa-Humuleno	28,1	5,7
Guaiol	32,5	20,2
alfa-Bisabolol	34,9	8,1

b)

Tabla 1: a) Composición de terpenos de extracto acetónico (a) y etanólico (b) de *C. sativa* variante Juanita.

1.3.3 - Resistencia, el papel de las enzimas detoxificantes

La resistencia se define como “la habilidad desarrollada por una cepa de insectos, de tolerar dosis de tóxicos que resultan letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie” (Casabe de Malkenson, 1982). Los mecanismos de resistencia reportados para triatomíneos son la penetración reducida del insecticida, una mayor detoxificación enzimática y la modificación del sitio de acción. En el año 2022 un equipo de investigadores del Conicet liderado por

Sheila Ons logró poner en evidencia la activación de proteínas quimiosensoriales, involucradas en el sentido del olfato de los insectos, las cuales juegan un rol importante en los mecanismos de detoxificación.

La potencia de los agentes de control químicos y su toxicidad se limita por la inducción de enzimas oxidativas, hidrolíticas y glutatión transferasas por los sistemas de defensa de los insectos, sus implicancias dependen de la especie y del agente que se utilice. Por lo tanto, uno de los mecanismos de resistencia más importantes, es el aumento del metabolismo que conducen a una mayor desintoxicación por enzimas como las carboxilesterasas, las microsomales oxidadas, las glutatión transferasas y las epóxido hidrolasas, en procesos controlados por genes. Por lo tanto, el complemento del insecticida con sustancias capaces de inhibir enzimas detoxificantes conduce a un aumento en la toxicidad y el sinergismo (Ishaaya, 1993).

En una publicación del año 2020, Rolandi y col. estudiaron la resistencia a deltametrina en las vinchucas, arrojando como resultado que son los procesos metabólicos los principales causantes de las resistencias de *T. infestans* recolectadas de Chaco, Argentina (figura 6).

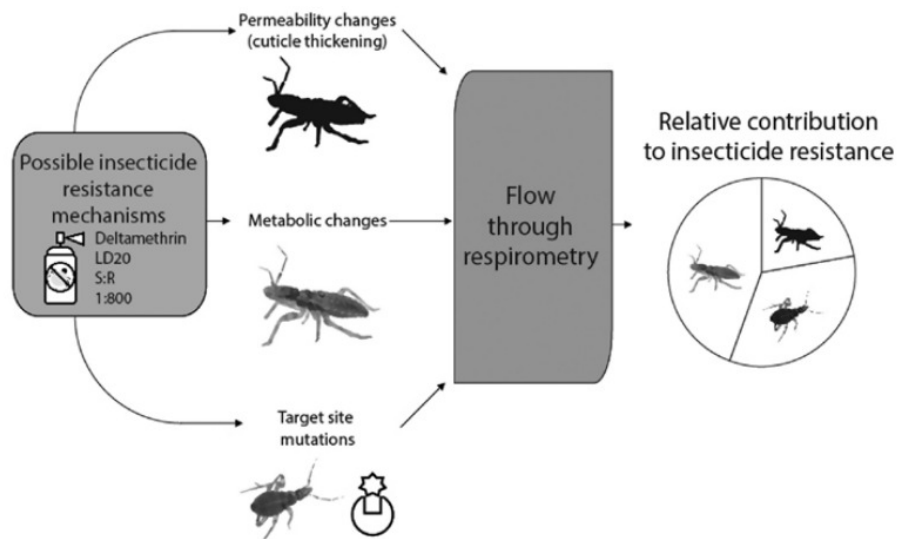


Figura 6: Abstract Rolandi y col, 2020.

Del mismo modo, en Bolivia en 2017, Santo-Orihuela y col., cuantificaron y demostraron un aumento en la inducción de monooxigenasas P450 y permetrato esterazas que detoxifican deltametrina más rápido y contribuyen a la resistencia de las poblaciones locales de *T. infestans*.

Las enzimas citocromo P450 participan en la fase I del metabolismo de los insecticidas y en funciones biosintéticas endógenas por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, están localizadas en la membrana del retículo endoplasmático liso y la membrana mitocondrial interna. Su función es transformar sustratos externos en moléculas más polares e hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables, sin embargo el mecanismo de acción escapa a la profundidad de este trabajo. Este grupo de enzimas es susceptible al entorno metabólico y en distintas situaciones o sustancias internas o externas son inducidas o inhibidas (Rodríguez González y Rodeiro Guerra, 2014). En el presente trabajo se usará el butóxido de piperonilo (PBO, figura 8) que es un compuesto semisintético que actúa como inhibidor de la citocromo P450, por lo que es utilizada como potenciador en formulaciones de pesticidas que se utilizan en entornos agrícolas, comerciales y residenciales (Rivera-González y col, 2020)

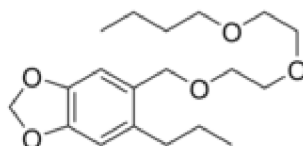


Figura 8: Estructura del butóxido de piperonilo. Fuente: Wikipedia.

Otras de las enzimas importantes antes mencionadas son las esterasas, las cuales hidrolizan ésteres, con la adición de agua, para dar alcoholes o fenoles y ácidos. Esta labor es principal en la metabolización de insecticidas, ya que, muchos de ellos tienen este grupo químico en su composición (organofosforados, carbamatos, piretroides). Están localizadas en distintos tejidos y se clasifican principalmente según el sustrato que modifican. En este trabajo se analizará la eficacia como inhibidor de las esterasas del compuesto trifenil fosfato (TPP, figura 9) que es un compuesto organofosforado sólido incoloro, es el éster de ácido fosfórico y fenol. Hay poca bibliografía y trabajos científicos publicados que utilizan este compuesto como inhibidor de enzimas detoxificantes en fórmulas plaguicidas, no obstante, en la industria se utiliza como plastificante y retardante de fuego (Casabe de Malkenson, 1982).

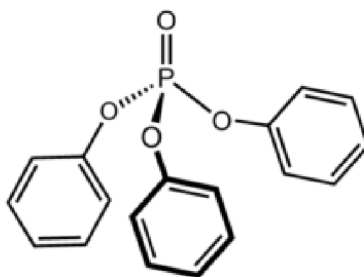


Figura 9: Estructura de trifeníl fosfato. Fuente: Wikipedia.

1.4 - Tipos de interacciones entre sustancias

Ting-Chao Chou en su publicación del 2006 llamada “Base teórica, diseño experimental y simulación computarizada de sinergismo y antagonismo en estudios de combinación de fármacos”, da las definiciones sobre las cuales basaremos el análisis de los resultados de las combinaciones de sustancias utilizados en el presente trabajo. Luego de años de investigación, Chou llega a una ecuación general de dosis-efecto y un teorema de índice de combinación, con sus algoritmos permitió la creación de un software informático, llamado Compusyn, que facilita la determinación de parámetros y permiten la simulación de sinergismo o antagonismo en combinaciones de fármacos y sustancias en todos los niveles de dosis y efecto. El fundamento matemático escapa a la finalidad de esta introducción, si bien, el índice de combinación (CI) se puede simplificar en la ecuación 1. Donde D es la dosis de cada sustancia en la mezcla binaria y D_x es la dosis con efecto por sí sola. Cuando CI está entre 0 y 1 la interacción es sinergista, del 1 al infinito es antagonista. Sin embargo, Chou estableció una lista que determina semi cuantitativamente el grado de sinergismo y antagonismo, pasando por la adición (Tabla 2).

