



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

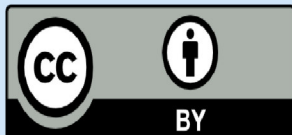
Diaz, Fabiana Susana

Estudio de la actividad letal y repelente de extractos de Cannabis sativa de la variante Deep Mandarin en ninfas de Triatoma infestans

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

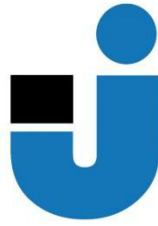
Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Diaz, F. S. (2023). *Estudio de la actividad letal y repelente de extractos de Cannabis sativa de la variante Deep Mandarin en ninfas de Triatoma infestans* [trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche].

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ

<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Trabajo final para la obtención del título de Bioquímica.

***“Estudio de la actividad letal y
repelente de extractos de Cannabis
sativa de la variante Deep Mandarin en
ninfas de Triatoma infestans”***

Autora: Diaz, Fabiana Susana

Director del trabajo: Dr. Dadé, Martin

Co-director: Mgs. Guillermo Schinella

Universidad Nacional Arturo Jauretche

Instituto de Ciencias de la Salud

Florencio Varela, 2023

Resumen

La enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* es transmitido a través de insectos vectores pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) y posee como huésped a más de 100 especies de mamíferos, incluyendo al hombre. El control químico con insecticidas se ha transformado a lo largo de los años en una herramienta fundamental para el control de los vectores de *T. infestans*. Sin embargo, el uso irracional por más de cincuenta años de estos insecticidas provocó la aparición de vinchucas resistentes a piretroides. En recientes estudios se ha puesto en evidencia el uso de bioinsecticidas para el control de vectores. Los bioinsecticidas tienen como ventaja su alta seguridad y especificidad, su naturaleza biodegradable y su bajo costo. En este contexto, en los últimos años extractos y aceites esenciales obtenidos de *Cannabis sativa* han sido objeto de distintos estudios para investigar su posible actividad como insecticida/acaricida. Teniendo en cuenta lo antes mencionado, los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la actividad letal y repelente de extractos de *Cannabis sativa* variante Deep Mandarin en triatominos, realizar la caracterización química por cromatografía de gases y evaluar la toxicidad de dichos extractos en una especie beneficiosa como son las abejas (*Apis mellifera*). Para cuantificar estos efectos se realizaron ensayos de topicación, de contacto con superficies tratadas con los extractos, mientras que, para cuantificar la repelencia de los extractos se utilizó la técnica de preferencia de área. Los tres extractos evaluados demostraron tener actividad letal sobre las ninfas de vinchucas. El extracto acetónico fue el más potente de los tres. Los tres extractos también demostraron una alta actividad repelente, que inclusive, fue similar al repelente de insectos N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) utilizado como control positivo. Por último, ninguno de los extractos de *C. sativa* demostró actividad letal sobre adultos de abejas. Los resultados presentados en este trabajo pueden contribuir como una alternativa interesante y efectiva que pueda reemplazar a los insecticidas sintéticos utilizados en la actualidad.

Palabras Claves: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma infestans*, bioinsecticidas, *Cannabis Sativa* variante Deep Mandarin.

Índice

1 - AGRADECIMIENTOS	3
2 - GLOSARIO	4
3 - INTRODUCCIÓN	5
3.1 - Enfermedad de Chagas	5
3.2 - Vector	7
3.3 - Formas de transmisión	8
3.4 - Fases de la enfermedad	9
3.5 - Tratamiento	10
4 - CONTROL DEL VECTOR	11
4.1 - Manejo integrado de vectores	11
4.2 - Insecticidas utilizados en la actualidad	12
4.3 - Bioinsecticidas	13
4.4 - <i>Cannabis sativa</i> variante Deep Mandarin	13
5 - OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	14
5.1 - Objetivos generales	14
5.2 - Objetivos específicos	14
6 - DESARROLLO DEL TRABAJO.....	15
6.1 - Materiales y métodos	15
6.2 - Insectos	15
6.3 - Material vegetal	15
6.4 - Extractos	16
6.5 - Perfil de terpenos y cannabinoides	16
6.6 - Ensayo de topicación	17
6.7 - Ensayo de contacto con papel de filtro	17
6.8 - Ensayo de repelencia de <i>Cannabis sativa</i> variante Deep Mandarin	18
6.9 - Toxicidad de extractos de <i>C. sativa</i> en abejas adultas	18
6.10 - Análisis estadístico	19
7 - RESULTADOS	20
8 - DISCUSIÓN	22
9 - CONCLUSIÓN	25
10 - BIBLIOGRAFÍA	26

1 - Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi director de trabajo final por su dedicación y compromiso, por proveerme las herramientas necesarias para poder llevar a cabo el trabajo final, sin su buena voluntad y predisposición no hubiera podido realizar el trabajo aquí presentado.

Gracias a mis compañeros por acompañarme en este proceso, por ayudarme a poder avanzar en los momentos difíciles que se plantearon a lo largo de la carrera. Estoy muy contenta del hermoso grupo que se formó, en el cual somos personas que se ayudan y celebran el logro de cada par.

También quiero hacer una mención especial a los profesores que he tenido, sin sus enseñanzas no hubiera logrado estar donde estoy hoy. Gracias por brindarme las herramientas, las aptitudes y los conocimientos para alcanzar el tan deseado título de Bioquímica. Es un orgullo para mí convertirme en profesional de la mano de excelentes personas, tanto a nivel humano como profesional.

Para finalizar quiero agradecer a mi familia y amigos por estar siempre, por comprender la importancia de la carrera para mí, entender que mi sueño desde chiquita siempre fue convertirme en Bioquímica, por estar ahí a pesar de que nunca tenía tiempo para dedicarles a ellos. Nunca recibí enojos ni reclamos de su parte, solo mensajes de aliento y apoyo incondicional, lo que me hizo valorar y entender la importancia que tiene la gente que nos rodea a la hora de cumplir nuestras metas, lo fundamental del entorno en nuestros logros.

Para llegar al fin de un proyecto se necesita voluntad, determinación, perseverancia, constancia, sacrificio, herramientas, apoyo, etcétera, agradezco a todas las personas mencionadas anteriormente por recorrer este camino a mi lado haciendo un aporte desde su lugar ayudándome a concluir con éxito uno de mis mayores sueños, convertirme en Bioquímica.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.” Albert Einstein

