

Identificación de la actividad insecticida y/o repelente de xenobióticos mediante bioensayos y respuestas electroantenográficas en *Rhodnius prolixus*.

Edwin Rodolfo Escobar Olarte

Biólogo

MAESTRIA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Bucaramanga

2022

Identificación de la actividad insecticida y/o repelente de xenobióticos mediante bioensayos y respuestas electroantenográficas en *Rhodnius prolixus*

Edwin Rodolfo Escobar Olarte

Biólogo

Estudiante Maestría Ciencias Básicas Biomédicas

Director del trabajo de investigación:

María Carolina Velásquez Martínez, PhD

Doctora en Fisiología

Codirector del trabajo de investigación:

Jonny Edward Duque Luna, PhD

Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en Entomología Médica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Medicina

Bucaramanga

2022

Contenido

1. Línea de investigación.	5
2. Lugar de ejecución.	5
3. Resumen	5
3.1 Abstract	7
4. Introducción	8
5. Planteamiento del problema	9
6. Marco Teórico	10
6.1 Enfermedad de Chagas (ECh)	10
6.2 Vías de transmisión.	11
6.3 Subfamilia Triatominae, vectores de la ECh	14
6.4 <i>R. prolixus</i> y su relación con los insecticidas.	16
6.5 Xenobióticos	17
6.6 Acción repelente	18
6.7 Antecedentes en la determinación de repelencia en triatominos	20
6.8 Sistema olfativo en insectos y electroantenograma (EAG)	22
7. Objetivos	27
7.1 Objetivo General	27
7.2 Objetivos específicos	27
8. Metodología	28
8.1 Material Biológico	28
8.2 Moléculas	28
8.3 Inferencia de actividad insecticida y/o repelente: Electroantenograma	30
8.3.1 Estímulo olfatorio y registro del electroantenograma	32
8.3.2 Análisis de datos electroantegráficos	34
8.4 Evaluación de la actividad insecticida y repelente.	34
8.4.1 Actividad insecticida	34
8.4.2 Actividad Repelente	36
8.4.2.1 Especificaciones del dispositivo propuesto por el laboratorio de entomología médica del CINTROP	37
8.4.3 Análisis de datos actividad insecticida y repelente	39
8.6 Consideraciones éticas	39

9. Resultados	40
9.1 Electroantenograma.	40
9.1.1 Registros EAG de los xenobióticos	40
9.2 Actividad insecticida	49
9.2.1 Dosis exploratorias (DE)	49
9.2.2 Dosis múltiples y determinación de las DL50 y DL95	51
9.2.3 Mejor molécula: Propoxur	53
9.2.4 Xenobióticos con posible actividad insecticida.	55
9.3 Actividad repelente	57
9.3.1 Comparación de los dispositivos CINTROP vs Zermoglio	57
9.3.2 Evaluación de xenobióticos con actividad repelente	58
9.3.3 Acercamiento al cebo	59
10. Discusión de resultados	60
10.1 Registros electroantegráficos.	60
10.1.1 Respuestas de compuestos insecticidas	61
10.1.2 Respuestas de compuestos repelentes	61
10.2 Actividad Insecticida	64
10.3 Actividad Repelente	67
11. Conclusiones	68
12. Referencias Bibliográficas	70

1. Línea de investigación.

Evaluación y estudio de manifestaciones semioquímicas en insectos vectores.

2. Lugar de ejecución.

Universidad Industrial de Santander, Facultad de Medicina y Parque Tecnológico Guatiguará edificio de investigaciones Laboratorio 110.

3. Resumen

La enfermedad de Chagas es transmitida por el contacto de insectos vectores conocidos como triatomíneos, se calcula que en todo el mundo hay aproximadamente 7 millones de personas infectadas. Para el control del vector se utilizan insecticidas comerciales a base de carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides. Sin embargo, debido a su uso excesivo, se registran casos de resistencia a sus principios activos en varios países. El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta antenográfica *in vivo* de moléculas sintéticas y metabolitos secundarios de plantas con acción insecticida y/o repelente contra *Rhodnius prolixus*. Las respuestas electroantenográficas (EAG) se realizaron con la fijación de la antena del triatómimo y exposición con los compuestos insecticidas y/o repelentes. Se tomaron individuos adultos de *R. prolixus*, con ayuno de 30 días, los cuales fueron fijados sobre un estereomicroscopio (Leica EZ4) con el objetivo de visualizar el preparado. Las EAG fueron amplificadas (1000x) con un preamplificador (Universal single probe, type PRS-1, Syntech, Alemania) y digitalizadas (IDAC-4, Syntech, Alemania). Las señales fueron visualizadas, grabadas y analizadas en un PC utilizando el programa AutoSpike (Syntech, Alemania). Se realizaron bioensayos de aplicación tópica basados en el protocolo establecido por la OMS 1994, los compuestos evaluados fueron: Temefos, Propoxur y los metabolitos Benzil benzoato, 1,8 Cineol, Alfa-Bisabolol, como control positivo de mortalidad se utilizó el insecticida de grado técnico Deltametrina (99,5%-ChemService), y se determinó las DL₅₀ y DL₉₅. La actividad repelente de las moléculas se determinó mediante bioensayos y pruebas comportamentales utilizando un cebo vivo (*Gallus gallus*) con dispositivos

de repelencia (Cintrop y Zermoglio). Se utilizó los compuestos con posible actividad repelente: IR3535, Carvona, Limoneno, Citronelal, DEET, Carvacrol a una concentración de 90%v/v, acetona fue usada como control negativo. Se registraron el tiempo de acercamiento al cebo y protección contra la picadura como parámetro de actividad repelente, con un tiempo máximo de 150 minutos por bioensayo. En los registros EAG se observó una disminución de la captación de su capacidad olfativa superior al 60% en respuesta a los compuestos IR3535 y Carvona, Estos compuestos presentaron diferencias estadísticamente significativas, IR3535 (KW: H (3, N=21) =17,44 P < 0,05), y Carvona (Anova F (8, 45) = 37,43 P< 0,05). En comparación con la Acetona donde no se observó una disminución estadísticamente significativa en su capacidad de captación de odorantes al igual que los demás xenobióticos propuestos con posible actividad insecticida y/o repelente (KW:H (3, N=21) =13,54 P > 0,05). Los xenobióticos con actividad insecticida presentaron muy baja mortalidad al ser comparados con el control positivo Deltametrina, cuya DL₅₀ para ninfas de primer estadio corresponde 0,22±(0,191-0,252,5) y 2,415±(2,169-2,696) para ninfas de quinto estadio, muy inferior al mejor compuesto propuesto, que en este caso fue el Propoxur con una DL₅₀ 18,2±(11,7-27,5) para ninfas de primer estadio y 3092,3±(2341,6-5503,0) para ninfas de quinto estadio. La molécula que presentó mayor actividad repelente fue el IR3535, con una protección media de 135,6 ± 43,29 minutos, seguido de Carvona con una protección media de 108, ± 26,33 minutos mostrando diferencias estadísticamente (KW: H (7, N=68) =37,12 (P > 0,05)) en comparación a los demás xenobióticos y su control negativo. Como conclusión general los compuestos que presentaron mejor actividad repelente afectaron el sistema olfativo de los insectos, por medio de la inhibición de su capacidad de percepción de olores, lo cual se corroboró con la disminución de la señal eléctrica en los de bioensayos EAG.

Palabras Claves.

Electroantenografía, xenobióticos, insecticidas, repelentes, *Rhodnius*, triatominos.

3.1 Abstract

Chagas disease is transmitted by contact with insect vectors. known as triatomines, it is estimated that throughout the world there are approximately 7 million people infected. For vector control, use commercial insecticides based on carbamates, organochlorines, organophosphates and pyrethroids. However, due to its excessive use, it is cases of resistance to its active ingredients have been recorded in several countries. The objective of this work was to determine the in vivo antenographic response of molecules synthetic and secondary metabolites of plants with insecticidal and/or repellent against *Rhodnius prolixus*. Electroantennographic (EAG) responses were made with the fixation of the triatomine antenna and exposure with the insecticidal and/or repellent compounds. Adult individuals of *R. prolixus*, with a 30-day fast, which were fixed on a stereomicroscope (Leica EZ4) in order to visualize the preparation. The EAG were amplified (1000x) with a preamplifier (Universal single probe, type PRS-1, Syntech, Germany) and digitized (IDAC-4, Syntech, Germany). The signals were visualized, recorded and analyzed on a PC using the AutoSpike program (Syntech, Germany). Application bioassays were performed topical based on the protocol established by the WHO 1994, the compounds evaluated were: Temefos, Propoxur and the metabolites Benzyl benzoate, 1.8 Cineol, Alpha-Bisabolol, as a positive control of mortality the insecticide was used of technical grade Deltamethrin (99.5%-ChemService), and the LD50 and LD95. The repellent activity of the molecules was determined by bioassays and behavioral tests using a live bait (*Gallus gallus*) with devices 6 of repellency (Cintrop and Zermoglio). Compounds with possible repellent activity: IR3535, Carvone, Limonene, Citronellal, DEET, Carvacrol a a concentration of 90%v/v, acetone was used as a negative control. HE recorded the time of approach to the bait and protection against the bite as a parameter of repellent activity, with a maximum time of 150 minutes per bioassay. In the EAG records, a decrease in the uptake of its olfactory capacity greater than 60% in response to compounds IR3535 and Carvone, These compounds presented statistically different significant, IR3535 (KW: H (3, N=21) =17.44 P < 0.05), and

Carvona (Anova F (8, 45) = 37.43 P < 0.05). Compared to Acetone where no observed statistically significant decrease in their ability to uptake odorants like the other proposed xenobiotics with possible activity insecticide and/or repellent (KW:H (3, N=21) =13.54 P > 0.05). Xenobiotics with insecticidal activity presented very low mortality when compared to the positive control Deltamethrin, whose LD50 for first instar nymphs corresponds to $0.22 \pm (0.191-0.252.5)$ and $2.415 \pm (2.169-2.696)$ for fifth instar nymphs, very inferior to the best proposed compound, which in this case was Propoxur with a LD50 $18.2 \pm (11.7-27.5)$ for first instar nymphs and $3092.3 \pm (2341.6-5503.0)$ for fifth instar nymphs. The molecule that presented the greatest repellent activity was IR3535, with an average protection of 135.6 ± 43.29 minutes, followed by Carvone with an average protection of $108, \pm 26.33$ minutes showing differences statistically (KW: H (7, N=68) =37.12 (P > 0.05)) compared to the other xenobiotics and their negative control. As a general conclusion the compounds that presented better repellent activity affected the system smell of insects, by inhibiting their ability to perceive of odors, which was corroborated by the decrease in the electrical signal in those of EAG bioassays

Keywords

Electroanthenography, xenobiotics, insecticides, repellents, *Rhodnius*, triatomines.

4. Introducción

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y se transmite principalmente mediante el contacto con los triatomíneos hematófagos (vectores). Actualmente se calcula que en todo el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas principalmente en Latinoamérica. Para el control del vector generalmente se utilizan insecticidas comerciales tales como: carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides (Alzogaray & Zerba, 2017). Sin embargo, en algunos casos debido a su uso frecuente y malas prácticas de aplicación, ya se registran casos de resistencia a sus principios activos, principalmente a la Deltametrina, principal piretroide usado para el control del vector (Rolandi et al., 2020). Por esta razón se están investigando nuevas opciones de moléculas para el reemplazo de insecticidas comerciales tradicionales, principalmente el uso de xenobióticos, como son los aceites

esenciales (AE) y sus componentes mayoritarios, en los cuales se ha detectado actividad insecticida y repelente (Sainz et al., 2012). Sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúan la actividad repelente en los triatominos, y la gran mayoría de estos estudios están centrados en pruebas de arenas experimentales (Alzogaray, 2016) sin tener en cuenta el individuo del cual se alimenta (huésped), y su relación con los compuestos repelentes (Zermoglio et al., 2015). De igual manera, hasta el momento no se ha sevaluado la respuesta de estas moléculas, frente a las técnicas electrofisiológicas del sistema olfativo de los triatominos (May-Concha et al., 2018; Reisenman, 2014). Por este motivo, en el presente trabajo se espera determinar las respuestas electroantenográficas para la identificación de xenobióticos con posible actividad insecticida y/o repelente en *Rhodnius prolixus*.

5. Planteamiento del problema

Debido a que no existe una vacuna, la forma más efectiva para disminuir la incidencia de la enfermedad de Chagas (ECh) es por medio de la acción conjunta de tres factores de prevención: el mejoramiento de las viviendas en las zonas rurales afectadas, la educación ambiental de las personas, en sitios de riesgo; y el control del vector mediante el empleo de insecticidas. Este último método es considerado la mejor estrategia para reducir la incidencia de la enfermedad, debido a que la disminución del vector lleva a la interrupción del ciclo de transmisión (Alzogaray, 2003). De acuerdo con esto, los principales insecticidas comerciales usados hoy son los piretroides (Deltametina, Cipermetrina). Sin embargo, en las últimas décadas, se ha reportado resistencia a su principio activo, esto debido a su excesivo uso como control biológico (Alzogaray & Zerba, 2017; Schama et al., 2016; Vassena & Picollo, 2003). Por este motivo se han buscado nuevas alternativas, al uso de insecticidas comerciales, como es el caso de algunos xenobióticos como por ejemplo los análogos sintéticos de Girgensohnina, Aceites Esenciales (AE) y sus componentes mayoritarios (Cuadros et al., 2017; Sainz et al., 2012). Dichos estudios han demostrado algunas moléculas con actividad insecticida y también efecto repelente. Sin embargo, ningún estudio hasta ahora ha tenido en cuenta el sistema olfativo de los insectos para ver su relación con las moléculas usadas para su control.

Básicamente, la mayoría de los estudios realizan bioensayos basados en pruebas de topicación para determinar la acción insecticida y experimentos de repelencia a través de la impregnación de superficies (Cuadros et al., 2017; Hernández et al., 2010; Lutz et al., 2014; Sainz, et al, 2012; Penido & Schofield, 2000; Vassena & Picollo, 2003). De igual manera, los diferentes experimentos de repelencia con productos comerciales como el DEET y el IR3535 no han sido efectivos en los triatominos, debido a que las dosis en las cuales se detectan alteraciones conductuales o evidencia toxicológica son demasiado altas (>90%) para tener una aplicación práctica sobre el control de *R. prolixus* (Alzogaray, 2016; Sfara et al., 2011). En la búsqueda de novedosas alternativas para el control de estos insectos, ahora se investiga el sistema nervioso periférico, específicamente con enfoque en las principales proteínas del sistema olfativo de los insectos como son las proteínas de unión al olor (OBP) y los receptores del olor (OR) que son claves en el comportamiento de los insectos (Oliveira et al., 2017, 2018). Estas investigaciones ahora son necesarias debido a que los insecticidas comerciales tienen un mecanismo de acción que afecta el sistema nervioso central de los insectos por medio de diferentes objetivos moleculares, tales como la inhibición de la acetilcolinesterasa para los organofosforados o los canales iónicos de sodio para los piretroides. Por esta razón, tanto las OBP como las OR, representan objetivos alternativos para la identificación de compuestos con respuestas de actividad insecticida y repelentes aplicables para el control de vectores de la ECh (Venthur & Zhou, 2018).

6. Marco Teórico

6.1 Enfermedad de Chagas (ECh)

Hace más de 100 años, *Trypanosoma cruzi* fue identificado como el agente causal de la ECh, sin embargo, en la actualidad esta enfermedad sigue siendo considerada como una dolencia tropical desatendida, siendo también relacionada con indicadores de pobreza, causando inclusive estigma y discriminación (Pérez-Molina & Molina, 2018). Según la Organización Mundial de la Salud actualmente existen alrededor entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* sobre todo distribuidas en zonas endémicas de 21 países de América Latina (OMS

2022). Sin embargo, debido a la migración de personas infectadas, especialmente hacia países desarrollados en donde las principales vías de transmisión son la infección congénita y las transfusiones de sangre, se considera un problema de salud mundial (Klein et al., 2012; Schmunis & Yadon, 2010). La ECh se produce en dos fases: una fase aguda caracterizada por una inflamación focal o difusa que afecta principalmente al miocardio, y una fase crónica marcada por una reacción fibrótica inflamatoria que daña el músculo cardíaco, y el sistema nervioso entérico. Hasta hace poco, la ECh se percibía como una enfermedad parasitaria en la fase aguda (miocitólisis inducida por el parásito y la inflamación) y como una enfermedad autoinmune en la fase crónica. Esta forma de la fase crónica se denomina forma indeterminada, y en la mayoría de los pacientes persiste indefinidamente. Varios años después del comienzo de la fase crónica, del 10 al 40% de las personas desarrollarán lesiones de varios órganos, principalmente el corazón y el sistema digestivo. Sin embargo, esta enfermedad ahora es considerada una interacción multifactorial, entre el patógeno y el huésped (Lescure et al., 2010; (Coura et al., 2002). Los medicamentos para tratar la ECh son el nirfutimox y benznidazol, eficientes en una etapa temprana de la patología, pero no han impactado considerablemente en la reducción de los casos debido a que, en la mayoría de los pacientes, se expresan de forma asintomática, por lo cual no son tratados en su etapa controlable (Boiani et al., 2010).

6.2 Vías de transmisión.

La principal forma de contagio con el parásito es por vía vectorial a través de los insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Rassi et al., 2012). La transmisión de la enfermedad puede ocurrir de forma selvática (asociados con nidos y refugios en rocas de mamíferos o aves), o sinantrópica, (viviendas que albergan al vector de la enfermedad). En ambos casos, *T. cruzi* se encuentra infectando una gran variedad de mamíferos como por ejemplo marsupiales, armadillos, roedores, de los cuales los insectos triatominos se alimentan y adquieren el parásito. El insecto puede dispersarse al interior de la vivienda humana donde se alimenta de las personas y/o de los animales domésticos, a los que eventualmente puede transmitir el parásito (Rassi et al., 2010).

En el momento que el triatomino se alimenta de su hospedero, sucede la transmisión, pues al poco tiempo de alimentarse el insecto defeca sobre la piel depositando las formas infectivas de *T. cruzi* (tripomastigotes metacíclicos que se encuentran en las glándulas rectales) y éstas ingresan al cuerpo principalmente por las heridas o la abrasión sobre la piel del hospedero causadas al rascarse (Castillo & Wolff, 2000) (Figura 1).

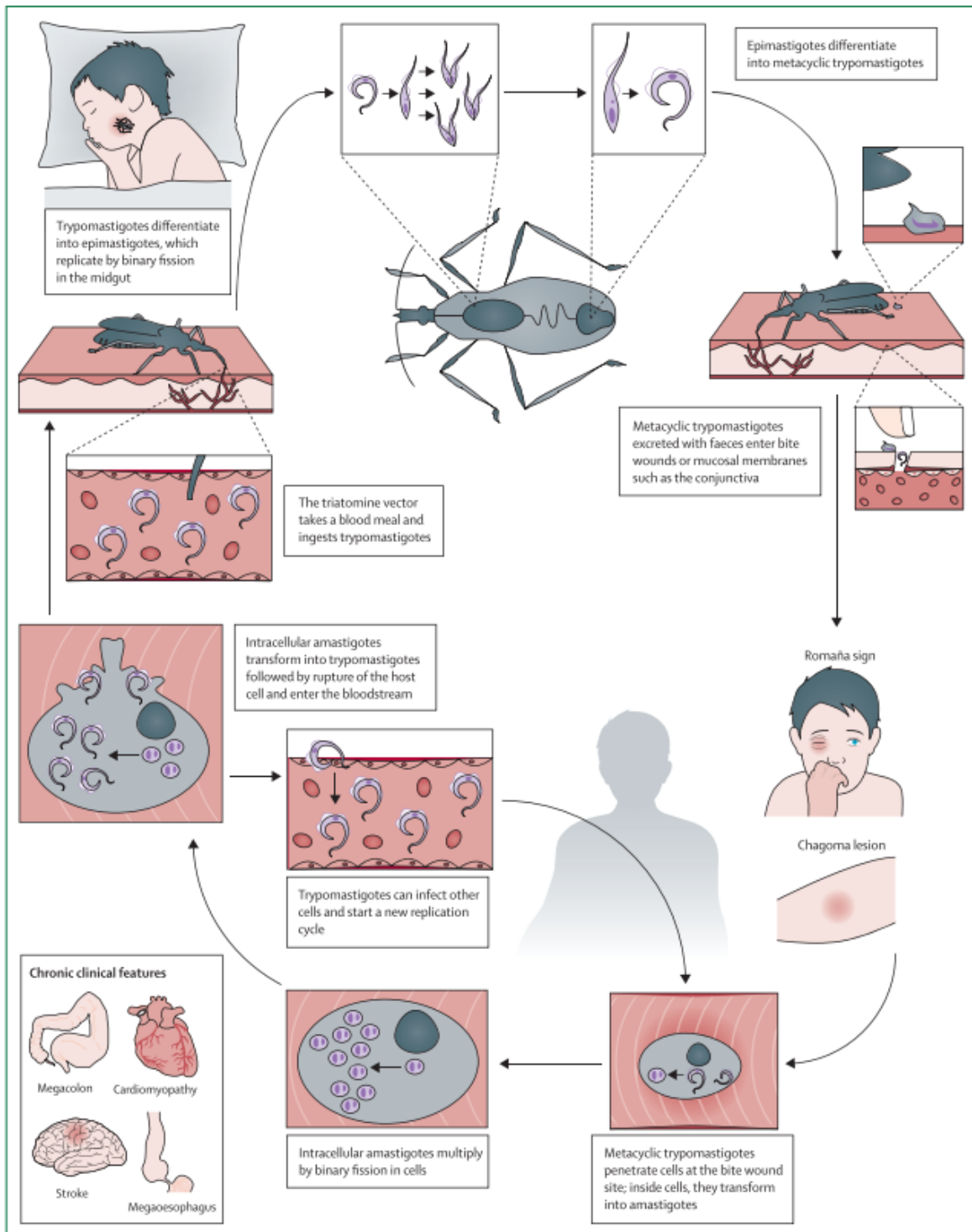


Figura 1. Ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* tomado de (Pérez & Molina, 2018).

