



Efecto letal y repelente del monoterpeno geraniol sobre ninfas de *Triatoma infestans* susceptibles y resistentes a deltametrina

Lethal and Repellent Effect of the Monoterpene Geraniol on *Triatoma infestans* Nymphs Susceptible and Resistant to Deltamethrin

Carla Rodas¹, Martin Daniele^{2,3}, Naomi Simon Difiori²,
Gustavo Marin⁴, Guillermo Schinella^{1,4},
Roger Iván Rodríguez-Vivas^{5*}, Martín Dadé^{1,2,3,4}



DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.v20.n1.2023.15045>

RESUMEN: *Triatoma infestans* es el principal vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. La herramienta más eficaz para el control de *T. infestans* es el uso de insecticidas del tipo piretroide. Sin embargo, la presencia de ejemplares de *T. infestans* resistentes a los piretroides conlleva la necesidad de buscar nuevas alternativas para su control. Los bioinsecticidas se posicionan en la actualidad como una alternativa novedosa, menos agresiva para el ambiente y de menor costo con respecto al uso de los insecticidas sintéticos tradicionales. El geraniol es un monoterpeno que ha demostrado tener actividad insecticida y repelente en insectos. Los objetivos del presente trabajo fueron determinar y comparar la actividad letal y repelente del geraniol solo y en combinación con el insecticida piretroide deltametrina y el repelente de insectos N,N-Dietil-meta-toluamida (DEET). Se demostró que el geraniol tiene una actividad letal similar en ninfas susceptibles y resistentes a piretroides (grado de resistencia de 0,8). Cuando se combinaron los dos insecticidas, el geraniol mostró un efecto sinérgico sobre la letalidad de la deltametrina. En cuanto a la actividad repelente, en bajas concentraciones, el geraniol fue menos potente que el DEET; sin embargo, cuando se combinaron ambas moléculas, la presencia de este monoterpeno aumentó la capacidad de repelencia del DEET al 100%. Se concluye que el geraniol tiene actividad letal sobre ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a los piretroides, y tiene un efecto sinérgico sobre la letalidad de la deltametrina. Asimismo, el geraniol aumentó la capacidad de repelencia del DEET sobre *T. infestans*.

PALABRAS CLAVE: enfermedad de Chagas, resistencia a los insecticidas, piretroide, bioinsecticidas, potenciación.

ABSTRACT: *Triatoma infestans* is the main vector of the *Trypanosoma cruzi* parasite, the etiological agent of Chagas disease. Pyrethroid insecticides are the most effective strategy for controlling *T. infestans*. However, the presence of specimens of *T. infestans* resistant to pyrethroids now raises the need to seek new alternatives for their control. Bioinsecticides are currently positioned as a novel alternative, less aggressive for the environment and less costly compared to traditional synthetic insecticides. Geraniol is a monoterpene that has been shown to have insecticidal and repellent activity on insects. The objectives of this work were to determine and compare the lethal and repellent activity of geraniol alone and in combination with the pyrethroid insecticide deltamethrin and the insect repellent N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET). Geraniol has been shown to be similar lethal to pyrethroid-susceptible and -resistant nymphs (resistance ratio of 0.8). When the two insecticides were combined, geraniol showed a synergistic effect on the lethality of deltamethrin. In terms of repellent activity, geraniol was less effective than DEET at low concentrations; however, when both molecules were combined, the presence of this monoterpene increased the repellency capacity of DEET to 100%. It is concluded that geraniol has lethal activity on *T. infestans* nymphs susceptible and resistant to pyrethroids and has a synergistic effect on the lethality of deltamethrin. Likewise, geraniol increased the repellency capacity of DEET on *T. infestans*.

KEYWORDS: Chagas disease, insecticide resistance, pyrethroid, bioinsecticides, potentiation.

FECHA DE RADICACIÓN: 22 de septiembre de 2022 **FECHA DE ACEPTACIÓN:** 25 de abril de 2023 **FECHA DE PUBLICACIÓN:** 28 de junio de 2023

- 1 Universidad Nacional Arturo Jauretche (CICPBA), Instituto de Ciencias de la Salud, Florencio Varela, Argentina.
 ORCID: Rodas, C.: <https://orcid.org/0000-0001-6743-8195>; ORCID: Schinella, G.: <https://orcid.org/0000-0001-9541-9688>;
 ORCID: Dadé, M.: <https://orcid.org/0000-0001-8562-6317>
 - 2 Universidad Nacional de Río Negro, Sede Alto Valle y Valle Medio, Escuela de Veterinaria y Producción Agroindustrial, Choele Choel, Argentina. ORCID: Daniele, M.: <https://orcid.org/0000-0001-8744-2351>;
 ORCID: Difiori, N. S.: <https://orcid.org/0000-0002-8467-3696>
 - 3 Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales (UCES), Carrera de Veterinaria, Cañuelas, Buenos Aires, Argentina.
 - 4 Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Cátedra de Farmacología Básica, La Plata, Argentina.
 ORCID: Marin, G.: <https://orcid.org/0000-0002-6380-6453>
 - 5 Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria and Zootecnia, Mérida (México).
 ORCID: Rodríguez-Vivas, R. I.: <https://orcid.org/0000-0002-3340-8059>
- * Autor de correspondencia: rvivas@correo.uady.mx

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una afección provocada por el hemoparásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, actualmente existen entre 7 y 8 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y 65 millones en riesgo de contraer el parásito. En las zonas endémicas se registran 30000 nuevos casos cada año, 12000 muertes y 8600 recién nacidos se infectan durante la gestación (transmisión vertical) (OPS & OMS, s. f.). Aunque es endémica en 21 países de las Américas, debido a los flujos migratorios originados principalmente por razones económicas, en la actualidad la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema mundial (OPS & OMS, s. f.).