2 - Glosario

DMSO: dimetilsulfóxido

ET: Etanólico

AC: Acetónico

CBDV: Cannabidivarina

CBG: Cannabigerol

CBD: Cannabidiol

THCV: Tetrahidrocannabivarina

CBN: Cannabinol

Δ^9 - THC: Delta-9-tetrahydrocannabinol

Δ^8 - THC: Delta-8-tetrahydrocannabinol

CBC: Cannabicromeno

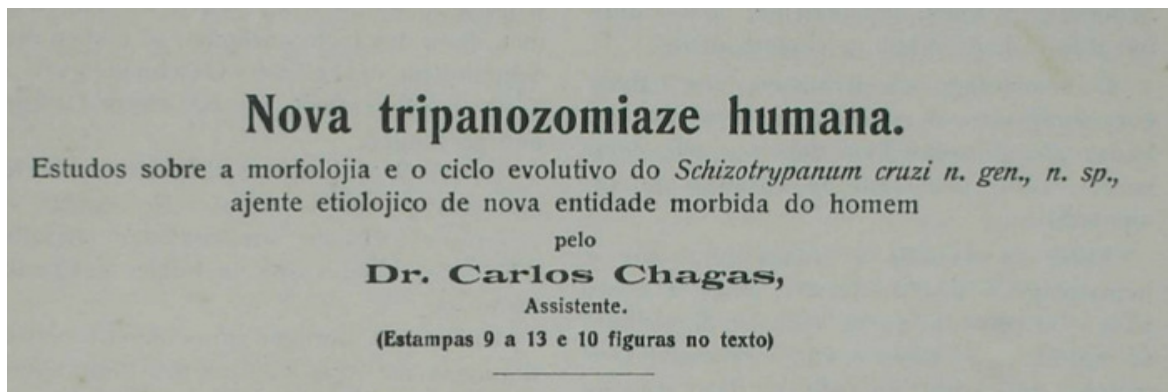
DEET: N, N-Dietil-meta-toluamida, ingrediente más habitual de los repelentes de insectos.

3 - Introducción

3.1 - Enfermedad de chagas

La enfermedad de Chagas fue descubierta por el doctor Carlos Chagas en el año 1909 durante un examen médico a Berenice, una niña de 2 años de edad con sospecha de malaria. Berenice presentaba fiebre, esplenomegalia y hepatomegalia, al hacer un frotis de sangre, Carlos Chagas descubrió un parásito flagelado al cual denominó *Schizotrypanum cruzi*, en honor a Oswaldo Cruz. Oswaldo Cruz, médico brasileiro, mentor de Chagas, en 1908 encomienda a Carlos Chagas la campaña contra la malaria en Lassance, fue allí donde Carlos Chagas realizó el descubrimiento del *Trypanosoma. cruzi*, el vector y las características clínicas y epidemiológicas de la enfermedad que hoy lleva su nombre (Náquira y col., 2009) (Figura 1).

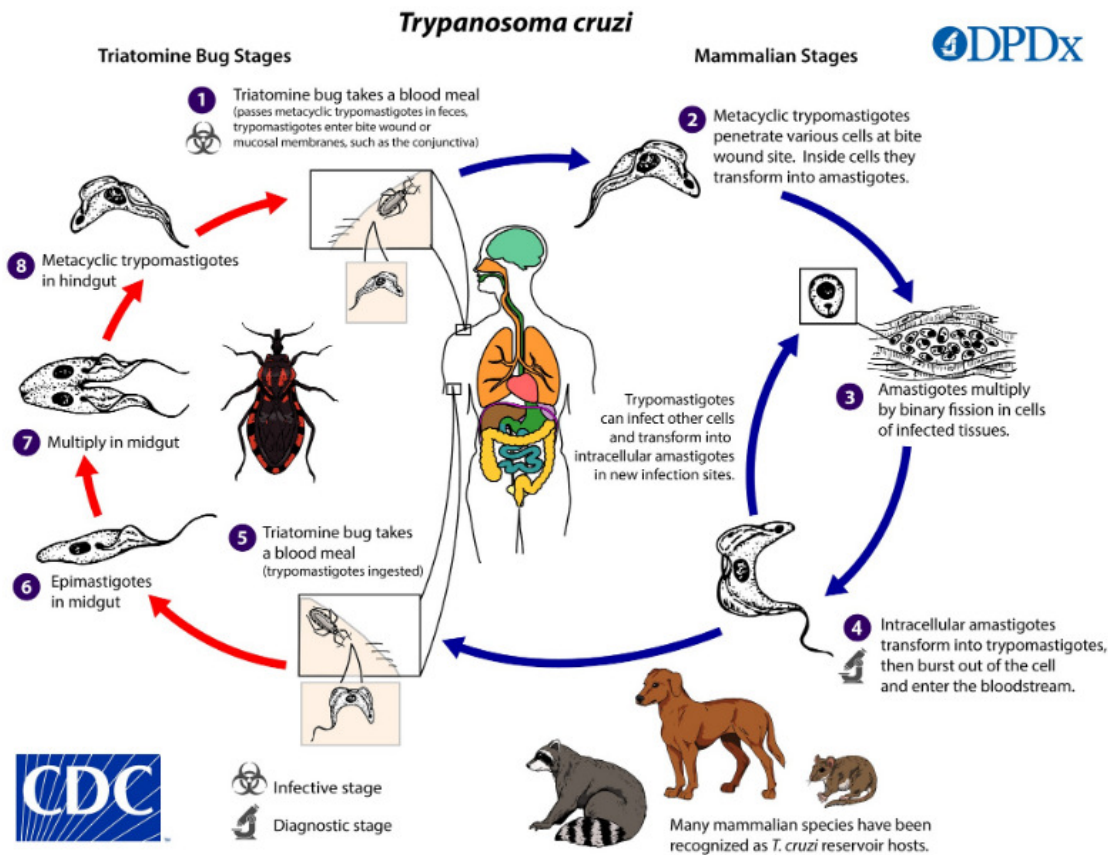
Figura 1: Trabajo original del Dr. Carlos Chagas en donde el autor describe por primera vez el ciclo biológico de la enfermedad.



La enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el parásito hemoflagelado *T. cruzi*, que es transmitido a través de un vector (insectos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) y posee como huésped a más de 100 especies de mamíferos, incluyendo al hombre (Gürtler y col., 1986).

Figura 2: Ciclo de vida del parásito *T. cruzi*.

Fuente: DPDx, *Trypanosoma cruzi*



La Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas) es la principal enfermedad parasitaria de nuestro continente y uno de los problemas de salud pública más importantes de América Latina.

Esta enfermedad es endémica en 21 países del Continente Americano, lo que se traduce en considerarla en la actualidad como una de las enfermedades transmitidas por insectos con mayor importancia a nivel mundial. Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), se calcula que en el mundo hay más de 10 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en América Latina. En América, se registran 30.000 nuevos casos cada año, 12.000 muertes en promedio. Unos 70 millones de personas en el Continente Americano, viven en áreas expuestas al Chagas y están en riesgo de contraer la enfermedad (OPS, 2023).

La OPS considera a la enfermedad de Chagas como una *enfermedad desatendida*, esto se debe a que es una patología invisible dado que no se expande

hacia otros países, está asociada a la pobreza y además a comparación de otras enfermedades, si bien causa daños graves y permanentes, no genera un número de muertes excesivo que capte la atención de los medios de comunicación. Es considerada invisible para varios sectores tales como la investigación y la industria los cuales no invierten en el desarrollo de medicamentos, métodos diagnóstico o vacunas porque la población afectada es de bajos recursos y no tiene acceso a la salud ni poder económico (OPS, 2023).