Cuando dos o más compuestos son combinados se producen distintos tipos de interacciones. En primer lugar, cuando una dosis de la droga A produce un efecto determinado, mientras que la droga B no tiene efecto, si la combinación produce un aumento de la eficacia de la droga A, se habla de **potenciación**. En segundo lugar, si se combinan ambas drogas a dosis que por sí solas producen efecto se puede dar sinergismo, adición o antagonismo. Se denomina **sinergismo** cuando A+B tiene más efecto que cada droga separada, mientras que **antagonismo** es cuando A+B produce un efecto menor al conseguido con cada droga por separado. La **adición** es más compleja ya que se esperaría que si A logra el 75% de efecto, mientras que B el 35%, la suma

debería dar 110% de efecto, lo cual es ilógico a nivel farmacológico. Del mismo modo, se puede plantear que, si A tiene un efecto del 50% y B del 25%, el total sea 75% y la realidad es que prácticamente nunca sucede esto. Sin embargo, son interacciones que suceden y suponen que ambas drogas ponen en juego su efectividad sin competir ni sumar.

La combinación de sustancias con diferentes mecanismos o sitios de acción supone un beneficio que se demuestra desde la farmacología clínica hasta las formulaciones de todo tipo de origen industrial. Los efectos favorables de la combinación cuando se da sinergismo son 1) aumento de eficacia terapéutica, 2) disminución de dosis de los componentes, manteniendo la misma eficacia o evitando la toxicidad, 3) evitar el desarrollo de resistencia, 4) proporcionar sinergismo selectivo que no afecte al huésped.

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} \quad (1)$$

Rango de CI	Descripción
<0.1	Muy fuerte sinergismo
0.1–0.3	Fuerte sinergismo
0.3–0.7	Sinergismo
0.7–0.85	Moderado sinergismo
0.85–0.90	Ligero sinergismo
0.90–1.10	Cerca de adición
1.10–1.20	Ligero antagonismo
1.20–1.45	Moderado antagonismo
1.45–3.3	Antagonismo
3.3–10	Fuerte antagonismo
>10	Muy fuerte antagonismo

Tabla 2: Descripción según rango del índice de combinación de sinergismo y antagonismo. Fuente: Chou, 2006.

2- Hipótesis y objetivos

2.1 - Hipótesis

- La combinación de extractos de *C. sativa* variante Juanita y del monoterpeno D-limoneno con inhibidores de enzimas detoxificantes aumenta la actividad letal y repelente de los mismos en ninfas de *T. infestans*.

2.2 - Objetivos generales

- Estudiar actividad letal y repelente de extractos de *C. sativa* variante juanita y su principal terpeno D-limoneno en ninfas susceptibles de *T. infestans*.

2.3 - Objetivos específicos

- Cálculo de la dosis letal cincuenta de extractos acetónicos y etanólicos de la variante juanita de *C. sativa* y de su principal terpeno D-limoneno sobre ninfas de *T. infestans*.
- Obtener el grado de potenciación de extractos acetónicos y etanólicos de la variante juanita de *C. sativa* y D-limoneno con butóxido de piperonilo y trifetil fosfato.
- Determinar el índice de combinación de mezclas binarias de extractos acetónicos y etanólicos de la variante juanita de *C. sativa* y D-limoneno.
- Análisis de la repelencia por preferencia de área por separado de extractos acetónicos y etanólicos de la variante juanita de *C. sativa* y D-limoneno.

3 - Materiales

Se utilizaron inflorescencias femeninas de *C. sativa* variante Juanita provisto por la Asociación Civil “PlantAR Ciencia”. Las plantas se multiplicaron por clonación y se desarrollaron en un cultivo en interior con control de variables. La obtención de los extractos de acetona (JAC) y etanol (JET). Para cada extracto de planta se pesaron 0,7 g de flores secas molidas y se agregaron 10 ml del solvente frío. La extracción se realizó en un baño de hielo, mediante ultrasonido al 50 % de potencia en forma de pulsos de 15 segundos en 10 minutos totales. Luego, se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 10 minutos.

Los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Artrópodos y Vectores (LabArVec), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata y en los laboratorios de bioquímica de la Universidad Nacional Arturo Jauretche. Se utilizaron ninfas de quinto estadio de *T. infestans* con 15 días de ayuno. Los insectos se colocaron en recipientes de plástico de 11 cm de diámetro. La crianza de los insectos se realizó en condiciones controladas de temperatura ($28\pm 1^\circ\text{C}$), humedad (50-70%) y un fotoperíodo de 12:12 horas (luz: oscuridad). Las ninfas de *T. infestans* fueron alimentadas con sangre de pollo una vez por semana. La colonia utilizada susceptible se inició con insectos enviados desde el Centro de Referencia de Vectores (CeReVe) (Santa María de Punilla, Córdoba).

4- Métodos

4.1 - Aplicación tópica de componentes.

Para el estudio de la actividad letal de los JAC, JET y D-limoneno sobre ninfas susceptibles en estadio V de las vinchucas se realizó siguiendo el protocolo establecido por la OMS (1994). Se aplicó sobre el dorso del abdomen de las ninfas 1 μL del principio activo y luego las mezclas binarias, disueltos en acetona con un micropipeta (figura 10). Se utilizó dosis crecientes de los compuestos para las curvas dosis-respuesta con al menos cuatro dosis que causan entre el 10 y 90% de mortalidad en las ninfas. El ensayo se replicó tres veces en días distintos bajo las mismas condiciones, utilizando 10 ninfas por cada dosis en cada una de las réplicas del ensayo, por lo tanto, el número total para cada dosis fue 30. El control negativo se estableció sobre 10 ninfas con 1 μL de acetona, mientras que el control positivo fue deltametrina. Luego de ser tópicados, se evaluó mortalidad a las 24, 48 y 72 horas, considerando muerto a aquel insecto que no pudo desplazarse desde el centro hasta el borde de un papel filtro de 9 cm de diámetro, por sus propios medios en forma espontánea o luego de ser estimulado mecánicamente con ayuda de una pinza. (OMS, 1994).



Figura 10: Aplicación tópica sobre cutícula de *T. infestans*. Fuente: Imagen tomada en la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

Determinación del efecto del PBO y TPP en la actividad triatocida de JAC, JET y D-limoneno. Para este bioensayo, 1 h antes de la administración del principio activo por vía tópica, los insectos fueron tratados con 1 μg de PBO y TPP disueltos en 1 μL acetona. Luego, la metodología fue la explicada en el párrafo anterior para cada inhibidor de enzima detoxificante. Como control, en cada réplica 10 vinchucas recibieron 2 μL de acetona y otras 10 recibieron 1 μg de PBO y TPP disuelto en 1 acetona, esto demostró que la concentración de inhibidores de enzimas, aplicadas por sí solas, no tuvo efectos letales sobre las ninfas ya que no hubo diferencia entre los insectos que recibieron 2 μL de acetona y los que recibieron PBO y TPP disueltos en acetona.

Para evaluar la interacción que pudiese existir entre los extractos, el terpeno D-limoneno y deltametrina se utilizó el programa Compusyn. Para el ensayo se estableció la relación entre las DL50 de los compuestos en estudio. Para la combinación de deltametrina + JAC la relación de combinación de dosis fue de 1/12, esto quiere decir, que si se agrega 1 μg de deltametrina se agregarán a la mezcla 12 μg de JAC. Las relaciones restantes fueron de 1/38, 1/3, 1/5 y 1/12 para deltametrina + JET, deltametrina + limoneno, limoneno + JAC y limoneno + JET, respectivamente.