En las zonas endémicas la principal vía de transmisión es de tipo vectorial. Este tipo de transmisión es llevada a cabo por insectos del orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Germano & Picollo, 2018). Entre los principales vectores de *T. cruzi* se pueden mencionar a *Triatoma infestans* y *T. sordida*, distribuidos principalmente en Paraguay, Bolivia, Argentina, Uruguay y sur de Brasil; *T. brasiliensis* en el noroeste de Brasil; *Rhodnius prolixus* distribuido principalmente en Colombia y Venezuela, y *T. dimidiata* ampliamente extendida en Centroamérica (De la Vega, 2016).

La principal estrategia de control vectorial es el rociado con insecticidas del grupo químico de los piretroides en los domicilios y las estructuras que ocupan el peridomicilio (cocinas en exterior, depósitos de leña, corrales, etc.). Pese al éxito alcanzado con esta estrategia, que se tradujo en una reducción considerable del área de distribución de los principales vectores de la enfermedad de Chagas, la notificación de la presencia de poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides trae aparejada la necesidad de buscar nuevas moléculas con mecanismos de acción distintos a los insecticidas disponibles para el control de los principales vectores de *T. cruzi* (Mougabure-Cueto & Picollo, 2021).

Debido a la alta especificidad, siendo activos sobre determinados tipos de insectos sin interferir con especies benéficas para el medio ambiente, su alta seguridad, su naturaleza biodegradable y, por lo tanto, menor impacto ambiental, sumado a su bajo costo de producción, los bioinsecticidas de origen botánico se constituyen en la actualidad como una alternativa interesante para el control de insectos vectores de importancia sanitaria (Choochote et al., 2007; Pavela, 2016). Entre este tipo de moléculas, los monoterpenos han llamado la atención debido a su demostrado efecto insecticida y acaricida (Liu et al., 2022). Distintos monoterpenos han demostrado efectos letales, de repelencia e hiperactivación sobre triatominos (Govindarajan et al., 2016; Reynoso et al., 2020). En algunos casos se observó distensión abdominal de los insectos cuyo mecanismo de acción se desconoce (Moretti et al., 2013).

El geraniol es un monoterpeno acíclico, se encuentra presente en los aceites esenciales de rosas, cítricos, palmarosa y citronela (Chen & Viljoen, 2010). En bioensayos de laboratorio, el geraniol ha demostrado actividad antibacteriana, antiinflamatoria e insecticida (Barnard & Xue, 2004; Liu et al., 2022). En triatominos se puede mencionar, por ejemplo, el trabajo de Moretti *et al.* (2013), quienes estudiaron la actividad de 10 monoterpenos –incluyendo el geraniol en ninfas de primer estadio de *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*– y demostraron que el geraniol provocó hiperactividad en las ninfas de ambas especies. Otro estudio es el realizado por Sfara *et al.* (2009), quienes demostraron actividad repelente por parte del geraniol en ninfas de primer estadio de *R. prolixus*.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron: i) estudiar la actividad letal del geraniol solo y en combinación con el piretroide deltametrina en ninfas de quinto estadio de *T. infestans*, y ii) estudiar la actividad repelente del geraniol de manera individual o en combinación con el repelente sintético de uso comercial N,N-Dietil-meta-toluamida (DEET).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los insecticidas geraniol y deltametrina junto con la acetona (grado analítico) fueron adquiridos en Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Insectos

En este trabajo se utilizaron ninfas de *T. infestans* provenientes de una colonia establecida durante 10 años en el Laboratorio de Artrópodos y Vectores (LabArVec), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Esta colonia fue conformada con insectos enviados desde el Centro de Referencia de Vectores (CeReVe), Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina. Esta colonia se considera como de referencia (R), debido a su alta susceptibilidad a la deltametrina. Para los ensayos se utilizó otra colonia de insectos que fue establecida en el año 2019 en el LabArVec. Esta colonia fue iniciada con insectos provenientes de la localidad de Salvador Mazza (SM), Salta, Argentina. En esta localidad los programas de control de *T. infestans* con el uso de insecticidas piretroides han fracasado sistemáticamente durante los últimos 20 años. Cabe destacar que en un trabajo previo se evaluó la susceptibilidad a deltametrina de ambas colonias, se determinó que la dosis del insecticida necesaria para matar al 50 % de las ninfas fue 300 veces mayor en la colonia SM con respecto a la dosis utilizada en la colonia R (Dadé et al., 2020). En todos los ensayos se utilizaron ninfas de quinto estadio de *T. infestans* con 12-15 días de ayuno posecdisis. Las colonias de insectos se mantuvieron en

condiciones constantes de temperatura (25 ± 1 °C), humedad relativa (50-60 %) y fotoperiodicidad de 12/12 h. Las ninfas fueron alimentadas con sangre de gallina cada 15 días.