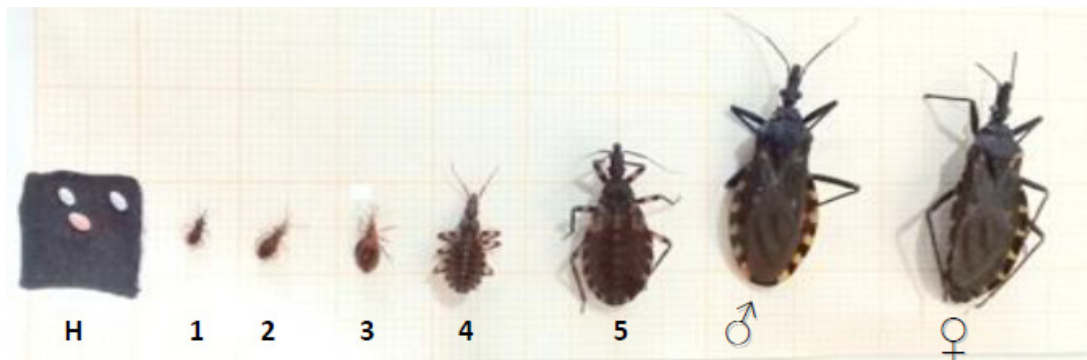
3.2 - Vector

Para ser un buen vector se debe cumplir con determinadas condiciones que permitan una transmisión efectiva del parásito. Uno de los requisitos es que el alimento tenga un efecto de diuresis en el insecto, es decir, que mientras el insecto se está alimentando sobre el hospedador defeca en el sitio de la picadura. Otro requisito es que el vector esté infectado con el parásito, para esto, el vector previamente debe haberse alimentado de un hospedador portador de *T. cruzi*. Por último, se debe considerar la temperatura apta para la supervivencia y el horario de preferencia de alimentación del insecto. En el caso de *T. infestans* el horario de mayor actividad suele ser durante la noche. Teniendo en cuenta los requisitos mencionados es que se sabe que no todas las especies del género *Triatoma* son buenos vectores de la enfermedad de chagas (Gürtler y col., 1986).

El principal vector de *T. cruzi* en el Cono Sur es *Triatoma infestans* (vinchuca). Dicho insecto es un vector biológico hematófago, es decir, que adquiere y transmite el parásito cuando se alimenta de la sangre de 100 especies de mamíferos incluyendo al hombre. En este punto, es importante aclarar que las aves si bien son una fuente de alimento no pueden infectar a la vinchuca ya que son refractarias a la infección con *T. cruzi* (Sfara y col., 2006).

Triatoma infestans tiene distintas formas dependiendo de la etapa de crecimiento en la que se encuentre, la podemos encontrar como huevo, ninfa o como insecto adulto; así mismo las ninfas tienen 5 estadios diferentes. Las diferencias entre la etapa adulta y la etapa de ninfas son que las ninfas no poseen alas ni sistema reproductor, con lo cual la diferenciación sexual se da en la etapa adulta (Figura 3).

Figura 3: Diferentes estadios del ciclo vital de *T. infestans* (vinchucas).



T. infestans es un insecto hematófago obligado, esto quiere decir que para pasar de una etapa de crecimiento a la siguiente necesita alimentarse, lo cual es un dato para nada menor ya que si no se alimenta muere y no alcanza su etapa adulta. Se debe tener en cuenta que *T. infestans* puede mantenerse hasta 6 meses sin alimento disminuyendo su metabolismo al mínimo (Sfara y col., 2006).

3.3 - Formas de transmisión

Dentro de las formas transmisión encontramos la vía vectorial, oral, transmisión vertical, la transmisión por accidentes que impliquen un contacto sanguíneo y las donaciones de sangre (OPS, 2023).

En la actualidad se realizan tamizajes serológicos tanto para embarazadas como para hemodonantes, con lo cual esto ha disminuido mucho el riesgo de contagio por dichas vías dejando a la vía vectorial como la principal. Esta vía es responsable de un 80% de la transmisión del parásito, mientras que, las transfusiones de sangre representan un 5-20%, los trasplantes de órganos 5-20%, la transmisión vertical 10-20%, la transmisión con alimentos contaminados menor a un 1%, al igual que los accidentes de laboratorio (OPS, 2023).

La Ley Nacional de Sangre 22.990/1983 estableció la obligatoriedad del tamizaje serológico de enfermedades endémicas (entre ellas enfermedad de Chagas) en todos los hemodonantes. En el año 2007, se sancionó la Ley 26.281, que en su artículo cuarto expresa la obligatoriedad de realizar pruebas diagnósticas en toda mujer embarazada, en los recién nacidos, hijos de madres infectadas hasta el primer

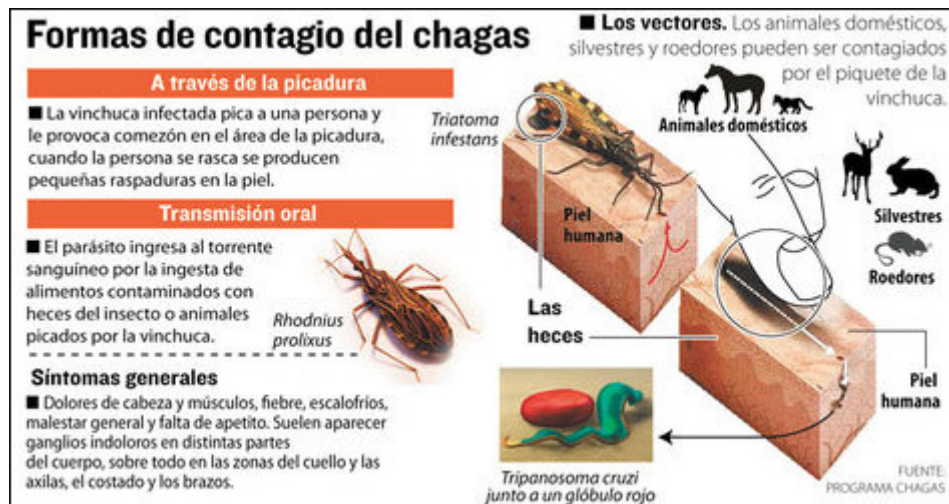
año de vida y en el resto de los hijos, menores de catorce (14) años de las mismas madres y, en general, en niños y niñas al cumplir los seis (6) y doce (12) años de edad.

La vía vectorial se da por la picadura del insecto infectado con el *T. cruzi*. Una vez que pica el insecto tiende a defecar en la zona de la picadura, como la picadura genera picazón, cuando la persona se rasca produce una lastimadura en la piel facilitando el ingreso del parásito al organismo (Gürtler y col., 1986).

Por otra parte, el contagio de la vía oral se produce por el consumo alimentos contaminados con el parásito, dicha contaminación se puede dar por diversos motivos, por ejemplo, por materia fecal del vector en la comida o en los utensilios.

Figura 4 Formas de contagio de chagas

Fuente: Diario de ciencias laboratorio y gabinete Mal de Chagas



3.4 - Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas tiene 3 fases: la fase aguda, la fase indeterminada y la fase crónica. Un gran porcentaje de los infectados (70-80%) cursan con la enfermedad de forma asintomática mientras que el resto (20-30%) cursan con cuadros crónicos sintomáticos (OPS, 2023).

La fase aguda asintomática dura pocas semanas o meses luego de ocurrida la infección. Algunos pacientes pueden experimentar síntomas, que en general son

leves y desaparecen solos, algunos de ellos son: fiebre, hinchazón en el sitio de la infección (chagoma), erupción, dolor de cuerpo, fatiga, pérdida de apetito, dolor de cabeza, náuseas, diarrea o vómitos, ganglios inflamados, hepatomegalia, esplenomegalia, hinchazón de los párpados, etc. En algunos casos, si la infección no es tratada, la enfermedad de Chagas evoluciona hacia la fase crónica (Storino R., 2010).