También la transmisión puede ocurrir por mecanismos no vectoriales como, por ejemplo: la transfusión sanguínea y la transmisión congénita madre-hijo siendo las

principales causas de infestación en zonas urbanas y países no endémicos (Klein et al., 2012). El riesgo de ECh después de la transfusión de un donante infectado es alto, aproximadamente entre el 10% y 20%. La transmisión congénita ocurre en al menos el 5% de los embarazos en mujeres con infección crónica en algunas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay, y en 1% a 2% o menos en la mayoría de los otros países endémicos. La transmisión también puede ocurrir por el trasplante de un órgano o médula ósea de un donante con infección crónica, que ha sido bien documentado en América Latina. Además, puede transmitirse por vía oral mediante la ingestión de alimentos o líquidos contaminados con *T. cruzi*. A pesar de las diferentes formas de contagio, este parásito también puede transmitirse a través de accidentes de laboratorio a personas que trabajan con parásitos vivos (Rassi et al., 2012).

6.3 Subfamilia Triatominae, vectores de la ECh

Los triatominos son una subfamilia de insectos perteneciente a la familia Reduviidae del orden Hemiptera, conocidos con diversos nombres dependiendo las regiones de América, entre los más comunes están: vinchuca (desde Ecuador hasta la Patagonia), chipo (Venezuela), pito (Colombia), barbeiro (Brasil), chinche (Centro América y México) y kissing bug (EE. UU.) (Otálora-Luna, 2016). Actualmente se han descrito 152 especies para la subfamilia a nivel global, agrupadas en 15 géneros y 5 tribus (Justi & Galvão, 2014).

Los triatominos son insectos grandes (5 a 44 mm) con amplios abdómenes (1.9 a 15 mm) y con cuatro alas, dos superiores con la parte anterior esclerotizada y la posterior membranosa, y dos inferiores con iguales rasgos. Tienen probóscides rectas divididas en tres partes, que se extienden ventralmente desde el ápice de la cabeza hasta la parte anterior del tórax cuando se mantiene en reposo. Las fases inmaduras (cinco estadios ninfales) son terrestres y ocupan durante su desarrollo el mismo hábitat que los adultos (Figura 2). Machos, hembras y ninfas se alimentan exclusivamente de sangre de aves, mamíferos y reptiles, y tienen actividad nocturna (Molina et al., 2000). Todos los miembros de esta subfamilia de insectos tienen la capacidad de transmitir el parásito *T. cruzi*. Esto es el resultado

del efecto de su evolución parásito-vector, en la cual han surgido aptaciones (adaptaciones y exaptaciones) morfológicas, fisiológicas y de comportamiento adecuadas para alimentarse de sangre. Los triatomíneos evolucionaron a partir de reduviídeos depredadores que descendieron de hemípteros fitófagos. De acuerdo con esto el aparato bucal, la composición de la saliva, enzimas y simbiontes digestivos son características plesiomórficas que desarrollaron los reduviidae ancestrales de los triatomíneos, lo cual facilitó su hábito hematófago (Otálora et al., 2015). Una de las características morfológicas más resaltantes del Triatómíneo es la posesión de un rostrum largo y recto, con una conexión membranosa entre los dos últimos segmentos, y que les permite una amplia flexión del tercer segmento rostral cuando se alimentan (Cazorla-Perfetti, 2016).

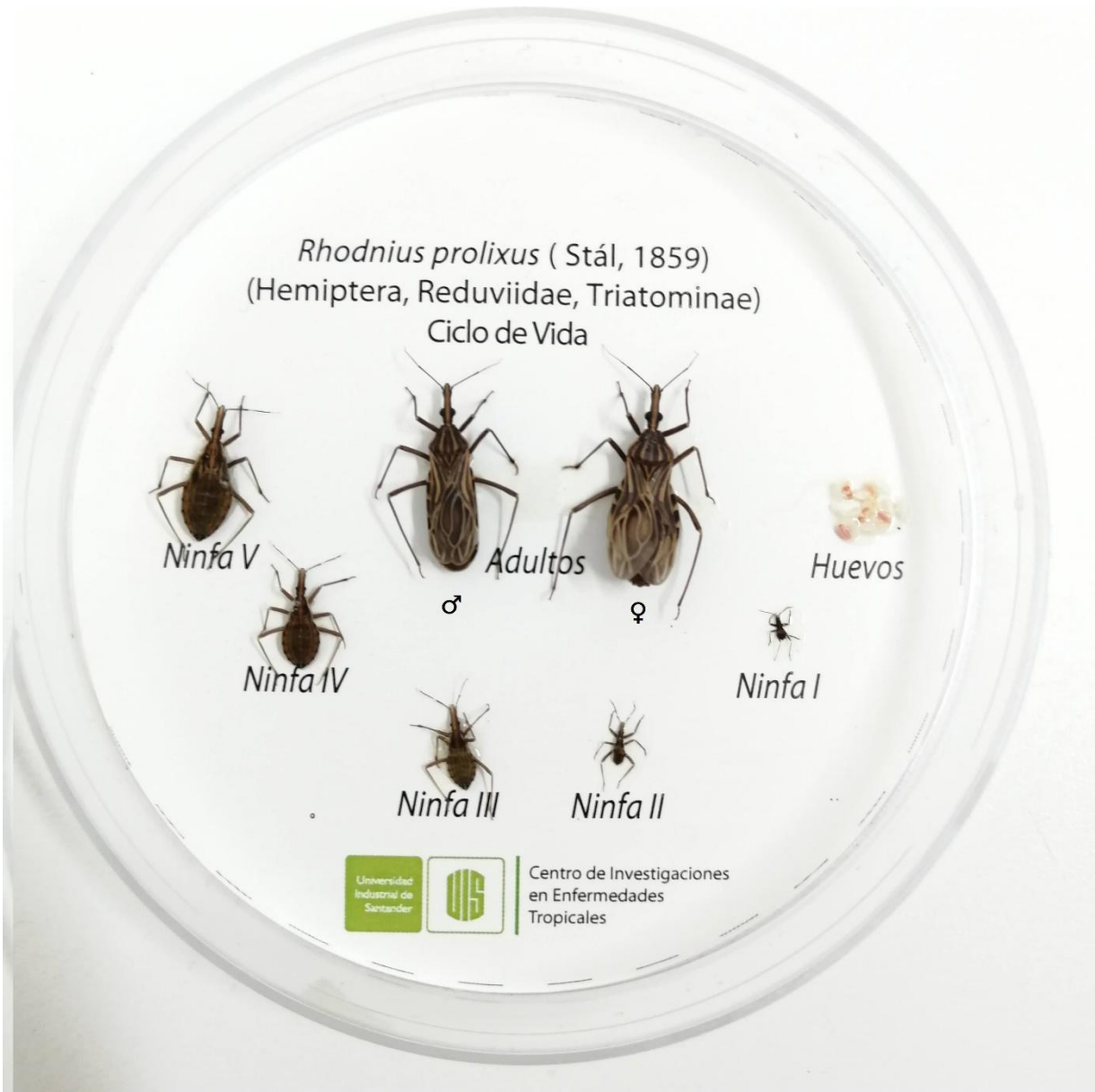


Figura 2 Ciclo de vida *Rhodnius prolixus*.

6.4 *R. prolixus* y su relación con los insecticidas.

Los géneros *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859) y *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) son los principales vectores en el continente americano (Alzogaray, 2003). En Colombia se han reportado 27 especies de triatominos agrupadas en 8 géneros y 4 tribus (Esteban et al., 2017), siendo *R. prolixus* el principal vector de la ECh (Bohman et al., 2018). Las cuatro familias principales de insecticidas sintéticos neurotóxicos (organoclorados,

organofosforados, carbamatos y piretroides) son las sustancias que más se han utilizado para controlar las plagas en los últimos setenta años. Estos químicos han recibido mucha atención por parte de los toxicólogos de insectos y, por lo tanto, su interacción con los insectos es bien conocida. No obstante, hay muy pocos estudios sobre su toxicocinética y toxicodinámica en *R. prolixus* (Alzogaray & Zerba, 2017). incluyendo la resistencia adquirida por el uso excesivo de insecticidas comerciales principalmente a los piretroides. (Fernández et al., 2004; Mijailovsky et al., 2009; Cueto & Picollo, 2015; Rolandi et al., 2020; Vassena & Picollo, 2003).

6.5 Xenobióticos

La palabra xenobiótico, fue acuñada, a mediados de la década de 1960 por el Dr. Howard Mason para que sirviera como un sustantivo colectivo que incluyera cualquier sustancia química a la que un organismo esté expuesto y sea extrínseco al metabolismo normal de ese organismo. Por lo tanto, incluye plaguicidas, químicos ocupacionales, contaminantes ambientales, drogas clínicas, químicos extraños creados por otros organismos, etc., y es un término particularmente útil cuando se discuten vías metabólicas y enzimas que tienen sustratos en varias de estas clases de uso (Croom, 2012). Algunos productos químicos naturales (endobióticos) se convierten en xenobióticos cuando están presentes en el medio ambiente en concentraciones excesivas. El "xeno" en "xenobióticos" proviene de la palabra griega *xenos* que significa invitado, amigo o extranjero (M, Schwab, 2011). Un claro ejemplo de estas sustancias son los (AE) propuestos como una alternativa más amigable con el medio ambiente, para el control de insectos. Los AE son mezclas volátiles de diferentes componentes, poseen una gran variedad de grupos funcionales y están presentes en una gran cantidad de plantas. Los AE se producen como metabolitos secundarios en plantas aromáticas. Los componentes principales de las AE son los monoterpenos, que son moléculas lipofílicas capaces de atravesar el tegumento del insecto. Hay mucha investigación sobre la actividad biológica de los (AE) en los insectos. Sin embargo, hay pocos estudios sobre los vectores de la ECh (Sainz, et al, 2012).

6.6 Acción repelente

Un repelente se ha definido como "algo que hace que los insectos hagan movimientos orientados lejos de su fuente" (Zermoglio et al., 2015). Los principales repelentes usados contra los mosquitos y otros vectores son: DEET, picaridin y IR3535 (Franco et al., 2018). N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) se ha utilizado como repelente de insectos comercial durante más de 60 años y sigue siendo el producto más utilizado para proteger a las personas contra los insectos hematófagos. Su éxito se debe a su alta eficiencia, amplio espectro de actividad y baja toxicidad para los mamíferos. Sin embargo, ocasionalmente puede causar reacciones cutáneas (picazón, inflamación e irritación) y otros efectos sobre el sistema nervioso (convulsiones, especialmente en niños). Otras desventajas de DEET son su fuerte efecto irritante en las membranas mucosas, su capacidad para disolver rayón, plásticos y vinilo, sumado con su presentación oleosa y olor desagradable. El 3- [acetil (butil) amino] propanoato de etilo (IR3535) es un repelente de insectos desarrollado en 1975 por la compañía Alemana Merck. En comparación con el DEET, la exposición cutánea u oral al IR3535 es menos tóxica para los mamíferos, causa menos irritación en las membranas mucosas y tiene propiedades físicas más fáciles de usar. La principal desventaja de IR3535 es que puede ser muy irritante para los ojos. Sin embargo, después de 30 años de uso, no se informaron efectos adversos (Alzogaray, 2016; Valeria Sfara et al., 2011). Además, se han probado otras alternativas como el uso de Aceites Esenciales (AE) (Tabla 1) (Lutz et al., 2014; V Sfara et al., 2009). En estos compuestos se logra observar el efecto repelente, pero significativamente más bajo, en comparación con los repelentes comerciales ($>74\mu\text{g}/\text{cm}^2$ valor referencia de actividad repelente DEET) (Alzogaray, 2016).

Tabla 1. Aceites Esenciales (AE), compuestos mayoritarios y moléculas utilizadas en la evaluación de la actividad repelente en *R. prolixus*.

Aceite o molécula	Dosis	Tiempo	Referencia
<i>Artemisia absinthium</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Artemisia absinthium</i> H2b	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Mentha arvensis</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Mentha spicata</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Mentha longifolia</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Mentha piperita</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Mentha rotundifolia</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Satureja montana</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Thymus vulgaris</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
<i>Thymus zygis</i>	10 µL de una solución de 10µg/µL	60'	Sainz et al 2012
Eucalipto	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Geranio	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Lavanda	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Menta	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Naranja	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Diclorvos	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Eucalyptol	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Geraniol	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Limoneno	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Acetato de linalilo	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Linalool	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Mentona	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
Acetato de mentilo	0,25 ml de la molécula (70 µg/cm ²)	30'	Sfara et al 2009
DEET	Dispositivo prueba in vivo 10µl sobre papel filtro	5'	Zermoglio et al 2015
Piperidina	Dispositivo prueba in vivo 10µl sobre papel filtro	5'	Zermoglio et al 2015
Icaridina	Dispositivo prueba in vivo 10µl sobre papel filtro	5'	Zermoglio et al 2015

Acetato de mentilo	740 µg/cm ²	5'	Lutz et al 2014
geraniol	74 µg/cm ²	5'	Lutz et al 2014
DEET	74 µg/cm ²	15'	Alzogaray 2016
IR3535	74 µg/cm ²	15'	Alzogaray 2016

6.7 Antecedentes en la determinación de repelencia en triatominos

Uno de los primeros dispositivos reportados para la evaluación de actividad repelente en insectos de importancia médica fue el empleado por Buescher et al., 1985. Estos autores evaluaron la acción repelente de diferentes compuestos frente a *Lutzomyia longipalpis* en voluntarios humanos, para esta prueba se empleó un dispositivo plástico de 18 cm de largo 4 cm de alto y 5 cm de ancho con 5 orificios de 2.9 cm de diámetro en su base. Para la determinación del efecto repelente en triatominos, Buescher et al. (1985) evaluaron la acción repelente de once sustancias frente a *Rhodnius prolixus*. Para ello, los autores modificaron levemente el dispositivo empleado en flebótomos con el fin de compensar el comportamiento de agregación de los triatominos. Incorporaron divisiones de plástico para separar cada uno de los orificios en la base y en cada división ubicaron 5 individuos adultos. Como cebo emplearon un conejo blanco previamente anestesiado y rasurado, sobre el que se demarcan círculos de 29 cm de diámetro para la impregnación de las sustancias en diluciones seriadas. Los resultados fueron registrados como número de picadas en un periodo de 30'. El compuesto con menor dosis efectiva (DE₅₀ y DE₉₀) y mayor porcentaje de repelencia fue Permetrina, seguida de RH-398, DEET y AI 3-35765.

Posteriormente, evaluaron el efecto repelente del DEET a diferentes concentraciones en ninfas III de *Triatoma infestans* (Alzogaray et al, 2000). Los autores emplearon un contenedor plástico circular (7.5 cm de diámetro y 4 cm de alto) en el que ubicaron papel filtro pretratado en diferentes áreas. Los autores registraron el desplazamiento de las ninfas mediante un Monitor de movimiento, siendo analizados en términos de área ocupada (píxeles) y expresados en términos de Coeficientes de Repelencia. Adicionalmente, evaluaron la acción repelente con un cebo vivo (paloma) y el uso de un cilindro plástico de 11 cm de

largo y 8 cm de diámetro, en cuyo interior se ubicó un pedazo de papel doblado a manera de concertina con el fin de proporcionar una superficie de desplazamiento para el individuo. Introdujeron una ninfa en el extremo distal del tubo, mientras que en el otro extremo se encontraba el cebo y un trozo de gasa impregnado. La prueba presentó una duración de 30'. Los resultados fueron expresados en términos de Coeficiente de Ingestión cuantificados con el peso de las ninfas antes y después de la prueba. El DEET evidenció un mayor efecto repelente a la mayor dosis empleada ($700\mu\text{g}/\text{cm}^2$) tanto en papel filtro impregnado como al emplear un cebo vivo. La acción repelente del DEET disminuyó a concentraciones más bajas ($7\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Sfara et al., (2011) evaluaron la respuesta comportamental de ninfas de quinto estadio (NV) de *Rhodnius prolixus* frente a papel filtro impregnado con DEET bajo diferentes tiempos de secado (1,5,10 y 20 minutos) y áreas de impregnación. Los autores emplearon un anillo de acrílico con el fin de contener 5 individuos y su comportamiento fue registrado mediante un monitor de movimiento. Los resultados se expresaron en términos de Coeficientes de Repelencia. También evaluaron el efecto de los vapores del DEET empleando un contenedor plástico con dos niveles, ubicando las ninfas en el nivel superior y un papel impregnado en el nivel inferior. Estos autores confirmaron el efecto repelente del DEET, pero que, bajo una exposición prolongada se pierde este efecto.

Zermoglio et al., (2015) evaluaron el comportamiento de *R. prolixus* frente a diferentes compuestos con potencial acción repelente. Para ello, elaboraron un dispositivo usando un tubo de poliestireno (10 cm de largo) abierto en uno de sus extremos, pero separado del ambiente mediante una malla a 1 cm del extremo. Los autores dividieron el tubo en tres zonas: una proximal (o zona del Cebo, a 2 cm de la malla), una zona intermedia y una zona distal (o zona de refugio) demarcada por la presencia de una compuerta ubicada a 2 cm del extremo más distal del tubo. Como cebo emplearon el antebrazo de un voluntario humano. Impregnaron papel filtro con los compuestos y los ubicaron entre el extremo proximal y la malla, la cual se ubicó cerca al antebrazo del voluntario. Del otro lado del tubo se ubicó el individuo (con un periodo de 5' de adaptación) y

posteriormente se retiró la compuerta de separación. Los resultados se expresaron en actividad del individuo, tiempo de permanencia en cada zona delimitada y respuesta de extensión de la probóscide (PER). Estos autores mencionan que el efecto repelente del DEET se presenta únicamente en altas concentraciones con o sin cebo; la Piperidina fue efectiva con o sin presencia de cebo, y la Icaridina solo es repelente en ausencia de cebo vivo.

Por último, (Ramírez et al., 2020) evaluaron la respuesta comportamental de adultos de *R. prolixus* y ninfas III de *Triatoma infestans* a diferentes compuestos volátiles repelentes, los cuales son liberados de manera natural por la piel humana. Para ello, emplearon la metodología y el dispositivo empleado por Zermoglio et al. (2015) modificado (Figura 8). El tiempo máximo de duración de cada experimento fue de 5'. Los autores mencionan que 2-phenylethanol y 2-mercaptoethanol reducen el tiempo de cercanía al hospedador en *R. prolixus*; y que dimethyl sulfoxido and 2-mercaptoethanol reducen el tiempo para *T. infestans*. También observaron un efecto repelente con DEET a altas concentraciones.

6.8 Sistema olfativo en insectos y electroantenograma (EAG)

En triatominos, al igual que en otros insectos, el sistema olfativo es de gran importancia para orientar su comportamiento, la alimentación, lugares de refugio, hospederos, oviposición, y respuestas de alarma, están mediados por este sistema (Barrozo et al., 2017). Las antenas de los insectos son las principales estructuras en detectar señales olfativas, sin embargo, los palpos bucales y maxilares también realizan esta función, pero en menor medida. Generalmente las antenas están formadas por tres segmentos de escapo pedicelo y dos flagelomeros. Los pelos olfativos también llamados sénsulos o sensilas, se encuentran distribuidos por las antenas y los palpos. Dentro de estas estructuras se encuentran las neuronas receptoras olfativas (NROs), responsables de la detección de olores. Los axones de las NROs forman en general dos nervios por antena, los cuales se fusionan para luego alcanzar el cerebro del insecto. Las sensilas presentan diferentes morfologías, y se clasifican de acuerdo con esta: con poros en la pared (que son generalmente olfativas), con poro en la punta

(generalmente gustativas) y sin poros (mecanorreceptoras o térmicas/hidrorreceptoras). A su vez las sensilas olfatorias pueden ser de pared única (celocónicos) o de pared doble (grooved peg), además las sensilas celocónicas, pueden ser de pared fina (basicónicos) o de pared gruesa (tricoideo) (Figura 3) (Barrozo et al., 2017; Diehl et al., 2003; Guidobaldi & Guerenstein, 2012).