Aplicación tópica de insecticidas

Durante la realización de este bioensayo se siguió el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (1994) con modificaciones. Esta técnica consiste en la aplicación tópica de 1 μL del principio activo (deltametrina o geraniol o la combinación de ambos insecticidas) disuelto en acetona sobre la zona dorsal del abdomen de las ninfas. Para la aplicación de los insecticidas se utilizó un microaplicador (Hamilton 1 μL). Para la confección de las curvas dosis-respuesta se evaluaron dosis crecientes de los insecticidas, teniendo en cuenta que al menos cuatro de estas dosis provoquen entre el 10 y 90 % de mortalidad entre las ninfas. El ensayo se replicó tres veces en días distintos con las mismas condiciones. Se utilizaron 10 ninfas por cada dosis en cada una de las réplicas del ensayo (30 insectos en total por cada dosis evaluada). El rango de dosis evaluadas con deltametrina fue de 10-100 ng por insecto en la colonia R y de 100-1000 ng/insecto para la colonia SM. En el caso del geraniol, las dosis fueron de 10-100 μg /insecto para ambas colonias. Luego de ser tipificados, los distintos grupos de ninfas fueron alojados en recipientes, registrando el estado de los insectos a las 24, 48, 72 y 168 h posadministración. En cada réplica se utilizaron 10 ninfas como control. Estos insectos recibieron 1 μL de acetona. Durante todos los ensayos del presente trabajo se consideró muerto a aquel insecto que no pudo desplazarse desde el centro hasta el borde de un papel filtro de 9 cm de diámetro, por sus propios medios en forma espontánea o luego de ser estimulado mecánicamente con ayuda de una pinza (OMS, 1994).

Ensayo de contacto con papel de filtro

Para esta técnica se siguió el protocolo propuesto por la OMS (1994) con modificaciones. Se utilizaron papeles de filtro de 9 cm de diámetro. Se realizaron distintas concentraciones de geraniol y deltametrina en acetona. Se impregnó el papel filtro con un 1 mL de solución de los insecticidas. Luego de dejar evaporar durante 24 horas, se expusieron sobre el papel tratado 10 ninfas de quinto estadio durante 60 minutos. Luego de ser expuestas, las ninfas fueron alojadas en recipientes limpios con papeles plegados y se registró la mortalidad a las 24, 48, 72 y 168 h poscontacto. Para obtener la CL al 50 % (CL50) de cada uno de los insecticidas, se evaluaron distintas concentraciones, teniendo en cuenta que al menos cuatro de estas concentraciones ocasionaron entre el 10 y 90 % de mortalidad en los insectos. Las concentraciones evaluadas fueron entre 100 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la deltametrina en ninfas de la colonia R, y de 1000-10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la colonia SM. Con el geraniol el rango de concentraciones evaluadas en ambas

colonias fue de 1000-10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los ensayos se realizaron por triplicado en distintos días. Las condiciones de mantenimiento de los insectos fueron similares a las que ya han sido especificadas con antelación. En cada réplica, 10 ninfas fueron utilizadas como control, estos insectos fueron expuestos a superficies tratadas con acetona sin presencia de los insecticidas.

Evaluación del efecto letal de la combinación entre el geraniol y deltametrina

Para constatar la actividad letal de la combinación del geraniol y la deltametrina se siguió el siguiente procedimiento: uno de los insecticidas fue utilizado en la máxima dosis/concentración evaluada que no haya provocado una mortalidad significativamente diferente a la observada en las ninfas control (5-10 %) y fue combinado con las dosis/concentraciones del otro insecticida evaluadas en los ensayos previamente descritos. Para la deltametrina, la dosis fija por vía tópica fue de 5 y de 2500 ng/insecto para las ninfas susceptibles y resistentes, respectivamente. Para el ensayo de contacto se utilizó una concentración fija de 150 y de 20000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para las ninfas susceptibles y resistentes, respectivamente. Para el geraniol, en ambas colonias la dosis fija por vía tópica fue de 12000 ng/insecto y 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue la concentración fija utilizada en el ensayo de contacto. Cabe aclarar que en este trabajo al combinar los insecticidas lo hacemos teniendo en cuenta la definición de potenciación propuesta por Chou (2006), que establece que si se combinan dos moléculas (A y B) y que, por separado, A tiene efecto y B no posee efecto, pero que al combinarse el efecto es mayor que el observado con A, entonces esta interacción entre ambas moléculas se denomina potenciación.