En la fase crónica los signos y síntomas pueden demorar entre 10 y 20 años en manifestarse, la mayoría de los pacientes desarrollan daño cardíaco y un porcentaje menor de pacientes sufren dilatación colon o esófago por trastornos motores gastrointestinales. Dentro de los signos y síntomas de la fase crónica podemos encontrar: insuficiencia cardíaca debido a una destrucción progresiva del músculo cardíaco, irregularidades en los latidos del corazón, paro cardíaco repentino, dificultad para tragar a causa del agrandamiento del esófago, dolor estomacal y estreñimiento causado por el agrandamiento del colon (Storino R., 2010).

Al período intermedio entre la fase aguda y la fase crónica se lo denomina fase indeterminada, la cual es completamente asintomática y se puede prolongar durante varios años (OMS/OPS, 2023).

3.5 - Tratamiento

El tratamiento se basa en matar al parásito en la fase aguda de la enfermedad, en los pacientes que se encuentran en la fase crónica ya no es posible matar al parásito, en estos casos el tratamiento apunta a un control de signos y síntomas y a una mejor evolución clínico-patológica (OPS, 2018).

Para los pacientes que se encuentran cursando la fase aguda de la enfermedad se utilizan los únicos dos fármacos eficaces para matar el parásito en la actualidad, éstos con Benznidazol o Nifurtimox.

El uso de estos fármacos en pacientes que cursan enfermedad de Chagas en fase crónica está contraindicado ya que sus diversos efectos adversos superan el beneficio. Estudios de toxicidad del fármaco Nifurtimox evidenciaron neurotoxicidad, daño testicular, toxicidad ovárica y efectos deletéreos en corazón, tejido mamario, adrenales, colon y esófago. Por otro lado, en los estudios de toxicidad experimental para el Benznidazol, se observó un impacto negativo en

adrenales, colon y esófago. También pudieron demostrarse efectos mutagénicos significativos para los dos fármacos (OPS, 2023).

4 - Control de vector

4.1 - Manejo integrado de vectores

En la actualidad, las principales estrategias para el control de la Enfermedad de Chagas son el tamizaje serológico de enfermedades endémicas en todos los hemodonantes y la erradicación de los insectos vectores de la enfermedad de los domicilios y peridomicilios (gallineros, corrales, galpones, etc.) (Gürtler y col., 1986). Estas estrategias están sustentadas por dos limitaciones fundamentales propias de la Enfermedad de Chagas: no existe una vacuna para eliminar a *T. cruzi*, sumado a la falta de eficacia clínica que han demostrado los principales fármacos utilizados para el tratamiento en ciertas etapas de la enfermedad (Germano y col, 2018).

Ante la situación planteada, el control del vector *T. infestans* se convirtió en la principal herramienta. Con tal propósito, la OMS plantea programas de *manejo integrado de vectores* en los cuales se desarrollan diferentes estrategias para alcanzar los objetivos, los cuales son:

- Proveer acceso a los tratamientos a las poblaciones pobres y marginales.
- Ampliar los sistemas de salud existentes y su capacidad a largo plazo para prevenir, monitorear, diagnosticar y tratar estas enfermedades.
- Abrir nuevos canales para extender la capacidad de los sistemas de salud y hacer llegar las intervenciones sanitarias hasta quienes más las necesitan.
- Desarrollar sistemas de vigilancia con participación de la comunidad.
- Contribuir al desarrollo y diseminación de nuevas herramientas para apoyar los sistemas de vigilancia.

Los programas involucran tanto al ámbito privado como al público y los resultados son variables ya que dependen de factores económicos, sociales y políticos. (OPS, 2023).

4.2 - Insecticidas utilizados en la actualidad

Ante la situación planteada, el control químico con insecticidas se convirtió en la principal herramienta, a lo largo de los años, para el control de *T. infestans*. Desde la década del 70, los piretroides son los insecticidas de elección para el control y erradicación de los triatominos transmisores de *T. cruzi*. Los insecticidas piretroides actúan a nivel de la membrana nerviosa del insecto, en un sitio específico de los canales de Na^+ , modificando la velocidad de cierre de los mismos y alterando la transmisión nerviosa normal (Barré y col., 2008).

Si bien los esfuerzos de salud pública dirigidos a prevenir la transmisión de esta enfermedad han reducido la cantidad de personas que contraen la infección, el uso irracional de estos insecticidas provocó la aparición de vinchucas resistentes a piretroides (Picollo y col., 2005).

Figura 5: Método de control del vector.

Fuente: WHO/TDR/I.Montilla



En el año 2015 un grupo de investigadores del Conicet logró poner en evidencia una mutación canales de sodio de vinchucas de Salta y Chaco, secuenciando genéticamente una gran parte de dicho canal descubrieron que las vinchucas resistentes a los piretroides presentaban allí una mutación que las hacía menos sensibles.

En el año 2017 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 (Ons y col., 2017).

En estudios recientes se puso en evidencia la posibilidad de realizar el control de vectores para diferentes enfermedades mediante el uso de bioinsecticidas debido a su alta seguridad y especificidad, su naturaleza biodegradable y su bajo costo. En este contexto, las moléculas de origen vegetal son las que más atención han generado para la eliminación de insectos de importancia productiva y sanitaria.

4.3 - Bioinsecticidas

Los bioinsecticidas son una excelente alternativa dados ciertos beneficios planteados en diferentes trabajos de investigación ya que son económicos, de fácil acceso, son simples de utilizar, ecológicos y efectivos a dosis bajas (Choochote y col., 2007).

Con respecto a los principios activos obtenidos a partir de plantas, caben ser destacados los estudios llevados a cabo con monoterpenos. En un trabajo realizado por Moretti (2013) los monoterpenos 1,8-cineol, linalool, 7-mentol, α -terpineol y timol resultaron buenos hiperactivantes de ninfas de *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*. 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).

4.4 - Cannabis sativa variante Deep Mandarine

Cannabis sativa se plantea como un buen candidato como bioinsecticida ya que el contenido de aceites esenciales es elevado y su cultivo y extracción son accesibles a nivel económico. Por otra parte, su cultivo es ecológico ya que se demostró que *C. sativa* tiene gran resistencia a las plagas (Ona y col., 2022).

C. sativa es utilizada desde hace muchos años, en 1922 Chemiker Zeitung publicó un artículo en una revista alemana haciendo referencia al uso de dicha planta como insecticida. También hay registros no occidentales y del Imperio Bizantino, del uso de *C. sativa*. Actualmente el Instituto Botánico de Barcelona (IBB; <https://www.ibb.csic.es/en>) y la Universidad de Barcelona (UB; <https://www.ub.edu>)

/portal/web/dp-bsma/botanica) crearon una base de datos que lleva un registro de la actividad insecticida y los usos como plaguicidas de *C. sativa* (Ona y col., 2022).