4.2 - Preferencia de área

Para el estudio de repelencia de los extractos acetónicos y etanólicos de la variante juanita de *C. sativa* y D-limoneno sobre ninfas susceptibles de *T. infestans*, se realizó utilizando la técnica de área de preferencia con mínimas adaptaciones (Dadé y col.,

2018). Se ofreció al insecto una mitad de un papel de filtro de 11 cm de diámetro con distintas concentraciones de los extractos y el monoterpeno disuelto en acetona y la otra mitad solo con acetona. Los papeles de filtro tratados se dejaron evaporar durante 24 h antes, luego se pegaron con cinta adhesiva y se colocó la ninfa en la mitad del papel, en un vaso de plástico alto con poca luz (figura 11). El control negativo se llevó a cabo tratando con acetona a una de las mitades, mientras que la otra porción quedó sin sustancias, utilizando 10 ninfas. Cada dosis fue evaluada en 10 vinchucas de quinto estadio por triplicado, es así que se usaron 30 en total. Como control positivo se utilizó N,N-dietil-meta-toluamida (DEET). Este compuesto es actualmente uno de los componentes principales de la mayoría de los repelentes para humanos y mascotas, efectivo contra mosquitos, moscas y garrapatas, se comercializa como aerosoles, barras, cremas, lociones y geles, con concentración del 5% al 100%. (Plumlee K, 2006). Se consideró actividad repelente cuando el insecto se alejó hacia la zona tratada con acetona. La ubicación de las vinchucas se observó a 1, 24 y 48 h.



Figura 11: Individuos de *T. infestans* en ensayo de preferencia de área. Fuente: Imagen tomada en la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

4.3 - Análisis estadístico

En el caso de la actividad letal se utilizó el software POLO-PLUS para determinar las dosis y la concentración necesaria para matar al 50% de los insectos. (DL50 y CL50, respectivamente) acompañado de sus intervalos de confianza

establecidos en 95% . También se conocerá el Grado de Potenciación (GP) entre los insecticidas, se obtiene del cociente entre la DL50 o CL50 del insecticida / DL50 o CL50 de la combinación de insecticidas y fueron consideradas significativamente distintas cuando el IC 95% no incluyó al número 1,0 ($p < 0,05$). Este software usa el modelo Probit. La relación entre el porcentaje de mortalidad observado (eje Y) y la dosis evaluada (eje X) se representa en una curva dosis-respuesta . El gráfico resultante de evaluar la mortalidad frente a la dosis es una curva sigmoidea que dificulta evaluar la respuesta cerca del 0 y del 100% de mortalidad, zonas donde la respuesta alcanza asíntotas (gráfico 1). Por lo tanto, se usa una transformación Probit para convertir la curva sigmoidea acumulativa en una función lineal de forma $y=a+bx$ donde Y es el porcentaje de respuesta en unidades probit y X es el logaritmo de la concentración (gráfico 2) (Hewlett y Plackett 1979) .

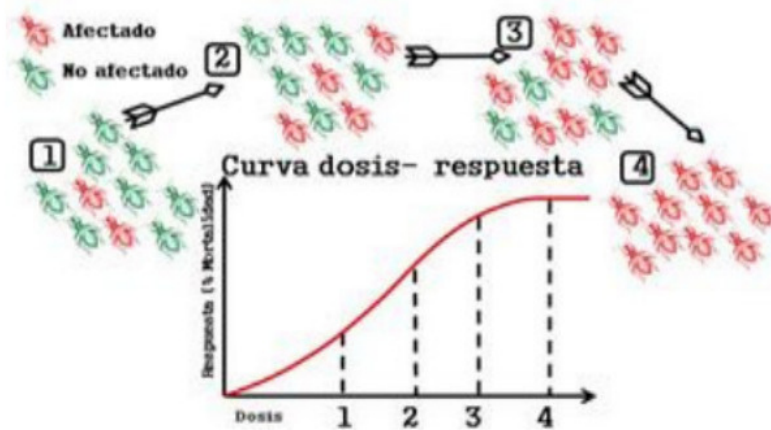


Gráfico 1: Curva dosis-respuesta para una población previa a la transformación Probit.

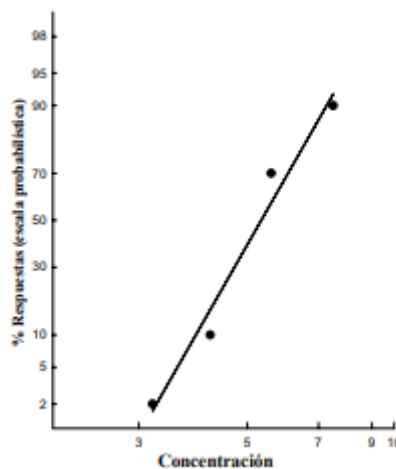


Gráfico 2: Función lineal donde el eje y es porcentaje de respuesta y el eje x la concentración , la concentración al 50% se denomina CL50.

Para determinar el tipo de interacción entre las mezclas binarias se usó el software Compusym, explicado en el apartado 1.4.

Por otro lado, para el estudio de la actividad repelente se establecerá un porcentaje de repelencia (PR) que se obtiene de la fórmula $N_s - N_t / N_s - N_t \times 100$. Siendo N_s el número de insectos presente en el área sin tratar y N_t el número de insectos en el área tratada. Si la mayoría de los insectos se encuentran en el área sin tratar ($N_s > N_t$), el signo de PR será positivo e interpretado como actividad repelente. En cambio, si los insectos se ubican en la zona tratada ($N_t > N_s$) el signo será negativo e interpretado como atrayente.

5- Resultados

5.1 - Evaluación de la letalidad

En primer lugar, los ensayos de aplicación tópica de las sustancias evaluadas en este trabajo mostraron que la deltametrina actúa rápidamente logrando una DL50 máxima a las 24 horas (Tabla 1). Fue 12, 38 y 3 veces más potente que JAC, JET y limoneno respectivamente. Del ensayo de deltametrina pre incubada con PBO se obtuvo una menor DL50 que el piretroide cuando actúa solo y da un grado de potenciación (GP) con diferencias significativas estadísticamente, (3,5 IC 95% 1,9-6,3) ya que el intervalo de confianza no incluye al 1. Lo contrario sucede con la deltametrina + TPP donde si bien es menor la DL50 no alcanza para que el GP sea significativo (1,2 IC 95% 0,6-2,4) que sí incluye al 1. Por lo tanto, mientras que el PBO potenció la acción de la deltametrina, el TPP no lo hizo (Tabla 4).

En segundo lugar, JAC tuvo su mínima DL50 a las 48 horas y resultó 3 veces más potente que JET (Tabla 3). Cuando JAC se combinó con PBO a las 48 horas se obtuvo una diferencia significativa en el GP, mientras que la mezcla con TPP fue significativa a las 24 horas (Tabla 4). Por lo tanto, la potenciación fue más rápida con TPP que con PBO, sin embargo fue similar numéricamente. A modo de ilustración se muestran las curvas dosis respuesta obtenidas cuando hay un grado de potenciación significativo en el Gráfico 3.

En tercer lugar, para JET, alcanzó su máxima eficacia a 24 horas cuando se tópicó solo, en sumatoria con PBO la mínima DL50 fue a las 48 horas, se compararon sólo los datos que ocurrieron el primer día y resultó en un GP significativo. En cambio, para TPP no se demostró un efecto de potenciación al combinarlos, el Gráfico 4 demuestra como son las curvas dosis respuesta de este tipo.