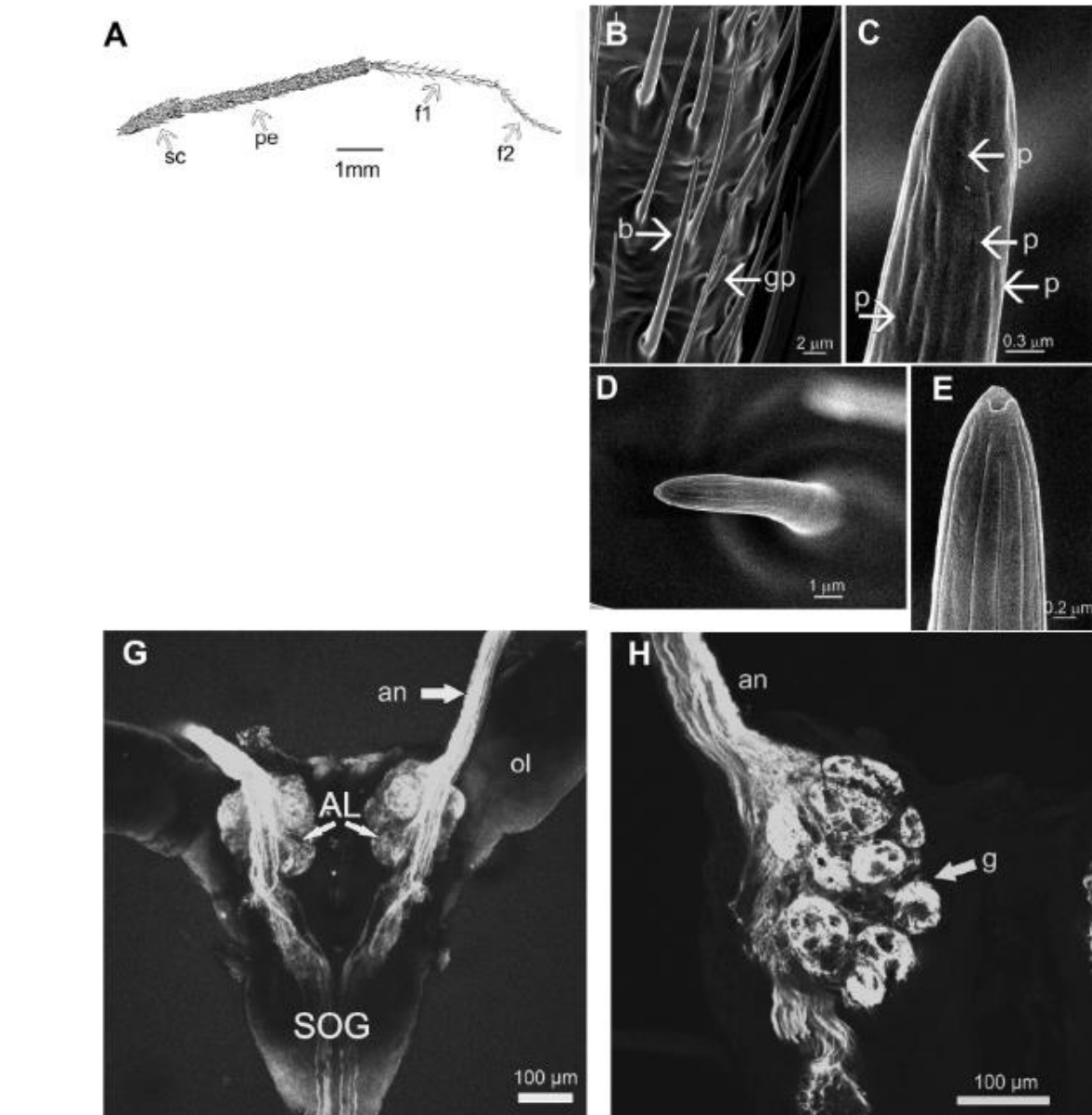


Figura 3. Morfología de las principales estructuras que conforman el sistema olfativo en triatomíneos. A. Antena de *Triatoma infestans* mostrando sus cuatro

partes, escapo, pedicelo, flagelomero 1 y 2. B Región media de un flagelomero de *R. prolixus* en la que se observa dos tipos de sencilas basicónicas (b) y grooved peg (gp). C. sencila basicónica con múltiples poros, D. sencila grooved peg G. Cerebro de *R. prolixus* que muestra los centros primarios de procesamiento cerebral de información olfativa, los lóbulos antenales. H. Detalle de un lóbulo antenal y los glomérulos, tomados de Barrozo et al., (2017).

La formación de la sensila se da gracias a un grupo de células auxiliares o de soporte que, durante el desarrollo del insecto, secretan estructuras cuticulares que dan lugar a la sensila (Guidobaldi & Guerenstein, 2012). Una vez desarrollada, dichas células mantienen concentraciones iónicas adecuadas en la linfa, transportando activamente K^+ , lo cual contribuye a un voltaje transepitelial positivo (de hasta 40 mV), al abrirse los canales iónicos en respuesta a la llegada de olores específicos se producen los fenómenos de conducción eléctrica (iónica) que llevan a la generación de potenciales de receptor (cambio de voltaje en estas membranas) (Figura 4). (Guidobaldi & Guerenstein, 2012). Muchos componentes involucrados en el proceso de señalización, como las proteínas de unión al olor (OBP), las proteínas quimiosensoriales (CSP), las enzimas que degradan el olor (ODE), los receptores olfativos (OR), los receptores ionotrópicos (IR) y las proteínas de la membrana de las neuronas sensoriales (SNMP) se han identificado en el genoma de *R. prolixus* (Pask & Ray, 2016).

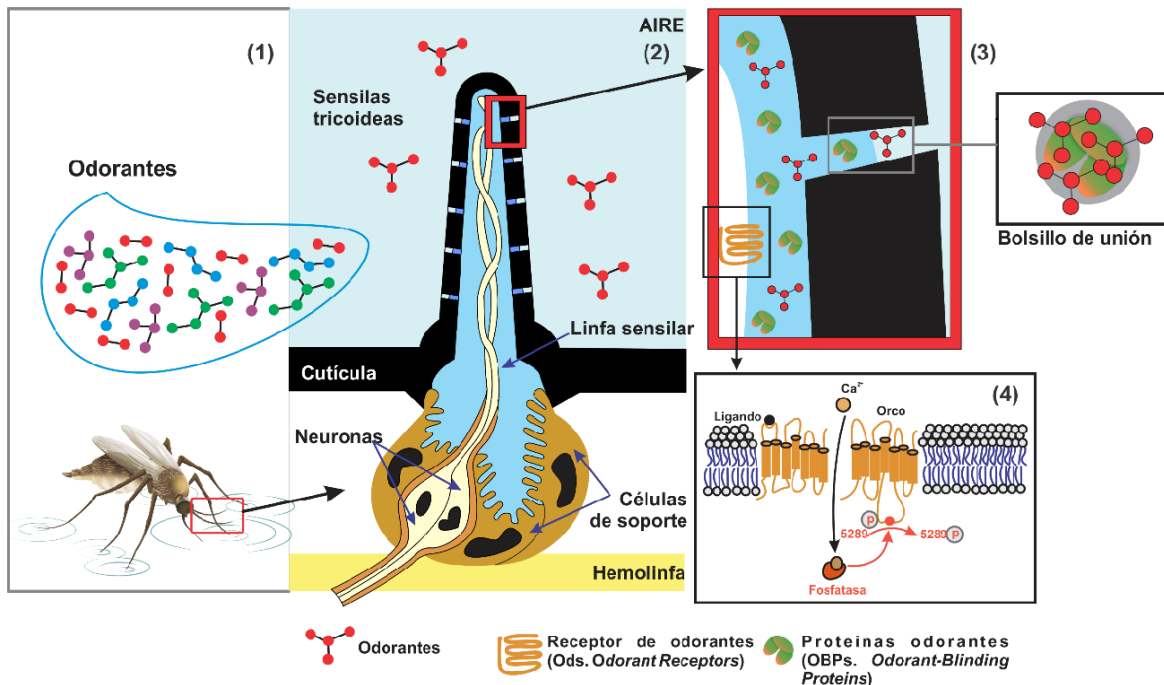


Figura 4 Mecanismo de recepción de odorantes en insectos. Las moléculas odorantes liberadas por animales y plantas llegan hasta las sensilas ubicadas en las antenas y palpos maxilares. (2) Al pasar a través de las sensilas, las moléculas odorantes llegan a la linfa sensorial. (3) Allí, se unen a proteínas de unión a odorantes (OBPs) para ser transportadas en un bolsillo de unión a través de la linfa sensorial hasta los receptores de odorantes (ROs). (4) Estos ROs ubicados en la membrana celular de neuronas receptoras olfativas (NROs) permiten la transformación de la señal química en una señal eléctrica; que desencadena una respuesta comportamental tomado de Portilla-Pulido et al., (2020).

La electroantenografía (EAG) es una técnica de bioensayos utilizada en entomología experimental para analizar las señales eléctricas generadas por la recepción de odorantes percibidos por el aparato olfativo antenal de los insectos (Olsson & Hansson, 2013). En el presente trabajo se espera inferir o discriminar con EAG la posible actividad insecticida y/o repelente de xenobióticos en *R. prolixus*, para de esta manera usarlo masivamente en la evaluación de compuestos con potencial insecticida y/o repelente. Este barrido de compuestos permitiría seleccionar los candidatos con mayor potencial de actividad de tal manera que se evalúan experimentalmente solamente los mejores compuestos.

El método se basa en pequeñas fluctuaciones de voltaje entre la punta y la base de una antena, estas fluctuaciones son causadas por la despolarización eléctrica de muchas neuronas olfativas. La amplitud de una respuesta EAG cambia dependiendo de las concentraciones del estímulo hasta llegar a su nivel de saturación (Figura 5). La amplitud depende aún más de la naturaleza del estímulo, la especie de insecto, su sexo entre otros factores. Las respuestas de un EAG se calculan midiendo la amplitud del cambio del voltaje en respuesta a los estímulos (volátiles) (Reisenman, 2014).

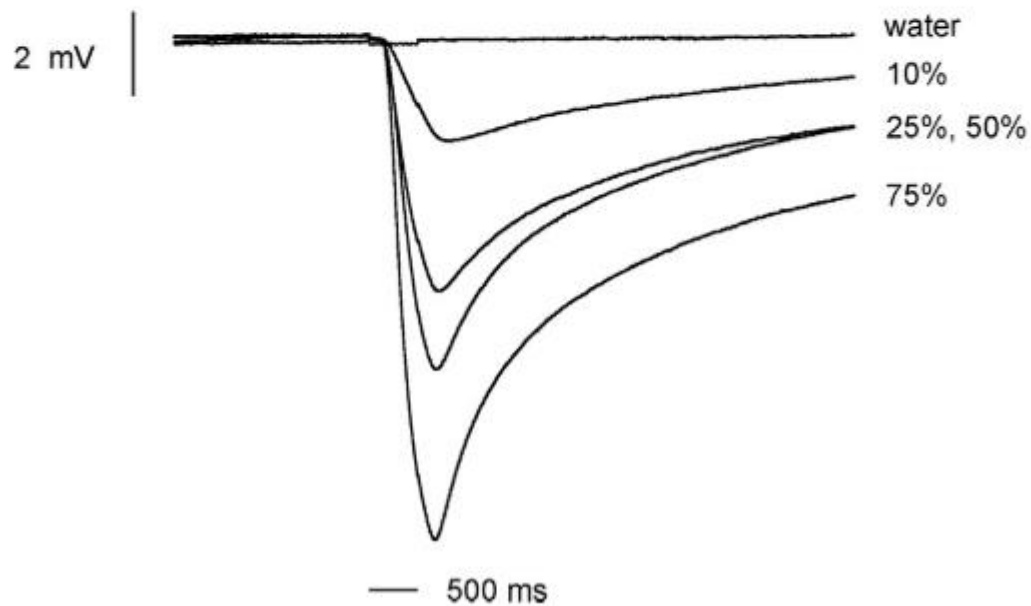
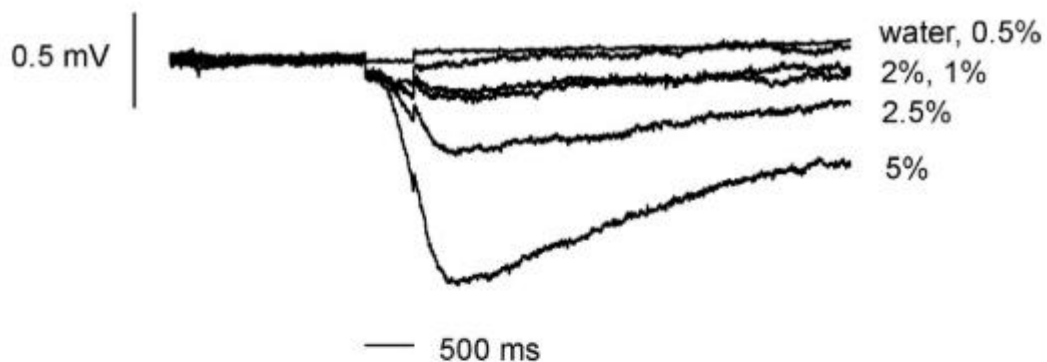


Figura 5. Ejemplos de respuestas típicas de EAG, en *R. prolixus*. Las respuestas son expresadas en milivoltios en un insecto estimulado a diferentes concentraciones de amoníaco (%vol/vol) y el control del agua, donde se logra observar como la amplitud aumenta con la dosis del amoniaco tomado de Reisenman, (2014).

Un dispositivo típico para el estudio de la respuesta de EAG de los insectos tiene una estructura sencilla, consistiendo en una fuente de estímulos (corriente de aire portador de una o varias sustancias volátiles), un sistema de captación de la respuesta mediante electrodos (uno denominado "registrador" y otro "de referencia") y un instrumento registrador capaz de amplificar, filtrar y procesar la señal eléctrica inducida en la antena. La señal eléctrica asociada a la respuesta de EAG se caracteriza por su bajo potencial (décimas de milivoltio a pocas decenas de milivoltio) y la alta resistencia de las antenas (del orden de varios megaohmios) (Olsson & Hansson, 2013; Tapras, 2002). Si bien la técnica EAG, nos brinda mucha información sobre el comportamiento de las señales eléctricas en la antena de los insectos en la recepción de odorantes, son muy escasos los estudios realizados en triatominos, siendo *T. infestans*, *R. prolixus*, *T. dimidiata*, las especies utilizadas, con experimentos, relacionados principalmente en volátiles expulsados en las glándulas femeninas, feromonas, levaduras e inanición (Fontan et al., 2002; Lorenzo et al., 1999; May-Concha et al., 2018; Reisenman, 2014).

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Determinación de respuestas electroantenográficas para la identificación de xenobióticos con posible actividad insecticida y/o repelente en *Rhodnius prolixus*.

7.2 Objetivos específicos

- Determinar la respuesta antenográfica in vivo de las moléculas sintéticas y metabolitos secundarios de plantas que presentan actividad contra *R. prolixus*.
- Determinar la actividad insecticida de moléculas sintéticas y metabolitos secundarios de plantas en ninfas de estadio NI y NV de *Rhodnius prolixus*.

- Evaluar la acción repelente en aves cuando se aplican tópicamente moléculas sintéticas y metabolitos secundarios de plantas como medio de protección contra la picadura de *Rhodnius prolixus*.

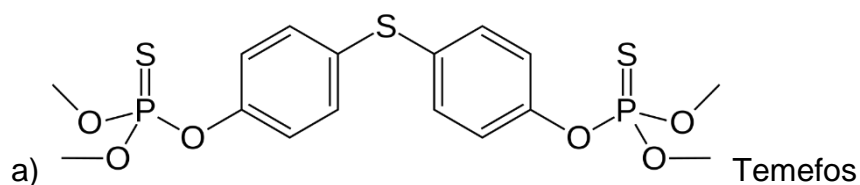
8. Metodología

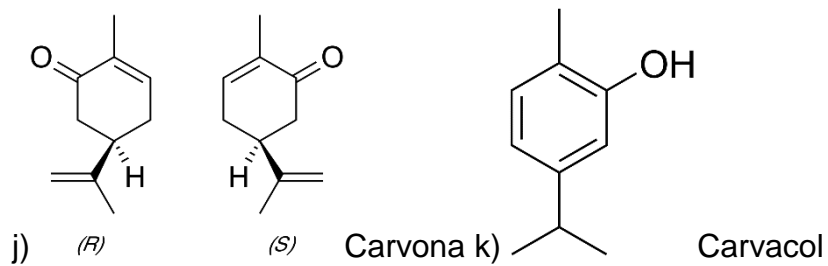
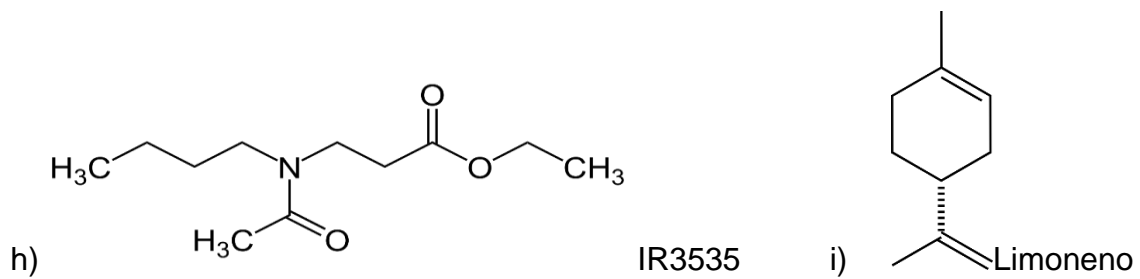
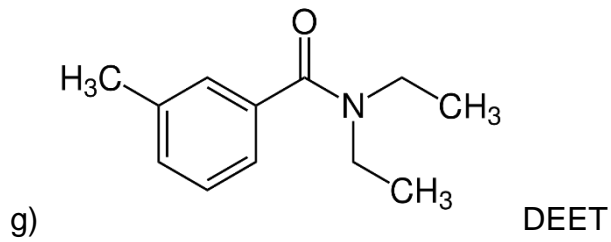
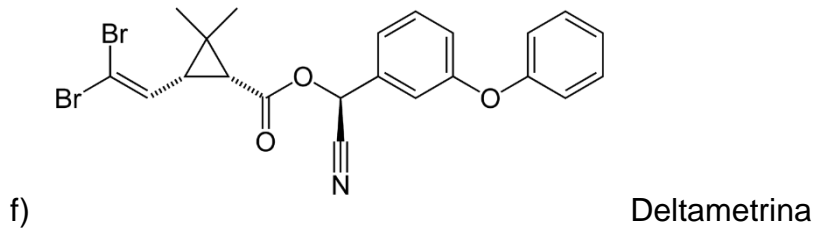
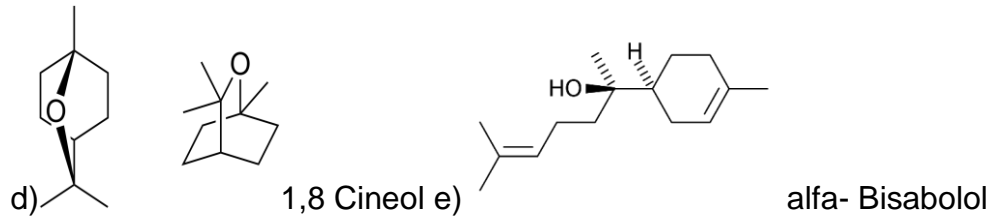
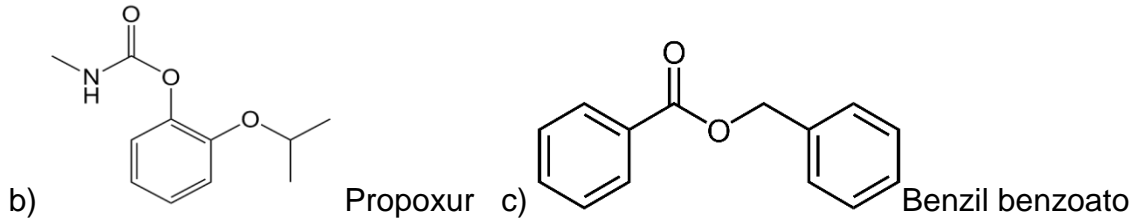
8.1 Material Biológico

Las ninfas y adultos de *Rhodnius prolixus* que se utilizaron en los diferentes bioensayos de este proyecto, provienen de colonias libres de cualquier tratamiento a insecticidas, las cuales están establecidas hace más diez años en el insectario cría del CINTROP-UIS. La sala de cría se mantiene a una temperatura de 26 (\pm) 3 °C, humedad de 75 (\pm) 4% y un fotoperiodo de 12:12. Los adultos de *R. prolixus* se alimentan cada quince días con sangre de gallina (*Gallus gallus*) para obtención de huevos y ninfas.

8.2 Moléculas

Para las pruebas de acción insecticida se utilizaron los insecticidas comerciales Temefos, Propoxur y los metabolitos Benzil benzoato, 1,8 Cineol, Alfa-Bisabolol como control positivo de mortalidad se utilizó el insecticida de grado técnico deltametrina (99,5%-ChemService), piretroide utilizado para el control vectorial en Santander. Para todas las diluciones y controles negativos se utilizó acetona (99,98% (Merck ©)). Para la acción repelente se usarán los repelentes comerciales DEET, IR3535, y los metabolitos Limoneno, Carvona, Carvacrol, Citronelal (Figura 6). Para los bioensayos de electroantenografía se utilizó tanto las moléculas con acción insecticida y repelente, además del compuesto amoniac (NH₃) el cual es utilizada como control positivo en estos bioensayos.