Por otro lado, distintos extractos y aceites esenciales obtenidos a partir de *Cannabis sativa* han demostrado eficacia como nematocidas, acaricidas, insecticidas, bactericidas y antifúngicos (Bedini y col., 2016). La actividad como insecticidas ha sido demostrada en especies de importancia agrícola y sanitaria. Por ejemplo, el aceite esencial obtenido de la variante Felina 32 demostró ser eficaz frente a moscas pertenecientes a la especie *Musca domestica*, y también frente a *Myzus persicae*, un pulgón de importancia productiva en el sector agrícola (Bedeni y col., 2016). En otras investigaciones, también se demostró la eficacia letal de extractos de *C. sativa* frente a dos especies de mosquitos de importancia sanitaria: *Culex quinquefasciatus*, vector del nematodo *Wuchereria bancrofti*, causante de la filariasis (Maurya y col., 2009), y frente al vector de la malaria *Anopheles gambiae* (Govindarajan y col., 2016).

5 - Objetivos del trabajo

5.1 - Objetivos generales

Estudiar la actividad tóxica y repelente de extractos de *Cannabis sativa* de la variante Deep Mandarin en ninfas de *T. infestans* susceptibles a piretroides.

5.2 - Objetivos específicos

- Estudiar la actividad letal sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles a piretroides de extractos acetónicos (AC), etanólicos (ET) y obtenidos con dimetilsulfóxido (DMSO) a partir de las variante Deep Mandarin de *C. sativa*.
- Determinar la actividad repelente en ninfas de *T. infestans* susceptibles de extractos AC, ET y obtenidos con DMSO a partir de las variante Deep Mandarine de *C. sativa*.
- Determinar, mediante cromatografía de masas, la composición química en terpenos y cannabinoides de los extractos obtenidos de las variantes de *C. sativa* en estudio.

- Estudiar la actividad letal de los extractos de *C. sativa* en la especie beneficiosa *Aphis mellifera* (abejas).

6 - Desarrollo del trabajo

6.1 - Materiales y métodos

Para el estudio de la actividad letal de los extractos de *C. sativa* se utilizaron dos técnicas estandarizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1994). Estas técnicas permiten determinar las dosis y concentraciones necesarias para eliminar a un determinado porcentaje de insectos. Para este proyecto se determinó la dosis y concentración necesarias para eliminar al 50 % de las vinchucas en estudio.

6.2 - Insectos

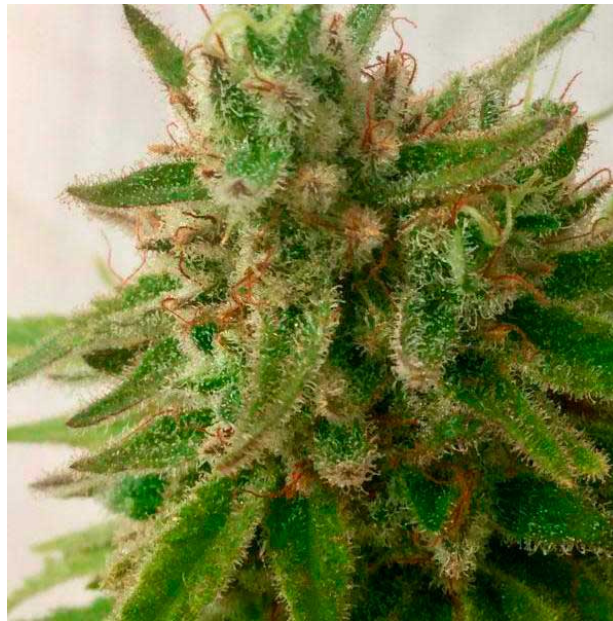
Los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Artrópodos y Vectores (LabArVec), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Se utilizaron ninfas de quinto estadio de *T. infestans* con 15 días de ayuno. Los insectos se colocaron en recipientes de plástico de 11 cm de 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 se inició con insectos de referencia enviados desde el Centro de Referencia de Vectores (CeReVe) (Santa María de Punilla, Córdoba).

6.3 - Material vegetal

El material vegetal (*Cannabis sativa* variante Deep Mandarine) utilizado en los ensayos fue provisto por la Asociación Civil "PlantAR Ciencia". El material vegetal utilizado corresponde a inflorescencias femeninas de *Cannabis sativa* L, variedad Deep Mandarine (banco Delicious Seeds). Las plantas se multiplicaron por clonación y se desarrollaron en un cultivo en interior con control de variables.

Figura 6: Cannabis sativa variante Deep Mandarine

Fuente: Delicious Seeds



6.4 - Extractos

Para realizar los diferentes ensayos se trabajó con 3 extractos de la planta *C. sativa* variante Deep Mandarine. Para la obtención de los extractos se utilizaron tres solventes: acetona, etanol y DMSO, obteniendo así tres extractos distintos.

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 mediante ultrasonido sonicando al 50 % de potencia en forma de pulsos de 15 segundos (10 min totales), y se llevó a cabo en un baño de hielo.

Por último, la mezcla fue centrifugada a 5000 xg durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. El rendimiento de extracción (RE) será calculado con la siguiente fórmula: $RE = \text{peso de extracto} / \text{peso de material vegetal} \times 100$.

6.5 - Perfil de terpenos y cannabinoides

Para obtener el perfil de terpenos y cannabinoides se utilizaron las técnicas de Cromatografía de Gases acoplado a un detector de ionización en llama (CG-FID) y Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (HPLC), respectivamente.

Dado que el laboratorio donde fue desarrollado el presente trabajo no dispone con los equipos cromatógrafos para llevar a cabo estos estudios, se solicitó el servicio del Laboratorio Hemps International S.R.L. para que lleve adelante la determinación del contenido de terpenos y cannabinoides.

6.6 - Ensayo de topicación

Para el ensayo de topicación, al igual que para el resto de los ensayos se utilizaron ninfas de quinto estadio de *T. infestans* con 15 días de ayuno. Para esta técnica se siguió el protocolo de la OMS (1994). La técnica consiste en la aplicación tópica en la zona dorsal del abdomen de las ninfas de 1 μ L de distintas dosis de cada uno de los extractos evaluados. Cada dosis fue evaluada en 10 ninfas, y se evaluaron al menos 4 dosis que causen entre el 10 y el 90% de mortalidad. Cada ensayo con cada dosis se replicó en tres oportunidades (30 ninfas por dosis). En cada replica fueron utilizadas 10 ninfas como control negativo (se les aplicó 1 μ L del solvente correspondiente al extracto evaluado). Se observó el estado de las vinchucas a las 24, 48, 72 y 96 hs post-topicación.

6.7 - Ensayo de contacto con papel de filtro

El estudio de la exposición de ninfas V de *T. infestans* a papel de filtro tratado con los extractos de *C. sativa* variante Deep Mandarin se realizó siguiendo el protocolo establecido por la OMS (1994). Para este ensayo se utilizaron papeles de filtro de 11 cm de diámetro, cada papel de filtro fue impregnado con 1 mL de los extractos y se dejó evaporar durante 24 hs. Luego se procedió a exponer durante 1 h diez ninfas V de *T. infestans*. Una vez transcurrido ese tiempo, las ninfas fueron colocadas en recipientes limpios con cartones colocados verticalmente y se registró su estado (vivas-muertas) a las 24, 48, 72 y 96 hs post-contacto con el papel.