Ensayo de repelencia

Para el ensayo de repelencia se utilizó la técnica de área de preferencia con mínimas adaptaciones (Tapondjou et al., 2005; Dadé et al., 2018). La superficie de trabajo se arma con papeles de filtro de 11 cm de diámetro divididos en dos mitades. El protocolo consiste en ofrecer al insecto una mitad del área de contacto tratada con distintas concentraciones de los insecticidas disueltos en acetona y la otra mitad tratada solo con acetona. Los papeles de filtro se dejaron evaporar durante 24 h antes de tomar contacto con los insectos. Luego de la evaporación, las mitades de cada papel fueron pegadas con cinta adhesiva y se colocó una ninfa en la mitad del papel con la ayuda de una pinza. En caso de existir repelencia por parte del insecticida, el insecto se ubicará en la mitad del papel de filtro libre de la molécula. Estos papeles fueron colocados en cajas de Petri para evitar que las vinchucas¹ se escaparan. El control se llevó a cabo tratando con acetona a una de las mitades, mientras

¹ Conocidas con este nombre en Argentina, Chile, Uruguay y Bolivia. En Colombia se conocen como pitos o chinches.

que la otra mitad no recibió tratamiento. Las concentraciones evaluadas para ambas moléculas por separado fueron 1,25; 2,5; 5,0 y 10,0 mg mL⁻¹. También se evaluó una combinación de ambas moléculas (1:1) en una concentración final de 2,5 mg mL⁻¹. Cada concentración fue evaluada en 10 ninfas de quinto estadio. A su vez, el ensayo fue replicado en tres ocasiones (30 ninfas por concentración en total). En cada réplica se utilizaron 10 ninfas como control. Los tiempos de observación en los cuales se constató la ubicación de los insectos, fueron a 1, 24 y 48 h.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos en el ensayo vía tópica y contacto en el papel filtro, se determinaron las dosis y la concentración necesaria para matar al 50 % de los insectos evaluados (DL₅₀ y CL₅₀), respectivamente. Cabe destacar que tanto para conocer las DL₅₀ y las CL₅₀ se utilizó el *software* POLO-PLUS a partir del modelo estadístico Probit. Este *software* nos permitió comparar la actividad letal de los insecticidas en las dos colonias de insectos que fueron utilizadas en este trabajo. A partir del conocimiento de las DL₅₀ y CL₅₀ de deltametrina y geraniol se determinó el grado de resistencia (GR). Para esto se hizo la comparación de las DL₅₀ y CL₅₀ entre las colonias R y SM (por ejemplo, GR= DL₅₀ Colonia SM / DL₅₀ R). Cada GR calculado fue acompañado con su correspondiente intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %). Dos DL₅₀ o CL₅₀ fueron consideradas significativamente distintas cuando el intervalo de confianza (IC 95 %) no tomara en cuenta el número 1,0 ($P < 0,05$) (Robertson et al., 2007).

Para conocer el grado de potenciación (GP) entre los insecticidas se utilizó el *software* POLO-PLUS. El GP se obtiene del cociente entre la DL₅₀ o CL₅₀ del insecticida / DL₅₀ o CL₅₀ de la combinación de insecticidas. Cada GP calculado fue acompañado con su correspondiente intervalo de confianza del 95 % (IC 95 %).

La actividad repelente por separado del geraniol y la DEET o la combinación de ambos fue calculada mediante la siguiente fórmula: porcentaje de repelencia (PR)= $N_s - N_t / N_s + N_t \times 100$. En la cual: N_s: número de insectos en el área sin tratar. N_t: número de insectos en el área tratada. En el caso de que la mayoría de los insectos se encuentren en el área sin tratar (N_s > N_t), el signo de PR será positivo e interpretado como actividad repelente. El signo negativo de PR (N_t > N_s) significa que la mayoría de los insectos se ubicó en la mitad tratada y se interpretó como actividad atrayente. Para cada insecticida los resultados se presentan como la media del PR ± error estándar (EE).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se pueden apreciar los resultados obtenidos en el ensayo por vía tópica. Se constató actividad letal dependiente de la dosis por parte de ambos insecticidas. En el caso de la deltametrina se pudo observar una diferencia significativa en su actividad letal dependiendo de la colonia de insectos. El GR fue de 147, necesitándose una dosis 147 veces mayor para matar el 50 % de los triatominos de la colonia SM con respecto a la R. Para el caso del geraniol se constató una actividad letal similar en ambas colonias con un GR de 0,8 (Tab. 1).

TABLA 1. Estudio de la actividad letal y de potenciación de los insecticidas deltametrina y geraniol a las 168 h luego de haber sido administrados por vía tópica en ninfas de quinto estadio de *T. infestans*.

Insecticida	Colonia	DL ₅₀ (ng/i) ^a (IC 95%) ^b	GR ^c (IC 95%)	GP ₅₀ ^d
Deltametrina	R	74,1 (48,6-165,7)		
	SM	10904,3 (8879,9-13471,1)	147,3 (83,9-261,5)	
Geraniol	R	166000,1 (131345,6-214355,8)		
	SM	138622,3 (103445,9-184963,9)	0,8 (0,5-1,2)	
Deltametrina + Geraniol	R	30,2 (22,2-43,1)		2,4 (1,3-4,5)
	SM	893,2 (766,4-1048,9)	29,5 (20,1-41,3)	12,2 (9,5-15,5)
Geraniol + Deltametrina	CR	178000,7 (131009,5-255673,2)		0,9 (0,6-1,3)
	CSM	148324,5 (105432,1-210555,3)	0,9 (0,6-1,3)	0,8 (0,6-1,4)

^a Dosis letal 50 %, expresada en nanogramos de insecticida por insecto.