En los Gráficos 3 se puede ver la diferencia de las distancias en las curvas rojas y azules que representan que las dosis letales en cada tratamiento fueron diferentes, y hubo una disminución en la DL50 cuando se trató con el inhibidor enzimático. De otro modo, el gráfico 4 demuestra que las curvas se acercan más cuando la disminución de DL50 no alcanza para representar una potenciación.

El limoneno tuvo su menor DL50 a las 72 horas, resultando más lento que los anteriores pero siendo 4 y 12 veces más potente que el extracto acetónico y etanólico, respectivamente (Tabla 3). En cuanto a su interacción con PBO y TPP, resultó potenciado con ambos, sin embargo fue más rápido con la acción de TPP (Tabla 4).

Tiempo de observación (h)	LD50 (ng/insecto) (IC 95%)		
	24	48	72
Deltametrina	62.503 (41.131 - 134.704)	62.503 (41.131 - 134.704)	62.503 (41.131 - 134.704)
Deltametrina + PBO	17.761 (13.421 - 23.959)	17.761 (13.421 - 23.959)	17.761 (13.421 - 23.959)
Deltametrina + TPP	48.708 (35.711 - 76.181)	48.708 (35.711 - 76.181)	48.708 (35.711 - 76.181)
JAC	1127.471 (685.935-3295.737)	784.433 (514.491-1791.977)	784.433 (514.491-1791.977)
JAC + PBO	568.018 (404.338- 920.022)	274.564 (204.873 - 364.912)	274.564 (204.873 - 364.912)
JAC + TPP	382.172 (276.559 - 648.842)	382.172 (276.559 - 648.842)	382.172 (276.559 - 648.842)
JET	2378.5 (1413.0 -11227)	2378.5 (1413.0 -11227)	2378.5 (1413.0 -11227)
JET + PBO	671.088 (531.725 - 842.808)	575.626 (449.690 – 720.418)	575.626 (449.690 – 720.418)
JET + TPP	1144.848 (762.030 - 2416.311)	1144.848 (762.030 - 2416.311)	1144.848 (762.030 - 2416.311)
LIMONENO	343.303 (212.025 - 957.350)	245.869 (157.472-583.251)	193.711 (120.987-484.871)
LIMONENO + PBO	176.442 (124.618 - 299.722)	63.056 (48.093 - 84.667)	38.611 (28.705 - 49.095)
LIMONENO + TPP	93.071 (69.373 - 143.120)	88.046 (63.345 - 144.725)	88.046 (63.345 - 144.725)

Tabla 3: Actividad letal expresada DL50 de deltametrina, extracto acetónico de *C. sativa* variante Juanita (JAC), extracto acetónico de *C. sativa* variante Juanita (JET) y limoneno dependiente de tiempo.

Tiempo de observación (h)	GP (IC 95%)		
	24	48	72
Deltametrina + PBO	3.519 (1.944 - 6.370) *	3.519 (1.944 - 6.370) *	3.519 (1.944 - 6.370) *
Deltametrina + TPP	1.283 (0.681-2.417)	1.283 (0.681-2.417)	1.283 (0.681-2.417)
JAC + PBO	1.985 (0.925 - 4.262)	2.857 (1.548 - 5.273) *	2.857 (1.548 - 5.273) *
JAC + TPP	2.950 (1.376 - 6.324) *	2.950 (1.376 - 6.324) *	2.950 (1.376 - 6.324) *
JET + PBO	3.544 (1.622 - 7.746) *	3.544 (1.622 - 7.746) *	3.544 (1.622 - 7.746) *
JET + TPP	2.078 (0.856- 5.043)	2.078 (0.856- 5.043)	2.078 (0.856- 5.043)
LIMONENO + PBO	1.946 (0.910 - 4.162)	3.899 (2.077 - 7.319) *	5.017 (2.643 - 9.524) *
LIMONENO + TPP	3.689 (1.790 - 7.601) *	2.792 (1.417 - 5.504) *	2.792 (1.417 - 5.504) *

Tabla 4: Grado de potenciación para mezclas de insecticidas y bioinsecticidas con inhibidores de enzimas detoxificantes. * diferencia significativa estadísticamente.

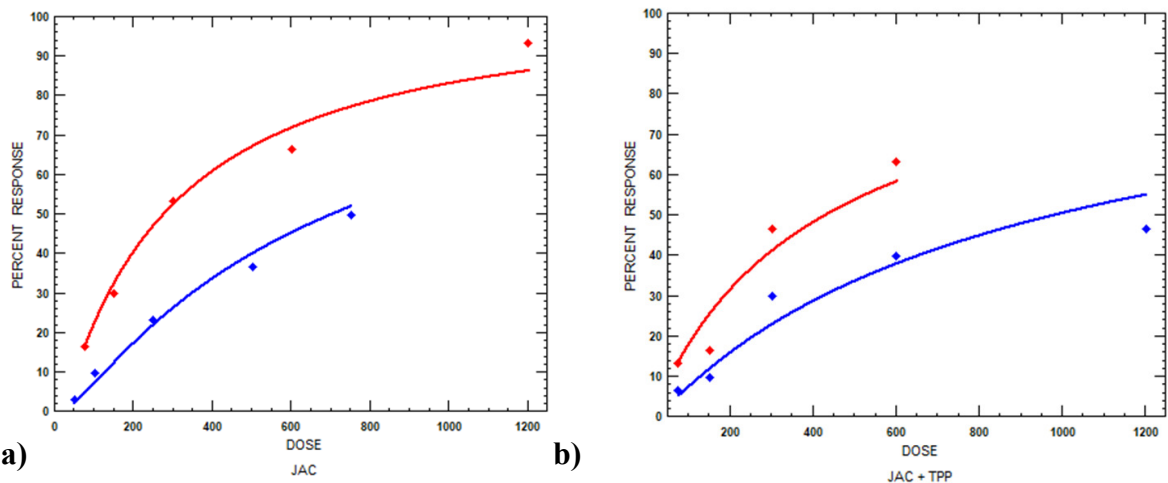


Gráfico 3: a) Curva dosis respuesta para JAC en azul y JAC + PBO en rojo a las 48 horas. b) Curva dosis respuesta para JAC en azul y JAC + TPP en rojo a las 24 horas. Hay diferencias significativas en ambas.

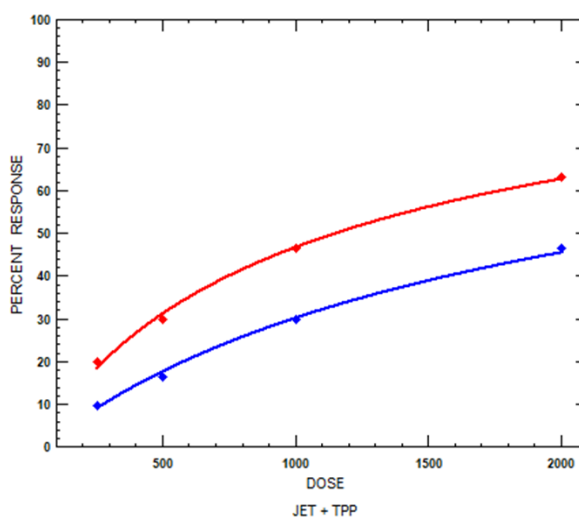


Gráfico 4: Curva dosis respuesta para JET en azul y JET + TPP en rojo a las 24 horas. No hay diferencia significativa.

