



**UNSAM**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE  
**SAN MARTÍN**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN E INGENIERÍA AMBIENTAL

**Atractantes florales para *Aedes Aegypti* y su incorporación  
en formulaciones de matrices sólidas**

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y  
Tecnología Mención Química

**por: Lic. Santiago Miguel von Oppen**

**Directores: Dra. Paola A. González Audino & Dr. Héctor M.  
Masuh**

San Martín, Buenos Aires

9 de Octubre de 2017

## RESUMEN

El mosquito de *Aedes aegypti* prolifera casi exclusivamente en áreas urbanas. Este hábito sumado a la preferencia de las hembras por ingerir sangre humana lo convierten en un perfecto vector de muchas enfermedades, entre las que se encuentran: el dengue, la fiebre amarilla, la chikunguña y el zika. Algunas de las metodologías recomendadas para el control de este mosquito hacen un uso intensivo de insecticidas, con posibles consecuencias ambientales, de salud y de selección de resistencia del insecto. El presente trabajo de tesis explora los efectos de los compuestos volátiles de plantas sobre el comportamiento de mosquitos adultos de la especie *Ae. aegypti*. Los resultados aquí obtenidos podrían ser incorporados en planes de manejo integrado de bajo impacto ambiental para esta especie.

Durante este trabajo se realizó un “screening” inicial, para determinar la preferencia del mosquito adulto hacia plantas comúnmente presentes en el entorno doméstico. Las plantas que presentaron una preferencia mayor fueron: *Lobularia maritima*, *Plectranthus neochilus*, *Euryops pectinatus*, *Senecio madagascariensis* y *Tagetes patula*. Estas plantas fueron posteriormente evaluadas en un olfatómetro con el objetivo de determinar si dicha preferencia es mediada, aunque sea en parte, por estímulos olfativos. Las plantas con flores que resultaron ser atractantes en el olfatómetro fueron: *L. maritima*, *E. pectinatus* en hembras como en machos y *S. madagascariensis* sólo en machos.

Como parte de este trabajo se realizaron ensayos con punto-final toxicológicos, evaluando un cebo compuesto por las flores cortadas de las plantas que resultaron atractantes en combinación con un insecticida tóxico por ingestión (imidacloprid). En hembras se observó una mayor mortalidad en presencia de *L. maritima* y *E. pectinatus*, mientras que en machos en presencia de *L. maritima*, *E. pectinatus* y *S. madagascariensis*.

Además se determinó la composición de los volátiles de aquellas plantas con flores que presentaron una mayor preferencia en el olfatómetro. Los cuales se extrajeron por medio de una fibra de microextracción y se analizaron en un CG-EM. Aquellos compuestos volátiles identificados y disponibles comercialmente fueron evaluados en el olfatómetro en “Y” en diferentes concentraciones resultando atractantes: (+)- $\alpha$ -pineno y acetofenona en hembras y 1-noneno en machos.

Las inflorescencias cortadas de *L. maritima* mostraron un efecto atractante en el olfatómetro hacia ambos sexos. Se identificaron los compuestos volátiles de las inflorescencias, por medio de una fibra de microextracción y su posterior análisis en un CG-EM. Los compuestos identificados y disponibles fueron evaluados en el olfatómetro. Ambos sexos tuvieron una respuesta comportamental positiva hacia acetofenona. Además se determinó y cuantificó la ingesta de néctar de las inflorescencias de *L. maritima* por parte de *Ae. aegypti* adultos.

A partir de los compuestos activos identificados se formularon discos de estearina

o parafina con distintas concentraciones de 1-noneno o acetofenona, que se combinaron con un insecticida (imidacloprid) para ser evaluados en ensayos con punto-final toxicológico. El efecto attractante de los discos formulados con acetofenona fue la misma para ambos sexos. El 1-noneno mostró un efecto attractante para ambos sexos, observándose en los machos un umbral de respuesta a menores concentraciones que en las hembras.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la posibilidad del uso de compuestos volátiles emitidos por plantas con flor como attractantes de mosquitos adultos para ser incorporados en trampas combinadas con un insecticida.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito inhabits almost exclusively urban areas. The female's marked preference for human blood-feeding turns her into an efficient vector of mosquito borne diseases, such as: Dengue Fever, Yellow Fever, Chikungunya and Zika. Traditional mosquito control methods are pesticide intensive, which may cause problems to the environment, the population's health and cause mosquito resistance to pesticides. This research focuses on the effects of plant volatile compounds on adult mosquito behavior, with the aim of gaining insights that could be applied in an integrated management of mosquitoes, with a low environmental impact.

An initial screening was performed to assess the adult mosquito's preference to plants commonly present in the domestic environment. The plants to which mosquitoes showed the highest preference were: *Lobularia maritima*, *Plectranthus neochilus*, *Euryops pectinatus*, *Senecio madagascariensis* and *Tagetes patula*. Further assays, with the previously mentioned plants, were performed in an olfactometer, to determine if olfactory cues were involved in the mosquitoes' attraction towards the plants. The plants that proved to be attractive in the olfactometer were: *L. maritima*, *E. pectinatus* in females; and *L. maritima*, *E. pectinatus* and *S. madagascariensis* in males.

Flower cuttings were tested as bait in a toxic end-point bioassay, which included a pesticide (imidacloprid). An increased mortality was observed in females with the cuttings of the following plants: *L. maritima* and *E. pectinatus*; and in males a higher mortality was observed with *L. maritima*, *E. pectinatus* and *S. madagascariensis*.

The compositions of the volatile compounds of the plants with flowers that proved attractant in the olfactometer were established by extracting them with a microextraction fiber and analyzing them in a GC-MS. The volatile compounds that were identified and were also available, were tested in the olfactometer. The volatile compounds that were attractant to females were: (+)- $\alpha$ -pinene and acetophenone; and only 1-nonene was attractant to males.

Cuttings of *L. maritima*'s inflorescences were attractant to both genders in the olfactometer. The volatile compounds emitted by the cuttings was established. The volatile compounds were identified by microextracting them with a fiber and analyzing them in a GC-MS. The identified volatile compounds that were commercially available were tested in the olfactometer. Both genders had a positive behavioral response to acetophenone. The ingestion of nectar from the inflorescences of *L. maritima*, by adult *Ae. aegypti*, was determined and quantified.

Disks made from stearin or paraffin, with different amounts of 1-nonene or acetophenone, were formulated. They were also tested as baits, with a pesticide (imidacloprid), in a toxic end-point bioassay. The disks made from both materials, with 1-nonene or acetophenone, proved to be attractant to mosquitoes of both genders. The attraction threshold to 1-nonene was at a lower concentration in males than in

females.

The results that were obtained through this research, suggest that it is possible to use plant volatile compounds and plant cuttings as mosquito attractants which could be included as bait in mosquito traps.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. González Audino por haberme permitido participar en el trabajo de esta tesis. También por introducirme en el mundo de la investigación, con sus desafíos y oportunidades que allí se presentan.

Al Dr. Masuh, que aparte de haber contruibuido como director de esta tesis, por su actitud abierta y directa para considerar propuestas relacionadas a este trabajo.

A la Dra. Licastro, por su afectiva disposición de ayudarme en todo lo que podía.

Al Dr. Zerba por haber estado siempre disponible y compartir su experimentado punto vista ante cualquier duda surgida.

A Laura Harburguer, mi compañera de escritorio, que presencié de primera mano mis éxitos y frustraciones. Prestando siempre un oído y dando valiosos consejos.

A mis compañeros de trinchera: Paula González, Cecilia Naspi, Mariel Slodowicz y Agustín Álvarez Costa. Con quienes compartí mi día a día durante el trabajo de tesis.

A Fernando Asenjo por facilitar el material experimental para los ensayos.

A Emilia Seccacini por explicarme los manejos de la cría de mosquitos en el insectario.

A Claudia Vassena y a Raúl Alzogaray, por haber estado disponibles para consultas específicas, relacionadas al trabajo de esta tesis.

A Luciana Salomón, del “Instituto de Botánica Darwinion”, por haber contribuido en la indentificación de las especies de plantas.

A Susana Mulet, por haber facilitado la limpieza de los lugares de trabajo.

A Mirta Rinaldi por realizar el aspecto administrativo de los recursos.

A Marina Leguizamón por haber facilitado fotocopias y encuadernamientos.

A mis compañeros de almuerzo: Mónica Germano, Lizzy Ortega, Valeria Sfara, Alejandro Lucía, Gastón Mougabure Cueto, Gonzalo Roca Acevedo y Ariel Tolosa, por haber hecho divertidos e interesante los mediodías.

A María Inés Pícollo por su actitud cálida y simpática.

A mis compañeros del CIPEIN: Laura Juan, Georgina Fronza, Ariadna Moretti, Noel Reynoso, Mariano Cáceres, Federico Galassi y Pablo Santo Orihuela con los que mi experiencia no hubiera sido la misma.

# Índice general

<b>Índice de tablas</b>	<b>VIII</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. El mosquito <i>Aedes aegypti</i> . . . . .	1
1.1.1. Distribución . . . . .	1
1.1.2. Biología de <i>Ae. aegypti</i> . . . . .	5
1.2. La problemática de la enfermedad de la fiebre del dengue . . . . .	9
1.2.1. Situación del dengue en las Américas . . . . .	11
1.3. Interacción mosquito-planta . . . . .	13
1.3.1. Alimentación por ingesta de azúcar en el mosquito adulto . . . . .	13
1.3.2. Estímulos vegetales y la preferencia de alimentación de mosquitos	15
1.4. Semioquímicos vegetales de mosquitos . . . . .	18
1.4.1. Origen de los semioquímicos vegetales . . . . .	19
1.4.2. Estudios en mosquitos con volátiles vegetales . . . . .	20
1.4.3. Técnicas de recolección de volátiles para la identificación de semioquímicos . . . . .	20
1.4.4. Evaluación del potencial atrayente de un compuesto volátil con olfatómetro . . . . .	22

1.4.5. Plantas cuyos volátiles fueron analizados y posteriormente probados en bioensayos . . . . .	23
1.5. Control de insectos de bajo impacto ambiental . . . . .	24
1.5.1. Tipos de trampa . . . . .	25
1.5.2. Ventajas de las trampas para mosquitos cebadas con semioquímicos . . . . .	25
1.5.3. Formulaciones de liberación controlada . . . . .	26
<b>2. Objetivos</b>	<b>30</b>
2.1. Objetivo general de la tesis . . . . .	30
2.2. Objetivos individuales . . . . .	30
<b>3. Materiales</b>	<b>31</b>
3.1. Material Biológico. Cría de <i>Ae. aegypti</i> en laboratorio . . . . .	31
3.2. Plantas utilizadas en los ensayos . . . . .	31
3.3. Compuestos químicos . . . . .	33
3.4. Construcción del olfatómetro en “Y” . . . . .	34
<b>4. Métodos</b>	<b>38</b>
4.1. Estudios comportamentales con plantas con flores . . . . .	38
4.1.1. Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores . . . . .	38
4.1.2. Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro . . . . .	41
4.2. Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico . . . . .	42
4.2.1. Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental . . . . .	42
4.2.2. Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores . . . . .	43
4.3. Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores . . . . .	44

4.3.1.	Recolección de volátiles de plantas con flores e identificación química . . . . .	44
4.3.2.	Síntesis de 1-noneno . . . . .	46
4.4.	Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores . . . . .	49
4.4.1.	Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores . . . . .	49
4.5.	Estudios sobre inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	50
4.5.1.	Evaluación de atracción por inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> en el olfatómetro . . . . .	50
4.5.2.	Identificación de compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	51
4.5.3.	Bioensayo de atracción hacia compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	53
4.5.4.	Determinación de una posible nectarización por <i>Ae. aegypti</i> de la flor de <i>L. maritima</i> presente en su inflorescencia. Cuantificación de ingesta de fructosa . . . . .	55
4.6.	Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico . . . . .	58
4.6.1.	Formulación de compuestos atractantes de mosquitos en parafina y estearina . . . . .	58
4.6.2.	Ensayo de atracción de mosquitos por formulados sólidos con punto-final toxicológico . . . . .	59
<b>5.</b>	<b>Resultados</b>	<b>62</b>
5.1.	Estudios comportamentales con plantas con flores . . . . .	62
5.1.1.	Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores . . . . .	62
5.1.2.	Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro . . . . .	62
5.2.	Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico . . . . .	64

5.2.1.	Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental . . . . .	64
5.2.2.	Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores . . . . .	64
5.3.	Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores . . . . .	66
5.3.1.	Recolección de volátiles de plantas con flores e identificación química . . . . .	66
5.3.2.	Identificación de volátiles de <i>E. pectinatus</i> . . . . .	67
5.3.3.	Identificación de volátiles de <i>S. madagascariensis</i> . . . . .	67
5.3.4.	Identificación de volátiles de <i>L. maritima</i> . . . . .	69
5.3.5.	Síntesis de 1-noneno . . . . .	69
5.4.	Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores . . . . .	72
5.4.1.	Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores . . . . .	72
5.5.	Estudios sobre inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	75
5.5.1.	Evaluación de atracción por inflorescencia cortadas de <i>L. maritima</i> en el olfatómetro . . . . .	75
5.5.2.	Identificación de compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	75
5.5.3.	Bioensayo de atracción hacia compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	78
5.5.4.	Determinación de una posible nectarización por <i>Ae. aegypti</i> de la flor de <i>L. maritima</i> presente en su inflorescencia. Cuantificación de ingesta de fructosa . . . . .	82
5.6.	Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico . . . . .	83
5.6.1.	Formulación de compuestos atractantes de mosquitos en parafina y estearina . . . . .	83
5.6.2.	Ensayo de atracción de mosquitos por formulados sólidos con punto-final toxicológico . . . . .	84