^b Intervalo de confianza 95 %.

^c Grado de resistencia: DL₅₀ SM/DL₅₀ R.

^d Grado de potenciación: DL₅₀ geraniol o deltametrina / DL₅₀ de la combinación de ambos insecticidas.

En cuanto a la potencia de ambas moléculas, en la colonia R la potencia de la deltametrina fue significativamente superior al monoterpeno. Como se puede observar en la Tabla 1, la DL₅₀ de la deltametrina se obtuvo en el orden de los nanogramos, mientras que el geraniol demostró su actividad letal a partir de los microgramos, necesitándose una dosis 2200 veces superior de geraniol con respecto a la deltametrina. En cuanto al comportamiento letal de ambas moléculas en las ninfas de la colonia SM, si bien se observó una mayor potencia por parte del piretroide, esta diferencia no fue de la magnitud a la obtenida entre las ninfas de referencia (Tabla 1).

Como se observa en la Tabla 1, el estudio de la actividad de potenciación arrojó resultados dispares dependiendo del insecticida utilizado en una dosis fija. En este ensayo, solo el geraniol demostró un efecto de potenciación sobre el efecto letal de la deltametrina. Este efecto de potenciación fue significativamente superior en las ninfas resistentes a piretroides (12,2 veces) con respecto a lo observado en las ninfas de referencia (2,4 veces). Esta mayor actividad de potenciación entre los insectos resistentes en comparación con

los de referencia trajo aparejada una disminución notable del GR a la deltametrina. Se constató que el GR calculado para la deltametrina de 147 disminuyó a 30 como consecuencia del efecto de potenciación del monoterpeno.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de la actividad letal y potenciación de los insecticidas cuando fueron impregnados en papel de filtro. Aunque en la colonia R la deltametrina fue más potente que el geraniol (25 veces), en las ninfas de SM se observó una mayor actividad letal del monoterpeno en comparación con el piretroide (3,5 veces). También se constató una diferencia significativa en la actividad letal de la deltametrina de acuerdo con el origen de los insectos. En este caso se requirió una dosis 89 veces superior del piretroide en las ninfas de SM con respecto a los insectos de referencia (Tabla 2). En el caso del geraniol, no se determinó una diferencia significativa entre las DL50 obtenidas con cada colonia de ninfas (Tabla 2).

TABLA 2. Actividad letal y de potenciación de deltametrina y geraniol luego de 168 h de haber estado en contacto con ninfas quinto estadio de *T. infestans*.

Insecticida	Colonia	CL ₅₀ (µg/mL) ^a (IC 95%) ^b	GR ^c (IC 95%)	GP ₅₀ ^d
Deltametrina	R	614,7 (539,5-723,4)		
	SM	54544,4 (48666,3-61533,5)	88,7 (74,1-106,1)	
Geraniol	R	18542,1 (13771,2-25766,6)		
	SM	14991,7 (11270,1-19888,1)	0,8 (0,5-1,2)	
Deltametrina + Geraniol	R	603,1 (497,7-778,9)		1,1 (0,7-1,3)
	SM	4169,4 (3084,4-6831,1)	7,0 (3,5-115)	13,1 (8,9-19,6)
Geraniol + Deltametrina	CR	16218,6 (11322,1-22554,6)		1,1 (0,7-1,7)
	CSM	20208,1 (15443,2-27345,1)	1,25 (0,8-1,7)	0,7 (0,4-1,2)

^a Concentración letal 50 %, expresada en microgramos de insecticida por mL de solución.

^b Intervalo de confianza 95 %.

^c Grado de resistencia: CL₅₀ SM/CL₅₀ R.

^d Grado de potenciación: CL₅₀ geraniol o deltametrina/CL₅₀ de la combinación de ambos insecticidas.

En cuanto al efecto de potenciación de ambas moléculas, se constató que el geraniol tuvo un efecto de potenciación en la actividad letal de la deltametrina solo en los triatominos de la CSM con un GP de 13 (Tabla 2). Este efecto de potenciación específico del monoterpeno en las ninfas de SM implicó una reducción significativa en la resistencia de los insectos a la deltametrina, pues disminuyó el GR de 89 a 7 en ausencia y presencia del monoterpeno, respectivamente (Tabla 2). Cabe destacar que la deltametrina no demostró efecto de potenciación en la letalidad del geraniol en ninguna de las dos colonias de insectos (Tabla 2).

En otro ensayo se constató que la actividad repelente de la DEET y el geraniol no sufrió variaciones de acuerdo con la colonia de ninfas evaluada. En ambas colonias, la DEET demostró un mayor poder repelente que el geraniol.