En el estudio de la interacción entre mezclas binarias de los componentes se obtuvo que para la deltametrina con los tres compuestos evaluados el valor de IC estuvo entre 0.3 y 0.7, lo que quiere decir que JAC, JET y limoneno son sinérgicos. En cambio, para el limoneno se obtuvo que la mezcla con JAC dio dentro del rango de sinérgico pero con JET se fue hacia la adición ya que el valor estuvo cerca de 1. (Tabla 5)

Combinación	Relación de combinación	IC	Tipo de interacción
deltametrina + JAC	1:12	0.35	sinérgico
deltametrina + JET	1:38	0.55	sinérgico
deltametrina + limoneno	1:3	0.62	sinérgico
limoneno + JAC	1:5	0.41	sinérgico
limoneno + JET	1:12	0.95	cerca de adición

Tabla 5: Índices de combinación de mezclas binarias y tipo de interacción según Chou (2006).

5.2 - Evaluación de la repelencia

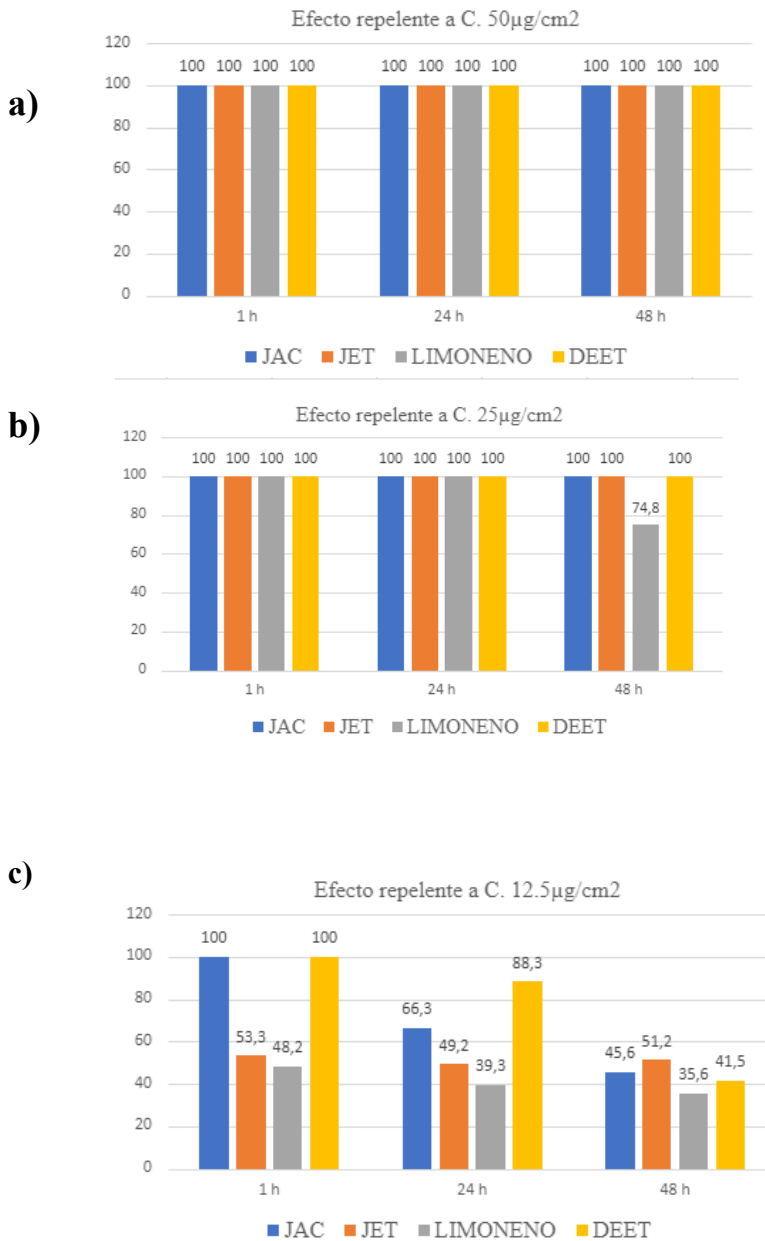


Gráfico 5: Efecto repelente de JAC, JET, LIMONENO Y DEET. C: Concentración a) 50µg/cm² b) 25µg/cm² c) 12,5µg/cm².

La repelencia sobre las ninfas de *T. infestans* demostró depender de la concentración y del tiempo de exposición al principio activo. A una concentración de 50 µg/cm² todos tuvieron 100% de repelencia a las 48 hs de evaluación. A la mitad de la primera concentración solo el limoneno disminuyó en 25% su capacidad repelente a las 48 h. Luego, a la mínima concentración probada, se observa que en la primera hora solo el extracto acetónico y el DEET obtuvieron una máxima efectividad, mientras que el JET

y limoneno llegan a la mitad de su capacidad y disminuyen en pequeña proporción a las 24 y 48 hs.

Como control positivo, la DEET demostró que su efecto repelente disminuyó su repelencia solo en un 20% a las 24 hs y un 60% a las 48 hs cuando se probó en su mínima concentración.

En primer lugar, JAC es el que mejor comportamiento tiene como repelente, se mantiene más cerca del DEET durante toda la prueba. Aunque las 24 h de exposición con 12,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ disminuye su capacidad al 66% sigue siendo por encima de la mitad del efecto.

En segundo lugar, JET fue el que más concentración-dependiente, ya que, a 12,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ inició con un efecto repelente rondando el 50% siendo que se había mantenido cerca de DEET en las concentraciones previas.

Por último, el D-limoneno de igual forma que JET, parece depender bastante de la concentración y ligeramente del tiempo, ya que disminuye a las 48 hs a 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e inicio por debajo del 50% cuando fue la mínima concentración y se mantuvo así los dos días de prueba.

6 - Discusión

De acuerdo a la hipótesis planteada al iniciar este trabajo de investigación se puede afirmar que se confirmó la potenciación especialmente para PBO ya que las DL50 obtenidas con la combinación de los extractos acetónicos y etanólicos de *C. sativa* y D-limoneno con el inhibidor fueron menores que las obtenidas para cada componente por sí solo. Esto está de acuerdo con resultados anteriores: PBO es un demostrado potenciador que actualmente se usa con ese fin en distintos formulados insecticidas. Por ejemplo, fue probado como sinergista por aplicación tópica en *Sitophilus zeamais* (gorgojo del maíz) en combinación con malatión, pirimifos metílico, lindano, permetrina y carbarilo y demostró que se requirieron dosis menores de tóxico para obtener el mismo nivel de mortalidad, especialmente en la mezcla con pirimifos metílico, concluyendo los autores que las oxidasas son importantes en la detoxificación de insecticidas, principalmente enfatizando en el piretroide (Guerrero, 2003). En una publicación sobre poblaciones resistentes a deltametrina en *Anopheles culicifacies sensu lato*, un mosquito transmisor de malaria en la India, los autores utilizaron PBO

como sinergista y se vió un resultado favorable, sin embargo, a diferencia de este trabajo, se usaron insectos resistentes (Sahu y col, 2019). También se estudia para disminuir la concentración de piretroide y bajar la toxicidad del insecticida, se utiliza para este trabajo *Hyaella azteca* (pulga saltarina de mar) porque es sensible a piretroides, al igual que las vinchucas utilizadas en este trabajo y son de referencia para ver la ecotoxicidad de insecticidas de las aguas superficiales, se probó que concentraciones de PBO menor a 4 mg/L no aumentaron la toxicidad, mientras que entre 4 mg/L y 15 mg/L si lo hicieron (Giddings y col, 2016).