Fueron evaluadas concentraciones crecientes de los insecticidas, teniendo en cuenta que al menos 4 de estas concentraciones provoquen entre el 10 y el 90% de letalidad entre las vinchucas.

El bioensayo descripto fue replicado en 3 ocasiones y se utilizaron 30 ninfas por cada concentración evaluada. Como control se rociaron las superficies evaluadas con

1 mL de acetona, etanol o DMSO sin presencia de extractos (OMS, 1994).

6.8 - Ensayo de repelencia con *C.sativa* variante *Deep Mandarin*

La actividad repelente de los extractos fue determinada mediante la técnica de área de preferencia. Para este bioensayo se utilizaron papeles de filtro de 11 cm de diámetro, los cuales fueron cortados por la mitad.

El protocolo consiste en ofrecer al insecto una mitad del papel tratada con distintas concentraciones de cada extracto de *C. sativa* y la otra mitad del papel sin tratamiento. Las mitades del papel impregnadas con los extractos se dejaron evaporar durante 24 hs. Luego de este tiempo, la mitad tratada se unió a la mitad sin tratamiento utilizando cinta adhesiva. A continuación, los papeles se colocaron en cajas de Petri para evitar que las vinchucas se escapen. En cada papel de filtro se colocó un insecto.

Se realizaron 3 réplicas del ensayo. En cada réplica fueron utilizados 10 papeles por cada concentración de insecticida. Los tiempos de observación en los cuales se verificó la ubicación de los insectos fueron a las 24, 48 y 72 hs desde el tiempo 0 (colocación del insecto sobre el centro del papel).

Para el control en cada réplica se registrará la posición de 10 vinchucas expuestas a papeles con una mitad tratada con acetona, etanol o DMSO y la otra mitad sin tratamiento alguno. En este caso se utilizó como control positivo N,N-diethyl-m-toluamide (DEET).

6.9 - Toxicidad de extractos de *C. sativa* en abejas adultas

Para determinar la toxicidad de los extractos de *C. sativa* en *A. mellifera* (abejas) se siguió el protocolo descrito por Schail y col., (2000). En el bioensayo se utilizaron abejas obreras adultas. A cada abeja evaluada se le administró 1 µL del extracto correspondiente en la zona dorsal del tórax. Se evaluaron dosis crecientes de los tres extractos considerando que al menos cuatro dosis causen entre 10 y 90% de mortalidad entre las abejas. El rango de dosis evaluado para cada extracto fue el mismo establecido para la prueba tópica en *T. infestans*. El ensayo se replicó tres veces en días diferentes bajo las mismas condiciones y con soluciones frescas. Se

utilizaron 10 abejas por dosis y por repetición (30 insectos por cada dosis evaluada) (Figura 7).

Figura 7: Adulto de *A. mellifera* siendo topicado en la zona dorsal de su abdomen.



Después de la administración, los diferentes grupos de insectos se alojaron en contenedores etiquetados y se registró el estado de los insectos a las 24, 48, 72 y 96 hs. Como control se utilizaron 10 trabajadores por repetición; estos insectos recibieron 1 μ L del solvente correspondiente a cada extracto. Se usó imidacloprid neonicotinoide en un rango de 2 a 30 ng x abeja como control positivo.

6.10 - Análisis estadístico

Finalmente, para el análisis estadístico se utilizó el modelo Probit. Este modelo estadístico permite relacionar una mortalidad determinada con la dosis o concentración necesaria para provocarla. Las mortalidades registradas en los ensayos de topicación y exposición a superficies tratadas fueron analizados a través del software POLO-PLUS. Dicho programa brindó las curvas dosis-respuesta o concentración-respuesta de los insecticidas evaluados. A partir de las cuales fueron calculados para cada insecticida las dosis o concentraciones necesarias para matar al 50% de los insectos evaluados (DL 50 o CL 50).

7 - Resultados

Tabla 1: Perfil cuali cuantitativo de cannabinoides y de terpenos obtenidos por HPLC y CG - FID respectivamente.

		DMSO	ET	AC
Cannabinoids (mg/mL)	CBDV	<0.5	ND	<0.5
	CBG	ND	ND	<0.5
	CBD	0.59	1.79	3.81
	THCV	ND	ND	ND
	CBN	<0.5	ND	<0.5
	Δ^9 - THC	0.59	1.95	5.35
	Δ^8 - THC	ND	ND	ND
	CBC	<0.5	<0.5	<0.5
Terpenes (ppm)	α - Pinene	<25	<25	36.6
	Camphene	ND	ND	ND
	β - Pinene	ND	105.6	149.8
	β - Myrcene	ND	ND	ND
	δ - 3 - Carene	ND	ND	ND
	α - Terpineno	ND	ND	ND
	p - Cymene	<25	ND	ND
	d - Limonene	27.1	55.1	178.4
	Ocimene	<25	51.1	278.5
	Gamma -Terpinene	ND	ND	ND
	Terpinolene	ND	ND	ND
	Linalool	ND	<25	60.3
	(-) - Isopulegol	ND	ND	ND
	Geraniol	ND	ND	ND
	β - Caryophyllene	22.7	138.9	418.6
	α - Humelene	<25	50.1	140.9
	Nerolidol	30.2	<25	64.6
	(-) - Guaiol	ND	<25	<25
(-) - α -Bisabolol	ND	<25	95.5	

El efecto letal de los extractos fue evaluado teniendo en cuenta su potencia, pero también el registro de su efecto a lo largo del tiempo post-contacto.

Para la prueba tópica, registramos la actividad máxima de los tres extractos 48 hs después de la aplicación a las ninfas. La mayor potencia con respecto al efecto letal del 50% la registró el extracto AC, el cual fue 5 y 13 veces más potente que el extracto ET y DMSO, respectivamente.

En cuanto a la prueba de contacto en papel filtro, registramos un patrón de toxicidad similar al observado en la prueba tópica. La máxima actividad letal se

observó a las 48 hs del primer contacto de los insectos con los papeles y, además, el extracto AC fue 7 y 14 veces más potente que los extractos ET y DMSO, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2: Determinación de LD₅₀ y LC₅₀ de los extractos de AC, ET y DMSO en ninfas de quinto estadio de *T. infestans*.

DL ₅₀ (µg/insecto) (IC 95%)				
Tiempo después de la aplicación (hs)				
Extracto	24	48	72	96
AC	5.1 (3.8 – 11.2)	2.1 (1.4-2.9)	2.1 (1.4-2.9)	2.1 (1.4-2.9)
ET	13.9 (9.2-43.3)	10.9 (7.5-26.2)	10.9 (7.5-26.2)	10.9 (7.5-26.2)
DMSO	28.6 (19.4-79.5)	25.7 (17.6-66.6)	25.7 (17.6-66.6)	25.7 (17.6-66.6)
CL ₅₀ (µg/cm ²) (IC 95%)				
Tiempo después del contacto (hs)				
Extracto	24	48	72	96
AC	212.4 (150.3 – 332.5)	117.1 (45.9-321.8)	117.1 (45.9-321.8)	117.1 (45.9-321.8)
ET	998.1 (564.3-1,322)	803.7 (555.7-1,324)	803.7 (555.7-1,324)	803.7 (555.7-1,324)
DMSO	2,002 (1,654-2,302)	1,554 (987-2,332)	1,554 (987-2,332)	1,554 (987-2,332)

En cuanto a la Tabla 3 podemos observar que los tres extractos demostraron tener un efecto repelente significativo contra las ninfas de *T. infestans*. El efecto repelente de los tres extractos se evaluó a la misma concentración (50 µg/cm²) que DEET (control positivo). Durante el período de observación, los extractos de AC y ET demostraron una actividad repelente máxima, similar a DEET. En el caso del extracto DMSO, la actividad máxima se mantuvo hasta las 48 hs, disminuyendo al 66 % a las 72 hs de observación.