Por ejemplo, a una hora de haber sido colocados los insectos sobre el papel de filtro la DEET, demostró el máximo de repelencia a una concentración de 2,5 mg mL⁻¹, mientras que el geraniol necesitó cuatro veces más de concentración para el mismo efecto (Tabla 3). En el tiempo máximo de observación establecido (48 h), el DEET logró un porcentaje de repelencia del 100 % con la concentración de 5 mg L⁻¹, mientras que en el caso del geraniol fue necesaria una concentración de 10 mg L⁻¹ para repeler el 100 % de los insectos (Tabla 3). Cuando ambos insecticidas fueron combinados en una concentración de 1,25 mg mL⁻¹, el geraniol demostró tener un efecto de potenciación en la actividad repelente de la DEET. Por ejemplo, en las ninfas de SM los valores de repelencia de la DEET aumentaron de 45, 50 y 23 a 100 % a 1, 24 y 48 h, respectivamente.

TABLA 3. Actividad repelente del geraniol y DEET ensayados de manera individual y en combinación binaria.

Colonia	Compuesto	Concentración (mg mL ⁻¹)	Porcentaje de repelencia (PR) ^a		
			1 h	24 h	48 h
R	DEET	1,25	65±8	35±9	29±9
		2,5	100±0	83±10	78±7
		5	100±0	100±0	100±0
		10	100±0	100±0	100±0
	Geraniol	1,25	5±2	10±3	10±4
		2,5	35±11	10±1	15±5
		5	67±7	67±9	70±7
		10	100±0	100±0	100±0
	DEET + Geraniol (1:1)	2,5	100±0	100±0	100±0
SM	DEET	1,25	45±7	50±5	23±9
		2,5	100±0	100±0	80±5
		5	100±0	100±0	100±0
		10	100±0	100±0	100±0
	Geraniol	1,25	5±7	5±2	5±5
		2,5	20±5	10±2	15±3
		5	80±7	90±10	70±12
		10	100±0	100±0	100±0
	DEET + Geraniol (1:1)	2,5	100±0	100±0	100±0

^a Promedio de los porcentajes de repelencia de 3 réplicas.

DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron dos técnicas avaladas por la OMS. Aunque en ambas técnicas el insecticida entra en contacto directo con la cutícula de las ninfas, los resultados fueron significativamente diferentes. Por ejemplo, cuando los insecticidas fueron administrados por la vía tópica se demostró

un GR de 147, mientras que con la técnica de contacto en papel filtro el GR fue de 89. Una de las razones para esta diferencia podría radicar en que mientras que en el ensayo por vía tópica se conoce con exactitud la dosis de insecticida que se le aplica al insecto, en la técnica de superficie de contacto se coloca una concentración del insecticida en el papel de filtro, por lo tanto, la cantidad de insecticida que tome contacto con cada insecto depende, entre otras variables, de la movilidad que tenga el insecto durante el tiempo en contacto con la superficie tratada. Para esta técnica, Busvine (1957) afirma que los insectos se “autodosifican”. También, entre ambas técnicas existen diferencias tanto en el área total de contacto entre el insecticida y el insecto como, además, en la zona de la cutícula por donde será absorbida la molécula: en la zona dorsal para la vía tópica, y ventral para la técnica de contacto (Chapman, 2013). Cabe aclarar que, si bien en la técnica de contacto con papel de filtro la incertidumbre de no conocer con precisión la cantidad de insecticida en contacto con el insecto es una desventaja con respecto a la administración de insecticidas por vía tópica, en un trabajo de Remón *et al.* (2017) se diseñó un protocolo basado en el uso de papeles de filtro impregnados con deltametrina para el monitoreo de la susceptibilidad de *T. infestans* al piretroide. En dicho trabajo se demostró la posibilidad de usar estos papeles en ensayos de campo a gran escala, lo que permitiría complementar esta técnica con la administración por vía tópica llevada a cabo en condiciones de laboratorio.

En este trabajo el geraniol demostró una actividad letal similar entre las ninfas de *T. infestans* independientemente de su susceptibilidad frente a la deltametrina. Esto permite afirmar que ninguno de los posibles mecanismos de resistencia presentes en las ninfas de la CSM interfiere con la capacidad letal del geraniol. La toxicidad similar del geraniol en las ninfas susceptibles y resistentes a piretroides descrita en este trabajo coincide con lo observado en el insecto hematófago *Cimex lectularius* (chinchas de cama); en este sentido, Gaire *et al.* (2020) observaron que la letalidad del geraniol fue similar entre chinchas susceptibles y con niveles de resistencia a la deltametrina de 290000 veces.

La actividad de potenciación del geraniol en la toxicidad de la deltametrina fue previamente estudiada en *C. lectularius*. Gaire *et al.* (2021) trabajaron con chinchas con un GR a deltametrina de 72000. Mediante la administración por vía tópica del piretroide, los autores demostraron que el efecto de potenciación del geraniol sobre la actividad letal de la deltametrina fue mayor en las chinchas resistentes que en las susceptibles al piretroide. También demostraron un efecto inhibitorio del geraniol en la actividad detoxificante de las monooxigenasas citocromo P-450. Teniendo en cuenta que en los insectos resistentes este tipo de enzimas detoxificantes suelen estar aumentadas, los autores concluyen que parte del efecto de potenciación del geraniol en la actividad letal de la deltametrina determinada en las chinchas resistentes