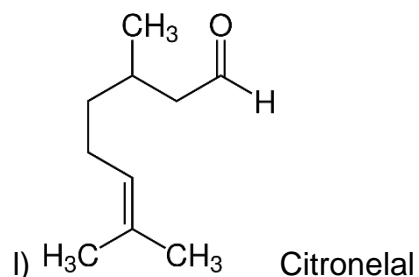


Figura 6. Moléculas con acción insecticidas y repelente utilizadas en los experimentos a) Temefos b) Propoxur c) Benzil benzoato d) 1,8 Cineol e) Alfa-Bisabolol d) Deltametrina f) DEET g) IR3535 h) Limoneno i) Carvona j) Carvacrol k) l) Citronelal.

8.3 Inferencia de actividad insecticida y/o repelente: Electroantenograma

Para evaluar la respuesta eléctrica de la antena del triatómido ante la exposición de las moléculas insecticidas y/o repelentes, se realizaron registros electroantenográficos (EAG). Para esto se tomaron individuos adultos con ayuno de 30 días. Los insectos se fijaron cuidadosamente en plastilina en una plataforma de madera donde permanecieron inmovilizados, exponiendo las antenas y ojos para el experimento. La plataforma con el insecto fijado se colocó bajo un estereomicroscopio (Leica EZ4) con el objetivo de visualizar el preparado. El electrodo de referencia se insertó en el ojo expuesto, mientras que el electrodo de registro se insertó en la base del pedicelo de la antena (Figura 7). Se utilizaron electrodos de registro y de referencia de Tungsteno (0,25 mm, Sigma Aldrich). Dichos electrodos se afilaron electrolíticamente mediante inmersión repetida de la punta en una solución de hidróxido de sodio NaOH (1 M, 3-5 V, Sigma Aldrich) hasta obtener un diámetro aproximado de 0,05 – 1 milímetro (mm) (Olsson & Hansson, 2013) (Figura 8). El registro de EAG se inició 2 minutos después de alistar la preparación del insecto. Las señales antenográficas se amplificaron (1000x) con un preamplificador (Universal Single Probe, type PRS-1, Syntech, Alemania) y digitalizaron (IDAC-4, Syntech, Alemania). Las señales se visualizaron, grabaron y analizaron en un computador utilizando el Software Autospike (Syntech, Alemania) (Olsson & Hansson, 2013).

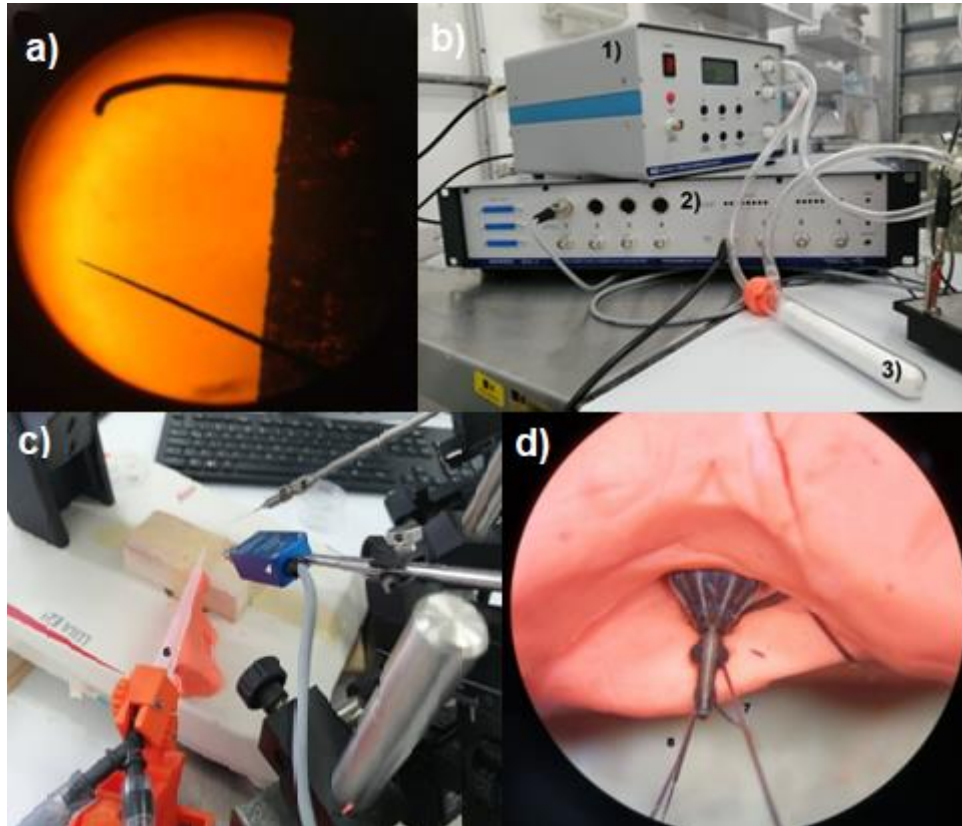


Figura 7. Montaje experimental para electroantenografía. a) Afilamiento electrolítico con NaOH de electrodos de Tungsteno (electrodo sin afilar, electrodo afilado). b) El equipo de electroantenografía consta de un sistema controlador de flujo de aire que permite llevar las moléculas volátiles directamente hasta el insecto (1) y un sistema de adquisición de datos inteligente (Synthec) (2). Además, se muestra el compartimiento donde se coloca el papel filtro impregnado con las sustancias de interés (3), por este tubo de ensayo con salida lateral pasa el flujo de aire hacia el insecto. c) Los electrodos son posicionados en unos dispositivos (Holders) que permiten la manipulación facilitada en los 3 planos x, y, z, (4) el electrodo de medición es incrustado en la antena mientras que el electrodo de referencia (5) en el ojo del insecto. Además, desde el tubo de ensayo con salida lateral (3) fluye el aire con los estímulos transportados hasta (6) donde son liberados finalmente en el triatomino montado. (d) Los electrodos incrustados se

muestran en (7) para el electrodo de referencia y (8) el electrodo de medición. Fotografías: Laboratorio CINTROP.

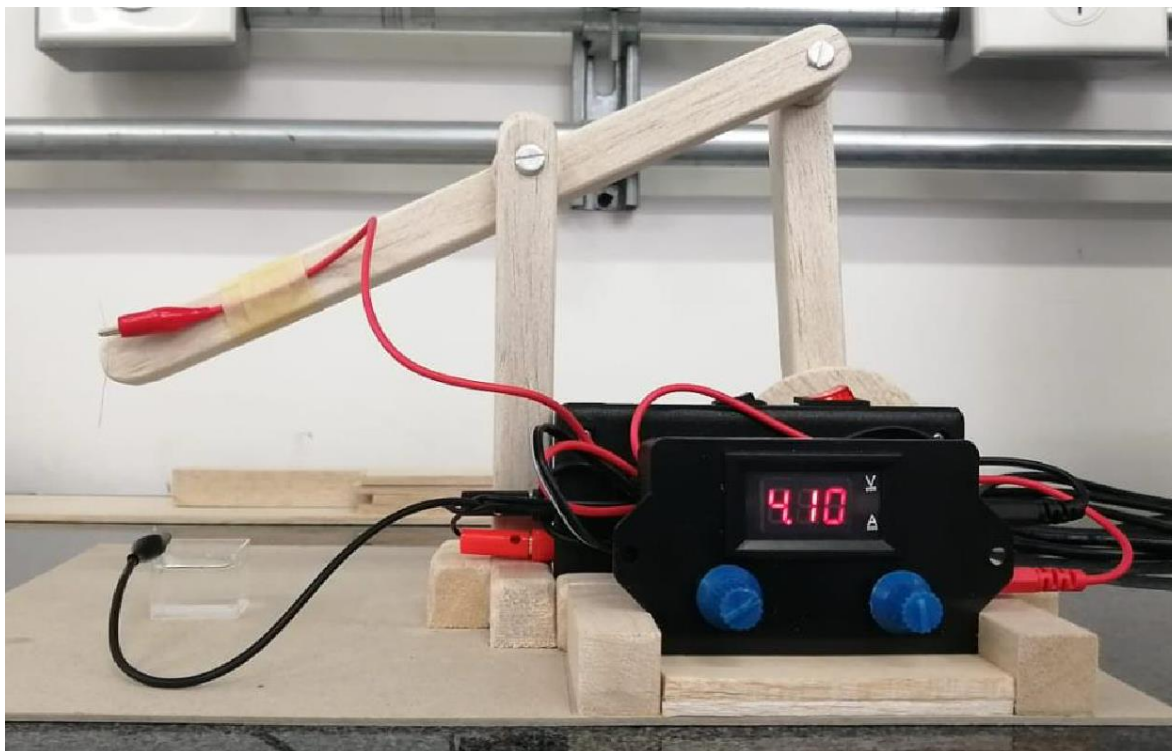


Figura 8. Dispositivo empleado para afilamiento electrolítico de electrodos de tungsteno. El movimiento repetitivo hacia arriba y abajo afila el electrodo de tungsteno en la solución de NaOH por la cual fluye corriente eléctrica. Fotografía: Laboratorio CINTROP.

8.3.1 Estímulo olfatorio y registro del electroantenograma

Los pulsos de aire se hicieron pasar a través de un tubo de ensayo con salida lateral donde se contenían los compuestos a evaluar. Este tubo de ensayo se acopló con mangueras de plástico que transportaron los compuestos hacia la preparación del insecto en la base de madera. Cada uno de los compuestos repelentes a evaluar, se aplicaron en una pequeña pieza de papel filtro (Whatman No. 1) en diferentes concentraciones: 90%, 60%, 30%. Luego de la aplicación en el trozo de papel filtro, se dejó secar durante 1 minuto para eliminación completa del solvente. El amoniaco fue empleado en una dosis de 25% para todos los

experimentos, un triatomino fue empleado por dosis con un estímulo inicial y final de amoníaco y con pulsos de 8 segundos de aire (*background*) entre cada dosis. El trozo de papel filtro se colocó dentro del tubo de ensayo con salida lateral acoplado al controlador de flujo de aire. Para cada molécula se empleó un tubo de ensayo diferente al igual que los tubos de conexión y la preparación del insecto (un individuo por réplica, con un número mínimo de N=7 por experimento) (Figura 9.)



Figura 9. Diseño del flujo de aire en los bioensayos de EAG, cada molécula evaluada contiene un juego de tubos y mangueras únicos.

Los xenobióticos utilizados se administraron mediante una bomba de flujo de aire controlado (*Stimulus controller unit, type CS-55*, Syntech, Alemania). La bomba de flujo de aire se programó con una secuencia de tres pulsos de aire: 25 mL/s de flujo, 10 segundos para cada pulso, con intervalos de 2 segundos para el flujo de aire que contenía los compuestos repelentes y 8 segundos de únicamente aire (*background*). Antes y después de aplicar cada sustancia repelente, se aplicó un

pulso de amoniaco al 25%, una sustancia atrayente para los insectos. Esto se realizó con el fin de garantizar que el insecto fuese estimulado de forma eficaz con los compuestos durante todo el experimento y observar el cambio en la señal electroantenográfica.

8.3.2 Análisis de datos electroantenográficos

Las respuestas del EAG fueron calculadas mediante el promedio de la amplitud máxima (mV) como respuesta a cada pulso de aire administrado. Todos los resultados obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y se hicieron análisis de varianza para comparar las respuestas máximas de EAG entre los diferentes compuestos (Anova o Kruskal wallis según las pruebas de normalidad), seguido de pruebas de comparación múltiple (Prueba de Tukey o Prueba Dunn según las pruebas de normalidad). Únicamente valores de $P < 0,05$ fueron considerados como significativos estadísticamente, adicionalmente se realizó una estandarización de los registros obtenidos; tomando como referencia el valor inicial de las respuestas EAG como el 100% y de esta manera determinar el cambio en porcentaje de las respuestas obtenidas posteriormente.

8.4 Evaluación de la actividad insecticida y repelente.

8.4.1 Actividad insecticida

El modelo experimental de este trabajo siguió los lineamientos de Cuadros, et al 2017., para bioensayos con triatominos donde primero se inicia evaluando la acción insecticida con las Dosis exploratorias (DE) para cada uno de los xenobióticos. Cada uno de los compuestos fue evaluado preliminarmente mediante aplicación tópica con micro-jeringas Hamilton (dosis fija de 0,1 μ L para ninfas de primer estadio N1 y 0.5 μ L para ninfas de quinto estadio N5) para determinar los porcentajes de mortalidad entre 5 y 95%. Las dosis preliminares fueron 365, 110, 10, 4 ppm para las moléculas insecticidas (Propoxur, Temefos, Benzilbenzoato, alfa-Bisabolol, 1,8-Cineol) más un tratamiento control negativo, donde únicamente se aplicó disolvente (acetona). Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento utilizando tres ninfas por tratamiento, para un total de

12 individuos por dosis y por réplica, siendo en total para las tres repeticiones del experimento 36 individuos por dosis. Lecturas de mortalidad se cada 72 horas. Posteriormente a la delimitación de los porcentajes de mortalidad se evaluaron una nueva batería de dosis asimétricas y múltiples (a partir del experimento anterior) (Figura 10). En todos los experimentos se utilizó en paralelo un control positivo que corresponde a un insecticida piretroide Deltametrina “ChemSevis”.

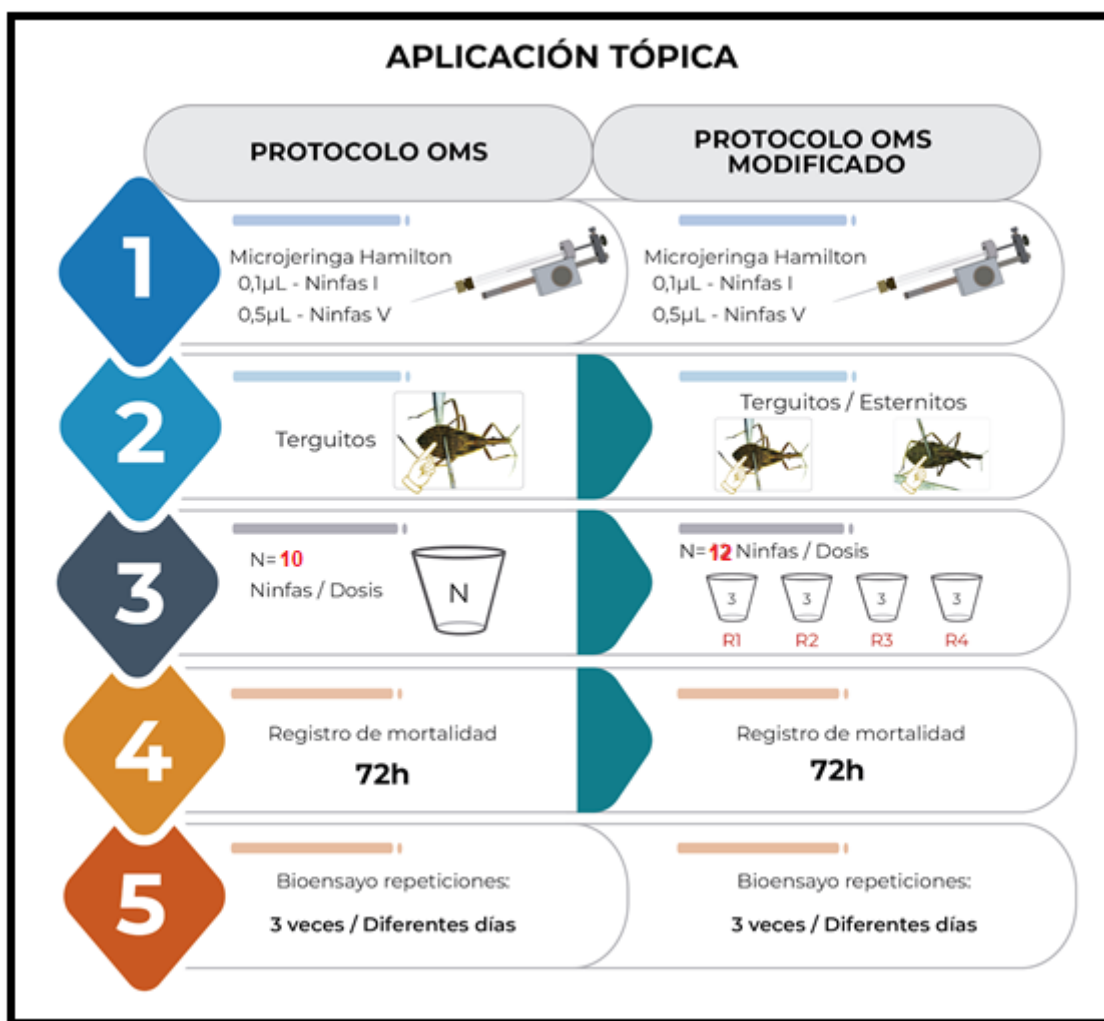
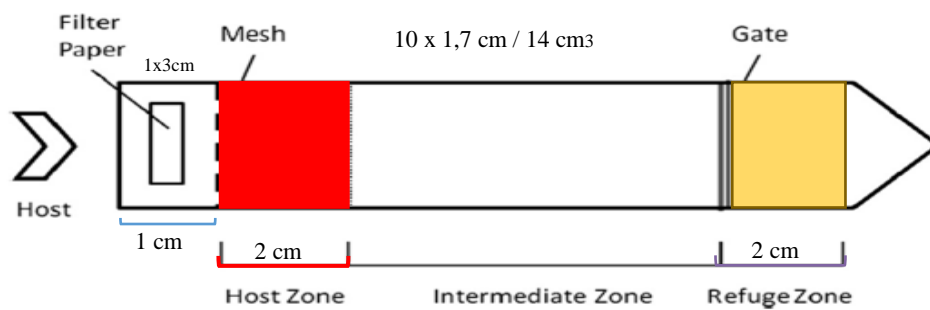


Figura 10. Protocolo utilizado en los bioensayos de acción insecticida, el cual se basa en el protocolo de la OMS 1994 con algunas modificaciones.

8.4.2 Actividad Repelente

Para determinar la repelencia de los xenobióticos propuestos, se tomó como referencia los bioensayos realizados por Zermoglio *et al* (2015) y Ramírez *et al* (2020) (Figura 11). Sin embargo, debido a la carencia de ergonomía y dificultad de manipulación se estableció un nuevo dispositivo propuesto por el laboratorio de entomología médica del CINTROP, tomando como base los dos dispositivos anteriormente propuestos, a los cuales se realizó una serie de bioensayos comparando los dos modelos de dispositivos con el fin de establecer la correcta determinación de la actividad repelente con el nuevo dispositivo.

a)



b)

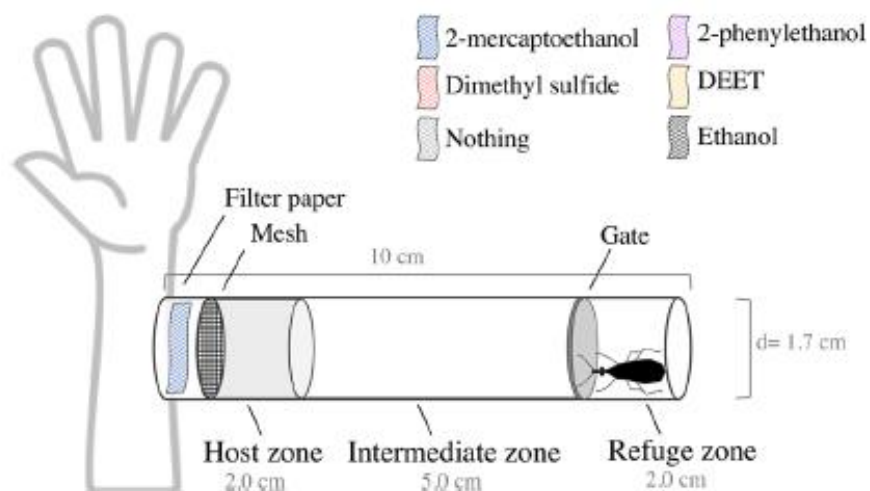
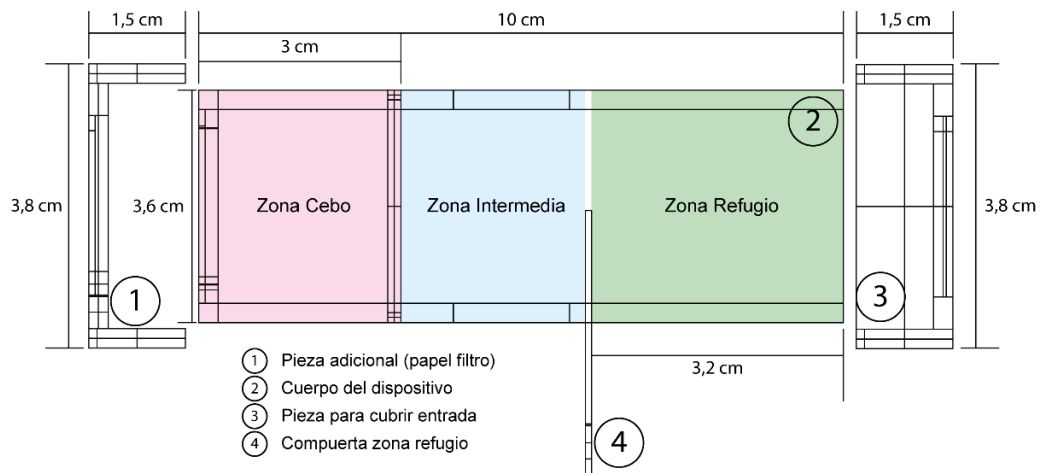


Figura 11. Dispositivos para determinar la actividad repelente propuestos por a) Zermoglio *et al* (2015) y b) Ramírez *et al* (2020) respectivamente.