En cambio, el TPP no tuvo resultados tan favorables como los anteriores, solo fue potenciador de JAC y limoneno, lo cual puede deberse a la enzima sobre la cual actúa, es decir las esterasas. Otra opción sobre JET es que haya algún componente que interfiera en la acción del TPP. Sobre esta sustancia hay muchas publicaciones que alertan sobre su uso debido a la toxicidad para animales especialmente acuáticos (Chen JY y col, 2021; Shi Q. y col, 2018; Li Y. y col, 2019). Resaltamos un artículo sobre su efecto en *Escherichia coli* que demostró que su exposición a las 24 hs aumenta el estrés oxidativo y metabólicamente, es decir, se alteraron diferentes vías metabólicas, incluida la glucólisis/gluconeogénesis, el metabolismo de las pentosas fosfato, entre otras (Yu X. y col, 2022). Por último, una de las pocas investigaciones sobre insectos que encontramos fue del año 2022 explorado sobre *Sitobion miscanti*, un pulgón del orden Hemiptera igual que las vinchucas, y plaga de las producciones de trigo. En dicho trabajo se seleccionó artificialmente poblaciones resistentes al malatión luego de 40 generaciones, estas fueron expuestas a TPP y resultó en potenciación significativa, mientras que PBO no, es importante recalcar que el malatión no es un piretroide sino un organofosforado (Lou K. y col, 2022).

Sobre los efectos de la deltametrina se usó como control positivo debido a que la población de vinchucas es susceptible, fueron criadas en laboratorio y nunca estuvieron expuestas al insecticida. El resultado de este trabajo se encuentra dentro del mismo orden del publicado por Dadé Martin en 2020 donde se evaluó poblaciones susceptibles de *T. infestans* el cual concluyó una DL50 de 74,1 ng/i IC 95% (48.6 - 165.7) mientras que en poblaciones resistentes fue de 22367,1 ng/i IC 95% (17,697.1–32,989.2), del mismo modo que demuestra su potenciación con PBO que disminuye la diferencia entre las DL50 de ambas poblaciones (Dadé, M y col, 2020). En un trabajo de 1992 de los autores Robert y Gilberte Mestres, donde se revisan los usos y efectos ambientales de la deltametrina, en la sección sobre control de insecticidas presentan que en Francia

en los años ochenta se estableció que la tasa de aplicación mínima necesaria para el control de larvas de *Aedes caspius* y *A. Egipto* en 8 g de ingrediente activo aplicado por hectárea pero también advirtió contra posible resistencia futura al piretroide, lo cual es remarcable. Aunque en sus primeros años como insecticidas abundaban los estudios sobre su eficacia y seguridad, actualmente, la mayoría de la bibliografía respecto a este piretroide se centra en los estudios de la resistencia que causa en los insectos, como mosquitos (Liu QM. et al, 2017) o chinches hematófagas de nombre científico *Cimex lectularius* del orden Hemiptera (Gonzalez-Morales y Romero, 2019).

Sobre la letalidad de los extractos podemos decir que JAC resultó ser más potente que el JET, esto se puede deber a los distintos componentes que son obtenidos a través de los dos procesos, estos materiales vegetales aunque derivan de la misma planta no tienen igual composición química. Esto concuerda con otros trabajos ya que *C. sativa* está siendo estudiado por distintos grupos como bioinsecticida, en diversas partes del mundo sobre diferentes insectos. Por ejemplo, se demostró actividad insecticida en *Ctenocephalides felis felis* (pulga de gato) con un extracto analizado con espectrometría de masas que arrojó como componentes principales el γ -elemene (16.2%) y caryophyllene oxide (14.2%), en huevo, larva, pupa y adulto resultó en DL50 de 32.45; 91.61; 466.41 y 927.92 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente (Soares, y col, 2023). En un trabajo muy completo fue testeado para insectos plagas (*Culex quinquefasciatus*, *Myzus persicae*, *Musca domestica* y *Spodoptera littoralis*) vs invertebrados inofensivos (*Harmonia axyridis* y *Eisenia fetida*) y se comparó con α -cipermetrina como control positivo. El extracto que se utilizó tenía (E)-caryophyllene (45.4%), myrcene (25.0%) y α -pinene (17.9%) como componentes más abundantes. Esta investigación demostró que *C. sativa* tuvo actividad sobre los vectores de enfermedades y no sobre los invertebrados inofensivos, lo cual da cuenta de una acción específica y sobre su característica de ser amigable con el medio ambiente (Benelli y col, 2018). En contraste con esto, el principal bioinsecticida que se estudia contra *Triatoma infestans* no es una planta, sino un hongo capaz de matar al insecto, denominado *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes), incluso en la región del Chaco argentino (Luz C. y col, 1998; Lecuona y col, 2001; Baldiviezo y col, 2023).

Por último, el D-limoneno resultó ser más potente que los extractos, aunque su máxima actividad se demostró en tiempos posteriores (72 h), fue el que más se acercó al valor de DL50 de la deltametrina. Esto lo posiciona como un buen insecticida por su potencia. Esto concuerda con un estudio que utilizó la topicación del limoneno del

mismo modo que nosotros probado en distintas especies de escarabajos, con distintas concentraciones del principio activo diluido en acetona aplicado del tórax de *R. dominica*, *S. oryzae*, y *T. castaneum*, dando DL50 de 74.73, 85.37, 79.78 microgramos por insecto respectivamente (Tripathi y col, 2003).

Las interacciones que pueden ocurrir cuando se combinan dos o más compuestos son potenciación, sinergismo, antagonismo y adición. Entre los resultados que se obtuvieron en el presente trabajo demostramos un efecto sinergista en la mayoría de las combinaciones, tan solo en la combinación de Limoneno + JET se demostró un efecto de adición entre los compuestos mezclados. Cabe destacar, que el mayor sinergismo se demostró entre la combinación de deltametrina y JAC, esto quiere decir, que la mezcla de deltametrina con extracto acetónico de la variante Juanita de *C. sativa* podría determinar una disminución en la dosis de deltametrina que se debería usar para el control de triatominos. A fines prácticos, la presencia de sinergismo entre compuestos supone la necesidad de menores dosis de cada compuesto y, por lo tanto, una disminución en costos y el impacto negativo para el ambiente que supone la liberación de insecticidas sintéticos como deltametrina.

Sobre los resultados del control positivo de repelencia del DEET como repelente de vinchucas están en concordancia con un trabajo realizado por Alzogaray y col (2000) donde se usaron tres tipos de experimentos, todos basados en ofrecer a ninfas de *T. infestans* una superficie con la sustancia y otra sin esta, y en todos resultó que la repelencia depende de la dosis. Del mismo modo, en una publicación se estudió el comportamiento de *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*, frente a piel humana sin nada, y con 2-mercaptoetanol, dimetil sulfito, 2-feniletanol y DEET como “gold-standard”, cuantificando el tiempo que tardaban los insectos en acercarse al huésped. Esto resultó en una disminución del tiempo de aproximación respecto al control negativo, especialmente cuando las dosis de DEET eran las más altas (Ramírez, M. y col. 2020).