Tabla 3: Efecto repelente de los extractos de *C. sativa* y del repelente DEET en ninfas de *T. infestans*.

Efecto repelente (%) - Periodo de evaluación			
	24 hs	48 hs	72 hs
AC	100	100	100
ET	100	100	100
DMSO	100	100	66.6
DEET	100	100	100

Finalmente, ninguno de los tres extractos evaluados fue tóxico en abejas. No se pudo determinar la DL₅₀ en este insecto ya que, el efecto tóxico de los extractos no difirió de

la toxicidad observada en las abejas que fueron utilizadas como control negativo. La DL_{50} del neonicotinoide imidacloprid, utilizado como control positivo durante el ensayo, fue de 14,3 ng/abeja.

8 - Discusión

Este trabajo de investigación es el primer reporte de la actividad letal y repelente de extractos de *C. sativa* sobre ninfas de quinto estadio de *T. infestans*. Los resultados presentados en el presente trabajo están en línea con antecedentes previos de la actividad insecticida de extractos de *C. sativa*. Thakur y Devi (2016) informaron que, en adultos del escarabajo, *Callosobruchus chinensis*, una plaga de insectos económicamente muy perjudicial en el almacenamiento de legumbres, los extractos de acetona y metanol de *C. sativa* en concentraciones de 5, 10 y 20 % causaron una mortalidad del 100 % durante el tiempo de observación. Además de los insectos plaga, hasta la actualidad un número importante de trabajos científicos pusieron de manifiesto el efecto letal y repelente de extractos de *C. sativa* sobre insectos vectores de importancia sanitaria.

Estos trabajos se han realizado principalmente con diferentes tipos de mosquitos. Por ejemplo, Jelees y col., (1993) ensayaron la actividad larvicida de un extracto etanólico de hojas de *C. sativa*. Los autores reportaron una CL_{50} del orden de 1000, 1400 y 5000 mg/L contra *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*, respectivamente.

En este trabajo determinamos que la máxima letalidad de las ninfas fue a las 48 hs del contacto con los extractos. Este patrón de actividad letal lenta de los extractos de *C. sativa* se observó también contra el vector de la filariasis, *Culex quinquefasciatus* y el principal vector de la malaria en la India, *Anopheles stephensi*. El tiempo que tarda un insecticida en alcanzar su concentración letal en un insecto es lo que determina si esa molécula causará una muerte rápida (menos de 24 hs después del contacto) o lenta (más de 24 hs después del contacto) (Busvine, 1971). Cabe destacar, que el primer signo de intoxicación en ninfas de *T. infestans* registrado por el contacto con los extractos de *C. sativa* fue una disminución muy significativa de la movilidad (24 hs post-contacto) seguida de una fase de descoordinación que finalmente condujo a la muerte de los insectos (48 hs post-contacto).

Estos signos difieren de los observados con el neuroinsecticida deltametrina (hiperexcitación, descoordinación y muerte) considerado un insecticida rápido. Los signos de intoxicación están directamente relacionados con los mecanismos de acción de los insecticidas. En aceites esenciales y extractos de *C. sativa*, los mecanismos de acción descritos involucran desde la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) hasta la interacción con receptores octopaminérgicos, GABAérgicos y colinérgicos (Benelli y col., 2018). Es necesario realizar futuras investigaciones para establecer los mecanismos de acción presentes en los extractos de *C. sativa* evaluados en este trabajo a fin de encontrar una explicación a la actividad letal lenta observada en los ensayos realizados en este trabajo.

La caracterización química de los extractos demostró a los cannabinoides y terpenos presentes en concentraciones más altas. Por ejemplo, el sesquiterpeno β -cariofileno, la molécula más concentrada en los extractos AC y ET y la tercera en el extracto DMSO, fue reportada previamente como uno de los principales constituyentes en un aceite esencial de *C. sativa* que demostró actividad tóxica en larvas del mosquito tigre asiático *Aedes albopictus* y contra larvas y adultos de *A. aegypti* (Bedini y col., 2016). De acuerdo con esto, en triatomíneos se demostró que el sesquiterpeno β -cariofileno aplicado tópicamente obtuvo letalidad en ninfas en estadios I a V y machos y hembras de *Meccus pallidipennis* y *Meccus bassolsae*, dos de los principales triatomíneos vectores de *T. cruzi* en México. Los aceites esenciales ensayados produjeron una tasa de mortalidad en *M. pallidipennis* del 40-50% a una dosis de $100\mu\text{g L}^{-1}$, una tasa de mortalidad del 70% con dosis de 200 y $100\mu\text{g L}^{-1}$ a las 48 h y 100% de mortalidad a las dosis de 200 y $300\mu\text{g L}^{-1}$ a las 72 horas. Es decir que se da una relación directamente proporcional entre las dosis ensayadas y la mortalidad. El β -pineno tuvo un efecto biocida comparable en *M. bassolsae* con respecto al observado para *M. pallidipennis*. El efecto de β -cariofileno y germacreno D en *M. bassolsae* fue ligeramente más débil que para *M. pallidipennis* (Pacheco-Hernández y col., 2021).

En cuanto a la presencia de monoterpenos en los extractos evaluados, el limoneno fue el más concentrado en el extracto DMSO y el segundo en los extractos AC y ET. En una investigación previa se reportó la presencia en altas concentraciones de limoneno en aceites esenciales de *C. sativa* con eficacia larvicida contra *A. aegypti* (Wanas y col., 2020). En un estudio de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR) de monoterpenos/sesquiterpenos como

insecticidas, Dambolena y col., (2016) concluyeron que la capacidad de estas moléculas para interactuar con las cutículas de insectos, particularmente en *T. infestans*, está influenciada por el solvente y las superficies accesibles. Los autores concluyen que, de los terpenos en estudio, el linalool y el nerolidol son los que mejor se relacionan. En este sentido, el mayor poder letal del extracto AC reportado en el presente trabajo podría estar relacionado con la alta concentración de linalol y nerolidol presente.

Otra posible explicación a la mayor potencia del extracto de AC podría estar relacionada con la mayor concentración de cannabinoides. En cuanto a los informes sobre la actividad de los principales cannabinoides presentes en los extractos de *C. sativa*, Mantzoukas y col., (2020) estudiaron la actividad larvicida de un aceite de CBD comercial contra larvas de 4º estadio de *Tribolium confusum*, *Oryzaephilus surinamensis* y *Plodia interpunctella*. Los autores informaron actividad pesticida dependiente de la dosis contra las tres especies, con porcentajes de letalidad del 100% con la dosis más alta (90 mg/mL).