podría estar relacionado con su actividad inhibitoria sobre las enzimas citocromo P-450. En coincidencia con estos resultados, en este trabajo demostramos que los niveles de potenciación del geraniol sobre la deltametrina fueron mayores en las ninfas resistentes (GP de 12,2) en comparación con el GP de 2,4 observado en las ninfas susceptibles. Cabe destacar que, si bien en el presente trabajo no se fijó como objetivo el estudio de los mecanismos de resistencia presentes en las ninfas de la colonia SM, en un trabajo previo, en el que realizamos ensayos con esta misma colonia de insectos, determinamos que la presencia del inhibidor de las monooxigenasas citocromo P-450, butóxido de piperonilo (PBO), provocó un aumento significativo en la letalidad de la deltametrina; de esta manera se concluyó que parte de la resistencia a deltametrina en las ninfas de SM se debe a un incremento de la actividad detoxificante de monooxigenasas citocromo P-450 (Dadé et al., 2020). Este resultado se suma al que previamente publicaron Picollo *et al.* (2005), también realizado en ninfas de *T. infestans* provenientes de la localidad de Salvador Mazza (Salta, Argentina).

Moretti *et al.* (2013) estudiaron el efecto repelente del geraniol en ninfas de primer estadio de *T. infestans*. Los autores obtuvieron valores similares de repelencia entre el monoterpeno y la DEET. En el presente trabajo, si bien demostramos un importante efecto repelente por parte del geraniol, también quedó claro que dicho efecto fue menos potente que el observado con el DEET. Este resultado coincide con investigaciones hechas con distintos monoterpenos en otros insectos. Por ejemplo, Giatropoulos *et al.* (2012) probaron la actividad repelente de los aceites esenciales de limón y naranja junto con sus principales monoterpenos en el mosquito vector del dengue, *Aedes albopictus*. Los autores demostraron que, a la máxima concentración evaluada, la mayoría de los monoterpenos ocasionaron una actividad repelente significativamente menor que la observada con el DEET. En el presente trabajo, también determinamos que la actividad repelente del geraniol y de DEET fue similar en ambas colonias, es decir, dicha actividad repelente no se vio afectada por el estatus de resistencia a piretroides que tuviera la ninfa. Este resultado coincide con lo publicado previamente por Sfara *et al.* (2006), quienes demostraron una capacidad de repelencia similar de la DEET entre ninfas de primer estadio de *T. infestans* susceptibles y ninfas de dos colonias con altos niveles de resistencia a deltametrina provenientes de dos localidades cercanas a Salvador Mazza (La Toma y El Chorro). Estos resultados podrían estar indicando que los mecanismos de resistencia a los insecticidas piretroides presentes en las ninfas de *T. infestans* provenientes de SM y localidades cercanas, no estarían vinculados con el efecto de repelencia demostrado por el monoterpeno y la DEET. También, cabe destacar que los resultados de repelencia del geraniol coinciden con resultados previamente obtenidos con otros insectos. Por ejemplo, Deletre *et al.* (2019), estudiando la actividad repelente del geraniol en el mosquito vector de la malaria, *Anopheles gambiae*, encontraron que la capacidad repelente del geraniol a

altas concentraciones fue similar en mosquitos susceptibles y repelentes a piretroides.

Otro resultado de importancia del presente trabajo tuvo que ver con el efecto de potenciación del geraniol en la actividad repelente del DEET. Este efecto se manifestó cuando la presencia del monoterpeno incrementó la repelencia del DEET a 100 % en ambas colonias de ninfas en estudio. En este trabajo combinamos ambas moléculas en una proporción 1:1 en bajas concentraciones (1,25 mg mL⁻¹), por lo tanto, son necesarios nuevos estudios para conocer cuáles podrían ser las proporciones y concentraciones de ambas moléculas que resulten en una mayor eficacia repelente sobre *T. infestans*.

El fenómeno de resistencia a insecticidas por parte de insectos con importancia sanitaria trae aparejado un doble desafío, ya que no solo es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas, sino que, además, esta tarea debe ser realizada de manera perentoria. Los principales resultados obtenidos en este trabajo con respecto a la actividad repelente y letal del geraniol en ninfas de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides, sumados a la actividad de potenciación en la letalidad de la deltametrina y eficacia repelente del DEET, proyectan a esta molécula como candidata para ser estudiada en futuros trabajos de investigación. Debido a su efecto de potenciación, la posibilidad de combinar el geraniol con deltametrina y/o DEET podría tener el resultado beneficioso de disminuir las concentraciones de estas moléculas sintéticas y, con esto, lograr una reducción del impacto negativo al medio ambiente y una reducción sustancial en los costos de los tratamientos.

CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos por primera vez la actividad repelente y letal del geraniol en ninfas de quinto estadio de *T. infestans* susceptibles y resistentes a piretroides. También, el geraniol demostró tener un importante efecto de potenciación sobre la letalidad de la deltametrina y la capacidad de repelencia de la DEET. Este trabajo constituye un primer paso para futuras investigaciones que tengan como principal objetivo, por ejemplo, incrementar el conocimiento sobre los mecanismos de letalidad y repelencia presentes en el geraniol.