Para los extractos JAC y JET, de nuevo se obtiene un mejor resultado del primero, probablemente por las razones antes explicadas. En cuanto a repelencia, un trabajo presentado en 2023 por Fabiana Diaz donde se evaluó sobre *C. sativa* variante deep mandarine los dos extractos obtenidos tienen un efecto inmediato y sostenido en el tiempo, esto puede ser porque distintas variantes de la planta tienen compuestos distintos, en especial el análisis por HPLC arroja que JAC tiene más cannabinoides que JET, en el presente trabajo no se evaluaron dichos compuestos, solo los terpenos ya que trabajamos con el limoneno. Respecto al monoterpeno parece ser el que menos

repelencia tiene, sin embargo hay mucha bibliografía que da cuenta de su alta capacidad repelente. La eficacia de este compuesto fue demostrado también en el mosquito *Aedes aegypti*, que tienen un sofisticado sistema olfatorio, el ensayo de repelencia fue el mismo utilizado en este estudio, los autores remarcan que la forma sintética de D-limoneno tiene más repelencia que la natural (Nematollahi, 2021). En un revisión realizada Nerio y col., (2010) sobre la actividad repelente de los aceites esenciales proponen que aunque se le suele dar la capacidad de repelencia a unos componentes específicos, es en realidad el fenómeno del sinergismo entre varios metabolitos el que tiene el mayor efecto versus cada componente aislado. Caso contrario a lo que se vio en la letalidad.

7- Conclusiones

Evaluamos que JAC, JET y D-limoneno se posicionan como buenas opciones frente al control de *T. Infestans* con DL50 de 784, 2378 y 193 ng/i respectivamente y 100% de repelencia a 50µg/cm² durante 48 hs. El PBO es un buen potenciador para JAC, JET y D-limoneno frente a las vinchucas con DL50 de 274, 575 y 38 ng/i respectivamente. El TPP presentó resultados positivos para JAC y limoneno con DL50 de 382 y 2.792 ng/i, pero no para JET ni deltametrina, lo cual deja abierto el espacio para más investigación sobre los mecanismos y posibilidades de este compuesto. JAC, JET y limoneno demostraron ser sinergistas de la deltametrina, principalmente el primero con un IC de 0.35. En el contexto epidemiológico actual de la enfermedad de Chagas en nuestro país y Latinoamérica es importante el control vectorial como herramienta principal para evitar el contagio por picadura de insecto. El uso de insecticidas sintéticos generó poblaciones de insectos resistentes y daño al medio ambiente, por lo cual se exploran nuevas alternativas con sustancias bioinsecticidas. Creemos que es importante dirigir esfuerzos económicos y recursos humanos en educación e investigación a las enfermedades desatendidas de nuestro país que afectan a las personas más vulnerables. Este trabajo es una parte dentro de un proyecto más grande de buscar nuevas herramientas para el control vectorial del Chagas.

8 - Bibliografía

Alzogaray RA, Fontan A, Zerba EN. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Med Vet Entomol.* 2000 Mar;14(1):6-10. doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00213.x. PMID: 10759306.

Baldiviezo LV, Nieva LB, Pedrini N, Cardozo RM. (2023) Microencapsulation of a Native Strain of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* and Bioinsecticide Activity against Pyrethroid-Resistant *Triatoma infestans* to Vector Control of Chagas Disease in the Argentine Gran Chaco Region. *Trop Med Infect Dis.* 2023 Apr 24;8(5):245. doi: 10.3390/tropicalmed8050245. PMID: 37235293; PMCID: PMC10224310.

Benelli G, Pavela R, Petrelli R, Cappellacci L, Santini G, et al. (2018) The essential oil from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products as an effective tool for insect pest management in organic crops. *Industrial Crops and Products*, 122:308-315.

CDC, Centro de control de enfermedades. DPDx - American Trypanosomiasis. Visitado por última vez en noviembre 2023. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>

Casabe de Malkenson, Norma Beatriz. (1982). Estudio de las esterases del *T. infestans* y su rol en el metabolismo de insecticidas organofosforados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1702_CasabedeMalkenson.pdf

Chen JY, Hu HL, Feng L, Ding GH. (2022) Ecotoxicity assessment of triphenyl phosphate (TPhP) exposure in *Hoplobatrachus rugulosus* tadpoles. *Chemosphere.* 2022 Apr;292:133480. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133480. Epub 2021 Dec 30. PMID: 34974044.

Chou, T.-C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, 58(3), 621–681. doi:10.1124/pr.58.3.1

Ciriminna, R., Lomeli-Rodriguez, M., Demma Carà, P., Lopez-Sanchez, J. A., & Pagliaro, M. (2014). Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. **Chemical Communications (Cambridge, England)**, 50(97), 15288-15296. doi:10.1039/c4cc06147k

Cuba C., Hidalgo S. (2018) Curso sobre Enfermedades Vectoriales para Agentes Comunitarios en Ambiente y Salud. Módulo V: Chagas. Ministerio de Salud de la Nación.

Dadé, M. M., Daniele, M. R., Marcos, M., Errecalde, J. O., & Rodriguez-Vivas, R. I. (2020). First report of the lethal activity and synergism between deltamethrin, amitraz and piperonyl butoxide against susceptible and pyrethroid-resistant nymphs of **Triatoma infestans**. **Experimental Parasitology**, 107986. doi:10.1016/j.exppara.2020.107986

Diaz, Fabiana Susana (2023) Estudio de la actividad letal y repelente de extractos de Cannabis sativa de la variante Deep Mandarin en ninfas de *Triatoma infestans*. Universidad Nacional Arturo Jauretche. Recurso en línea visitado por última vez en noviembre de 2023.
<https://biblioarchivo.unaj.edu.ar/mostrar/pdf/scvsdf/erwe/9152fac3d56d1a9b5c2633437701ca9f8aaa94d8>

Giddings, J., Gagne, J., & Sharp, J. (2016). Synergistic effect of piperonyl butoxide on acute toxicity of pyrethrins to *Hyalomma azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(8), 2111–2116. doi:10.1002/etc.3373

Gonzalez-Morales MA, Romero A. (2019) Effect of Synergists on Deltamethrin Resistance in the Common Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae). *J*

Econ Entomol. 2019 Mar 21;112(2):786-791. doi: 10.1093/jee/toy376. PMID: 30535372.

Guerrero Rodríguez, E., Silva Martínez, H.L., Corrales Reynaga, J. (2003). Susceptibility of *Sitophilus zeamais* to insecticides and piperonyl butoxide in two food substrata. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba (Costa Rica) Visitado por última vez en noviembre del 2023. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6840>

Gürtler RE, Solard ND, Lauricela MA, Haedo AS, Pietrokovski SM, Alberti, AA y col. (1986) Dynamics of transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of Argentina. III. Persistence of *T. cruzi* parasitemia among canine reservoirs in a two-year follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* ;28(4):213-9.

Heinzow B y Andersen H. 2006. Biocides and pesticides. En: John H y Howard G. Worth (eds), *Fundamental toxicology*, pp 292-296. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Hewlett, P. S., & Plackett, R. L. (1979). **The Interpretation of quantal responses in Biology**. University Park Press, Baltimore.

Hourfane, S., Mechqoq, H., Bekkali, A. Y., Rocha, J. M., & El Aouad, N. (2023). A Comprehensive Review on Cannabis sativa Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. **Plants (Basel)**, 12(6), 1245. doi:10.3390/plants12061245

Ishaaya, I. (1993). Insect detoxifying enzymes: their importance in pesticide synergism and resistance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 22(1-2), 263-276. doi:10.1002/arch.940220119

Konnie H. Plumlee, Chapter 42 - DEET, Editor(s): Michael E. Peterson, Patricia A. Talcott, *Small Animal Toxicology (Second Edition)*, W.B. Saunders, 2006, Pages 690-692, ISBN 9780721606392
<https://doi.org/10.1016/B0-72-160639-3/50045-9>.