<b>6. Discusión de Resultados</b>	<b>87</b>
6.1. Estudios comportamentales con plantas con flores . . . . .	87
6.1.1. Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores . . . . .	87
6.1.2. Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro . . . . .	88
6.2. Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico . . . . .	89
6.2.1. Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental . . . . .	89
6.2.2. Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores . . . . .	90
6.3. Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores . . . . .	91
6.3.1. Recolección de volátiles de plantas con flores e identificación química . . . . .	91
6.3.2. Identificación de volátiles de <i>E. pectinatus</i> . . . . .	92
6.3.3. Identificación de volátiles de <i>S. madagascariensis</i> . . . . .	92
6.3.4. Identificación de volátiles de <i>L. maritima</i> . . . . .	93
6.3.5. Síntesis de 1-noneno . . . . .	94
6.4. Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores . . . . .	95
6.4.1. Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores . . . . .	95
6.5. Estudios sobre inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	97
6.5.1. Evaluación de atracción por inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> en el olfatómetro . . . . .	97
6.5.2. Identificación de compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	98
6.5.3. Bioensayo de atracción hacia compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	100

6.5.4.	Determinación de una posible nectarización por <i>Ae. aegypti</i> de la flor de <i>L. maritima</i> presente en su inflorescencia. Cuantificación de ingesta de fructosa . . . . .	101
6.6.	Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico . . . . .	103
6.6.1.	Formulación de compuestos atractantes de mosquitos en parafina y estearina . . . . .	103
6.6.2.	Ensayo de atracción de mosquitos por formulados sólidos con punto-final toxicológico . . . . .	103
<b>7.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>105</b>
7.1.	Conclusiones particulares . . . . .	105
7.1.1.	Estudios comportamentales con plantas con flores . . . . .	105
7.1.2.	Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico . . . . .	105
7.1.3.	Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores . . . . .	106
7.1.4.	Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores . . . . .	106
7.1.5.	Estudios sobre inflorescencias cortadas de <i>L. maritima</i> . . . . .	107
7.1.6.	Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico . . . . .	108
7.2.	Conclusión general . . . . .	108

# Índice de tablas

1.1. Factores que influyen en la velocidad de liberación. . . . .	28
5.1. Respuesta de elección de hembras de <i>Ae. aegypti</i> en un olfatómetro de dos vías hacia las plantas con flores seleccionadas sin contacto visual. . . . .	63
5.2. Respuesta de elección de machos de <i>Ae. aegypti</i> en un olfatómetro de dos vías hacia las plantas con flores seleccionadas sin contacto visual. . . . .	64
5.3. Porcentaje de supervivencia de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> adultos expuestos a distintas concentraciones de imidacloprid, con o sin sacarosa, a distintos tiempos de exposición. . . . .	65
5.4. Mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> hembras por cebo tóxico en presencia o ausencia de plantas con flores. . . . .	66
5.5. Mortalidad de <i>Ae. aegypti</i> machos por cebo tóxico en presencia o ausencia de plantas con flores. . . . .	67
5.6. Compuestos volátiles de <i>E. pectinatus</i> identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros y por comparación del IR medido para la columna DB-5ms contra una biblioteca. . . . .	68
5.7. Compuestos volátiles de <i>S. madagascariensis</i> identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros y por comparación del IR calculado para la columna DB-5ms contra una biblioteca. . . . .	68
5.8. Compuestos volátiles de <i>L. maritima</i> identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros y por comparación del IR calculado para la columna DB-5ms contra una biblioteca. . . . .	69
5.9. Intensidades relativas y absolutas de los fragmentos del espectro de masas, generados por IE, del compuesto desconocido. . . . .	70
5.10. Patrón de fragmentación del compuesto desconocido. Principales fragmentos del espectro de masa. . . . .	70

5.11. Respuesta en olfatómetro de hembras de <i>Ae. aegypti</i> hacia los compuestos presentes en flores atractantes. . . . .	73
5.12. Respuesta en olfatómetro de machos de <i>Ae. aegypti</i> hacia los compuestos presentes en flores atractantes. . . . .	74
5.13. Compuestos volátiles de inflorescencias de <i>L. maritima</i> cortadas, identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros; comparación del IR medido para la columna DB-5ms contra una biblioteca. . . . .	77
5.14. Intensidades relativas y absolutas de los picos del espectro de masa, generados por IE del 3,4-epitiobutilnitrilo. . . . .	78
5.15. Intensidades relativas y absolutas de los picos del espectro de masa, generados por IE del 4,5-epitiopentilnitrilo. . . . .	79
5.16. Patrones de fragmentación de 3,4-epitiobutilnitrilo y de 4,5-epitiopentilnitrilo. Principales fragmentos del espectro de masa de ambos compuestos. . . . .	79
5.17. Cantidad de fructosa promedio en: mosquitos ayunados, alimentados con <i>L. maritima</i> y alimentados con sacarosa. Comparación de los resultados del blanco de alimentación, de la alimentación con <i>L. maritima</i> y la alimentación con sacarosa entre sí. . . . .	83
5.18. Mortalidad de hembras de <i>Ae. aegypti</i> por efecto de discos de estearina conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. . . . .	84
5.19. Mortalidad de machos de <i>Ae. aegypti</i> por efecto de discos de estearina conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. . . . .	85
5.20. Mortalidad de hembras de <i>Ae. aegypti</i> por efecto de discos de parafina 55°C conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. . . . .	85
5.21. Mortalidad de machos de <i>Ae. aegypti</i> por efecto de discos de parafina 55°C conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. . . . .	85

# Índice de figuras

1.1. Estado de erradicación <i>Ae. aegypti</i> , abril de 1962. . . . .	2
1.2. Distribución histórica de <i>Ae. aegypti</i> en Argentina. . . . .	3
1.3. Distribución del mosquito de <i>Ae. aegypti</i> y las zonas con riesgo de transmisión de dengue en el año 2013. . . . .	4
1.4. Esquema con escala del ciclo biológico de <i>Ae. aegypti</i> . . . . .	5
1.5. Fotografía de huevos de <i>Ae. aegypti</i> . . . . .	6
1.6. Fotografía de larvas en el cuarto estadio larval de <i>Ae. aegypti</i> . . . . .	6
1.7. Fotografía de pupas de <i>Ae. aegypti</i> . . . . .	7
1.8. Imagen de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> adultos de ambos sexos . . . . .	8
1.9. Ciclo de la transmisión del virus del dengue en la naturaleza. . . . .	10
1.10. Proceso de extracción del SHS, desorción en CG y posterior análisis del EM. . . . .	22
1.11. Esquema de olfatómetro en “Y”. . . . .	23
1.12. Esquema del olfatómetro de puerto dual. . . . .	23
3.1. Cría de mosquitos . . . . .	32
3.2. Fotografía del olfatómetro desarmado . . . . .	35
3.3. Componentes para la introducción de estímulos olfativo en el olfatómetro. . . . .	36
3.4. Esquema del olfatómetro y sus componentes externos. . . . .	37
4.1. Jaula de prueba para el ensayo de preferencia de posada. . . . .	39
4.2. Presentación de las plantas en el área experimental . . . . .	40

4.3. Distribución espacial de los recipientes en la jaula de ensayo. . . . .	44
4.4. Vaso de 250 ml con el estímulo vegetal. . . . .	45
4.5. Extracción de volátiles de plantas evaluadas en el olfatómetro . . . .	47
4.6. Equipo CG-EM Shimadzu, modelo: GCMS-QP5050 . . . . .	48
4.7. Mecanismo de la reacción de deshidratación de un alcohol primario. .	49
4.8. Toma de muestra de volátiles de las inflorescencias cortadas de <i>L. ma-</i> <i>ritima</i> . . . . .	54
4.9. Reacción de Seliwanoff para la determinación espectrofotométrica de ketosas . . . . .	56
4.10. Viales de vidrio con estándares de la reacción de Seliwanoff con fructosa.	57
4.11. Disco de parafina . . . . .	59
4.12. Recipiente de polietileno con el disco de parafina . . . . .	60
4.13. Área experimental para evaluar los discos con compuesto volátil incor- porado. . . . .	61
5.1. Promedio de mosquitos posados y probando cada planta . . . . .	63
5.2. Mecanismo de la deshidratación de un alcohol primario . . . . .	69
5.3. Respuesta de elección de ambos sexos de <i>Ae. aegypti</i> en el olfatómetro hacia inflorescencias de <i>L. maritima</i> . . . . .	76
5.4. Respuesta de elección de hembras de <i>Ae. aegypti</i> en el olfatómetro en “Y” hacia seis compuestos volátiles identificados en <i>L. maritima</i> . . . .	80
5.5. Respuesta de elección de machos de <i>Ae. aegypti</i> en el olfatómetro en “Y” hacia seis compuestos volátiles identificados en <i>L. maritima</i> . . . .	81
6.1. Muestra el desplazamiento híbrido de la carga positiva entre los car- bonos adyacentes. . . . .	94
6.2. Mecanismos y los productos de la hidrólisis de glucosinolatos. . . . .	99
6.3. Esquema de los aparatos bucales de culícidos hembras y machos. . . .	102

# Lista de abreviaturas

CAR	carboxen
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
°C	grados Celcius
CG	cromatografía gaseosa
CIPEIN	Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas
CITEDEF	Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa
DC	dengue clásico
DENCO	Dengue Control
DHS	espacio de cabeza dinámico
DVB	divinilbenceno
EAG	electroantenograma
EM	espectro de masas
g	gramos
mg	miligramos
µg	microgramos
HR	humedad relativa
hs.	horas
IE	ionización electrónica
IQ	ionización química
IR	índice de retención
LD	dosis letal
l	litros
ml	mililitros
µl	microlitros
m	metros
cm	centímetro
mm	milímetros
µm	micrómetro
nm	nanómetro
m/z	La m se refiere al número de masa molecular y z al número de carga del ion
min	minutos
OMS	Organización Mundial de la Salud (WHO)
OPS	Organización Panamericana de la Salud

$t_R$	tiempo de retención
PDMS	polidimetilsiloxano
SHS	espacio de cabeza estático
SPME	microextracción en fase sólida
SSD	síndrome de shock por dengue
T	temperatura

# 1 Introducción

## 1.1. El mosquito *Aedes aegypti*

### 1.1.1. Distribución

Los mosquitos son artrópodos de gran interés para la salud pública, pertenecientes a la Clase Insecta, Orden Diptera, y a la Familia Culicidae. Actualmente *Aedes aegypti* es una especie del subgénero *Stegomyia*. Hubo un intento para reclasificarlo a género entre 2004 y 2005 [146], pero el cambio de nombre a *Stegomyia aegypti* ha sido muy debatido, resultando en la utilización de la nomenclatura anterior por la mayoría.

*Aedes aegypti* (Linnaeus) es originario del continente africano, donde se encuentran tres formas o subespecies: *Ae. aegypti aegypti*, *Ae. aegypti queenslandensis* y *Ae. aegypti formosus*. Las dos primeras habitan en el continente americano, son de hábitos domésticos y poseen características taxonómicas similares. El mosquito *Ae. aegypti* fue introducido en América durante las primeras exploraciones europeas en el siglo XVI. Es una especie tropical y subtropical que se encuentra en todo el mundo, por lo general limitada a las latitudes comprendidas entre 35° norte y 35° sur, correspondientes a una isoterma de 10°C en invierno. A principios del siglo XX llegó a estar presente en todos los países del continente americano, con excepción de Canadá. En la década de 1920 se iniciaron las primeras actividades de control del vector. En 1947, los países miembros de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) decidieron iniciar una campaña para erradicar al mosquito. La campaña fue exitosa, logrando hacia el año 1962 la erradicación del vector de 18 países del continente y de varias islas del Caribe. La Figura 1.1 muestra la dispersión en el continente americano del mosquito *Ae. aegypti* para abril de 1962 [154]. Posteriormente, debido a problemas financieros, políticos, técnicos y administrativos, se inició la reinfestación en muchos de los países que lo habían erradicado. Para 1991 sólo quedaban cuatro países del continente libres del mosquito: Bermuda, Chile, Islas Caimán y Uruguay [154]. Hasta la fecha, los dos únicos países del continente americano que no detectaron la presencia del mosquito de *Ae. aegypti* son Canadá y Chile [97].