Otro resultado importante presentado en este trabajo es la capacidad repelente inmediata y sostenida en el tiempo que muestran los extractos evaluados. En consonancia con nuestros resultados, un aceite esencial de *C. sativa* demostró una actividad repelente similar al DEET contra adultos de *A. aegypti* (Wanas et al., 2020). En cuanto a los informes de actividad repelente en triatominos, el monoterpeno linalol, presente en alta concentración en el extracto de AC, demostró un efecto repelente similar al DEET y actividad expurgante en ninfas de *T. infestans* (Moretti y col., 2013). En este trabajo determinamos que los tres extractos de *C. sativa* en las dosis evaluadas fueron selectivos para *T. infestans* y no tóxicos para *A. mellifera*. La presencia de una toxicidad-selectividad en los extractos estudiados, dada la importancia de *A. mellifera* como insecto polinizador, presupone un hecho fundamental debido al contacto que los componentes químicos de los extractos podrían tener con especies de insectos no diana de importancia ecológica. Una de las ventajas de los bioinsecticidas frente a los insecticidas tradicionales es su alta especificidad; es decir, la capacidad de controlar sus especies objetivo mientras se minimizan los efectos colaterales (Benelli y col., 2018).

9 - Conclusión

Este trabajo es el primer reporte del efecto letal y repelente de inflorescencias de *C. sativa* en ninfas de *T. infestans* en estadios de desarrollo tardíos. Debido al creciente número de informes de poblaciones de vinchucas resistentes a los principales insecticidas utilizados para su control, sumado a la baja inversión en el desarrollo de nuevos insecticidas para reemplazar los antiguos, los programas de control de vectores se enfrentan actualmente a una encrucijada difícil de superar. La búsqueda de moléculas de origen natural para el control de vectores de importancia sanitaria parece ser una alternativa más que razonable. Con respecto a *C. sativa*, son necesarios más estudios para dilucidar los mecanismos de letalidad y repelencia presentes en los extractos. Otro objetivo podría ser evaluar la actividad letal y repelente de los principales terpenos y cannabinoides hallados en los extractos, para establecer posibles interacciones de agonismo, antagonismo o adición entre estas moléculas.

10 - Bibliografía

- **Barré, N., Li, A.Y., Miller, R.J., Gaia, H., Delathiere, J.M., Davey, R.B., George, J.E.** (2008) In vitro and in vivo evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae) in New Caledonia. *Vet. Parasitol*, 155, 110–119.
- **Bedini S, Flamini G, Cosci F, Ascrizzi R, Benelli G, Conti B.** (2016) *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* essential oils as novel control tools against the invasive mosquito *Aedes albopictus* and fresh water snail *Physella acuta*. *Industrial Crops and Products*, 85:318-323.
- **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.
- **Busvine, J. R.** *A critical review of the techniques for testing insecticides*. *Common wealth Agricultural Bureau x. 2nd ed.* Londres: 1971:345.
- **Choochote, U. Chaithong, K. Kamsuk, A. Jitpakdi, P. Tippawangkosol, B. Tuetun, D. Champakaew, B. Pitasawat.** (2007) Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78, 359-364.
- **Dambolena, J.S.; Zunino, M.P.; Herrera, J.M.; Pizzolitto, R.P.; Areco, V.A.; Zygadlo, J.A.** (2016) Terpenes: Natural products for controlling insects of importance to human health—A structure-activity relationship study. *Psyche*, 4595823.
- **Germano, M.D., Picollo, M.I.** (2018) Stage-dependent expression of deltamethrin toxicity and resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *J. Med. Entomol*, 55, 964–968.

- **Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S. L., Bhattacharyya, A., & Benelli, G.** (2016) Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Parasitology research*, 115(2), 807–815.
- **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.
- **Jalees S, Sharma SK, Rahman SJ, Verghese T.** (1993) Evaluation of insecticidal properties of an indigenous plant, *Cannabis sativa* Linn., against mosquito larvae under laboratory conditions. *Journal of Entomological Research*, 17:117-120.
- **Mantzoukas S, Ntoukas A, Lagogiannis I, y col.** (2020) Larvicidal action of cannabidiol oil and neem oil against three stored product insect pests: effect on survival time and in progeny. *Biology (Basel)*, 9:321.
- **Maurya, Preeti Sharma, Lalit Mohan, Lata Batabyal, C.N. Srivastava.** (2009) Evaluation of the toxicity of different phytoextracts of *Ocimum basilicum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12, Issue 2, 113-115.
- **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.
- **Náquira C, Cabrera R.** (2019) Short review of chagas disease history after a century of its discovery and the current situation in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Public*, 495-496

- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** (1994) Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatominos. *Acta Toxicológica Argentina*, 2:29-32.
- **Ona Genís, Manica Balant, José Carlos Bouso, Airy Gras, Joan Vallès, Daniel Vitales, and Teresa Garnatje.** (2022) The Use of Cannabis sativa L. for Pest Control: From the Ethnobotanical Knowledge to a Systematic Review of Experimental Studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 365-387.
- **Ons Sheila, Lucila Traverso, Andrés Lavore, Ivana Sierra, Victorio Palacio, Jesús Martínez-Barnetche, 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.
- **OPS Organización Panamericana de la Salud.** *Enfermedad de Chagas.* (s. f.). [Recuperado 15 de febrero de 2023, de <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>.
- **OPS (Organización Panamericana de la Salud).** (2018) Nuevas generaciones sin la infección por el VIH, la sífilis, la hepatitis B y la enfermedad de Chagas en las Américas.
- **Picollo 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.
- **Reynoso, M.M.N., Seccacini, E.A., Zerba, E.N. and Alzogaray, R.A.** (2020) Botanical monoterpenes synergise the toxicity of azamethiphos in the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health*.

- **Sfara V, Zerba E, Alzogaray RA.** (2006) Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101:89–94.

- **Storino R.** (1^a ed) (2010) Etapas clínicas de la Enfermedad de Chagas. En: Librería Arcadia Editorial. Atención médica del paciente chagásico. Chagas en el siglo XXI, de la enfermedad a la problemática social. Buenos Aires: Librería Arcadia Editorial;:127-137.

- **Suchail S, Guez D, Belzunces LP.** (2000) Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Enviro Toxicol Chem*, 7:1901-1905.

- **Thakur DR, Devi B.** (2016) Biopesticidal efficacy of *Berberis lycium* and *Cannabis sativa* against *Callosobruchus chinensis* Linnaeus. *Journal of Insect Science (Ludhiana)*, 29:227-232.

- **Wanas AS, Radwan MM, Chandra S, y col.** (2020) Chemical composition of volatile oils of fresh and air-dried buds of *Cannabis* chemovars, their insecticidal and repellent activities. *Nat Prod Commun*, 15:1–7.

- **Yesenia Pacheco-Hernández, Carlos Jonnathan Castro-Juárez, Sergio Alberto Ramírez García, Ramiro Cruz Durán, Edmundo Lozoya-Gloria, Nemesio Villa-Ruano.** (2021) Volátiles de *Marina* descuidada: Efecto biocida en insectos vectores de enfermedades tropicales en el sur de México. *Revista de entomología de Asia y el Pacífico*, 244.