8.4.2.1 Especificaciones del dispositivo propuesto por el laboratorio de entomología médica del CINTROP

El dispositivo está fabricado en acrílico cristal de 3 mm de espesor, es un rectángulo con unas dimensiones de 10 cm de largo, 3,6 cm de ancho y 9 cm² de área de contacto (Figura 12). En su extremo proximal cuenta con una malla y una pieza adicional en acrílico cristal que permite la inserción de papel filtro, con el fin de permitir el contacto directo (o no) con un cebo vivo. A 3 cm de esta malla se encuentra una división interna marcada en el acrílico, la cual delimita la Zona del Cebo, de la Zona intermedia. En el extremo distal se encuentra una compuerta ubicada a 3,2 cm del extremo más distal del dispositivo, la cual demarca la Zona de Refugio. El dispositivo cuenta con un sistema de fijación, útil cuando se emplea un cebo vivo (gallina) sin anestesia.



b)

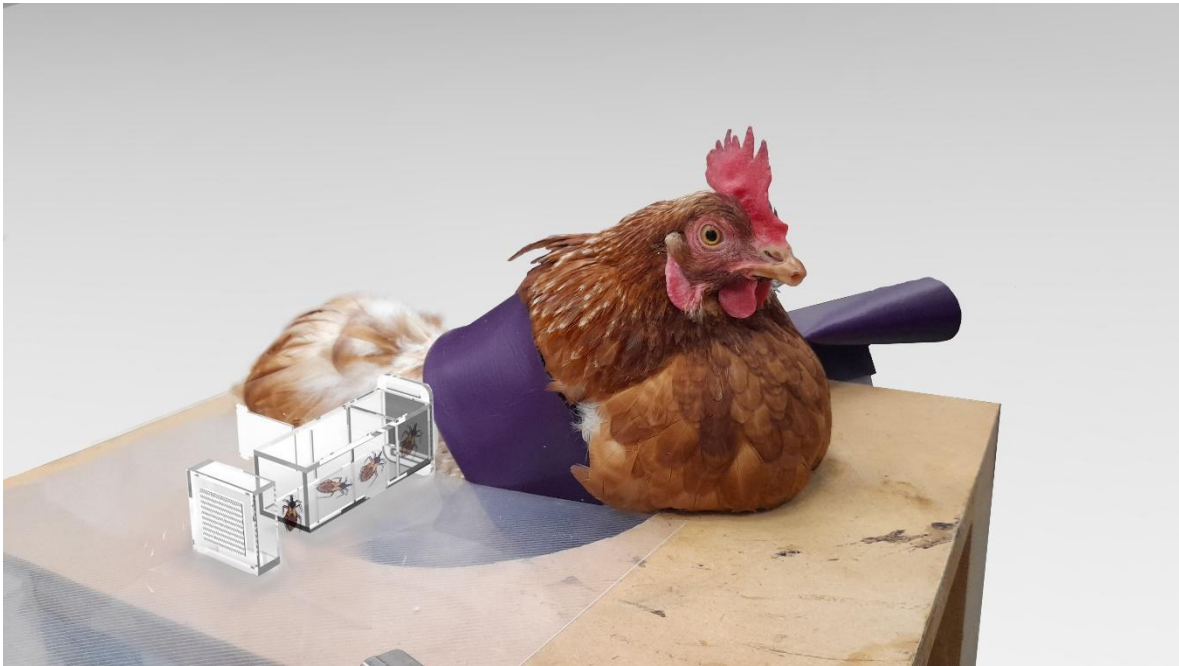


Figura 12. Especificaciones del Diseño del dispositivo propuesto para la evaluación de la actividad repelente en triatomíneos a) Esquema b) Dispositivo.

8.4.2.2 Determinación de la actividad repelente.

Inicialmente se realizó una comparación del dispositivo diseñado por Zermoglio *et al* 2015 y el dispositivo CINTROP con el fin de determinar la efectividad del nuevo dispositivo. Los dos dispositivos fueron evaluados simultáneamente, empleando como cebo vivo gallinas adultas comunes (*Gallus gallus*) e individuos adultos de la especie *R. prolixus*. Cada ave fue impregnada con 150 μ L en un costado del abdomen, debajo de las alas. Inicialmente se empleó el repelente comercial IR3535 a una concentración del 90%. La respuesta del comportamiento de los individuos fue evaluada en el interior de un dispositivo plástico descrito por Zermoglio y una propuesta de prototipo CINTROP, se tomaron tres réplicas de la molécula repelente y dos réplicas del control (Acetona) por bioensayo. Se calculó el tiempo de protección a la picada (PC) y acercamiento al cebo (AC) desde cero hasta 150 minutos, tomando descansos de 30' para comodidad de las gallinas. Cada prueba fue ejecutada por triplicado en diferentes días y utilizando diferentes cebos vivos (Figura 13).

Posteriormente, se evaluó el efecto repelente de los demás xenobióticos con posible actividad repelente: DEET, Limoneno, Carbona, Carvarol y Citronellal a una concentración del 90%.

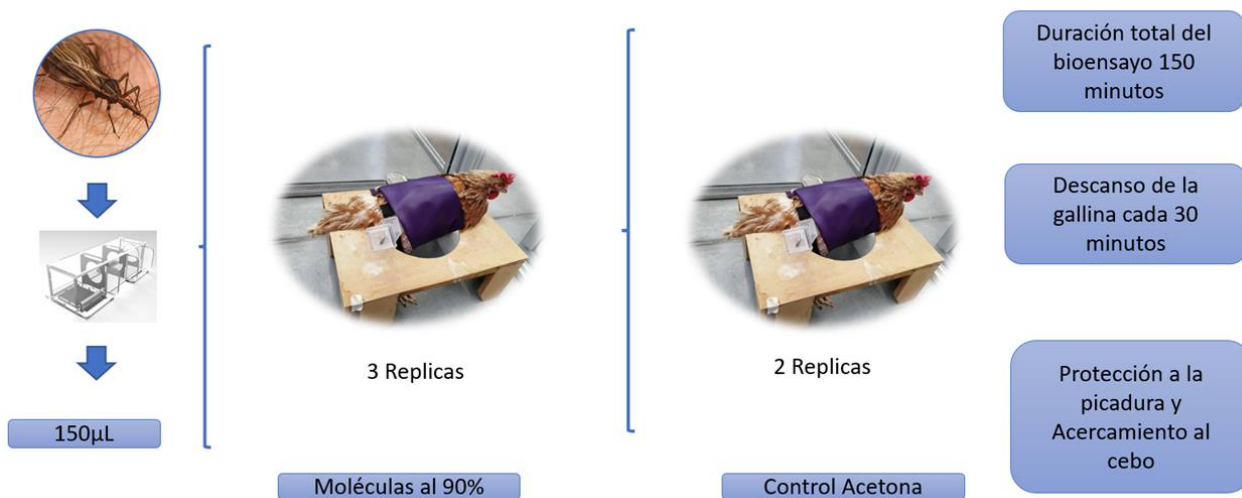


Figura 13. Metodología utilizada para determinar la actividad repelente de los xenobióticos con posible actividad repelente.

8.4.3 Análisis de datos actividad insecticida y repelente

Para todos los datos obtenidos, se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad (Kolmogorov Smirnov). Posteriormente se realizó el análisis de varianza (Kruskall-Wallis (KW) o ANOVA de una vía según la normalidad de los datos). Cuando se encontraron diferencias entre los tratamientos se realizaron pruebas de comparación múltiple (Prueba de Tukey o Prueba Dunn según las pruebas de normalidad). Únicamente valores de $P < 0,05$ fueron considerados como significativos estadísticamente. Para todos los análisis se utilizaron los softwares "Statistics V13", "Prism-GraphPab V8". Para determinar las dosis letales DL_{50} y DL_{95} se utilizó un análisis probit, mediante el software "Polo Plus V2".

8.6 Consideraciones éticas

De acuerdo con lo definido en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 del Ministerio de Salud del 4 de octubre de 1993, este trabajo tuvo un riesgo de

clasificación mínimo de acuerdo con la normativa nacional. Sin embargo, se indica que fueron evaluadas moléculas con acción insecticida en insectos y no en humanos. En este sentido, para proteger al humano los experimentos se trabajan con todos los implementos de seguridad como: guantes, tapabocas, batas antifluido, máscaras de seguridad y campanas de extracción de gases. También, como política de la sede Guatiguará, se hace un seguimiento estricto a todos los laboratorios para que se mantengan las normas ajustadas y se asegure el bienestar del ser humano.

Con el fin de evitar todo riesgo biológico en este proyecto se utilizaron insectos del insectario del CINTROP libres de patógenos y de referencia como *R. prolixus*. Estas colonias son mantenidas bajo condiciones controladas en una sala de cría de 3 x 2 m² adecuada para evitar la fuga y entrada de otros insectos o animales a la sala.

El proceso de alimentación de *R. prolixus* y empleó gallinas debido a que su sangre no permite el desarrollo del parásito, lo realizó un técnico de laboratorio entrenado bajo los estamentos que indica la ley 84 de 1989 del capítulo VI, artículos 23 (literales a, b y c) y 24 del estatuto nacional de protección a los animales y que regula el uso de animales vivos en experimentos de investigación. Igualmente se seguirán las directrices de la normatividad en la investigación biomédica con animales expuesta en el título V de la Resolución No. 008430 de 1993, artículos 87 (literales c, d, e, f, g, i, j y k), 89, 92 y 93. El manejo de insectos también guardo las exigencias de acuerdo a los Artículos 63, 67 (c) y 71 del Título IV de la Resolución N° 008430 de 1993, emanada del Ministerio de Salud de la República de Colombia, sobre la Bioseguridad de las investigaciones y el manejo de material biológico que puede contener microorganismos patógenos.

9. Resultados

9.1 Electroantenograma.

9.1.1 Registros EAG de los xenobióticos

Para determinar la respuesta del sistema olfativo de *R. prolixus*. Se registraron las señales de electroantenografía de los xenobióticos tratados. Cada insecto presentó un registro único, razón por la cual se observó una gran variación en las

amplitudes, aun cuando se utilizaba el mismo compuesto y la misma concentración. Por este motivo se realizó una normalización con base en la respuesta inicial y final del registro de amplitud del amoniaco de todos los compuestos evaluados, tomando como referencia el valor inicial de la amplitud de la respuesta de amoniaco como 100% del registro evaluado, y basado dicha amplitud se determinó el porcentaje del compuesto a evaluar y el registro final de amoniaco. Inicialmente se realizó un bioensayo para determinar las respuestas EAG de los insectos ante la acetona que se estableció como control negativo, que a su vez fue el solvente de los compuestos insecticidas y repelentes. En los resultados se observó, como el en tratamiento inicial de amoníaco no se observaron cambios estadísticamente significativos en comparación con el registro final, por lo cual este compuesto no altera el sistema olfativos de los insectos y por ende no se ve afectó los compuestos en los cuales se utilizó como solvente (Tabla 2).

Tabla 2. Registros EAG de los xenobióticos del control negativo (Acetona). Se tomó un registro inicial de Amoniaco seguido del compuesto a evaluar y finalmente amoniaco, expresados en voltios (V) (promedio \pm desviación estándar). Normalización de las amplitudes registradas expresadas en porcentaje (promedio \pm desviación estándar).

Compuesto	NH ₃ Inicia	[100%]	NH ₃ Final
Acetona	1,85 \pm 1,57	0,03 \pm 0,04	1,49 \pm 1,28
Normalización %	100	1,53 \pm 2,36	85,88 \pm 16,99

De igual manera que en el tratamiento anterior, se realizaron los bioensayos con los compuestos con posible actividad insecticida, los cuales fueron disueltos en acetona a unas concentraciones de 90%, 60% y 30% v/v. Donde se observó que los insectos perciben los odorantes provenientes de estos compuestos, estos registros no superaron el 10% de las amplitudes, al ser comparadas con el amoniaco, de igual manera tampoco se observó diferencias entre el registro inicial y final de amoniaco (Tabla 3).

Tabla 3.

Registros EAG de los xenobióticos utilizados en este trabajo con actividad insecticida: Propoxur, Temefos, Benzil-benzoato, 1,8-Cineol, Alfa-Bisabolol, en las concentraciones 90%, 60%, 30% V/V. Se tomó un registro inicial de amoniaco seguido del compuesto a evaluar y finalmente amoniaco, expresados en voltios (mV) (promedio \pm desviación estándar). Normalización de las amplitudes registradas expresadas en porcentaje (promedio \pm desviación estándar).

Compuesto	NH ₃ Inicial	[90%] NH ₃ Final	NH ₃ Inicial	[60%] NH ₃ Final	NH ₃ Inicial	NH ₃ Final	[30%] NH ₃ Final	NH ₃ Final	
Propoxur	0,81 \pm 0,38	0,04 \pm 0,05	0,82 \pm 0,44	1,26 \pm 0,70	0,09 \pm 0,09	1,08 \pm 0,60	1,07 \pm 0,76	0,03 \pm 0,03	0,92 \pm 0,62
Propoxur %	100	5,21 \pm 5,08	101,60 \pm 28,08	100	5,72 \pm 3,86	90,49 \pm 31,01	100	2,94 \pm 3,42	93,09 \pm 32,23
1,8-Cineol	0,98 \pm 0,69	0,04 \pm 0,06	0,88 \pm 0,52	1,53 \pm 0,77	0,20 \pm 0,25	1,18 \pm 0,95	0,83 \pm 0,49	0,09 \pm 0,10	0,61 \pm 0,84
1,8-Cineol %	100	2,11 \pm 3,14	117,30 \pm 52,51	100	11,14 \pm 14,41	82,74 \pm 42,63	100	12,1 \pm 17,10	64,14 \pm 47,87
Alfa-Bisabolol	0,85 \pm 0,30	0,04 \pm 0,04	0,57 \pm 0,55	0,82 \pm 0,53	0,05 \pm 0,05	0,57 \pm 0,48	0,77 \pm 0,43	0,03 \pm 0,05	0,76 \pm 0,41
Alfa-Bisabolol %	100	5,06 \pm 5,15	65,56 \pm 47,63	100	6,95 \pm 7,28	76,62 \pm 39,76	100	4,08 \pm 6,09	105,80 \pm 45,14
Benzilbenzoato	1,28 \pm 0,42	0,10 \pm 0,09	0,84 \pm 0,29	1,26 \pm 0,66	0,13 \pm 0,14	1,18 \pm 0,74	1,53 \pm 0,75	0,12 \pm 0,14	1,68 \pm 1,04

Benzilbenzoato	100	8,93 ±	68,55 ±	100	8,59 ±	92,41 ±	100	6,17 ±	104,90 ±
%		8,02	18,92		9,24	29,63		6,66	39,42
Temefos	1,01 ±	0,06 ±	0,71 ±	1,17 ±	0,05 ±	0,80 ±	1,09 ±	0,05 ±	0,70 ±
	0,69	0,06	0,38	0,57	0,04	0,55	0,96	0,08	0,63
Temefos %	100	7,38 ±	76,79 ±	100	4,76 ±	70,98 ±	100	5,34 ±	63,66 ±
		7,51	15,41		3,38	23,30		6,32	13,83

Finalmente se realizó el mismo tratamiento para los compuestos con posible actividad repelente. Los cuales fueron disueltos en acetona a unas concentraciones de 90%, 60%, 30% V/V. Se tomó un registro inicial de amoniaco seguido del compuesto repelente, finalmente se tomó un registro de amoniaco. Los compuestos IR3535 y Carvona, presentaron una disminución mayor del 60% en el registro final de amoniaco, siendo los dos únicos compuestos que presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el registro inicial contra el registro final en dichos compuestos, en comparación con los demás compuestos cuya cambio porcentual no supera el 35% con respecto al registro inicial de amoniaco, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

Tabla 4

Registros EAG de los xenobióticos utilizados en este trabajo con actividad repelente, IR3535, Carvona, DEET, Carvacrol, Citronelal, Limoneno, en las concentraciones 90%, 60%, 30%. Se tomó un registro inicial de Amoniaco seguido del compuesto a evaluar y finalmente amoniaco, expresados en milivoltios (mV) (promedio ± desviación estándar). Se estableció el porcentaje de captación para los compuestos evaluados y el registro final de amoníaco, con respecto al registro inicial el cual se estableció como 100% para cada registro (promedio ± desviación estándar).

Compuesto	NH ₃	[90%]	NH ₃	NH ₃	[60%]	NH ₃	NH ₃	[30%]	NH ₃
	Inicial		Final	Inicial		Final	Inicial		Final
IR3535	1,63 ±	0,05 ±	0,62 ±	1,08 ±	0,06 ±	0,33±	1,92 ±	0,05 ±	0,72 ±
	1,57	0,06	0,71	1,156	0,05	0,50	0,66	0,03	0,51

Porcentaje	100	4,60 ± 4,76	38,54 ± 15,78	100	11,71 ± 12,67	32,49 ± 20,06	100	6,11 ± 9,07	36,60 ± 15,21
Carvona	0,26 ± 0,12	0,02 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,31 ± 0,18	0,03 ± 0,04	0,09 ± 0,07	1,33± 0,66	0,03± 0,05	0,69± 0,60
Porcentaje	100	7,319 ± 11,11	32,1 ± 17,99	100	21,97 ± 32,94	26,38 ± 14,41	100	2,362 ± 2,83	51,78 ± 25,33
Limoneno	0,70 ± 0,39	0,04 ± 0,09	0,29 ± 0,16	0,38 ± 0,15	0,04 ± 0,04	0,26 ± 0,32	0,71 ± 0,60	0,04 ± 0,05	0,52 ± 0,28
Porcentaje	100	5,41 ± 8,90	52,50 ± 26,06	100	9,94 ± 7,05	57,90 ± 50,28	100	4,55 ± 5,43	92,64 ± 50,73
Carvacrol	0,50 ± 0,47	0,08 ± 0,12	0,43 ± 0,37	0,59 ± 0,38	0,05 ± 0,06	0,52 ± 0,34	0,69 ± 0,75	0,04 ± 0,06	0,58 ± 0,69
Porcentaje	100	10,83 ± 16,93	112,80 ± 98,43	100	8,06 ± 5,71	109,20 ± 75,64	100	7,16 ± 11,07	82,79 ± 35,25
Citronelal	0,53 ± 0,20	0,03 ± 0,03	0,76 ± 0,28	0,77 ± 0,38	0,04 ± 0,04	0,53 ± 0,25	0,75 ± 0,72	0,13 ± 0,17	0,71 ± 0,77
Porcentaje	100	5,48 ± 4,75	162,30 ± 74,07	100	9,92 ± 14,30	80,42 ± 41,02	100	19,38 ± 26,75	89,87 ± 47,59
DEET	0,36 ± 0,21	0,03 ± 0,03	0,29 ± 0,16	0,17 ± 0,09	0,02 ± 0,02	0,15 ± 0,13	1,14 ± 0,69	0,05 ± 0,07	0,73 ± 0,46
Porcentaje	100	11,17 ± 12,64	109,2 ± 71,23	100	17,56 ± 25,11	89,63 ± 63,08	100	4,682 ± 6,765	74,85 ± 37,68

Al realizar la comparación múltiple de las respuestas EAG, observamos que solamente los compuestos IR3535 (Prueba de Kruskal wallis H (3, N=21) =17,44 P < 0,05 posthoc prueba de Dunn's, Figura 15) y Carvona (Prueba Anova de una vía F (8, 45) = 37,43 P< 0,05 prueba de Tukey, Figura 16) presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la respuesta del estímulo de amoníaco antes y después de la aplicación del compuesto. Los demás compuestos evaluados no presentaron diferencias estadísticamente significativas, presentando un comportamiento similar al control negativo donde la variación del registro EAG de amoníaco no presentó diferencias estadísticamente significativas, después de ser aplicado el compuesto (Prueba de Kruskal wallis H (3, N=21) =13,54 P > 0,05 posthoc prueba de Dunn's, Figura 14). En síntesis, en esta evaluación masiva de

compuestos con actividad sobre *R. prolixus* se puede decir que solo dos: IR3535 y Carvona.