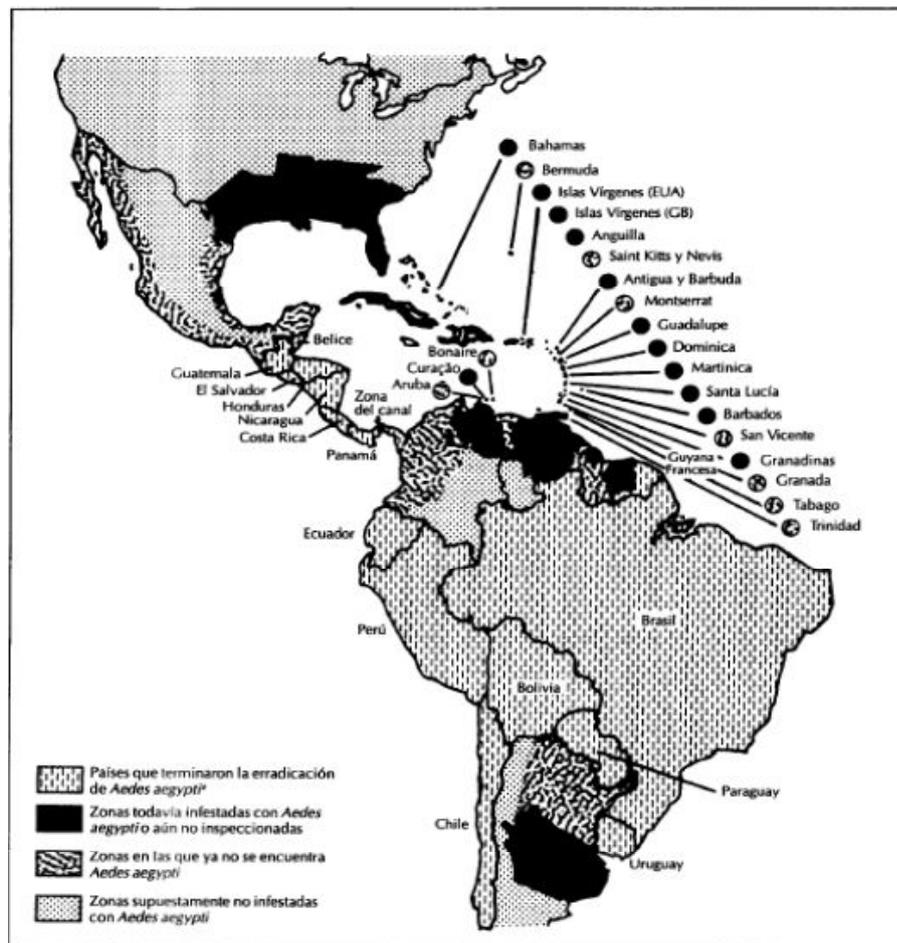


Figura 1.1: Estado de erradicación *Ae. aegypti*, abril de 1962.

## Distribución de *Ae. aegypti* en Argentina

*Ae. aegypti* estuvo ampliamente extendido sobre el territorio de la República Argentina durante la primera mitad del siglo XX, abarcando principalmente las provincias del Norte y Centro del país: Jujuy, Salta, Formosa, Misiones, Corrientes, Chaco, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, La Rioja, Santa Fe, Entre Ríos, Córdoba y Buenos Aires. Como resultado de sucesivas campañas de control, en 1963 ejecutadas por el Ministerio Nacional de Salud Pública y en 1965 a cargo del Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud, *Ae. aegypti* se consideró erradicado de la superficie Argentina [175]. En el año 1975 el mosquito fue reintroducido en Brasil, y a finales de los años 80 se detectó la reinfestación en Misiones (Posadas y Puerto Iguazú) y en Formosa (Clorinda y Puerto Pilcomayo). En el año 1991 se encontró al mosquito de *Ae. aegypti* en Quilmes (Buenos Aires) y en 1994 en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán. En 1995 fue confirmada su presencia en Córdoba, en la Ciudad de Buenos Aires y en las provincias de Corrientes, Chaco, Entre Ríos y Santa Fé [26]. Para el año 2000 su detección más occidental se encontraba en la provincia de Mendoza (Departamento de Guaymallén), y su presencia más austral correspondía a la provincia de La Pampa (Santa Rosa), extendiéndose su distribución hacia el Oeste y el Sur en relación con su rango de distribución histórica. En la Figura 1.2 se pueden observar las detecciones del mosquito *Ae. aegypti* en distintos años [50]: El año 1916 fue la primera epidemia sospechada de dengue. El año 1986 corresponde a la primera detección después de la erradicación. Durante el periodo del año 1991 al 1999 la detección en sucesivas provincias muestran su expansión sobre el territorio nacional.

La Figura 1.3 muestra la distribución conocida del mosquito hacia el año 2013 en la Argentina, junto con los lugares en donde fue observado esporádicamente [50].

En el año 2012 fue detectado en la provincia de Neuquén (Neuquén), correspondiendo esa ciudad al punto más austral y occidental en que se lo haya encontrado hasta la fecha [73].

Las poblaciones de *Ae. aegypti* en los principales centros urbanos del país (Buenos Aires y Córdoba), fueron probablemente reintroducidas a través de las principales rutas terrestres internacionales desde Bolivia y Brasil [175].

### 1.1.2. Biología de *Ae. aegypti*

*Ae. aegypti* es una especie casi exclusiva de entornos urbanos y su preferencia de alimentación sanguínea es predominantemente antropofílica. Se ha adaptado para desarrollar sus estadios juveniles en fuentes de agua artificiales y naturales en el entorno doméstico. Es un insecto holometábolo, cuyo desarrollo ontogénico dura entre 7 y 13 días, y se completa en un medio acuático (estadios de huevos, larvas y pupas) y en uno aéreo (adulto) [125]. La Figura 1.4 muestra el ciclo biológico del mosquito [3]:



Figura 1.2: Distribución histórica de *Ae. aegypti* en Argentina. En el año 1916 sucedió la primera epidemia que presentaba síntomas parecidos al dengue; 1986 fue el año en el que se volvió a detectar después de haber sido erradicado; el tercer mapa muestra la reinfestación en los años sucesivos.

## Huevos

Los huevos son depositados sobre el nivel agua, de manera individual, en las paredes de recipientes con agua limpia y quieta. Tienen un tamaño aproximado de 1 mm y son blancos al momento de la postura, oscureciéndose en el transcurso de alrededor de tres horas hasta llegar a un color negro brillante. La Figura 1.5 es una fotografía de huevos de mosquito de más de tres horas después de haber sido puestos [7].

En condiciones óptimas de temperatura y humedad el desarrollo del embrión se completa en dos o tres días. La mayoría de los huevos eclosiona rápidamente al quedar sumergidos bajo el agua, otros después de haber sido mojados varias veces. Los huevos no sumergidos son capaces de sobrevivir varios meses, llegando a resistir hasta un año. La tolerancia a la desecación es uno de los principales obstáculos en el control del mosquito, ya que permite su supervivencia durante condiciones climáticas adversas facilitando la reinfestación durante condiciones climáticas favorables. Por eso, la eliminación de adultos y larvas no evita la reinfestación, mientras que haya huevos residuales a la espera de condiciones favorables para reactivarse [125].

## Larva

Luego de eclosionar los huevos, las larvas pasan por cuatro estadios larvales, incrementando su largo de 1 mm a los 6 o 7 mm finales, a través de tres mudas. Se alimentan de materia orgánica suspendida en el agua y/o depositada en las paredes y fondo del recipiente donde habitan.

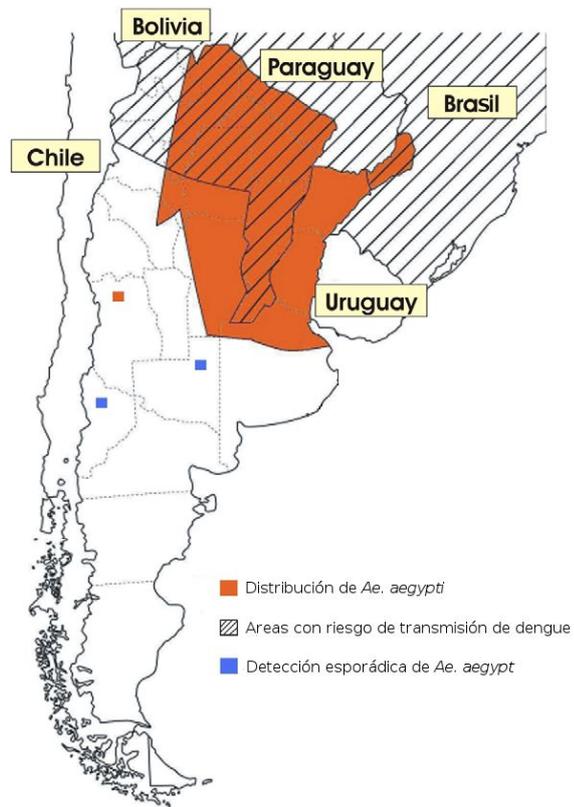


Figura 1.3: Distribución del mosquito de *Ae. aegypti* y las zonas con riesgo de transmisión de dengue en el año 2013.

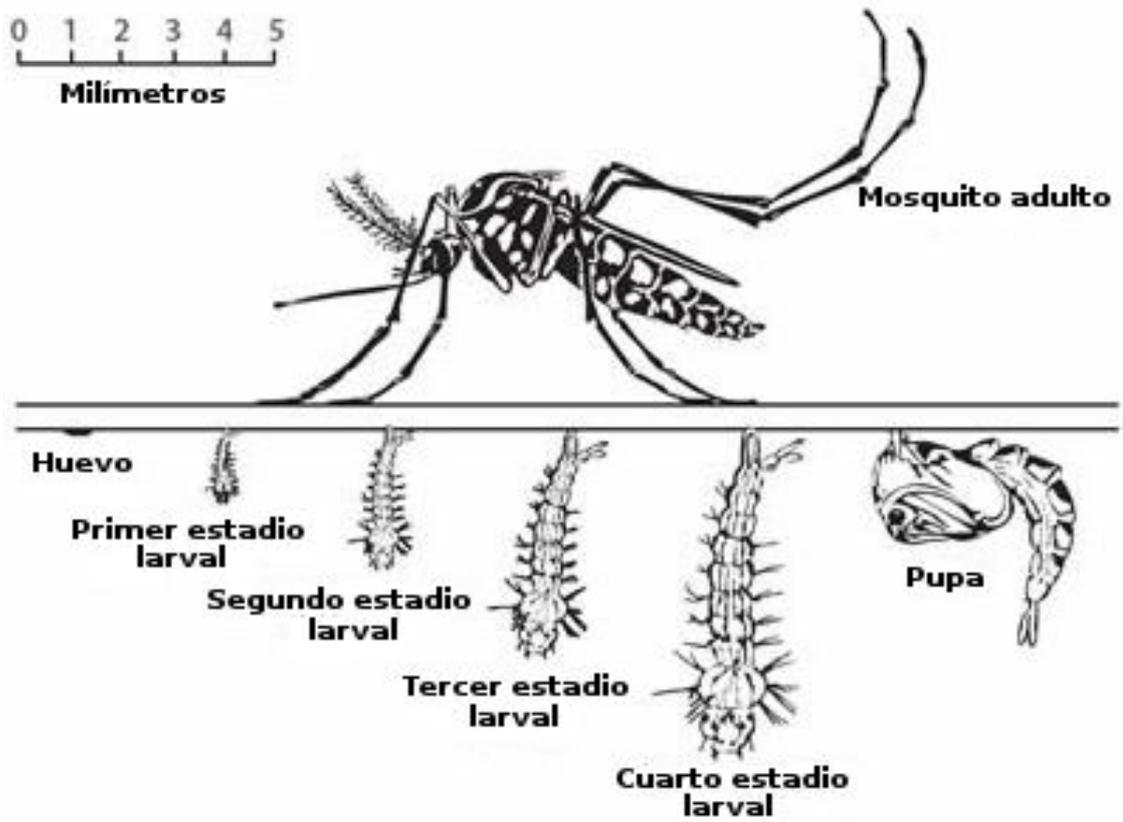


Figura 1.4: Esquema con escala del ciclo biológico de *Ae. aegypti*.



Figura 1.5: Fotografía de huevos de *Ae. aegypti*.



Figura 1.6: Fotografía de larvas en el cuarto estadio larval de *Ae. aegypti*.

La velocidad de desarrollo larval está condicionada por la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas, con temperaturas entre 25 y 29°C, puede completarse el período desde la eclosión hasta la formación de la pupa en 5 a 7 días. El desarrollo de la larva es más rápido durante los tres primeros estadios. El cuarto es más lento, debido a que las larvas experimentan un mayor incremento de peso y tamaño que en los estadios anteriores. La Figura 1.6 es una fotografía de *Ae. aegypti* en su cuarto estadio larval [8]. Bajo condiciones adversas (baja temperatura, escasez de alimento, hacinamiento), el estadio larval puede prolongarse por varias semanas [125].

Igual que en otras larvas de mosquitos, la larva de *Ae. aegypti* está compuesta por nueve segmentos, siendo la cabeza y el tórax ovoides. El órgano utilizado para respirar, el sifón, es más corto que en la mayoría de otros culícidos. Comparado con especies relacionadas, la posición de reposo de las larvas varía según el género: *Aedes* mantiene una posición casi vertical en relación con la superficie del agua, *Anopheles* lo hace en una posición paralela mientras que *Culex* reposa formando un ángulo agudo.

## Pupas

Las pupas representan la última etapa del ciclo acuático. Aunque no se alimentan, son muy activas y se desplazan por todo el medio. Reaccionan rápidamente a estímulos lumínicos y de percusión. En la base del tórax tienen un par de tubos respiratorios o trompetas que les permiten respirar en la superficie del agua. La Figura 1.7 muestra a dos pupas de *Ae. aegypti* reposando debajo de la superficie de agua, donde se pueden ver los tubos respiratorios [9]. El estadio de pupa dura de 1 a 3 días en condiciones favorables (entre 28 y 32°C), aunque puede alargarse, dependiendo de las condiciones externas [125].