Lecuona RE, Edelstein JD, Berretta MF, La Rossa FR, Arcas JA. (2001) Evaluation of *Beauveria bassiana* (hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol.* 2001 Mar;38(2):172-9. doi: 10.1603/0022-2585-38.2.172. PMID: 11296819.

Li Y, Chen R, He J, Ma H, Zhao F, Tao S, Liu J, Hu J. (2018) Triphenyl Phosphate at Environmental Levels Retarded Ovary Development and Reduced Egg Production in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci Technol.* 2019 Dec 17;53(24):14709-14715. doi: 10.1021/acs.est.9b05669. Epub 2019 Dec 5. PMID: 31751126.

Liu QM, Li CX, Wu Q, Shi QM, Sun AJ, Zhang HD, Guo XX, Dong YD, Xing D, Zhang YM, Han Q, Diao XP, Zhao TY (2017). Identification of Differentially Expressed Genes In Deltamethrin-Resistant *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J Am Mosq Control Assoc.* 2017 Dec;33(4):324-330. doi: 10.2987/17-6658.1. PMID: 29369035.

Lou K, Song D, Zhu B, Liang P, Gao X. (2022) Resistance Mechanisms of *Sitobion miscanthi* (Hemiptera: Aphididae) to Malathion Revealed by Synergist Assay. *Insects.* 2022 Nov 11;13(11):1043. doi: 10.3390/insects13111043. PMID: 36421946; PMCID: PMC9692644.

Luz C, Silva IG, Cordeiro CM, Tigano MS. (1998) *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible agent for biological control of Chagas disease vectors. *J Med Entomol.* 1998 Nov;35(6):977-9. doi: 10.1093/jmedent/35.6.977. PMID: 9835689.

Maia, M.F., Moore, S.J. (2011) Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malar J* 10 (Suppl 1), S11 (2011). Visitado por última vez en noviembre del 2023. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S11>

Moretti, A. N., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2013) Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*

(Hemiptera: Reduviidae) to 10 monoterpene alcohols. Journal of medical entomology, 50(5) ., 1046–1054.

Nematollahi N, Ross PA, Hoffmann AA, Kolev SD, Steinemann A. Limonene Emissions: Do Different Types Have Different Biological Effects? Int J Environ Res Public Health. 2021 Oct 7;18(19):10505. doi: 10.3390/ijerph181910505. PMID: 34639805; PMCID: PMC8507918.

Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: a review. Bioresour Technol. 2010 Jan;101(1):372-8. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.048. Epub 2009 Sep 2. PMID: 19729299.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (1994) Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. Acta Toxicológica Argentina, 2:29-32.

PAHO (Organización Panamericana de la Salud). Enfermedad de Chagas. Visitado por última vez en noviembre 2023.
<https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>.

Piccolo M, Vassena C, Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E. (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J Med Entomol, 42:637-642.

Ramírez, M., Ortiz, M.I., Guerenstein, P. et al. Novel repellents for the blood-sucking insects *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*, vectors of Chagas disease. Parasites Vectors 13, 142 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04013-5>

Reynoso MMN, Lucia A, Zerba EN, Alzogaray RA. The Octopamine Receptor Is a Possible Target for Eugenol-Induced Hyperactivity in the Blood-Sucking Bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol. 2020 Feb 27;57(2):627-630. doi: 10.1093/jme/tjz183. PMID: 31637445.

Rivera-González, K. S., Beames, T. G., & Lipinski, R. J. (2021). Examining the developmental toxicity of piperonyl butoxide as a Sonic hedgehog pathway inhibitor. **Chemosphere**, 264(Pt 1), 128414.

doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128414

Rodríguez González, Julio César, & Rodeiro Guerra, Idania. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(3), 495-507. Visitado por última vez noviembre 2023
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300015&lng=es&tlng=es

Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., & Fernández, D. (2007). Determinación in vivo del papel de las enzimas esterasas y glutatión transferasa en la resistencia a piretroides en **Aedes aegypti** (Diptera: Culicidae). **Revista Cubana de Medicina Tropical**, 59(3)

Rolandi, C., Roca-Acevedo, G., Schilman, P. E., & Germano, M. D. (2020). Aerobic Metabolism Alterations as an Evidence of Underlying Deltamethrin Resistance Mechanisms in **Triatoma infestans** (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, 57(6), 1988-1991. doi:10.1093/jme/tjaa099

Ruigt, G. S. F. (1985). Pyrethroids. In G. A. Kerkut & L. I. Gilbert (Eds.), **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology** (pp. 183-262). Pergamon Press.

Sahu SS, Dash S, Sonia T, Gunasekaran K. (2019) Synergist piperonyl butoxide enhances the efficacy of deltamethrin in deltamethrin-resistant *Anopheles culicifacies sensu lato* in malaria endemic districts of Odisha State, India. *Indian J Med Res.* 2019 Apr;149(4):554-557. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_144_18. PMID: 31411181; PMCID: PMC6676828.

Santo-Orihuela, P. L., Vassena, C. V., Carvajal, G., Clark, E., Menacho, S., Bozo, R., ... Marcet, P. L. (2017). Toxicological, Enzymatic, and Molecular

Assessment of the Insecticide Susceptibility Profile of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) Populations From Rural Communities of Santa Cruz, Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, 54(1), 187-195. doi:10.1093/jme/tjw163

Sfara V, Zerba EN, Alzogaray RA. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. J Med Entomol. 2009 May;46(3):511-5. doi: 10.1603/033.046.0315. PMID: 19496421.

Sheila Ons ,Lucila Traverso, Andrés Lavore, Ivana Sierra, Victorio Palacio, Jesús Martínez-Barnette, José Manuel Latorre-Estivalis, Gaston Mougabure-Cueto, Flavio Francini, Marcelo G. Lorenzo, Mario Henry Rodríguez, Rolando V. Rivera-Pomar. (2017) Comparative and functional triatomine genomics reveals reductions and expansions in insecticide resistance-related gene families. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2-3:8-25.

Shi Q, Wang M, Shi F, Yang L, Guo Y, Feng C, Liu J, Zhou B. (2018) Developmental neurotoxicity of triphenyl phosphate in zebrafish larvae. Aquat Toxicol. 2018 Oct;203:80-87. doi: 10.1016/j.aquatox.2018.08.001. Epub 2018 Aug 3. PMID: 30096480.

Soares EFMS, Carlos DFLP, Epifanio NMM, Coumendouros K, Cid YP, Chaves DSA, Campos DR. (2023) Insecticidal activity of essential oil of *Cannabis sativa* against the immature and adult stages of *Ctenocephalides felis felis*. Rev Bras Parasitol Vet. 2023 Jan 13;32(1):e015122. doi: 10.1590/S1984-29612023003. PMID: 36651425.

Tripathi AK, Prajapati V, Khanuja SP, Kumar S. Effect of d-limonene on three stored-product beetles. J Econ Entomol. 2003 Jun;96(3):990-5. doi: 10.1603/0022-0493-96.3.990. PMID: 12852646.

WHO (Organización Mundial de la Salud). Enfermedad de chagas. Visitado por última vez en noviembre del 2023.

[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypnosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypnosomiasis))

Yu X, Jin X, Tang J, Wang N, Yu Y, Sun R, Deng F, Huang C, Sun J, Zhu L.

(2022) Metabolomic analysis and oxidative stress response reveals the toxicity in *Escherichia coli* induced by organophosphate flame retardants

tris(2-chloroethyl) phosphate and triphenyl phosphate. *Chemosphere*. 2022

Mar;291(Pt 3):133125. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.133125. Epub 2021

Nov 30. PMID: 34861260.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-076020070003000

05&lng=es&tlng=pt