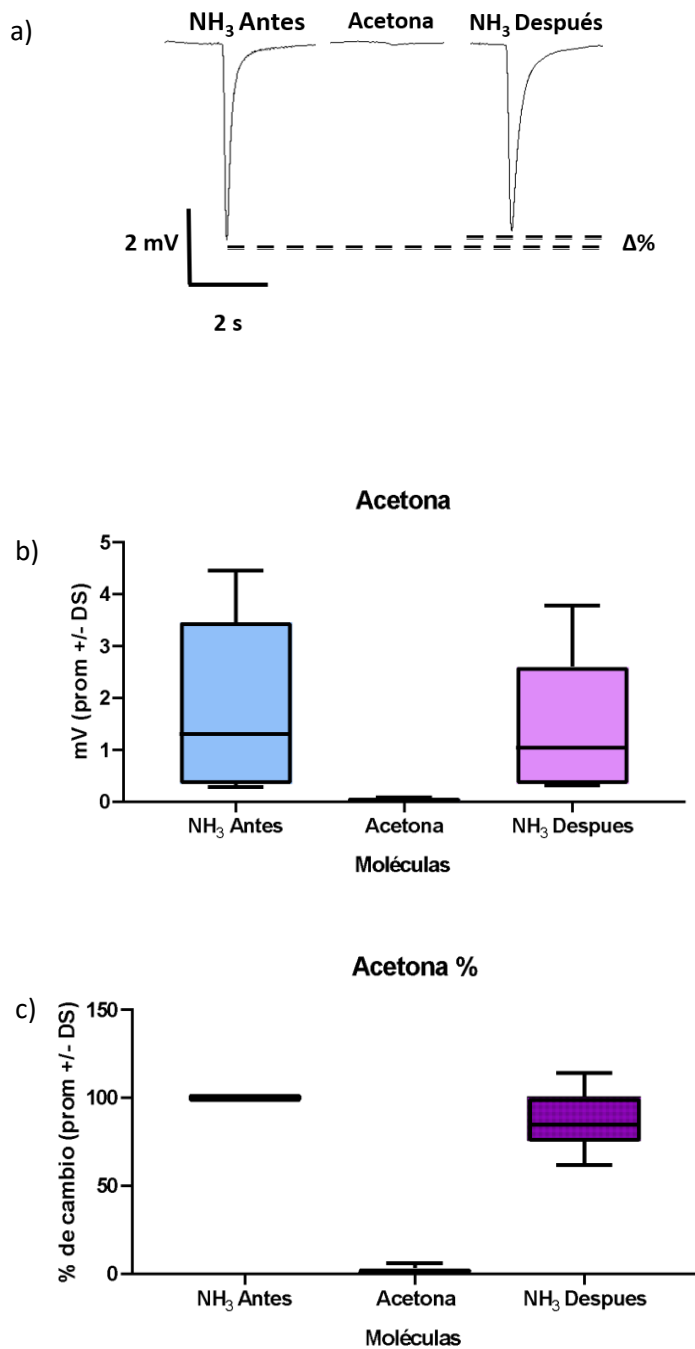
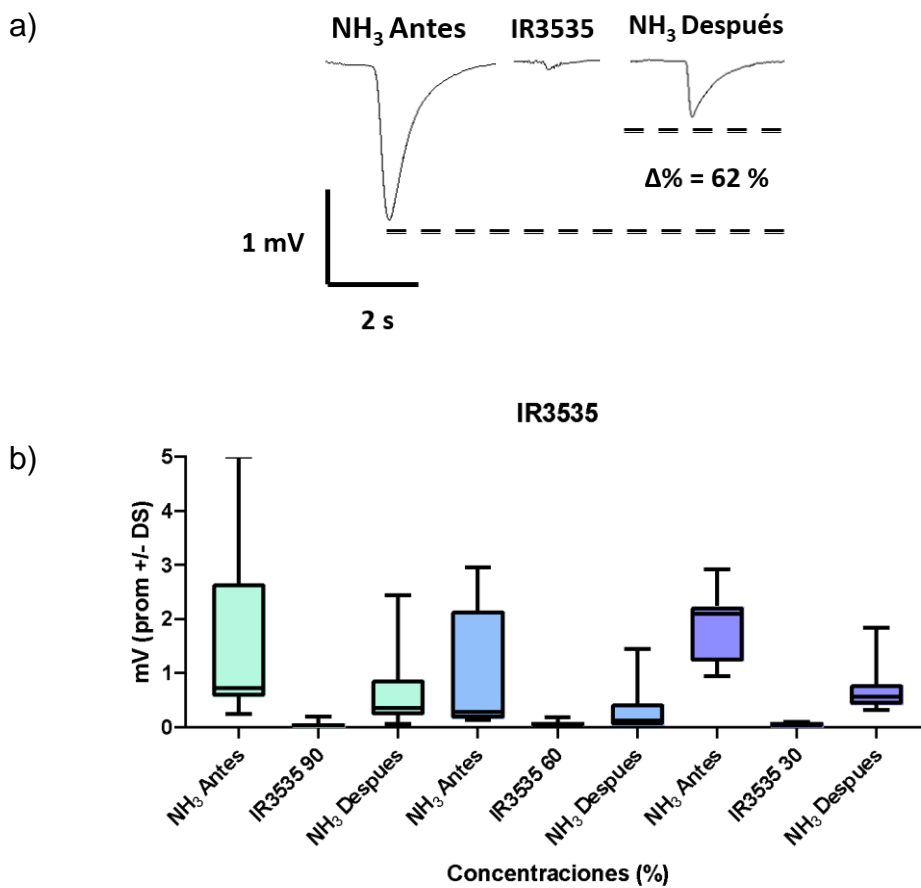


Figura 14. Señales electroantenográficas y cambio porcentual en la señal de amoniaco al utilizar el compuesto Acetona (control negativo) con un estímulo pre y post tratamiento de amoniaco a) Respuestas típica de (EAG) b) Registros de las

señales electroantenográficas expresado en milivoltios (mV, promedio \pm desviación estándar c) Cambio expresado en porcentaje en respuesta del compuesto al amoniaco (promedio \pm desviación estándar). No se observó diferencias estadísticamente significativas entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula (Prueba de Kruskal Wallis H (3, N=21) =17,44 P < 0,05 posthoc prueba de Dunn's).



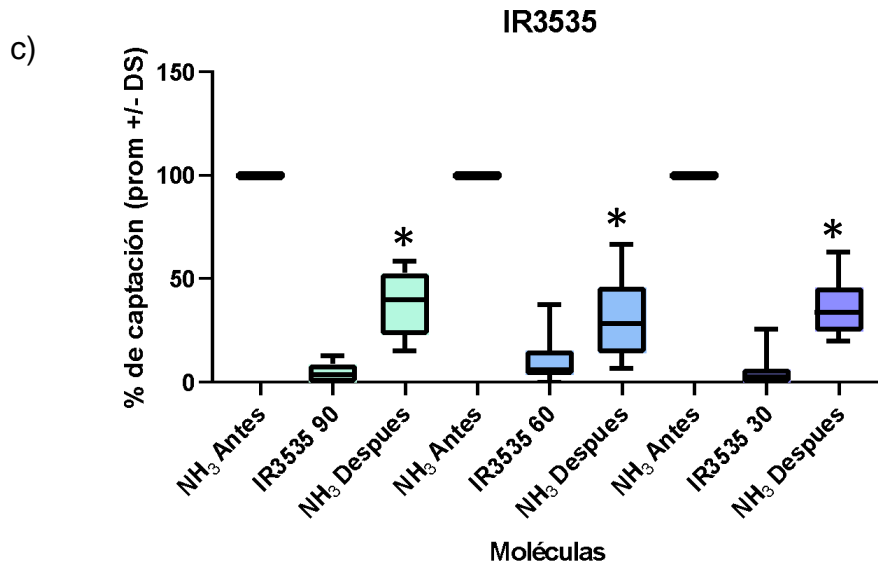
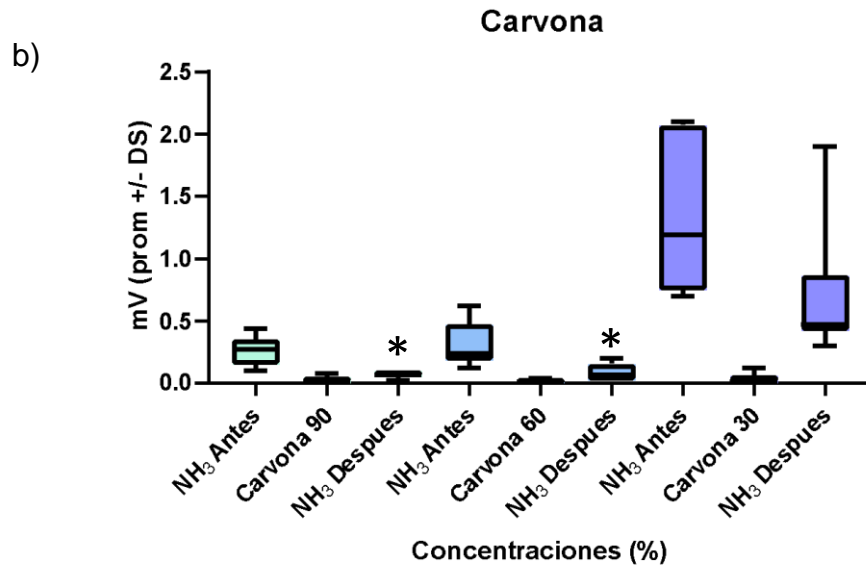
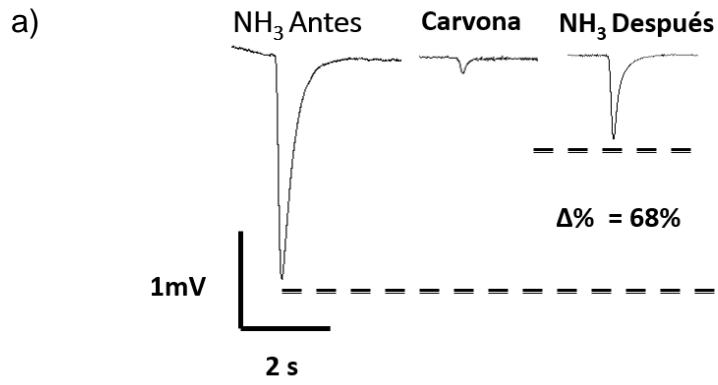


Figura 15. Señales electroantenográficas y cambio porcentual en la señal de amoniaco al utilizar la molécula IR3535 (repelente comercial) con un estímulo pre y post tratamiento de amoniaco a) Respuestas típica de electroantenograma (EAG) b) Registros de las señales electroantenográficas en tres concentraciones (90%, 60%, 30%)c) expresado en milivoltios (mV, promedio \pm desviación estándar). C) Cambio expresado en porcentaje en respuesta del compuesto al amoniaco en tres concentraciones (90%, 60%, 30% promedio \pm desviación estándar). (*) indican diferencias estadísticamente significativas entre las señales EAG de amoniaco antes y después de aplicar la molécula (Prueba Kruskal Wallis H (3, N=21) =17,44 P < 0,05 posthoc prueba de Dunn).



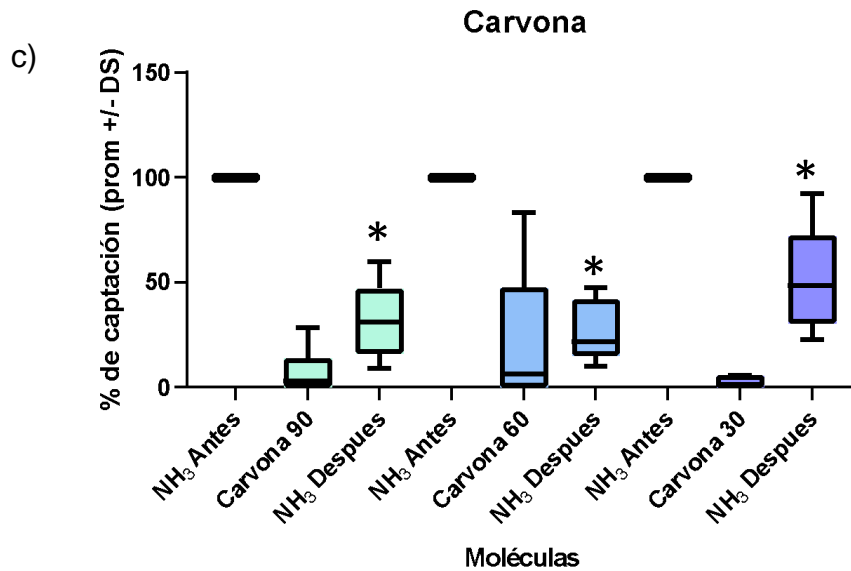


Figura 16. Señales electroantegráficas y cambio porcentual en la señal de amoniacó al utilizar la molécula carvona con un estímulo pre y post tratamiento de amoniacó a) Respuestas típica de EAG b) Registros de las señales electroantegráficas en tres concentraciones (90%, 60%, 30%) expresado en milivoltios (mV, promedio \pm desviación estándar). C) Cambio expresado en porcentaje en respuesta del compuesto al amoniacó en tres concentraciones (90%, 60%, 30%; promedio \pm desviación estándar). (*) indican diferencias estadísticas significativas entre las señales EAG de amoniacó antes y después de aplicar la molécula (Anova de una vía F (8, 45) = 37,43 P < 0,05 posthoc prueba de Tukey).

9.2 Actividad insecticida

9.2.1 Dosis exploratorias (DE)

Al comparar las repuestas de las DE en los compuestos con actividad insecticida podemos observar como el compuesto propoxur presentó una mayor mortalidad en ninfas de primer estadio, con una mortalidad alrededor del 100%, siendo una mortalidad alta en comparación a los demás compuestos, donde no superó el 25% de mortalidad en esta misma dosis (Figura 17). Por este motivo se estableció como el compuesto que presentó mayor actividad insecticida, siendo

estadísticamente diferente a los demás compuestos evaluados (Anova de una vía $F(1,475, 2,950) = 66,58$ $P=0,0037$ posthoc prueba de Tukey).

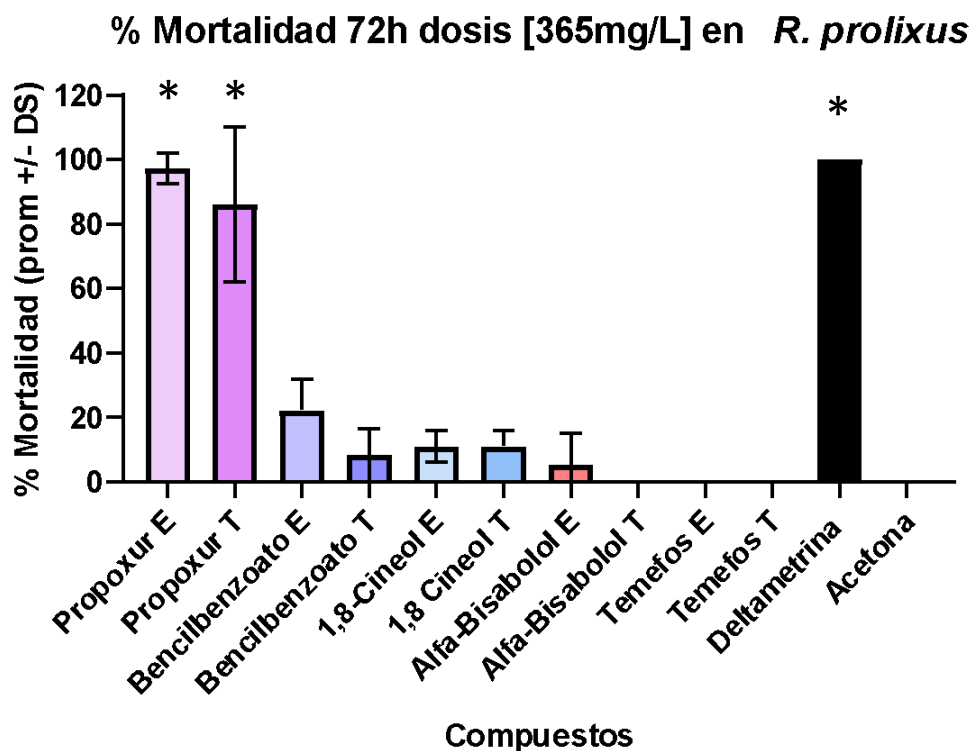


Figura 17. Evaluación de las DE por medio de aplicación tópica sobre terguitos (T) y esternitos (E) en los compuestos Propoxur, Bencilbenzoato, 1,8-Cineol, Alfa-Bisabolol y Temefos a una dosis de 365mg/L, indicando el porcentaje de mortalidad y su error medio estándar pasadas 72 horas, desde su aplicación en ninfas de primer estadio NI, como referencia del control positivo se toman la mortalidad observada con el insecticida Deltametrina y como control negativo el disolvente de las diferentes concentraciones, acetona. (*) indica diferencias estadísticamente significativas (Anova de una vía $F(1,475, 2,950) = 66,58$ $P=0,0037$ Posthoc prueba de Tukey).

Al realizar la evaluación de las DE en ninfas de quinto estadio NV, no se logró observar ningún tipo de mortalidad con las concentraciones previamente establecidas.

9.2.2 Dosis múltiples y determinación de las DL50 y DL95

Inicialmente se estableció las DL50 y DL95 para el control positivo deltametrina (Tabla 5) en cual se utilizó una dosis máxima de 0,67 mg/L para ninfas de primer estadio NI y 3,18 mg/L para ninfas de quinto estadio NV basados en experiencias propias en el manejo de esta molécula por parte del laboratorio de entomología médica del CINTROP, de esta manera se logra establecer los límites de mortalidad. En las ninfas de primer estadio (NI) se observó diferencias estadísticamente significativas en las dosis superiores a 0,1 mg/L respecto al control, sin embargo, dosis menores a 0,1mg/L (0,097 y 0,081) no presentaron diferencias estadísticamente significativas al ser comparadas con el control (Anova de una vía F (8, 18) = 45,53 P= 0,0001). De igual manera en ninfas NV se logran observar diferencias estadísticamente significativas para las dosis superiores a 2 mg/L, al ser comparadas con el control. Sin embargo, dosis menores (1,5 y 1,86) no presentan diferencias estadísticamente significativas al ser comparadas con el control (Anova de una vía F (8, 18) = 15,45 P=0,0001 (Tabla 5).

Tabla 5. Mortalidad observada en el bioensayo de aplicación tópica sobre el control positivo (deltametrina) y sus dosis múltiples, indicando el porcentaje de mortalidad y su desviación estándar pasadas 72 horas, desde su aplicación en ninfas de primer y quinto estadio (NI y NV, respectivamente).

Dosis para ninfas de primer estadio	Mortalidad (%±DE) 72h ninfas NI	Dosis para ninfas de quinto estadio	Mortalidad (%±DE) 72h ninfas NV
0,67	97,22 ± 4,81 ^e	3,18	69,44, ± 12,73 ^e
0,51	80,56 ± 12,73 ^{de}	3	55,56 ± 9,62 ^{de}
0,36	63,89 ± 9,62 ^{cd}	2,98	47,22 ± 9,62 ^c
0,25	50 ± 8,33 ^c	2,54	38,89 ± 9,62 ^{bcd}
0,17	36,11 ± 4,81 ^{bc}	2,32	38,89 ± 9,62 ^{bd}
0,1	22,22 ± 4,8 ^{ab}	2	22,22 ± 4,81 ^{abc}

0,097	19,44 ± 9,62 ^a	1,86	16,67 ± 14,43 ^a
0,81	13,84 ± 4,81 ^a	1,5	13,89 ± 4,81 ^a
Control	5,55 ± 9,62 ^a	Control	0 ^a

En cada columna, letras iguales muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas: Anova de una vía F (8, 18) = 45,53 P= 0,0001 Posthoc, Prueba de Tukey para ninfas NI, Anova de una vía F (8, 18) = 15,45 P=0,0001, Posthoc Prueba de Tukey para ninfas NV.

Posteriormente se determinó las DL₅₀ y DL₉₅ por medio de un análisis probit tomando como base los datos de las DM, obteniendo los resultados mostrados en la (Tabla 6).

Tabla 6. Determinación de las dosis letales, DL₅₀ y DL₉₅ con los índice de confianza al 95%, para ninfas de primer (NI) y quinto (NV) estadio utilizando la molécula deltametrina, pasadas las 72 horas del tratamiento por medio del análisis Probit.

Molécula	DL 50-IC95%	DL 95-IC95%	χ²
Deltametrina NI	0,22±(0,191-0,2525)	0,96±(0,718-0,1505)	4,15
Deltametrina NV	2,415±(2,169-2,696)	4,032±(3,375-5,394)	14.6

9.2.3 Mejor molécula: Propoxur

Basados en los resultados observados en las DE se establecieron una batería de dosis múltiples asimétricas desde 365 hasta 1 mg/L para ninfas de primeros estadios NI (Tabla 7) en la cual se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes dosis y el control siendo solamente la dosis de 1 mg/L donde no se observaron diferencias en comparación con el control tanto para los bioensayos de tergutitos como en esternitos. De igual manera, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la aplicación sobre tergutitos y esternitos en todas las dosis evaluadas (Anova de una vía F (14, 30) = 69,93, P= 0,0001). En ninfas de quinto estadio (NV) se establecieron también dosis múltiples asimétricas de 2000 mg/L hasta 365 mg/L, para la molécula propoxur, al igual que el bioensayo de ninfas NI, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos tergutitos y esternitos, además de solo existir diferencias en las dosis 2000 y 1500 mg/L en comparación del control (Anova de una vía F (12, 26) = 9,767, P= 0,0001, Figura 16). A partir de los resultados se logró establecer las dosis letales DL50 y DL95 (Tabla 8).

Tabla 7. Mortalidad observada en el bioensayo de aplicación tópica sobre esternitos y tergutitos, utilizando el compuesto Propoxur y sus dosis múltiples, indicando el porcentaje de mortalidad y su error medio estándar pasadas 72 horas, desde su aplicación en ninfas de primer y quinto estadio (NI y NV).