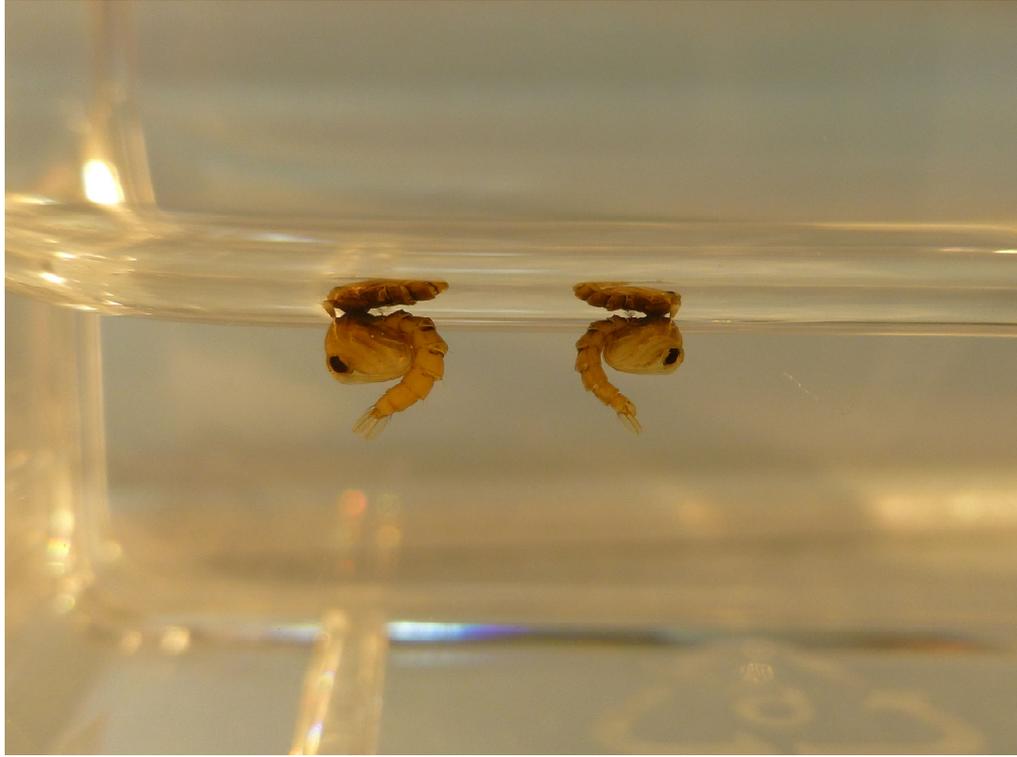


Figura 1.7: Fotografía de pupas de *Ae. aegypti*.

## Adultos

El mosquito adulto emergido es de color negro. Presenta en el dorso del tórax patrones blancos-plateados formados por escamas claras, dispuestas en forma de una “lira”. Los segmentos tarsales de las patas poseen un anillado característico. El macho se diferencia de la hembra por poseer las antenas plumosas y los palpos más largos [154]. Las características físicas y las diferencias entre ambos sexos pueden apreciarse en la Figura 1.8 [71]. Luego de emerger de la pupa el adulto permanece en reposo por varias horas con el fin de endurecer el exoesqueleto y las alas. Este endurecimiento por un lado les brinda protección y por otro les permite el vuelo. A partir de 24 hs. después de emerger pueden aparearse. Durante el apareamiento, el macho sujeta el ápice del abdomen de la hembra con su terminalia e inserta su edeago dentro del receptáculo genital, inseminándola. El esperma es almacenado en la espermateca de la hembra y es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra produzca durante su vida. La hembra sólo se aparea con éxito una vez en su vida [154].

Las hembras son las únicas capaces de alimentarse de sangre, con una marcada preferencia por sangre humana, indispensable como fuente de proteína para la formación de huevos. La alimentación sanguínea sucede principalmente durante el amanecer o al anochecer. Es usual que después de cada alimentación sanguínea se desarrolle una camada de huevos. En caso de que el mosquito no haya podido alimentarse hasta re-

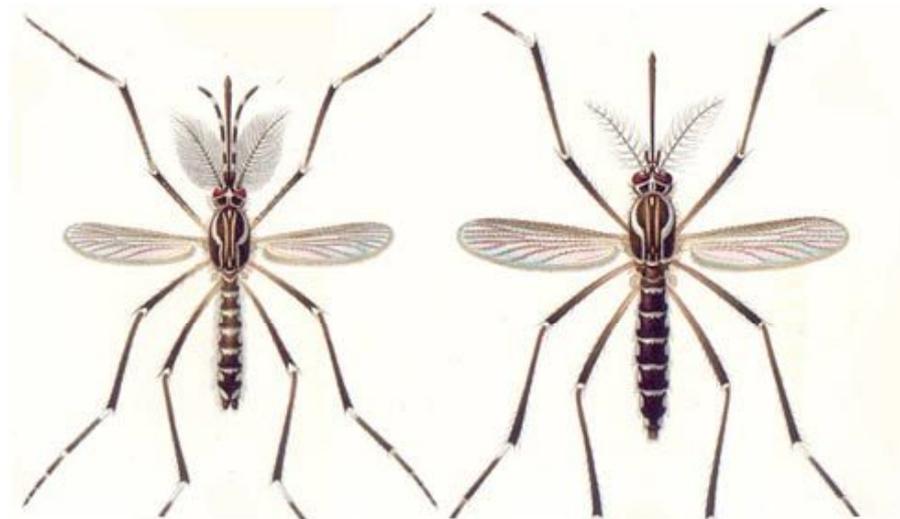


Figura 1.8: Imagen de mosquitos *Ae. aegypti* adultos de ambos sexos, el de la izquierda corresponde a un macho, el de la derecha a una hembra.

pleción, puede volver a ingerir antes de la postura. La oviposición comúnmente sucede al atardecer. Los huevos son depositados por las hembras grávidas en recipientes oscuros, a pocos centímetros del agua. Tienen a distribuir los huevos de una misma camada entre varios recipientes [125].

Las piezas bucales de los machos no permiten chupar sangre; aunque en general tienen la misma forma que la de las hembras, tienen algunos estiletes reducidos o ausentes. Los machos se alimentan únicamente de azúcares provenientes en la naturaleza principalmente de néctar floral y frutas dañadas. Las hembras también pueden cubrir sus necesidades energéticas con azúcar, pero no son capaces de esta manera de generar huevos [60].

## 1.2. La problemática de la enfermedad de la fiebre del dengue

El dengue es una infección viral aguda y sistémica, producida por un flavovirus. Es actualmente la enfermedad más importante entre las virales transmitidas por artrópodos, y constituye una prioridad en salud pública en los países tropicales y subtropicales. El dengue está presente en más de 100 países, en los cinco continentes, en donde habitan alrededor de 2500 millones de personas. Una vez expuesta la persona al virus, los síntomas más comunes del dengue - dolores de cabeza, fiebre alta, náuseas, dolores musculares y de articulaciones - se manifiestan entre los 3-14 días después de la infección. En una minoría de los casos, la enfermedad se desarrolla en dengue hemorrágico: una manifestación grave, con riesgo de vida, que presenta he-

morragias junto con niveles bajos de plaquetas en la sangre. Se reportan anualmente 500 mil casos de dengue hemorrágico, de los cuales 25 mil resultan fatales. El dengue se transmite principalmente en los entornos domésticos y urbanos, de zonas tropicales y subtropicales.

Son varios los factores que influyen en el crecimiento de la problemática del dengue para la salud pública mundial: cambio climático, crecimiento poblacional en zonas urbanas de manera rápida y desorganizada, provisión limitada de agua potable que fuerza el almacenamiento desordenado en recipientes comúnmente descubiertos, deficiente recolección de residuos, que genera un gran número de criaderos en forma de recipientes descartable. A los factores anteriores hay que sumarle la alta movilidad de las poblaciones humanas, un control deficiente del vector y la falta de una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad [154].

La fiebre del dengue es causada por una arbovirus con cuatro serotipos, conocidos como: DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4 [54]. El contraer uno de los serotipos genera inmunidad de por vida contra el mismo, pero no proporciona inmunidad cruzada contra los tres restantes. Al infectarse con otro serotipo es posible que se manifieste la forma grave de la enfermedad, el dengue hemorrágico. Este fenómeno es causado por una respuesta infrecuente: una ampliación que se traduce en una significativa replicación viral y en el aumento de la viremia. Las personas que habitan en zonas endémicas corren el riesgo de contraer la enfermedad del dengue hasta cuatro veces, aumentando el riesgo de contraer dengue hemorrágico con cada infección sucesiva. Desde hace tres décadas, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido y recomendado las siguientes clasificaciones del dengue: fiebre hemorrágica por dengue o dengue hemorrágico con o sin síndrome de shock por dengue. La utilidad de la clasificación ha sido cuestionada por una serie de publicaciones hechas en los últimos años, por considerarla rígida, excesivamente dependientes de análisis de laboratorio, excluyentes de los afectados por otras formas graves de dengue; como la encefalitis, la miocarditis o hepatitis grave, y poco práctica para el manejo clínico de los enfermos. Para corregir estas obvias deficiencias, la OMS auspició el estudio internacional llamado DENCO (Dengue Control), con el propósito de poder clasificar mejor a la enfermedad y poder identificar los signos de alarma útiles para mejorar el manejo de los casos. Del estudio surgió la propuesta de clasificar la enfermedad en forma binaria: dengue y dengue grave [82].

El virus es adquirido por la hembra de *Ae. aegypti* al ingerir sangre de una persona o animal virémico. En un ciclo que dura entre 10 y 14 días, llamado periodo de incubación extrínseca, el virus se multiplica dentro de la hembra, concentrado en sus glándulas salivales. Posteriormente cuando la hembra pica a una persona sana para alimentarse de sangre inyecta simultáneamente su saliva, que contiene un anestésico que también actúa como un lubricante para las partes móviles de la boca y como anticoagulante, junto con una carga viral, infectando a la persona en el caso de que no sea inmune. La hembra del mosquito será transmisor de la enfermedad el resto de su vida [15]. Animales silvestres sirven como reservorio del virus y otras especies del género *Aedes* lo transmiten en zonas no urbanas. Esto permite la rápida reaparición

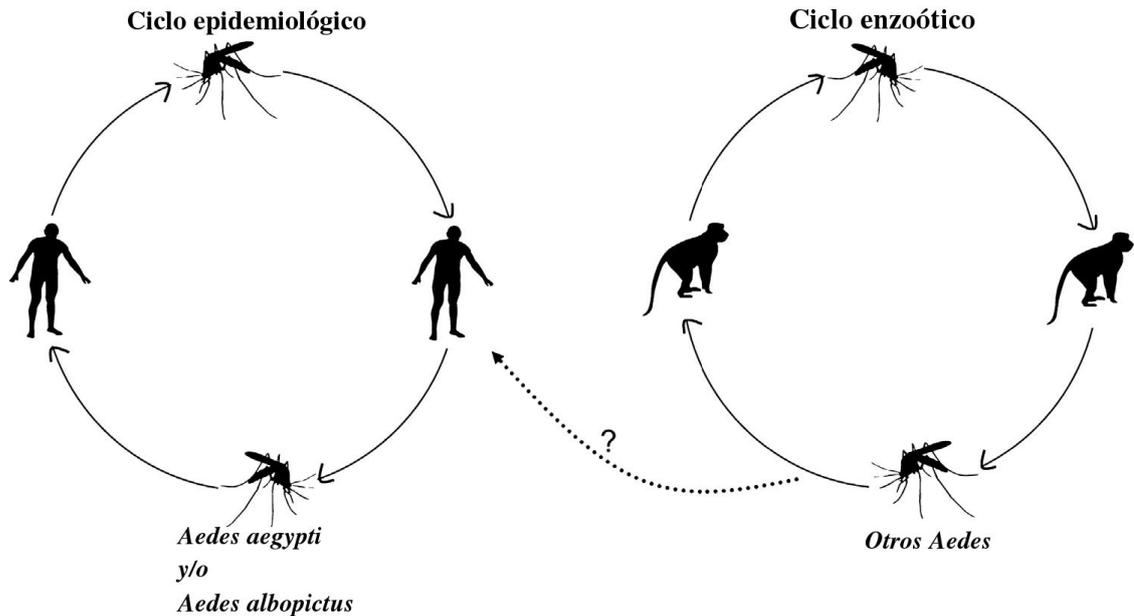


Figura 1.9: Ciclo de la transmisión del virus del dengue en la naturaleza.

de la enfermedad, en zonas urbanas, si las condiciones ambientales lo permiten. La Figura 1.9 muestra el ciclo epidemiológico, la transmisión del virus de una persona al mosquito y del mosquito a otra persona [182]. También muestra un ciclo enzoótico, que ocurre principalmente entre animales con otros *Aedes*, donde esporádicamente queda una persona infectada.

El dengue es comúnmente transmitido por mosquitos del género *Aedes* en zonas urbanas (ciclo epidemiológico) y ocasionalmente puede presentarse en primates no-humanos (ciclo enzoótico) [182].

La infección por dengue puede manifestarse de varias formas, desde ser asintomática a causar una enfermedad de variada intensidad. Los primeros síntomas aparecen después de haberse cumplido el periodo de incubación intrínseca de 5 a 7 días, aunque la mayoría de las personas enfermas no presentan síntomas [14].

El cuadro clínico del dengue clásico (DC) se manifiesta por fiebre alta, dolor de cabeza, dolor retro-orbital, vómitos, náusea, mialgias y frecuentemente erupciones maculopapulares. Sumado a lo anterior, muchos pacientes perciben cambios en el gusto. La enfermedad tiene tendencia a ser más leve en los niños que en los adultos y puede ser confundida con influenza, sarampión o rubeola. La fase aguda tiene una duración de hasta una semana y la sigue un período de convalecencia de 1 a 2 semanas, que se caracteriza por debilidad, malestar y anorexia. El tratamiento es casi exclusivamente sintomático.

Una de las variedades de la enfermedad más graves es el dengue hemorrágico, que se manifiesta con un cuadro febril, manifestaciones hemorrágicas, hemoconcentración

y trombocitopenia. El síndrome de shock por dengue (SSD) está definido como dengue hemorrágico aunado a alteraciones de la hemostasia, a un débil pulso acelerado, etc. [1].