Conflicto de intereses. Los autores declaran no tener algún conflicto de interés que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

Contribuciones de autoría. CR Validación y revisión bibliográfica, MD Diseño de bioensayos, NSD Diseño de bioensayos, GM Análisis de datos, GS Análisis de datos y escritura, RIRV Escritura y edición final, MD Escritura y edición final.

Recursos financieros: el trabajo se llevó adelante con fondos aportados por un proyecto de la Universidad Arturo Jauretche, código del proyecto: 80020200100025UJ.

REFERENCIAS

- Barnard, D. R., & Xue, R.-D. (2004). Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochierotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 726–730. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.726>
- Busvine, J. R. (1957). *A critical review of the techniques for testing insecticides*. Commonwealth Institute of Entomology.
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: Structure and function* (5th ed). Cambridge University Press.
- Chen, W., & Viljoen, A. M. (2010). — A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, 76(4), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Choochote, W., Chaithong, U., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Tuetun, B., Champakaew, D., & Pitasawat, B. (2007). Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78(5), 359–364. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.02.006>
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Dadé, M., Zeinsteger, P., Bozzolo, F., & Mestorino, N. (2018). Repellent and lethal activities of extracts from fruits of chinaberry (*Melia azedarach* L., Meliaceae) against *Triatoma infestans*. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 158. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00158>
- Dadé, M. M., Daniele, M. R., Machicote, M., Errecalde, J. O., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2020). First report of the lethal activity and synergism between deltamethrin, amitraz and piperonyl butoxide against susceptible and pyrethroid-resistant nymphs of *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology*, 218, 107986. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107986>
- De la Vega, G. J. (2016). Bases fisiológicas de la distribución de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas [tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5973_DelaVega.pdf
- Deletre, E., Martin, T., Duménil, C., & Chandre, F. (2019). Insecticide resistance modifies mosquito response to DEET and natural repellents. *Parasites & Vectors*, 12(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3343-9>
- Gaire, S., Lewis, C. D., Booth, W., Scharf, M. E., Zheng, W., Ginzal, M. D., & Gondhalekar, A. D. (2020). Bed bugs, *Cimex lectularius* L., exhibiting metabolic and target site deltamethrin resistance are susceptible to plant essential oils. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 169, 104667. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104667>
- Gaire, S., Zheng, W., Scharf, M. E., & Gondhalekar, A. D. (2021). Plant essential oil constituents enhance deltamethrin toxicity in a resistant population of bed

- bugs (*Cimex lectularius* L.) by inhibiting cytochrome P450 enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 175, 104829. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104829>
- Germano, M. D., & Picollo, M. I. (2018). Stage-dependent expression of deltamethrin toxicity and resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 55(4), 964–968. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy017>
- Giatropoulos, A., Papachristos, D. P., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Polissiou, M. G., Emmanouel, N., & Michaelakis, A. (2012). Evaluation of bioefficacy of three *Citrus* essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitology Research*, 111(6), 2253–2263. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3074-8>
- Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S. L., Bhattacharyya, A., & Benelli, G. (2016). Eugenol, α -pinene and β -caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. *Parasitology Research*, 115(2), 807–815. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4809-0>
- Liu, Z., Li, Q. X., & Song, B. (2022). Pesticidal activity and mode of action of monoterpenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(15), 4556–4571. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00635>
- Moretti, A. N., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2013). Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) to 10 monoterpene alcohols. *Journal of Medical Entomology*, 50(5), 1046–1054. <https://doi.org/10.1603/ME12248>
- Mougabure-Cueto G., & Picollo, M. I. (2021). Insecticide resistance in triatomines. En A. Guarneri, & M. Lorenzo (Ed.), *Triatominae — The biology of Chagas disease vectors* (pp. 537–555). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-64548-9_19
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1994). Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatomines. *Acta Toxicológica Argentina*, 2, 29–32.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) & Organización Mundial de la Salud (OMS). (s. f.) *Enfermedad de chagas*. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>.
- Pavela, R. (2016). History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects: a review. *Plant Protection. Science*, 52, 229–241. <https://doi.org/10.17221/31/2016-PPS>
- Picollo, M. I., Vassena, C., Santo, P., Barrios, S., Zaidemberg, M., & Zerba, E. (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 42(4), 637–642. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.4.637>
- Remón, C., Lobbía, P., Zerba, E., Mougabure-Cueto, G. A. (2017). Methodology based on insecticide impregnated filter paper for monitoring resistance to deltamethrin in *Triatoma infestans* field populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 414–426. <https://doi.org/10.1111/mve.12252>

- Reynoso, M. N. N., Lucia, A., Zerba, E. N., & Alzogaray, R. A. (2020). The octopamine receptor is a possible target for eugenol-induced hyperactivity in the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(2), 627–630. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz183>
- Robertson, J. L., Russell, R. M., Preisler, H. K., & Savin, N. E. (2007). Bioassays with arthropods (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420004045>
- Sfara, V., Zerba, E. M., & Alzogaray, R. A. (2006) Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1), 89-94. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000100017>
- 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(3), 511–515. <https://doi.org/10.1603/033.046.0315>
- Tapondjou, A. L., Adler, C., Fontem, D. A., Bouda, H., & Reichmut, C. (2005) Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucaliptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research*, 41(1), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.01.004>