Dosis ninfas NI Propoxur	Mortalidad (%±DE) 72h sobre Esternitos	Mortalidad (%±DE) 72h sobre Tergutitos
365	100 ^e	100 ^e
110	91,67 ± 8,33 ^{de}	77,78 ± 4,81 ^{de}
50	75 ± 14,43 ^{cd}	63,89 ± 4,81 ^{cd}
10	63,89 ± 9,62 ^{bc}	41,67 ± 8,33 ^{bc}

4	50 ± 14,43 ^{ab}	22,22 ± 9,62 ^{ab}
1	22,22 ± 4,81 ^a	2,77 ± 4,81 ^a
Control	0 ^a	0 ^a

Dosis ninfas NV Propoxur	Mortalidad (%±DE) 72h sobre Esternitos	Mortalidad (%±DE) 72h sobre Terguitos
2000	27,78 ± 4,81 ^c	19,44 ± 12,73 ^c
1500	19,44 ± 4,81 ^b	8,33 ± 0 ^b
1000	8,33 ± 8,33 ^a	2,77 ± 4,81 ^a
700	0 ± 0 ^a	2,77 ± 4,81 ^a
500	2,77 ± 4,81 ^a	0 ^a
365	0 ^a	0 ^a
Control	0 ^a	0 ^a

En cada columna, letras iguales muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas, Anova de una vía F (14, 30) = 69,93, P= 0,0001 Posthoc prueba de Tukey para ninfas NI, Anova de una vía F (12, 26) = 9,767, P= 0,0001 para ninfas NV.

Tabla 8.

Determinación de las dosis letales DL₅₀ y DL₉₅ con los índices de confianza al 95%, para ninfas de primer (NI) y quinto (NV) estadio utilizando la molécula Propoxur, pasadas las 72 horas del tratamiento por medio del análisis Probit.

Molécula	DL 50 IC95%	DL 95 IC95%	χ²
Propoxur NI (terguitos)	18,2±(11,7-27,5)	288,14±(156,22-722,69)	6,92

Propoxur NI (esternitos)	5,11±(0.90-2,9)	176,65±(9069-485)	5,24
Propoxur NV (terguitos)	3092,3±(2341,6- 5503,0)	11204±(6070,6-43914)	2,47
Propoxur NV (esternitos)	4086,5±(2760,0- 12655)	14804, ±(6607,4- 0,17*10 ⁶)	1,14

9.2.4 Xenobióticos con posible actividad insecticida.

Con respecto a las demás moléculas con actividad insecticida solamente se pudo observar mortalidad para ninfas de primer estadio (NI), aun cuando se aumentaron las concentraciones a 2000 mg/L, hasta 200mg/L, siendo estas mortalidades bajas (<25%) con excepción de la molécula Benzilbenzoato que presentó una mortalidad de 44,44% ± 9,62 para terguitos y 47,22% ± 9,61 para esternitos (Tabla 9). Al igual que en los compuestos anteriores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de terguitos y esternitos, pero sí se observaron diferencias entre las diferentes dosis en comparación al control, con excepción de la dosis 365 y 200 mg/L que no mostraron diferencias (Anova de una vía F (14, 30) = 6,031 P= 0,0001). Por este motivo solamente fue posible determinar las DL50 y DL95 en esta molécula para ninfas de primer estadio NI (Tabla 10).

Tabla 9. Mortalidad observada en el bioensayo de aplicación tópica sobre terguitos (T) y esternitos (E) utilizando la molécula benzilbenzoato y sus dosis múltiples, indicando el porcentaje de mortalidad y su error medio estándar pasadas 72 horas, desde su aplicación en ninfas de primer estadio NI.

Dosis ninfas NI	Mortalidad (%±DE)	Mortalidad (%±DE)
	72h sobre Esternitos	72h sobre Terguitos
2000	47,22 ± 9,61 ^a	44,44 ± 9,62 ^a

1500	47,22 ± 9,61 ^a	33,33 ± 8,35 ^a
1000	33,34 ± 14,43 ^a	30,55 ± 14,80 ^a
700	30,55 ± 4,80 ^a	13,89 ± 4,81 ^a
500	36,11 ± 12,73 ^a	22,22 ± 4,80 ^a
365	25, ± 8,33 ^a	13,89 ± 4,81 ^a
200	16,67 ± 16,67 ^b	8,33 ± 4,81 ^b
Control	0 ^b	0 ^{bc}

En cada columna, letras iguales muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas, Anova de una vía $F(14, 30) = 69,93$, $P = 0,0001$ Posthoc prueba de Tukey.

Tabla 10. Determinación de las dosis letales DL_{50} y DL_{95} con los índices de confianza al 95%, para ninfas de primer NI estadio utilizando la molécula Benzilbenzoato, pasadas las 72 horas del tratamiento por medio del análisis probit.

Molécula	DL 50 IC95%	DL 95 IC95%	χ^2
Benzilbenzoato NI (terguitos)	2869,9±(1835,6- 7519,6)	77618,9±(20067- 0.19*10 ⁷)	0,59
Benzilbenzoato NI (esternitos)	2270,3±(1392,3- 8043,8)	0,19*10 ⁶ ±(29589- 0,64*10 ⁸)	1,64

9.3 Actividad repelente

9.3.1 Comparación de los dispositivos CINTROP vs Zermoglio

En la comparación del dispositivo CINTROP contra Zermoglio se determinó la protección ante la picadura por parte del compuesto IR3535 a una concentración del 90% como parámetro de actividad repelente, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el tiempo de protección en los dispositivos utilizados, tanto en la especie *R. prolixus* (Tabla 11). Sin embargo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el compuesto repelente IR3535 y su control (Acetona) (Prueba de Kruskal Wallis H (6, N=48) =20,58 (P > 0,05) posthoc prueba de Dunn's).

Tabla 11. Comparación del tiempo de protección entre el dispositivo Zermoglio y el CINTROP, mostrando el tiempo medio de protección ante la picadura del insecto expresado en minutos y su desviación estándar, utilizando IR3535 al 90% de concentración en dos especies *R. prolixus*.

Xenobióticos	<i>R. prolixus</i> Zermoglio Tiempo en minutos (%±DE)	<i>R. prolixus</i> Cintrop Tiempo en minutos (%±DE)
Control negativo (Acetona)	12,18 ± 14,4 ^b	7,45 ± 11,28 ^b
IR3535 al 90% de concentración	118,4 ± 62,65 ^a	102,8 ± 69,86 ^a

En cada columna, letras iguales muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas, (Prueba de Kruskal Wallis H (7, N=68) =37,12 (P > 0,05) posthoc prueba de Dunn's).

Dados estos resultados, podemos utilizar cualquiera de los dispositivos para evaluar la actividad repelente, al no se observaron diferencias estadísticamente significativas en sus bioensayos de estandarización. Por este motivo, se prefiere utilizar el nuevo dispositivo diseñado por el laboratorio CINTROP, ya que presentan muchas ventajas al momento de ejecutar los bioensayos,

principalmente la comodidad y practicidad, por ejemplo: evita la pérdida del montaje si el cebo en este caso la gallina presenta algún tipo de movimiento, logrando mantener su posición, contrario al dispositivo Zermoglio en el cual, cuando se presenta este fenómeno, es necesario repetir la prueba, entre otras ventajas del nuevo dispositivo CINTROP.

9.3.2 Evaluación de xenobióticos con actividad repelente

Se evaluaron dos repelentes comerciales DEET, IR3535 y tres componentes mayoritarios de (AE): Limoneno, Carvona, Carvacrol a una concentración del 90% y Acetona como control negativo. La molécula que presentó mayor actividad repelente fue el IR3535, con una protección ante la picadura del insecto de 135,6 minutos \pm 43,29 (promedio \pm desviación estándar), seguido de Carvona con una protección media de 108 minutos \pm 26,33 mostrando diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Kruskal Wallis H (7, N=68) =37,12 (P > 0,05) posthoc prueba de Dunn's) en comparación a las demás moléculas evaluadas que no superaron los 5 minutos de protección (Figura 18).

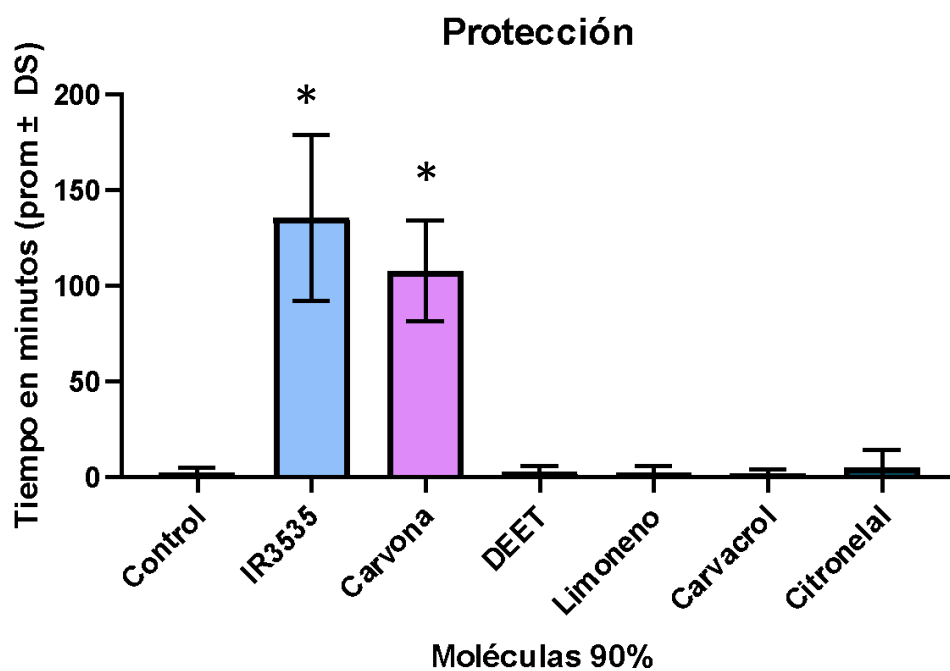


Figura 18. Protección ante la picadura de las moléculas con posible actividad repelente: IR3535, Carvona, DEET, Limoneno, Carvacrol, Citronelal, Control (promedio \pm desviación estándar), (*) indican diferencias estadísticamente significativas en comparación a los compuestos.

9.3.3 Acercamiento al cebo

Se determinó el tiempo de acercamiento al cebo, como el primer movimiento del insecto hacía su fuente de alimentación, es decir la intención del insecto a picar al cebo indiferentemente si tiene éxito o no. En las moléculas donde se evidencia efecto repelente, el insecto se acerca al cebo, pero al ser influenciado por la molécula repelente se retira a la zona de refugio, donde realiza múltiples intentos de picadura. Sin embargo, se tomó como referencia el primer intento de picadura en los compuestos repelentes (Tabla 12), este tiempo fue similar al tiempo de picada en las moléculas en las cuales no hubo efecto repelente, ya que el comportamiento en ambos casos es similar, con la única diferencia en que los compuestos realmente repelentes no se observa la horadación en la piel de la gallina por parte del insecto, de igual manera no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes bioensayos realizados (Anova de una vía $F(6, 61) = 1,066 P = 0,39$).

Tabla 12. Tiempo de acercamiento al cebo en los compuestos con actividad repelente: IR3535, Carvona, DEET, Limoneno, Carvacrol, Citronelal, Control (promedio \pm desviación estándar).

Xenobioticos a una concentración del 90% v/v	Acercamiento al cebo expresado en minutos	Desviación estándar
Control (Acetona)	2,613	2,273
IR3535	4,948	4,377
Carvona	2,463	2,344
DEET	3,051	2,751
Limoneno	2,797	3,264

Carvacrol	2,158	2,041
Citronelal	1,945	1,656

10. Discusión de resultados

10.1 Registros electroantenográficos.

En este trabajo se deseaba dilucidar el comportamiento del sistema olfativo de los insectos triatominos ante diferentes compuestos con el fin de encontrar relación entre los bioensayos de actividad insecticida, repelente y las pruebas de electroantenograma (EAG). Para de esta manera crear un sistema de discriminación precoz de moléculas con posible acción insecticida y/o repelente de acuerdo con la respuesta fisiológica del insecto.

Por este motivo, se realizaron bioensayos de respuestas EAG de todos los compuestos evaluados. Inicialmente, se estimulaba el sistema olfativo de los insectos con amoniaco (NH_3), este compuesto es indispensable para la búsqueda de alimentos de insectos hematófagos, además de ser el compuesto ideal para realizar la estandarización en los bioensayos de EAG, debido a la facilidad de respuesta de este compuesto bajo diferentes concentraciones entre otras variables en *R. prolixus* (Reisenman, 2014). Con el cual era evidente la respuesta por parte de las neuronas del sistema olfativo de los insectos, obtenido respuestas entre 0,26 y 4 mV, donde los canales iónicos involucrados en el proceso de recepción estaban siendo estimulados, pues mayor voltaje significa mayor cantidad de iones pasando a través de la membrana de las neuronas causando la despolarización membranal (Jacob, 2018). Sin embargo, las respuestas de las señales en los compuestos evaluados eran bajas en comparación con las respuestas del amoniaco, esto debido a que los compuestos evaluados, posiblemente activan un menor número de canales iónicos en comparación al amoniaco y se ve reflejado en la pequeña señal de respuesta. Finalmente se evalúa nuevamente el compuesto amoniaco para ver como el compuesto, tanto repelente como insecticida, afecta la respuesta del sistema olfativo frente a este compuesto.

10.1.1 Respuestas de compuestos insecticidas

Inicialmente los sistemas olfativos de los insectos fueron expuestos a amoniaco, de esta manera con la respuesta EAG de este primer registro determinamos el patrón de la captación del sistema olfativo en los insectos, el cual se esperaba fuera alterado por los xenobióticos con actividad insecticida. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las respuestas del amoniaco inicial y post tratamiento de los compuestos evaluados, aun en aquellos insecticidas que mostraron una mortalidad relevante (Propoxur, Benzil Benzoato).

Si bien los insecticidas afectan el sistema nervioso central y tienen diferentes objetivos moleculares como: inhibición del funcionamiento de los canales de sodio o la inhibición de la acetilcolinesterasa, estos compuestos funcionan por contacto directo y sus moléculas odorantes no logran afectar el sistema olfativo de los insectos (Alzogaray & Zerba, 2017) a pesar de mostrar respuestas eléctricas cuando fueron evaluados. Es decir, los insectos logran captar las moléculas odorantes provenientes de estos compuestos y mostrar una señal eléctrica, pero no se vieron afectadas las neuronas del sistema olfativo, ya que las respuestas del amoniaco después de la evaluación del compuesto insecticida eran similar a la respuesta inicial. Esta respuesta de comportamiento del bioensayo es similar al evaluar el control negativo: acetona, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de amoniaco antes y después de la evaluación del compuesto. Esto nos lleva a inferir que en los bioensayos con EAG no es posible identificar compuestos con presumible actividad insecticida, ya que no alteran el funcionamiento de las neuronas del sistema olfativo de los insectos y presentan un comportamiento similar al compuesto control (Acetona) al momento de ser evaluados.

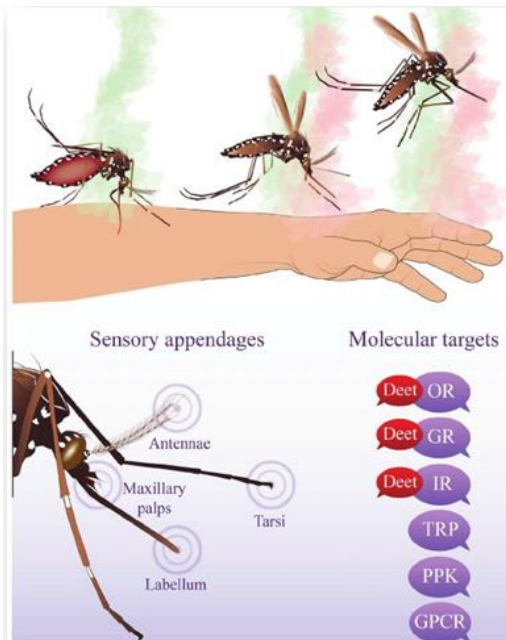
10.1.2 Respuestas de compuestos repelentes

De igual manera, se evaluaron todos los compuestos con posible actividad repelente, a bioensayos de EAG, donde los compuestos que mostraron actividad repelente (IR3535, Carvona) si afectaron el sistema olfativo del insecto. Esto se

corroboró mediante la comparación del registro inicial y final de amoniaco, donde se observó una disminución en la señal eléctrica alrededor 60% en su dosis máxima. Este resultado puede indicar que estas moléculas inhiben la capacidad del insecto de percibir el huésped o cebo al cual debe acercarse para alimentarse. Dicho mecanismo de acción es similar al DEET, el cual es capaz de atenuar las respuestas antenales en algunos insectos hematófagos a varios olores atractivos a través de la inhibición directa o atenuación de las amplitudes y frecuencias de acción que emanan las ORN (Shrestha & Lee, 2020). Otros compuestos que tienen mecanismos de acción similares son la picaridina, el aminopropanoato de piperidincarboxilato, el IR3535 (Bohbot et al., 2014). El modo de acción molecular de los compuestos repelentes está basado en la inhibición selectiva de los complejos heteroméricos de los receptores de olores de insectos (OR), que son proteínas receptoras quimiosensoriales específicas de insectos involucradas en la detección de olores en el aire. Este modelo sigue siendo controvertido ya que otros estudios muestran que estos compuestos repelentes activan e inhiben directamente las neuronas receptoras de olores adultos para provocar conductas de evitación. En conjunto, es probable que interactúen con varios objetivos biológicos que se distribuyen en múltiples sistemas quimiosensoriales (Dickens & Bohbot, 2013; Shrestha & Lee, 2020)(Figura 25). Por este motivo se puede presumir que una molécula presenta actividad repelente, sí en los bioensayos de electroantenografía se logra observar una disminución en señal eléctrica del amoniaco por parte del compuesto tratado, siendo esta disminución estadísticamente significativa y debe corresponder porcentualmente alrededor de un 60% de capacidad de detección por parte del insecto, como fue el caso del IR3535 y Carvona, compuestos en los que se observó un efecto de protección ante la picadura, con un tiempo superior a 100 minutos en los bioensayos de actividad repelente con cebo vivo. En comparación con los compuestos cuya protección ante la picadura fue menor a los 5 minutos y no se observó un cambio estadísticamente significativo, las respuestas del amoniaco antes y después del compuesto, corroboran que estos compuestos no afectan el sistema olfativo de los insectos y por ende no se evidencia una actividad repelente. Además, que

estudios en triatominos en los cuales se silenciaron los receptores odorantes y correceptores RproOrco, por medio de la técnica RNAi, donde con una disminución del 73% de este gen, se observó la pérdida de la capacidad de encontrar un huésped vertebrado de manera oportuna (Franco et al., 2016). Por lo cual, es más que evidente que la afectación de estas proteínas por parte del IR3535 y Carvona determinan el efecto repelente observado en los bioensayos de actividad repelente y confirmado por la disminución de las señales eléctricas del amoniaco al ser expuesto a estos xenobióticos en los bioensayos de EAG. Dados estos resultados es posible inferir precozmente el comportamiento repelente por parte de un compuesto desconocido por medio de bioensayos de EAG.

a)



b)

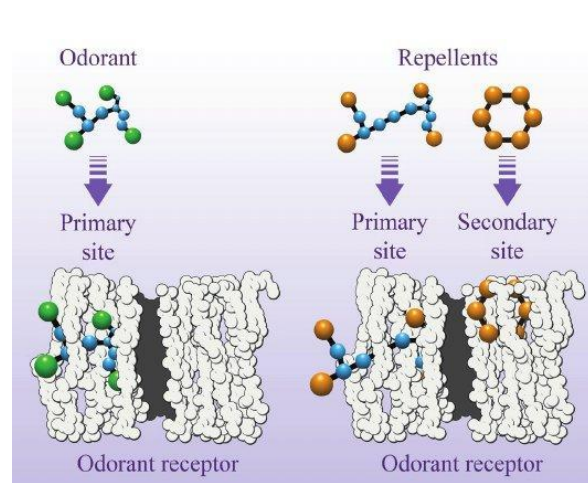


Figura 19 Modo de acción de los repelentes de insectos. (a) Los repelentes de insectos como DEET interactúan con múltiples grupos de receptores sensoriales (receptor odorante, OR; receptor gustativo, GR y receptor ionotrópico, IR) distribuidos en varios apéndices de artrópodos. b) Interacciones entre un receptor de odorante (OR), un odorante y un repelente. Un odorante y un repelente de insectos interactúan con los sitios de unión primario y secundario de un OR. Un repelente de insectos con una estructura química similar a un odorante puede interactuar con el mismo sitio primario; mientras que un repelente de insectos con una estructura química diferente puede interactuar con un sitio secundario. Tomado de (Bohbot et al., 2014).

10.2 Actividad Insecticida

Los bioensayos toxicológicos son el primer paso para determinar la susceptibilidad de una molécula insecticida determinada sobre una especie en particular. (Alzogaray & Zerba, 2017). Por este motivo se utilizaron una gran variedad de xenobióticos insecticidas neurotóxicos, en algunos casos conociendo su modo de

acción (Deltametrina, Propoxur, Temefos), sin embargo: otros xenobióticos (componentes mayoritarios de (AE) y acaricidas) se desconoce su accionar, a pesar de presentar actividad insecticida sobre diferentes especies de insectos (Sanz, et al, 2012; Vildósola & Martín, 2021). Sin embargo, dados los diferentes mecanismos de acción de los compuestos con posible actividad insecticida, ninguno de ellos logró afectar las neuronas del sistema olfativo de insectos, lo cual se corroboró con los bioensayos EAG, a pesar de la mortalidad observada en alguno de ellos.