### 1.2.1. Situación del dengue en las Américas

El virus del dengue fue aislado por primera vez en América en el año 1942 [158]. A pesar de ello, se sabe que hubo grandes brotes en la zona del Caribe desde la primera mitad del siglo XVII, y también hubo epidemias continentales o pandemias a lo largo de los siglos XIX y XX.

El DEN-1 fue reintroducido en la región a fines de los años setenta, provocando una pandemia que afectó a El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Estados Unidos, Colombia, Guyana Francesa, Guyana, Surinam y Venezuela, y las islas del Caribe. Durante la década de 1980 el DEN-1 se expandió por Sudamérica, provocando brotes en Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay y Perú, países en donde hacía varios años no se había detectado la enfermedad o que jamás la habían notificado. La primera gran epidemia documentada del siglo XX de dengue hemorrágico ocurrió en Cuba en 1981, con 158 muertes registradas durante un periodo de tres meses [158, 74]. El número de casos de dengue hemorrágico aumentó notablemente durante los años noventa y en 1994 el DEN-3 fue introducido en la región. Este serotipo no se registraba en el continente americano, su reaparición fue recibida con preocupación debido a que la población urbana de la región carecía de inmunidad para este serotipo. [158]

### Situación del dengue en la Argentina

El primer brote conocido de dengue en nuestro país se produjo en 1916. Fue introducido desde Paraguay, afectando las provincias de Corrientes y Entre Ríos; durante los siguientes ochenta años la enfermedad no fue registrada en Argentina [21].

En 1998 un brote epidémico del serotipo DEN-2 en el Chaco salteño, cuyo epicentro estaba en la ciudad de Tartagal, provocó varios cientos de casos, todos de dengue clásico. El virus había sido introducido desde Bolivia y el pico epidemiológico se dio en el mes de mayo.

En los años siguientes empezaron a circular por la frontera noroeste argentina otros serotipos aparte del DEN-2: el DEN-1 y el DEN-3, generándose brotes epidémicos reducidos, hasta que en el año 2004 se produjo un brote extenso, con miles de casos de DEN-3, en las ciudades de Salta, Salvador Maza, Orán, Tartagal, Embarcación, Aguaray y Pichanal. A pesar de que circularon distintos serotipos durante los años sucesivos (condición necesaria para la aparición de DH), no fueron registrados casos de esta forma clínica.

Debido a las inundaciones que se dieron en Tartagal en 2006 la situación se agravó, tanto en el noroeste argentino como en Iguazú-Misiones, produciéndose en ambos sitios brotes de paludismo y de dengue.

En el año 2007, los casos confirmados de dengue en Argentina ascendieron a 192, de los cuales uno resultó en dengue hemorrágico [164].

En el año 2009 fueron informados 25989 casos de dengue por el Ministerio de Salud de Argentina, que han sido confirmados por análisis de laboratorio o por nexos epidemiológicos. El número de casos importados llegó a 1911, de los cuales 890 fueron confirmados y 1021 eran sospechosos. Las provincias que resultaron más afectadas fueron: Chaco, Catamarca, Salta y Jujuy, llegándose a documentar tres casos de DH (dos muertes), dos fallecimientos por SSD, uno en Chaco y uno en Catamarca [123]. Los casos registrados en el país correspondieron al serotipo DEN-1 [13].

En las primeras trece semanas del año 2016, se han notificado al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud un total de 47741 casos de dengue en las veinticuatro provincias, entre los que se encuentran los confirmados, probables, en estudio y descartados. De ellos, 22940 corresponden a casos probables o confirmados por laboratorio o nexo epidemiológico en dieciséis jurisdicciones del país. Hasta el momento han sido reportados cinco pacientes fallecidos con sospecha de dengue: 2 en CABA, 1 en la provincia del Chaco y 2 en la provincia de Salta [52].

Actualmente no se dispone de una vacuna efectiva y segura contra el virus del dengue, por lo que se vuelve imprescindible el control de la enfermedad a través de la eliminación del vector.

Los programas de saneamiento ambiental y los de reducción de criaderos de *Ae. aegypti* son aspectos fundamentales dentro de las estrategias delineadas para el control del mosquito, aunque no han mostrado ser suficientes para reducir los índices de infestación, por lo cual durante los últimos 40 años, el control del mosquito ha dependido de métodos químicos [154, 152].

El enfoque de este trabajo se basa en el desarrollo de nuevas herramientas de control de bajo impacto ambiental, elevada eficacia y especificidad, ya que, como se expresó anteriormente, la manera más eficaz de prevenir la transmisión o de controlar una epidemia es reducir la exposición de la población al mosquito.

### 1.3. Interacción mosquito-planta

Los azúcares vegetales son la principal fuente de alimentación de los mosquitos. El néctar floral es la fuente más conocida, pero también los pueden obtener de nectarios extraflorales, frutas dañadas, tejidos vegetales dañados e intactos. La alimentación vegetal provee una fuente de alimentación importante durante toda la vida adulta

a los mosquitos de ambos sexos. En el caso de los machos, es su única fuente de alimentación [105].

Los principales constituyentes del néctar son el disacárido sacarosa y los monosacáridos fructosa y glucosa. En algunas familias vegetales el néctar está predominantemente compuesto por sacarosa, en otras por fructosa y glucosa. También hay familias de plantas con proporciones de azúcares variables [173]. Hay aminoácidos presentes en los néctares de la mayoría de las plantas, pero en cantidades insuficientes para el desarrollo de los huevos [22].

La alimentación sanguínea es llevada a cabo únicamente por las hembras y su principal fin es la producción de huevos, aunque existen evidencias de que también sirve como fuente de alimentación. La ingesta de sangre es indispensable para la reproducción de especies anautógenas. Los mosquitos ingieren más que su propio peso en sangre; el peso de la alimentación sanguínea puede llegar a ser hasta cuatro veces el peso de la hembra [124].

### **1.3.1. Alimentación por ingesta de azúcar en el mosquito adulto**

El rol y la importancia de la alimentación con fuentes de azúcares vegetales (néctares y jugos frutales) en el metabolismo de los mosquitos empezó a estudiarse en la década de 1960 [17]. La alimentación con azúcar tiene una influencia significativa en la capacidad de dispersión vectorial y contrariamente a lo que se creía, tanto machos como hembras la necesitan durante toda su vida adulta.

Los machos y las hembras de mosquitos se alimentan de azúcares vegetales, siendo el azúcar el único alimento de los mosquitos machos, independientemente de la especie [183, 62, 68]. Ambos géneros suelen visitar por primera vez una planta poco después de la emergencia. Los machos requieren azúcar a intervalos frecuentes para mantener sus reservas de energía con el fin de unirse a los enjambres de apareamiento nocturnos [184]. Las hembras consumen azúcar entre las tomas de sangre, cuando están digiriendo la sangre o cuando están grávidas.

Aún no se ha dilucidado la relación de la alimentación con azúcar con la alimentación por sangre y las opciones de comportamiento asociados con la selección de una u otra fuente de alimento. La relevancia y frecuencia de cada tipo de ingesta dependerá de la especie de mosquitos y de su estado fisiológico. La mayoría de los mosquitos necesitan azúcares vegetales para ejecutar varias funciones esenciales, incluyendo el vuelo y la reproducción, factores que inciden en su capacidad vectorial. El azúcar no utilizado es convertido en glicógeno y en lípidos. La alimentación con néctar es más importante para especies zoofílicas que para las especies antropofílicas. Estas últimas son capaces de convertir en mayor proporción la sangre ingerida en reservas de energía [124, 179, 58].

A pesar de que las hembras de *Ae. aegypti* pueden completar el ciclo biológico alimentándose únicamente con sangre durante su etapa adulta, sólo durante las primeras 36 hs. después de haber eclosionado responden con mayor preferencia hacia fuentes de azúcar, que hacia huéspedes sanguíneos. Antes de emprender la alimentación con sangre, las hembras buscan recomponer sus reservas energéticas con azúcar, debido a que las fuentes de azúcar son más frecuentes y presentan menos riesgos que la alimentación sanguínea. La ingesta previa de azúcar, les permite maximizar la producción de huevos después de cada picadura [60]. Se ha demostrado en *Ae. aegypti* y en *An. gambiae* que el privar a las hembras de alimentación de azúcar, aumenta su respuesta comportamental hacia hospederos sanguíneos y reduce su susceptibilidad hacia repelentes [67, 30, 61].

En varias especies de mosquitos la oferta de azúcares resulta indispensable para completar el ciclo biológico; en otras, compromete la fecundidad y la longevidad del mosquito. Si bien la disponibilidad de sacarosa aumenta su longevidad y su capacidad reproductiva [124, 171], *Ae. aegypti* puede completar su ciclo sin consumir fuentes de azúcar, e incluso el consumo en condiciones específicas puede reducir su fecundidad [162].

Las fuentes comunes de azúcar en la naturaleza son el néctar floral y el extrafloral [62, 134, 33, 72], la ligamaza [68] y las frutas maduras [88].

Un parámetro comúnmente utilizado para determinar la reciente ingestión de néctar por el mosquito, es la presencia de fructosa en el abdomen. Debido a que la fructosa no es un producto del metabolismo del mosquito, su detección es el resultado de una ingesta aún no digerida. Existen dos métodos colorimétricos probados para hacer el análisis cualitativo y cuantitativo de fructosa en mosquitos: el de Van Handel con antrona fría [172, 150] y el test de Seliwanoff con resorcinol [127].

### **1.3.2. Estímulos vegetales y la preferencia de alimentación de mosquitos**

Las primeras interacciones entre mosquitos y compuestos volátiles provenientes de vegetales fueron reportadas en 1907 [94]. Varios factores están implicados en la naturaleza en la atracción y la orientación de los mosquitos hacia plantas vasculares. Los estímulos de plantas son, en proporciones variables, visuales, táctiles, gustativos y olfativos [176]. Todas estas señales ayudan a los insectos a reconocer las posibles fuentes de recompensa e involucran una compleja interacción de procesos físicos, químicos y neuronales [32].

Entre los factores más destacados para este reconocimiento se encuentran el aroma floral y del néctar [144]. La presencia de néctar y el color de las flores [104, 85] le indican al mosquito la ubicación, abundancia, calidad de néctar y el polen, dando como resultado la atracción de los insectos hacia la planta. Sandholm y Price [155]

observaron que los mosquitos en el campo eran atraídos hacia flores de color claro con fragancias distintas. También se observó la respuesta positiva de mosquitos hacia volátiles florales en ausencia de estímulos visuales [85]. Lo que sugiere que los volátiles actúan como atractantes de largo alcance, incluso antes de que hubiera contacto visual. La elección de flores con claves visuales parecidas, pero con volátiles diferentes es sólo posible en la cercanía, con contacto visual, por lo cual el olor parece ser el principal responsable de la atracción de largo alcance, con señales visuales que jugarían un papel en el corto alcance [85].

Los mosquitos, a pesar de ser una especie generalista a la hora de alimentarse con néctar, muestran una clara preferencia por ciertas especies de plantas. La predilección es independiente de la disponibilidad y sólo visitan ciertas plantas cuando la oferta de azúcar está restringida [184, 60, 61]. Estudios de campo mostraron que los mosquitos se alimentan de un número muy acotado de plantas [17, 16, 119]. En 1964 Abdel-Malek evaluó la aptitud como fuente de alimento para *Anopheles sergentii* en 40 especies de plantas provenientes de un oasis con una gran presencia del mosquito. Sólo tres especies vegetales resultaron capaces de servir como fuente de alimento [16]. *Anopheles gambiae* es atraído hacia trece especies de plantas en Kenia [107] y cinco en Burkina Faso, entre las que se encuentra la planta de *Parthenium hysterophorus* [128]. La atracción hacia *P. hysterophorus* es peculiar debido a que si bien la planta resultó ser altamente atractante, no dispone de cantidades de azúcares medibles y además el tiempo de supervivencia de los mosquitos que visitan la planta no difiere significativamente con los que no ingirieron sacarosa [107]. Las explicaciones más probables son: a) que los mosquitos obtienen algún otro beneficio además del alimenticio al visitar la planta, b) los mosquitos tienen una preferencia innata hacia cierta característica desconocida de la planta. Algunas especies de mosquitos tropicales incluso han sido únicamente recolectadas sobre una o dos especies de plantas, sugiriendo un comportamiento que se acerca a la monofagia.

Aparentemente, la especificidad está basada, en parte, en claves visuales, debido a que la mayoría de las flores tienen los mismos colores claros. Pero dentro de las flores claras, hay algunas que son preferidas particularmente, sugiriendo que los compuestos orgánicos volátiles tienen un efecto determinante en la elección final de las flores.

En el caso de *Ae. aegypti* se ha demostrado por medio de electroantenogramas, que es capaz de reconocer compuestos volátiles comúnmente relacionados con las flores como forma de localizar las fuentes de néctar [87].

Los mosquitos también se pueden alimentar de néctares extraflorales y de ligamzas excretadas por homópteros; pero sigue siendo una incógnita el cómo los insectos voladores son capaces de identificar estas fuentes.

Las claves visuales cobran mayor importancia en algunos casos. Los mosquitos son capaces de localizar y ser atraídos hacia plantas que no ofrecen néctar floral ni extrafloral, y alimentarse de los fluidos internos [61, 105, 157, 118].

## Evidencias de atracción de mosquitos hacia plantas en condiciones de laboratorio.

En 1949 se capturaron Anofelinos en una habitación cebada con frutas [23]. En otro estudio, basándose en la frecuencia de posada en jaulas con hembras y machos de *Culex quinquefasciatus*, se observó que el azúcar no refinada era más atractante que el azúcar refinada, y esta última resultó ser marginalmente más atractiva que el agua. La miel también resultó ser altamente atractante, especialmente hacia hembras [112].

En un estudio hecho por Vargo en 1982, se indujo la extensión de la proboscis en hembras de *Ae. aegypti* a distancias cortas con extractos de *Solidago canadenses* en diclorometano, de *Asclepias syriaca* en metanol; y de miel en éter [174]. Debido a que la miel emite sustancias volátiles similares a las florales [112, 63, 49], ensayos de olfatómetro hacia volátiles de miel y de miel reforzados con los de la flor del manzano [77, 78, 79] mostraron que mosquitos hembras de *Ae. aegypti* y *Cx. Nigripalpus* tienen un comportamiento de vuelo positivo hacia las fuentes de olor anteriormente mencionadas. Resultados parecidos se obtuvieron en *An. gambiae* frente a volátiles de miel [63]; extractos en éter y etanol de miel y de *Cyanthum laeve* resultaron atractantes hacia *An. quadrimaculatus* y *Ae. aegypti* [61, 178]. Ensayos de laboratorio con volátiles vegetales y florales han demostrado la atracción de *Ae. aegypti* hacia extractos de *A. syriaca* [174] y de *An. gambiae* hacia *P. hysterophorus*, *Ricinus communis* y *Bidens pilosa* [128]. Se probaron en *Culex pipiens pipiens* extractos de *L. vulgare*, *A. millefolium*, *A. syriaca* y *S. canadensis* en un olfatómetro-túnel de viento tipo “Y”, en donde sólo el extracto de *A. syriaca* resultó ser significativamente atractante. El análisis del espacio de cabeza de *A. syriaca* por CG-EM mostró que el alcohol fenético y el alcohol bencílico eran los compuestos más abundantes. Sin embargo, una mezcla sintética de ambos compuestos no resultó atractante en ensayos de olfatómetro [110, 131].

La planta de *Silene otites* es oriunda de Europa Norte y Central, y fue elegida para ser estudiada debido a que es polinizada por mosquitos. Se evaluó la respuesta electrofisiológica por medio de EAG, a los principales compuestos presentes en el espacio cabecal de *S. otites* en *Cx. pipiens pipiens*. Los 14 compuestos que dieron una respuesta electrofisiológica positiva se evaluaron posteriormente en bioensayos de comportamiento. El fenil acetaldéido y el alcohol fenético resultaron ser los más atractantes [87]. En *Ae. aegypti* los volátiles de *S. otites* mostraron respuesta por CG-EAG hacia varios compuestos, incluyendo acetofenona [87].

## Evidencia de atracción en ensayos de campo

Son escasos los estudios publicados sobre el uso de volátiles de origen vegetal como única fuente para atraer mosquitos en campo. Sin embargo, hay abundantes publicaciones sobre el uso de cebos tóxicos de azúcar que combinan el alimento con

un atractante de origen vegetal y sobre ensayos para determinar la preferencia de flores en campo [121].

Joseph [88] logró capturar mosquitos en campo de los siguientes géneros: *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Psorophra* y *Culiseta* usando manzanas, uvas, duraznos y melones dañados y/o sobremaduros.

En Los Países Bajos, se cubrieron plantas de *S. otites* en floración con una red que impedía la alimentación y el contacto visual del mosquito con la flor. Se observaron varios *Cx. pipiens pipiens* y *Culiseta annulata* posados sobre la red, del lado de la sombra de viento [31].

En California se usaron trozos de melón para cebar una trampa diseñada para hembras grávidas colocada al ras del suelo y una trampa tipo CDC “sin luz”. Se capturaron 761 hembras y machos de *Cx. Tarsalis* entre ambas trampas durante las noches que duró el ensayo. El número promedio de capturas por trampa/noche no fue reportado, con excepción de la primera noche cuando se capturaron 33,5 hembras y 35,5 machos por trampa cebada [147]. Las trampas tipo CDC son cilíndricas, en la parte superior tienen una fuente de luz para atraer a los mosquitos. Debajo de la misma se encuentra un ventilador que aspira a los insectos atraídos. Requiere de una batería para funcionar, la cual debe ser reemplazada cada 24 horas.

En Florida (EEUU), se probaron trampas tipo CDC no iluminadas cebadas con extractos de éter-solución salina de miel (la sal se usó para aumentar la polaridad de la fase acuosa y de esta manera aumentar la afinidad de los compuestos orgánicos a la fase de éter). También se probaron en las trampas tipo CDC los siguientes compuestos y combinaciones: fenol, 1-octanol, mezcla de fenol y 1-octanol o CO<sub>2</sub>. Las trampas cebadas con extracto de miel, fenol, y fenol-octanol capturaron cantidades parecidas de *Oc. taeniorhynchus* y de *Cx. nigripalpus*. Las trampas cebadas con CO<sub>2</sub> capturaron un número significativamente más alto de las especies de mosquitos previamente mencionados [93].

Se observaron frecuentes posadas y alimentación de *Ae. vexans* en *Asclepias syriaca*, aun cuando la presencia de la flor en el medio ambiente era baja. *Ochlerotatus trivittatus*, que comparte hábitat con *Ae. vexans*, visita también a *A. syriaca* aunque en menor medida, aún cuando su densidad en el entorno era mayor. Las flores de *A. syriaca* fueron evaluadas como atractante fitoquímico en trampas CDC sin luz en ensayos de campo. Se encontró que las trampas cebadas capturaron mayores cantidades de *Ae. vexans* de ambos sexos y de todos los estadios genotrópicos que las del blanco control. Durante el mismo ensayo, la captura promedio de *Oc. trivittatus* hembras fue similar a la de los blancos. La cantidad de adultos machos de *Oc. trivittatus* capturados en las trampas tipo CDC sin luz cebadas con *A. syriaca* fue mayor que las mismas trampas, pero no cebadas, usadas como blanco control. En el sitio y durante el ensayo, la principal especie tratando de picar humanos era *Oc. trivittatus*. Este comportamiento se puede explicar debido a que el mosquito *Oc. trivittatus* o bien tiene una mayor preferencia hacia humanos que hacia plantas nectarizables, o bien

porque su necesidad de ingerir azúcar es distinta a la de *Ae. vexans*.

La especificidad para atraer una especie de mosquito es un aspecto importante a considerar a la hora de desarrollar un formulado attractante a base de fitoquímicos para el monitoreo de poblaciones de mosquitos. Formulados que atraigan más especies de mosquitos tendrán una posibilidad de aplicación más amplia.

Müller *et al.* rociaron en campo una mezcla de sacarosa, colorante e insecticida sobre todas las plantas presentes de una especie, en la zona experimental. Cerca de las plantas dejaron trampas de luz. La intención fue evaluar la proporción de mosquitos que se alimentaban de la planta rociada cada día, lo que pudo ser evaluado al contar la cantidad de mosquitos con el abdomen coloreado que había en la trampa cada día. El insecticida garantizaba que los mosquitos que no ingresaban en la trampa el día que se habían alimentado de la planta rociada, no pudieran hacerlo en otros días y a través de ello, afectar los resultados. La sacarosa dentro de la mezcla, actuó como fagoestimulante [119, 122].

## 1.4. Semioquímicos vegetales de mosquitos

Los semioquímicos son compuestos químicos que funcionan como mensajeros entre organismos. Los semioquímicos se subdividen en aleloquímicos, si la interacción es interespecífica y en feromonas, si la interacción es intraespecífica. Los aleloquímicos se dividen a su vez nuevamente en tres subgrupos: Si el compuesto favorece tanto al emisor como receptor, es una sinomona; si el compuesto favorece al emisor, es una alomona; si favorece al receptor, es una kairomona [51].

### 1.4.1. Origen de los semioquímicos vegetales

Las plantas producen sustancias químicas volátiles como producto de sus procesos metabólicos naturales y éstos tienden a ser de naturaleza lipofílica, aunque algunos monoterpenoides y glucósidos oxigenados muestran una solubilidad considerable en agua. Estos compuestos tienen generalmente pesos moleculares menores a 250 m/z, un punto de ebullición por debajo de 340°C, entre 5 y 20 carbonos, y son una mezcla compleja de monoterpenos y sesquiterpenos, que son los principales constituyentes, fenoles aromáticos, cetonas, ésteres, alcoholes simples y compuestos sulfurados [156, 143, 137].

Son sintetizados *in situ* y almacenados en los tricomas glandulares, o *de novo* cuando la planta es atacada por un herbívoro [83, 133]. La síntesis de volátiles en la planta se lleva a cabo generalmente a través de rutas sintéticas comunes. Por ejemplo, los derivados de ácidos grasos parten de ácidos grasos insaturados formados por la vía de la lipooxigenasa [98] y los terpenoides formados por las via del mevalona-

to y la del fosfato de metileritriol [102, 55]. Los terpenos son el grupo más grande y estructuralmente diverso de compuestos [48]. Los compuestos volátiles específicos surgen de posteriores modificaciones de estos metabolitos secundarios [156, 143, 137]. La proporción de síntesis y liberación de compuestos volátiles vegetales es altamente dependiente de las condiciones ambientales, como la temperatura, presión, hora del día [113], como se pudo comprobar en un estudio con *S. otites*, cuyas emisiones de volátiles cambiaban según la hora del día y es polinizada por *Cx. pipiens pipiens* [86].

Los compuestos volátiles son emitidos por las flores y las partes vegetativas de la planta [96, 136]. Mientras que los volátiles de las partes florales han sido ampliamente estudiados, en especial su efecto en la atracción de polinizadores, los compuestos volátiles de la parte vegetal aún están siendo explorados, debido a su composición compleja y las diversas funciones que cumplen [96]. Se supone que los olores florales han evolucionado a partir de compuestos de defensa, como protección de las plantas contra el ataque de insectos fitófagos, hasta convertirse en semioquímicos de insectos: compuestos volátiles que indican la presencia de alimento, facilitando la polinización al guiar a los artrópodos hacia las flores mediante la asociación de la fragancia floral con una recompensa de néctar [96, 89]. A pesar de que el mosquito se sirve de los volátiles vegetales para ubicar las fuentes de néctar, son pocas las especies que son polinizados por ellos, convirtiendo a la mayoría de los mosquitos en ladrones de néctar. El néctar funciona de recompensar a los insectos que polinizan, llevando el polen de una flor a la otra. El mosquito, al no transportar polen, consume la recompensa para los insectos polinizadores, sin contribuir en la polinización. Por eso se lo denomina “ladrón de néctar”.

Los olores emitidos a partir de una fuente puntual se desplazan como paquetes de olores o pulsos a favor del viento hacia el insecto que los percibirá como resultado de la turbulencia del aire. Por lo tanto una orientación contra el viento es un requisito previo para la ubicación de un olor de una fuente puntual [39], y el resultado es un anemotaxis mediada por optometría [37]. La frecuencia de giros está determinada por la concentración de los olores en el paquete, y la frecuencia con la que los insectos se encuentran con estos paquetes está determinada por la velocidad del aire.

#### 1.4.2. Estudios en mosquitos con volátiles vegetales

Los estudios de las antenas de hembras de *Cx. pipiens pipiens* permitieron la identificación de sensillas que responden hacia una amplia variedad de terpenos, volátiles de hojas verdes, ésteres de ácidos grasos y compuestos varios. De las 36 neuronas examinadas, 19 eran casi específicas hacia dos de los terpenos bicíclicos con un grupo carbonilo: tujona y verbenona. Cuatro neuronas respondían hacia ambos terpenos, 2 hacia tujona y 4-metilciclohexanol; las 17 restantes eran de especificidad amplia. Sin embargo en ensayos de vuelo de mosquitos hacia terpenos bicíclicos no se observó orientación hacia estos compuestos [29]. En hembras de *Ae. aegypti* se detectaron dos sensillas que mostraban respuestas hacia varios aceites esenciales [100]. Cator-

ce compuestos volátiles extraídos del espacio cabeza de *S. otites* resultaron mostrar una respuesta electrofisiológica positiva en *Cx. pipiens pipiens*, de los cuales solamente cuatro resultaron ser atractantes en bioensayos [87]. Se observó atracción de *Cx. pipiens pipiens* en bioensayos con extractos de diclorometano de *A. syriaca*. Análisis posteriores mostraron que los principales componentes del extracto eran alcohol fenilético y alcohol benílico. Una mezcla de ambos componentes resultó en una respuesta atractante [110].

Estos ejemplos muestran la dificultad en predecir los efectos comportamentales de los compuestos volátiles, independientemente de si resultaron ser detectados por las sensillas de las antenas, tuvieron una respuesta electrofisiológica positiva o eran los principales constituyentes de un extracto atractante. La única manera de poder afirmar el efecto comportamental de un compuesto es a través de un bioensayo.

### 1.4.3. Técnicas de recolección de volátiles para la identificación de semioquímicos

El descubrimiento de la importancia de la interacción entre los volátiles vegetales con los insectos despertó un gran interés en la química, bioquímica, fisiología y ecología de estos compuestos. Esto ha llevado al desarrollo de varias técnicas con el fin de coleccionar y analizar estos volátiles [80, 114]. En donde la elección del método más apropiado para su colecta es dependiente del material vegetal investigado [170].

Los extractos de plantas con solventes han sido ampliamente usados para determinar su potencial de atracción hacia varias especies de mosquitos. Se han probado extractos hechos con un solvente [131] o con una serie de solventes [174, 85], para una gran variedad de plantas. Una ventaja de la extracción de compuestos con solventes es que permite, cambiando su polaridad, obtener todo el perfil de compuestos orgánicos de una planta. A pesar de ello, este método presenta una gran desventaja: los perfiles de compuestos obtenidos difieren de los compuestos volátiles emitidos por las plantas, que probablemente tengan una función importante en la interacción mosquito-planta. Este método además es susceptible a la presencia de impurezas presentes en el solvente.