Al comparar las dosis DL50 y DL95 de los xenobióticos evaluados, se observa cómo los piretroides (Deltametrina, control positivo) presentaron las dosis más bajas, tanto en ninfas de primer estadio como ninfas de quinto estadio, lo cual es explicado por la acción triatómica que presentan los piretroides (Vivas & Molina, 2001). Los piretroides al igual que otros grupos de insecticidas están enfocados en afectar el sistema nervioso central. Estos compuestos afectan los canales de sodio de los axones neuronales (IRAC, 2012), dando como resultado una afectación en los mecanismos de homeostasis en los insectos, influyendo en el control hormonal y por ende el control sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos, además de provocar cambios en las concentraciones de iones de la hemolinfa, afectando el funcionamiento normal de los tejidos y generando la muerte celular (Alzogaray, 1996, Cueto & Picollo, 2015).

El compuesto con mayor actividad insecticida fue Propoxur con una DL50 18,2 mg/L \pm (11,7-27,5) en ninfas de primer estadio NI, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Vivas & Fernández, 2001. Sin embargo, no ocurre lo mismo al comparar las DL50 en ninfas de quinto estadio NV, lo cual es explicado por las diferencias metodológicas en los bioensayos de topicación implementados, ya que en el trabajo de Vivas & Fernández, (2001), no tiene en cuenta el comportamiento de agregación, que pueden magnificar la acción insecticida del compuesto utilizado (Cuadros et al., 2017). Propoxur pertenece al grupo de los carbamatos, los cuales funcionan inhibiendo la acetilcolinesterasa. Sin embargo, a diferencia de los organofosforados esta inhibición es reversible, por lo cual este

compuesto es menos tóxico en comparación a los insecticidas piretroides, esto explica por qué presenta unas dosis letales más altas al ser comparado con el compuesto Deltametrina (Nauen, R. et al., 2019).

La siguiente molécula en presentar actividad insecticida fue el benzoato de bencilo, este compuesto es un acaricida que se usa como tratamiento para la escabiosis (Sarna) (Elgart, 2003). Sin embargo, no se conoce su mecanismo de acción y existen en la literatura científica moléculas con mejor efecto para control de la escabiosis, con dosis más bajas, como es el caso de la permetrina y la ivermectina (Elgart, 2003). De igual manera este compuesto solo mostró mortalidad sobre ninfas de primer estadio NI y presentó DL50 muy altas al ser comparada con el compuesto control Deltametrina.

El compuesto Temefos no presentó mortalidad en ningún tratamiento, este compuesto es uno de los principales larvicidas que se usan para el control de poblaciones de culícidos como *Aedes* sp, en Colombia. El compuesto temefos pertenece al grupo de insecticidas organofosforados, su mecanismo de acción consiste en la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa (Conde et al., 2015; IRAC, 2012). La nula mortalidad observada en este compuesto puede ser explicada, debido a que el compuesto no logra atravesar la cutícula triatominos debido a sus propiedades lipofílicas, ya que el compuesto normalmente se encuentra diluido en el agua donde se encuentran las larvas de *Ae. aegypti*. Las cuales ingieren el compuesto pasando directamente a su organismo sin tener una barrera física, como es la cutícula de los insectos triatominos, también puede ser que los individuos presentan resistencia al principio activo del temefos (Vargas V et al., 2006; Santo-Orihuela & Picollo, 2011), tampoco existen estudios previos del uso del temefos como insecticida en triatominos con los cuales poder confrontar estos resultados.

Finalmente, los componentes mayoritarios de (AE) (monoterpenos), 1,8-cineol y α -Bisabolol presentaron mortalidad muy baja, menor del 25% a una dosis de 2000mg/L y dicha mortalidad solo fue observada en ninfas de primer estadio, por

este motivo es imposible determinar las DL50 y DL95 dados estos resultados. El mecanismo de acción de estos compuestos es desconocido, pero se piensa que afecta el sistema nervioso central como los insecticidas sintéticos, específicamente octopamina, acetilcolinesterasa y los receptores gabaérgicos (Reynoso & Noel, 2019). Sin embargo, este efecto no es lo suficientemente fuerte para causar una mortalidad relevante en *R. prolixus*, de igual manera no existen estudios en los que se haya evaluado previamente la acción insecticida de estos monoterpenos con los cuales poder confrontar los resultados obtenidos.

10.3 Actividad Repelente

Como se explicó en los antecedentes sobre dispositivos para medir la actividad repelente, en la actualidad no existe una metodología clara, precisa y estándar para estimar esta variable, siendo las pruebas de arena por medio de captura de movimiento (Videomex), la metodología más utilizada (Alzogaray, 2016b). Pero esta metodología presenta la desventaja al no utilizar un individuo vivo y determinar realmente la intención de picadura por parte del insecto. Otro aspecto que tienen en común es el uso del DEET, como compuesto modelo para evidenciar efecto repelente, sin embargo, tanto en las pruebas de test de arena como los dispositivo con cebo vivo, nos indican que es necesario altas concentraciones de dicho compuesto para evidenciar un efecto repelente, en el caso bioensayo con cebo vivo una concentración del 90% (Zermoglio et al., 2015a), inclusive algunos otros autores indican la ineficacia del DEET como compuesto repelente frente a *R. prolixus* (Franco et al., 2018). Debido a esto, nosotros utilizamos inicialmente el compuesto IR3535 como compuesto de referencia para evaluar la actividad repelente, de igual manera utilizamos una concentración del 90% y diseñamos un nuevo dispositivo para determinar la actividad repelente, el cual fue basado en el dispositivo propuesto por Zermoglio, contando con todas sus características.

Al comparar los dispositivos Zermoglio y CINTROP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al determinar el tiempo de protección con el compuesto IR3535. Por lo cual es viable determinar la actividad repelente con cualquiera de los dos dispositivos, siendo más que evidente las ventajas con las

que cuenta el nuevo dispositivo diseñado por el laboratorio de entomología médica, el cual resulta con más ventajas ergonómicas, mucho más fácil de manipular, se puede ajustar a diferentes cebos animales por las correas que tiene, y se pueden realizar múltiples observaciones como las mencionados por (Zermoglio et al., 2015b) y (Ramírez et al., 2020).

Por otra parte, de todos los compuestos evaluados solamente el xenobiótico Carvona, presentó protección ante la picadura superando los 100 minutos de protección, siendo similar estadísticamente al comportamiento observa por el compuesto IR3535, y presentando diferencias estadísticamente significativas con los demás compuestos repelentes que no superaron los cinco minutos de protección, es decir los compuestos en los cuales observamos un comportamiento de repelencia fueron IR3535 y Carvona.

11. Conclusiones

Es posible inferir la actividad repelente de compuestos desconocidos utilizando bioensayos de EAG en *R. prolixus*, sin embargo, no es posible inferir compuestos con actividad insecticida por medio de bioensayos de EAG.

Los compuestos repelentes IR3535 y Carvona afectaron el sistema olfativo de *R. prolixus*, ya que inhiben la capacidad de percepción de olores, según los bioensayos de EAG. En comparación, Limoneno, Carvacrol, DEET, y Citronelal no se observó una inhibición en la percepción de olores.

Los xenobióticos con actividad insecticida presentaron muy baja mortalidad al ser comparados con el control positivo Deltametrina, cuya DL50 para ninfas de primer estadio corresponde $0,22 \pm (0,191-0,252,5)$ y $2,415 \pm (2,169-2,696)$ para ninfas de quinto estadio, muy inferior al mejor compuesto Propoxur con una DL50 $18,2 \pm (11,7-27,5)$ para ninfas de primer estadio y $3092,3 \pm (2341,6-5503,0)$ para ninfas de quinto estadio.

En las comparaciones de los dispositivos Zermoglio vs CINTROP para determinar la actividad repelente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su tiempo de protección ante la picadura, razón por la cual se

pueden usar indistintamente cualquiera de los dispositivos para evaluar la actividad repelente.

Los xenobióticos que mostraron mayor protección ante la picadura del insecto fueron IR3535 y Carvona ambos con un tiempo de protección superior a los 100 minutos.

12. Referencias Bibliográficas

- Alzogaray, R. a. (1996). *Caracterización de la toxicidad de insecticidas piretroides en Triatoma infestans (Klug)*. 1–130.
- Alzogaray, R. a. (2003). El control químico de *Triatoma infestans* en Argentina. *Retel (Revista De Toxicología Ene Linea)*, 1–18.
- Alzogaray, R. A. (2016a). Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the insect repellents DEET and IR3535. *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 387–393. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv194>
- Alzogaray, R. A. (2016b). Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the insect repellents DEET and IR3535. *Journal of Medical Entomology*, 53(2), 387–393. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv194>
- Alzogaray, R. A., & Zerba, E. N. (2017). *Rhodnius prolixus* intoxicated. *Journal of Insect Physiology*, 97, 93–113. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.04.004>
- Alzogaray Raul; Fontan, E. Z. N. (2000). *Repellency of deet to nymphs of Triatoma infestans*.
- Barrozo, R. B., Reisenman, C. E., Guerenstein, P., Lazzari, C. R., & Lorenzo, M. G. (2017). An inside look at the sensory biology of triatomines. *Journal of Insect Physiology*, 97, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.11.003>
- Bohbot, J. D., Strickman, D., & Zwiebel, L. J. (2014). The future of insect repellent discovery and development. *Outlooks on Pest Management*, 25(4), 265–270. https://doi.org/10.1564/v25_aug_05
- Bohman, B., Weinstein, A. M., Unelius, C. R., & Lorenzo, M. G. (2018). Attraction of *Rhodnius prolixus* males to a synthetic female-pheromone blend. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2997-z>
- Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., & Denicola, A. (2010). Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*, 79(12), 1736–1745. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>
- Buescher, M. D., Rutledge, L. C., Wirtz, R. A., & Nelson, J. H. (1985). Laboratory repellent tests against *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 22(1), 49–53. <https://doi.org/10.1093/jmedent/22.1.49>
- Castillo, D., & Wolff, M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera : Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*, 20(1), 59–64.

- Cazorla-Perfetti, D. (2016). Revisión de los vectores de la enfermedad de Chagas en Venezuela (Hemiptera-Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Saber*, 28(3), 387–470.
- Conde, M., Orjuela, L. I., Castellanos, C. A., Herrera-Varela, M., Licastro, S., & Quiñones, M. L. (2015). Evaluación de la sensibilidad a insecticidas en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del departamento de Caldas, Colombia, en 2007 y 2011. *Biomedica*, 35(1), 43–52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2367>
- Coura, J. R., Dias, J. C. P., Frasc, A. C. C., Guhl, F., Lazzari, J. O., Lorca, M., Monroy Escobar, C., Ponce, C., Silveira, A. C., Velazquez, G., & Zingales, B. (2002). Control of Chagas disease. *World Health Organization - Technical Report Series*, 905, 1–99. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90338-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90338-x)
- Croom, E. (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 112). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00003-9>
- Cuadros, J., Carreño, A. L., Kouznetsov, V. V., & Duque, J. E. (2017). Insecticidal action of synthetic girsensohnine analogues and essential oils on *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 37(May), 50–58. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3379>
- Dickens, J. C., & Bohbot, J. D. (2013). Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.02.006>
- Diehl, P. A., Vlimant, M., Guerenstein, P., & Guerin, P. M. (2003). Ultrastructure and receptor cell responses of the antennal grooved peg sensilla of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Structure and Development*, 31(4), 271–285. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(03\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(03)00004-5)
- Elgart, M. L. (2003). Cost-benefit analysis of ivermectin, permethrin and benzyl benzoate in the management of infantile and childhood scabies. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 4(9), 1521–1524. <https://doi.org/10.1517/14656566.4.9.1521>
- Esteban, L., Montes, J. M., & Angulo, V. M. (2017). Diversidad de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Santander, Colombia: Implicaciones epidemiológicas. *Biomedica*, 37(1), 42–52. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3140>
- Fernández, D. M. De, Vivas, A. S., & Barazarte, H. (2004). *Susceptibilidad a insecticidas piretroides en cepas de campo de Rhodnius prolixus Stål (Hemiptera : Reduviidae) de Venezuela Materiales y Métodos*. 19(1), 1–5.
- Fontan, A., Audino, P. G., Martinez, A., Alzogaray, R. A., Zerba, E. N., Camps, F., & Cork, A. (2002). Attractant Volatiles Released by Female and Male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a Vector of Chagas disease: Chemical Analysis

and Behavioral Bioassay . *Journal of Medical Entomology*, 39(1), 191–197.
<https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.1.191>

- Franco, T. A., Oliveira, D. S., Moreira, M. F., Leal, W. S., & Melo, A. C. A. (2016). Silencing the odorant receptor co-receptor RproOrco affects the physiology and behavior of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.02.012>
- Franco, T. A., Xu, P., Brito, N. F., Oliveira, D. S., Wen, X., Moreira, M. F., Unelius, C. R., Leal, W. S., & Melo, A. C. A. (2018). Reverse chemical ecology-based approach leading to the accidental discovery of repellents for *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas diseases refractory to DEET. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103(October 2018), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.004>
- Guidobaldi, F., & Guerenstein, P. (2012). El Sistema Olfativo de los Insectos. *Temas Selectos de Ecología Química de Insectos*, 2, 46–71.
- Hernández Carvajal, J. E., Florez Orjuela, Y., & Vallejo, G. A. (2010). Evaluación de la actividad insecticida de *Solanum macranthum* (Dunal) sobre ninfas de los estadios IV y V de *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius colombiensis*. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(1), 71–78.
- IRAC. (2012). IRAC Mode of Action Classification Scheme. *Insecticide Resistance Action Committee, February*, 1–23.
- Jr, A. R., Rassi, A., & Marin-neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Justi, S. A., & Galvão, C. (2017). The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends in Parasitology*, 33(1), 42–52.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002>
- Klein, N., Hurwitz, I., & Durvasula, R. (2012). *Review Article Globalization of Chagas Disease : A Growing Concern in Nonendemic Countries. 2012.*
<https://doi.org/10.1155/2012/136793>
- Lorenzo, M. G., Manrique, G., Pires, H. H. R., De Brito Sánchez, M. G., Diotaiuti, L., & Lazzari, C. R. (1999). Yeast culture volatiles as attractants for *Rhodnius prolixus*: Electroantennogram responses and captures in yeast-baited traps. *Acta Tropica*, 72(1), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00093-X)
- Lutz, A., Sfara, V., Alzogaray, R. A., & Lapointe, S. (2014). Repellence produced by monoterpenes on *Rhodnius prolixus* (hemiptera: Reduviidae) decreases after continuous exposure to these compounds. *Journal of Insect Science*, 14(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu116>

- Schwab. (2011). CTFC-Binding Factor. In: Schwab M. (eds) Encyclopedia of Cancer. *Encyclopedia of Cancer*, 16, 1008–1012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5>
- May-Concha, I. J., Guerenstein, P. G., Malo, E. A., Catalá, S., & Rojas, J. C. (2018). Electroantennogram responses of the *Triatoma dimidiata* complex to volatiles produced by its exocrine glands. *Acta Tropica*, 185(April), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.06.018>
- Mijailovsky, S. J., Girotti, J. R., Cardozo, M., & Jua, M. P. (2009). *Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi*. 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000434>
- Molina, J. A., Gualdrón, L. E., Brochero, H. L., Olano, V., Barrios, D., Guhl, F., Entomoloogia, L. De, Nacional, I., & Boató, D. S. (2000). Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatominos (Reduviidae : Triatominae) en Colombia. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 344–360.
- Mougabure-Cueto, G., & Picollo, M. I. (2015). Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica*, 149, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.014>
- Nauen, R., S., R., S., TC, Elbert, A., & Mccafery, A. (2019). *Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas*. 1–28.
- Oliveira, D. S., Brito, N. F., Franco, T. A., Moreira, M. F., Leal, W. S., & Melo, A. C. A. (2018). Functional characterization of odorant binding protein 27 (RproOBP27) from *rhodnius prolixus* antennae. *Frontiers in Physiology*, 9(AUG), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01175>
- Oliveira, D. S., Brito, N. F., Nogueira, F. C. S., Moreira, M. F., Leal, W. S., Soares, M. R., & Melo, A. C. A. (2017). Proteomic analysis of the kissing bug *Rhodnius prolixus* antenna. *Journal of Insect Physiology*, 100(June), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.06.004>
- Olsson, S. B., & Hansson, B. (2013). *Electroantennogram and Single Sensillum Recording in Insect Antennae*. 1068(January), 179–187. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-619-1>
- Otálora-luna, F. (2016). *La evolución del hábito hematofágico en los triatominos (Heteroptera : Reduviidae) Versión en castellano de éste artículo : January 2015*.
- Pask, G. M., & Ray, A. (2016). Insect Olfactory Receptors: An Interface between Chemistry and Biology. *Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli*, 101–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801694-7.00006-8>

- Paula Sainz, Jesus Sanz, Jesus Burrillo, Azucena González, María Bailén, R. M. (2012). *Essential oils for the control of reduviid insects*. 361–369. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9261-5>
- Penido, C. M., & Schofield, C. J. (2000). *Excito-repellency effect of deltamethrin on triatomines under laboratory conditions Efeito excito-repelente da deltametrina sobre triatomíneos*. 33(3), 247–252.
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Portilla-Pulido, J. S., Castillo-Morales, R. M., Barón-Rodríguez, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Design of a Repellent Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Using in silico Simulations with AaegOBP1 Protein. *Journal of Medical Entomology*, 57(2), 463–476. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz171>
- Ramírez, M., Ortiz, M. I., Guerenstein, P., & Molina, J. (2020). Novel repellents for the blood-sucking insects *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*, vectors of Chagas disease. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04013-5>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 26, Issue 2, pp. 275–291). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Reisenman, C. E. (2014a). Hunger is the best spice: Effects of starvation in the antennal responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 71, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.09.009>
- Reisenman, C. E. (2014b). Hunger is the best spice: Effects of starvation in the antennal responses of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 71(September), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.09.009>
- Reynoso, P., & Noel, M. M. (2019). *Vinchucas Expuestas a Monoterpenos Vegetales E Insecticidas Sintéticos*. 1–174.
- 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. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa099>
- Santo-Orihuela, P. L., & Picollo, M. I. (2011). Contribution of general esterases to pyrethroid resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Acta Toxicol. Argent.*, 19(1), 32–40.
- Schama, R., Pedrini, N., Juárez, M. P., Nelson, D. R., Torres, A. Q., Valle, D., & Mesquita, R. D. (2016). *Rhodnius prolixus* supergene families of enzymes

- potentially associated with insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.06.005>
- Schmunis, G. A., & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1–2), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>
- Sfara, V., Mougabure-cueto, G., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2011). Adaptation of the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. *Journal of Insect Physiology*, 57(10), 1431–1436. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.009>
- Sfara, V., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. a. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Medical Entomology*, 46, 511–515. <https://doi.org/10.1603/033.046.0315>
- Shrestha, B., & Lee, Y. (2020). Cellular and molecular mechanisms of DEET toxicity and disease-carrying insect vectors: a review. *Genes and Genomics*, 42(10), 1131–1144. <https://doi.org/10.1007/s13258-020-00991-z>
- Tapras, R. (2002). *TERAPÉUTICA Estructura básica y principales parámetros de un dispositivo de estímulos olfativos en para el estudio electroantenoográfico cerambícidos*.
- Vargas V, F., Córdova P, O., & Alvarado A, A. (2006). Determinación de la resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Lutzomyia peruensis* procedentes del norte peruano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 23(4), 259–264. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2006.234.1057>
- Vassena, C. V., & Picollo, I. (2003). *Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de Triatoma infestans y Rhodnius prolixus , insectos vectores de la Enfermedad de Chagas*. 4397, 1–21.
- Venthur, H., & Zhou, J. J. (2018). Odorant receptors and odorant-binding proteins as insect pest control targets: A comparative analysis. *Frontiers in Physiology*, 9(AUG), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01163>
- Vildósola, J. A., & Martín, A. H. (2021). Trastornos de la pigmentación: Lentigos, nevus y melanoma. Fotoprotección. *Pediatría Integral*, 25(4), 194–200.
- Vivas, A. S., & Fernández, D. M. De. (2001). *prolixus Stål , 1859 (Hemiptera : Reduviidae) de Venezuela Materiales y Métodos Resultados y Discusión*. 16(3), 187–190.
- Vivas, A. S., & Molina, D. (2001). *prolixus Stål , 1859 (Hemiptera : Reduviidae) de Venezuela Materiales y Métodos Resultados y Discusión*. *Entomotropica*, 16(3), 187–190.

Zermoglio, P. F., Martin-Herrou, H., Bignon, Y., & Lazzari, C. R. (2015a). *Rhodnius prolixus* smells repellents: Behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors. *Journal of Insect Physiology*, *81*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.012>

Zermoglio, P. F., Martin-Herrou, H., Bignon, Y., & Lazzari, C. R. (2015b). *Rhodnius prolixus* smells repellents: Behavioural evidence and test of present and potential compounds inducing repellency in Chagas disease vectors. *Journal of Insect Physiology*, *81*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.012>