Otro método utilizado para coleccionar los volátiles vegetales es la micro-extracción en fase sólida (SPME del inglés) de un espacio cabeza estático (SHS del inglés). Para realizar la SPME el espacio cabeza de la muestra es aislado para concentrar los volátiles. Luego se introduce una fibra recubierta con una película de un material afín a los compuestos volátiles presentes en el espacio cabeza. Los compuestos volátiles son transferidos desde el espacio aéreo y adheridos a la fibra, resultando en una extracción. Los compuestos en la fibra son desorbidos en el puerto de inyección de un cromatógrafo gaseoso (CG) y separados, y posteriormente son analizados en un espectrómetro de masas (EM). La cuantificación exacta con este método es imposible, debido a que la cantidad de un compuesto extraído no solamente depende de su

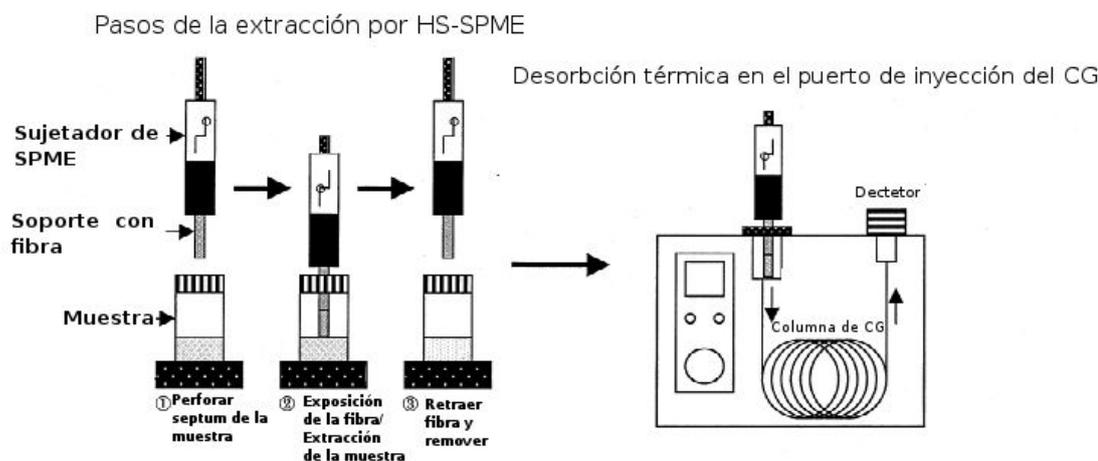


Figura 1.10: Proceso de extracción del SHS, desorción en CG y posterior análisis del EM.

concentración en la muestra y su afinidad con la fase de la fibra, sino también de las concentraciones y afinidades de los otros compuestos generando equilibrios entre la fibra y la fase aérea difíciles de cuantificar. Hay diversas fibras de SPME, con distintas películas adsorbentes, que tienen mayores afinidades por ciertas polaridades y pesos moleculares [170]. La cantidad de analito colectado depende del grosor de la película de la fibra y su constante de distribución. Este método tiene ventajas frente a la extracción con solvente: necesita un menor volumen de muestra; permite detectar compuestos a niveles de trazas y no requiere solventes. Las desventajas no son menores: no permite repetir la medición con la misma extracción; la cuantificación no es posible, ya que la adsorción sobre la fibra depende de la constante de distribución y el tiempo de extracción y el extracto obtenido no puede usarse posteriormente en ensayos biológicos [170]. La Figura 1.10 es un esquema de la extracción por SPME del espacio cabeza de una muestra y su posterior análisis en un CG-EM [90]. En este trabajo se introdujeron las flores o material vegetal en un vial de vidrio sellado y se colocó una fibra de SPME sin flujo de aire [131].

El método de espacio de cabeza dinámico (DHS en inglés) consiste en pasar una corriente de aire sobre la muestra. El flujo de aire va arrastrando a los volátiles a medida que se van liberando. En general, el DHS tiene varias ventajas sobre el SHS, entre las que se encuentran: mayor facilidad de colectar suficientes volátiles para su detección y determinación de la estructura; no genera cambios en la temperatura o humedad y reduce la acumulación de volátiles nocivos en el espacio cabeza [170]. Aun así este método está limitado por la adsorción incompleta de los compuestos orgánicos volátiles hacia las distintas matrices, que tienen afinidades diferentes hacia compuestos diferentes. Por ejemplo, el carbón activado es menos eficiente para adsorber aldehídos aromáticos, mientras que Tenax-TA y Super Q tienen una baja afinidad hacia compuestos de bajo peso molecular o muy polares. Para compensar esta limitación, se requiere el uso de dos o más matrices adsorbentes y así aumentar

el rango de los compuestos orgánicos adsorbidos.

#### 1.4.4. Evaluación del potencial attractante de un compuesto volátil con olfatómetro

Olfatómetro es un término genérico para equipos utilizados en observaciones de la respuesta comportamental de un individuo (en este caso: un mosquito) hacia estímulos olfativos. En el caso de los mosquitos, los olfatómetros son utilizados principalmente para medir comportamientos de atracción y de aversión hacia distintas sustancias volátiles. No existe un diseño universal de olfatómetro, por lo que los diseños son libremente adaptados según las necesidades y los recursos disponibles. A pesar de ello, existen dos diseños cuyo uso está muy extendido. Son bastante simples y lógicos, pero para poder operarlos con éxito, hay que estar muy atento hacia factores que podrían afectar el funcionamiento. Los más importantes a tener en cuenta son: tener estímulos visuales simétricos, para que no influyan en el comportamiento del insecto y tener el equipo limpio de olores ajenos al experimento. La respuesta comportamental de los compuestos en el olfatómetro es muy dependiente de la concentración. En ciertas concentraciones es posible que se presente un comportamiento de aversión hacia una sustancia que resulte ser attractante en otra.

##### Olfatómetro en “Y”

El olfatómetro en “Y” consiste, como sugiere su nombre, en un equipo de esa forma. Antes de iniciar el experimento, los mosquitos se cargan en la base del equipo, mientras que a través de cada brazo fluye un volumen de aire similar, pero con compuestos volátiles distintos. Una vez aclimatados los mosquitos, se los libera de la base y se les permite moverse libremente dentro del equipo, durante el tiempo de experimento. Si algún componente, en alguno de los brazos, resultara ser más attractante (o menos aversivo) que el otro, esto se verá reflejado a través de una mayor cantidad de mosquitos en el brazo con ese compuesto. Estos olfatómetros sirven para hacer evaluaciones rápidas de compuestos volátiles. Está reportado que *Ae. aegypti* muestra una buena respuesta en este tipo de olfatómetro [69]. En la Figura 1.11 se puede apreciar un olfatómetro en “Y” [126].

##### Olfatómetro de puerto dual

Este olfatómetro consiste en un compartimento rectangular donde en uno de los lados se ubican dos trampas y en el lado opuesto se ubica una jaula de liberación. Las trampas están situadas sobre el mismo lado, en paralelo y a la misma distancia de la base y el vértice, obteniéndose una ubicación simétrica. La estructura del equipo puede observarse en la Figura 1.12 [167]. A través de cada trampa fluye un

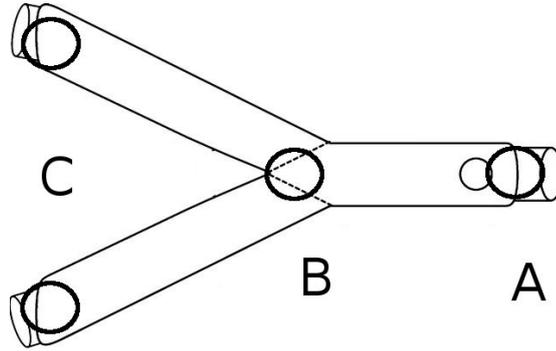


Figura 1.11: Esquema de olfatómetro en “Y”. A: entrada de mosquitos. B: punto de elección de brazo. C: final de brazo.

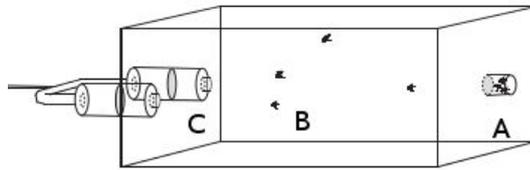


Figura 1.12: Esquema del olfatómetro de puerto dual. A: jaula de liberación. B: cámara de vuelo. C: jaulas de captura.

volumen de aire equivalente, pero con distintos estímulos olfativos. Una vez liberados los mosquitos de las trampas, tienen la libertad de moverse por toda la arena experimental. En caso de sentirse atraídos hacia los volátiles siendo emitidos por algunas de las trampas, quedan atrapados. Al final del experimento se cuenta la cantidad de mosquitos en cada trampa. Este olfatómetro es utilizado en especies que requieren una mayor arena experimental. Una de las ventajas es que permite discriminar entre los comportamientos de aversión y atracción, al no forzar al mosquito a decidir por un brazo [95].

#### 1.4.5. Plantas cuyos volátiles fueron analizados y posteriormente probados en bioensayos

La ecología química de mosquitos es el estudio de las interacciones mediadas, por moléculas que funcionan como semioquímicos, entre la misma especie y del mosquito con el entorno. En otras especies, el estudio de la ecología química ha permitido el desarrollo de estrategias de control basadas en la aplicación de compuestos que tienen especificidad hacia una especie y no afectan especies no-blanco. Dentro de las sustancias químicas del entorno a los que está expuesto el mosquito se encuentran los compuestos volátiles vegetales.

Las referencias bibliográficas sobre la preferencia de mosquitos del género *Aedes* hacia plantas específicas son escasas en general e inexistentes para el caso de plantas locales. Debido a ello, se tuvo que recurrir a diversas técnicas de “screening”, hasta obtener las plantas cuyos volátiles tuvieran algún compuesto attractante. De las trece plantas inicialmente evaluadas se obtuvieron tres que resultaron de interés para el análisis de compuestos volátiles, las plantas fueron: *Lobularia maritima*, *Senecio madagascariensis* y *Euryops pectinatus*.

*L. maritima* es una especie originaria de la zona del mediterráneo y está ampliamente difundida alrededor del mundo como planta doméstica ornamental. Localmente se la puede adquirir con inflorescencias, en los viveros durante casi todo el año. En bioensayos comportamentales, los volátiles de las inflorescencias de *L. maritima* resultaron attractantes en *Delia radicum* y *Diachasmimorpha longicaudata* [151]. Los resultados de los análisis de compuestos volátiles de *L. maritima* en la literatura, son limitados: en un trabajo sólo identificaron acetofenona [151]; en otro reportaron sólo la similitud con el espectro de masa de la base de datos de los compuestos encontrados, sin compararlo contra un estándar [145].

*S. madagascariensis* es una especie originaria del sur de África. Es considerada una especie invasiva y tóxica para el ganado, debido a los alcaloides que contiene [66]. La planta ha sido introducida en Argentina, Colombia, Hawaii, Japón, Kenia, Islas Mauricio e Isla Reunión [4]. Actualmente no es considerada una especie ornamental, por lo que la única forma de obtenerla es del campo. Comúnmente florece entre julio y diciembre. Hasta la fecha no existen en la literatura referencias del uso de los compuestos volátiles de *S. madagascariensis* en ecología química de insectos, ni del análisis de sus volátiles.

*E. pectinatus* es originaria de Sudáfrica y es comúnmente usada como planta ornamental de jardín [10]. En zonas más cálidas tiene un régimen casi continuo de floración, aunque localmente florece entre octubre y marzo. Es de fácil obtención en viveros durante el periodo de floración. Hasta la fecha no existen en la literatura referencias del uso de los compuestos volátiles de *E. pectinatus* en ecología química de insectos, ni del análisis de sus volátiles.

## 1.5. Control de insectos de bajo impacto ambiental

Dada la ausencia de vacunas para prevenir muchas de las enfermedades transmitidas por los mosquitos, la herramienta que resulta más efectiva para controlar al virus es la interrupción de la transmisión de la enfermedad por el control del mosquito vector.

El empleo de insecticidas tradicionales para el control del mosquito *Ae. aegypti* durante el último medio siglo por parte de organismos tanto nacionales como provinciales ha generado el desarrollo de resistencia y causado daños en los ecosistemas al afectar también especies no blanco.

### 1.5.1. Tipos de trampa

Las trampas de luz son efectivas para muestrear poblaciones de algunas especies de mosquitos. Entre éstas se encuentran las trampas miniaturas de luz de CDC y la trampa de luz “New Jersey” con sus correspondientes variaciones. En algunas especies, las trampas de luz atrapan machos y hembras grávidas, no solamente hembras en busca de un huésped sanguíneo. Pero en la mayoría de los casos atraen principalmente a hembras en busca de sangre, en forma similar a las trampas cebadas con kairomonas de vertebrados. El uso de una lámpara de bajo consumo elimina la necesidad de una gran fuente de energía y evita la repelencia que genera la elevada luminosidad a cortas distancias. Para algunas especies de mosquitos, aún fuentes débiles de luz reducen la cantidad de insectos atrapados en trampas que también usan cebos químicos. Las principales desventajas de las trampas de luz son las bajas capturas en comparación con las trampas cebadas con compuestos olorosos y la saturación de la trampa por otros insectos voladores, que termina dificultando la identificación de los mosquitos, al dañar los patrones en la cutícula [61].

Las trampas para mosquitos grávidos dependen del crecimiento bacterial para generar mezclas de volátiles atractantes asociados a los sitios de oviposición. Han sido ampliamente implementadas para detectar la presencia de *Culex sp.*, especialmente desde la introducción en América del Norte del Virus del Nilo Occidental [27, 70]. A pesar de ser efectivas, estas trampas son voluminosas, pesadas, tienen que ser atendidas frecuentemente y atrapan casi únicamente hembras grávidas de *Culex*. No son efectivas para muestrear *Aedes*, debido a que éstos oviponen fuera del agua.

### 1.5.2. Ventajas de las trampas para mosquitos cebadas con semioquímicos

Los fitoquímicos tienen un potencial poco explorado como cebos en trampas de alerta temprana, con el fin de determinar la densidad de mosquitos y la presencia de patógenos en ellos. Estos compuestos tienen ventajas sobre otros tipos de atractantes como los basados en combinaciones de kairomonas de vertebrados. Las ventajas más obvias son: 1) atraen mosquitos desde el primer día después de la emergencia; 2) atraen tanto a machos como hembras; 3) atraen machos de todas las edades, los que al tener tendencia a permanecer cerca del lugar de emergencia son el primer indicativo focal de la presencia de adultos; 4) atraen a las hembras antes y después de la dispersión incluyendo las que están en el medio del ciclo gonotrópico, obteniéndose una representación de toda la población; 5) Atraen hembras tanto activas en el ciclo gonotrópico como las que están entrado en una diapausa reproductiva antes de la hibernación en climas templados; 6) Los compuestos volátiles de origen vegetal, al poder ser formulados en trampas en forma de liberación lenta con pequeñas concentraciones por extensos periodos de tiempo permiten diseñar trampas ligeras, que no incluyen dióxido de carbono, lo que minimiza el mantenimiento [61].

Las trampas cebadas con volátiles vegetales permiten obtener estimados bastante precisos sobre la densidad de población. En comparación, la mayoría de las trampas cebadas con kairomonas de vertebrados y que requieren grandes cantidades de CO<sub>2</sub>, sólo atraen hembras en busca de un hospedero para llevar a cabo la alimentación sanguínea. Algunos modelos de trampa novedosos que resultan altamente efectivos utilizan propano como fuente para crear un flujo de CO<sub>2</sub> duradero, además de generar calor y electricidad en combinación con una feromona de liberación lenta como el 1-octen-3-ol. Pero tienen la desventaja de ser pesadas, voluminosas y costosas. Además de ser casi exclusivamente efectivas en hembras en búsqueda de un huésped sanguíneo, dejan de lado a los machos, a las hembras recientemente emergidas, a las que recientemente se alimentaron de sangre y a las que entraron en diapausa reproductiva. Estas últimas forman una parte substancial y crítica en poblaciones de *Anopheles* y *Culex*, debido a que comprenden la última cuarta parte de la temporada de actividad de los adultos en zonas climáticas templadas [61].

Los atrayentes derivados de plantas tienen el potencial de actuar en programas de monitoreo colocados en trampas cebadas, combinados o no con soluciones tóxicas azucaradas para controlar las poblaciones de mosquitos. En la década del 2000 se intensificó la búsqueda de plantas atrayentes de mosquitos para ser utilizadas principalmente como cebos en ensayos de campo; los resultados fueron positivos e incluso se pudo determinar que algunas especies resultaban más atrayentes que otras [121].

### 1.5.3. Formulaciones de liberación controlada

Durante las últimas décadas la tecnología de liberación controlada ha recibido un aumento de atención importante frente a una creciente toma de conciencia de que las sustancias, que varían desde medicamentos o fármacos hasta agroquímicos, son con frecuencia excesivamente tóxicas y a veces inefectivas cuando son aplicadas a través de métodos convencionales [99]. La aplicación usual de los agroquímicos, por ejemplo, provee una concentración muy por encima de la requerida para resultados inmediatos, a fin de asegurar la presencia de suficiente cantidad de la sustancia química por un período de tiempo considerable. Esta sobredosificación desperdicia mucho potencial químico de la sustancia o compuesto en cuestión y, muy a menudo, causa problemas de toxicidad a organismos no blanco [99].

El proceso de difusión molecular a través de polímeros y membranas sintéticas se ha empleado como un método efectivo y confiable para lograr no sólo la liberación controlada de medicamentos y principios farmacológicamente activos, sino también para fertilizantes, plaguicidas y herbicidas [99].

Durante el proceso de transporte, en el caso de compuestos agroquímicos, la concentración, persistencia y movimiento en el suelo disminuyen como consecuencia de procesos de biodegradación, degradación química, fotólisis, evaporación, erosión de las superficies y por lixiviación [99].

## Ventajas de los Sistemas de Liberación Controlada

Los Sistemas de Liberación Controlada tienen muchas ventajas, entre ellas se mencionan las siguientes: reducción de la toxicidad hacia mamíferos de sustancias altamente tóxicas; extensión de la duración de la actividad a niveles iguales de principio activo; reducción de las pérdidas por evaporación y la inflamabilidad de los líquidos; reducción de la fitotoxicidad; protección de los pesticidas de la degradación medioambiental; reducción de la lixiviación a través de la tierra y el transporte hacia las corrientes de agua; disminución de la contaminación por plaguicidas del medio ambiente; control de la liberación de los compuestos activos; más económico debido a que se utiliza menor cantidad de material activo; mayor facilidad y seguridad de manejo [99].

## Breve descripción de algunas tecnologías de Liberación Controlada

Estas tecnologías incluyen tanto sistemas físicos como químicos. Algunas de estas se mencionan a continuación [99].

- Sistemas de reservorio con una membrana de control de velocidad de liberación: estos incluyen las microcápsulas y macrocápsulas. La microencapsulación es el procedimiento por el cual se aplica, de forma reproducible, una capa uniforme fina de polímero alrededor de partículas sólidas pequeñas, gotas de líquido, o dispersiones de sólidos en líquidos [99].
- Sistemas de reservorio sin una membrana de control de velocidad de liberación: estos incluyen fibras huecas, la impregnación en plásticos porosos, polipropileno poroso, espumas, algunos hidrogeles y triacetato de celulosa ultramicroporoso [99].
- Sistemas monolíticos: es la forma más simple y más económica de controlar la liberación de un principio activo. Consiste en la dispersión del producto en una matriz polimérica inerte. En sistemas poliméricos, el agente activo se mezcla físicamente con el polvo de polímero y luego, la mezcla es fundida por moldeo por compresión o inyección, extrusión, calandrado o fundición. De forma similar, el compuesto activo puede ser incorporado junto a materiales elastómeros en el paso de mezclado, así como también se pueden agregar otros aditivos [99].

En todos los casos mencionados, el agente activo se disuelve en la matriz polimérica o elastomérica hasta alcanzar la saturación. La presencia de mayor cantidad de agente activo, si es el caso, se mantiene disperso en la matriz polimérica, y el sistema está, en consecuencia, físicamente disperso. A medida que el compuesto es removido de la superficie del dispositivo monolítico, más cantidad difunde desde el interior hacia la superficie como respuesta a la disminución del gradiente de concentración [99].

<b>Dependientes del soluto</b>	<b>Independientes del soluto</b>
Solubilidad	Concentración
Coefficiente de partición	Geometría
Coefficiente de difusión	Tortuosidad
	Porosidad
	Fracción de volumen
	Capa de difusión

Tabla 1.1: Factores que influyen en la velocidad de liberación.

- Estructuras laminadas: en este sistema, al menos dos, y usualmente tres películas de polímeros son adheridas o son laminadas conjuntamente. La capa central de un laminado de tres capas es la capa de reservorio. Esta contiene una gran cantidad de principio activo, y puede ser hecha a partir de material polimérico poroso o no poroso. Las capas exteriores controlan la velocidad de liberación, y son fabricadas comúnmente con polímeros más rígidos que los que constituyen la capa central [99].

Los dispositivos monolíticos se preparan usualmente mediante la incorporación del soluto dentro del material monomérico antes de la polimerización y moldeo, extrusión, moldeo por inyección o por fundición “casting” de película. De otra forma, la matriz puede ser sumergida en una solución de concentración de soluto conocida hasta que se alcanza la dosis de carga. La geometría del dispositivo se controla según las dimensiones del molde o lámina [99]. En la Tabla 1.1 se pueden ver los factores que influyen en la velocidad de liberación del soluto.

Los parámetros que influyen los perfiles de liberación de los solutos desde los dispositivos monolíticos se dividen en dos categorías: las que son dependientes del soluto y las que son independientes de las propiedades del soluto. La primera categoría está relacionada con la naturaleza físicoquímica del soluto en el polímero, mientras que la segunda se refiere a las variables del sistema. Cualquiera de estos conjuntos puede ser variado para optimizar la velocidad de liberación [99].

Concentración: para los dispositivos monolíticos que contienen el principio activo disperso, las velocidades de liberación son proporcionales a la raíz cuadrada de la concentración ( $A^{1/2}$ ) [99].

Coefficientes de difusión: la magnitud del coeficiente de difusión está dictada por la energía así como la geometría del sistema. El tamaño y la forma de la molécula difusiva, el grado de cristalinidad del polímero, y las interacciones de las cadenas poliméricas y flexibilidad afectarán la habilidad del polímero para formar un hueco lo suficientemente grande para acomodar la molécula penetrante [99].

Coefficientes de partición: el coeficiente de partición entre el polímero y el agua entra en juego cuando hay transferencia desde la fase polimérica hacia el solvente. En el caso del transporte por membrana, el producto del coeficiente de partición y el

coeficiente de difusión define la constante de permeabilidad [99].

La constante de partición es una propiedad aditiva de los grupos funcionales presentes en una molécula, y en contraste con el coeficiente de difusión es extremadamente sensible a pequeños cambios en la estructura de la molécula [99].

Solubilidad: la solubilidad del soluto en el polímero o en el medio de elución depende de la interacción de fuerzas moleculares entre el soluto y el solvente. Relaciones de extensión de solubilidad pueden estimarse mediante el parámetro de solubilidad, medida de la energía de cohesión de densidades de las mismas moléculas [99]. Cuanto menor sea la diferencia del parámetro de solubilidad entre un soluto y el solvente, mayor será la solubilidad del soluto. La liberación de sustancias a través de dispositivos monolíticos que contienen un exceso de ellas es proporcional a la raíz cuadrada de su solubilidad en el polímero [99].

Factores adicionales: los materiales de relleno, como sílica, óxido de zinc, carbón negro, etc. se incorporan dentro de los polímeros para modificar algunas propiedades físicas y mejorar ciertas propiedades de manipuleo. Si se asume que el relleno que se agrega es inerte con respecto al transporte de un compuesto, su presencia en dispositivos monolíticos reduce la fracción de volumen para la difusión e incrementa la tortuosidad [99]. Los coeficientes de difusión determinados por el método de retraso disminuirán si el soluto se adsorbe sobre las partículas de relleno. El grado de ocurrencia de esto último depende de la capacidad de unión y del grado de adsorción [99]. Los efectos de adsorción se han observado durante el transporte de solutos orgánicos a través de membranas de siliconas. Una vez que los sitios de adsorción se saturaron, el estado estacionario se mantiene relativamente constante. La presencia de un relleno en una goma monolítica de silicona reduce la liberación del acetato de medroxiprogesterona [99].

Los surfactantes aumentan la velocidad de liberación de dispositivos monolíticos porosos por medio de la humectación de los canales para la subsecuente difusión, de este modo, se incrementa efectivamente la porosidad [99].

## 2 Objetivos

### 2.1. Objetivo general de la tesis

El objetivo general de la tesis es el desarrollo de un posible método de control de mosquitos de bajo impacto ambiental, basado en la incorporación de compuestos volátiles vegetales, atractantes para *Ae. aegypti*, en matrices de liberación controlada.

### 2.2. Objetivos individuales

1. Identificar las plantas sobre las cuales los mosquitos son más propensos a posarse y a mostrar comportamiento de alimentación.
2. Evaluar las plantas que mayor comportamiento de posada mostraron, en el olfatómetro y en ensayos de posada con punto-final toxicológico.
3. Identificar y evaluar en el olfatómetro los compuestos volátiles puros de las plantas.
4. Incorporar los compuestos volátiles en distintas matrices.
5. Evaluar la efectividad en ensayos de posada con punto-final toxicológico de las matrices.

## 3 Materiales

### 3.1. Material Biológico. Cría de *Ae. aegypti* en laboratorio

Los mosquitos *Ae. aegypti* utilizados en los ensayos son de la cepa Rockefeller, originaria de Venezuela. Son criados desde 1996 en el insectario del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN), en condiciones de humedad y temperatura estándar;  $26\pm 2^\circ\text{C}$ , 60% de humedad relativa y con un fotoperiodo de 12:12 horas.

Los lineamientos de la cría de *Ae. aegypti* se basaron en el “Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia de mosquitos a insecticidas”, establecido durante una reunión de RELCOV (Red Latinoamericana para el Control de Vectores), llevada a cabo en Iguazú (Argentina) en diciembre de 2004 [25]. El protocolo metodológico de cría fue el descrito por Seccacini *et al.* [163]. Los huevos, depositados sobre discos de algodón se rehidrataron con 2 litros de agua purificada y se dejaron eclosionar a  $26\pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperíodo 12:12 hs. en una bandeja de polipropileno. Las condiciones fueron las mismas durante todo el periodo larval. Larvas del primer estadio pueden ser observadas aproximadamente después de las primeras 24 horas. Las larvas fueron alimentadas con una mezcla de alimento balanceado para conejos molido con levadura de cerveza en polvo en una relación 4 a 1. Trascurrido el período de una semana, se desarrollaron las primeras pupas, que fueron transferidas a recipientes de polietileno de 250 ml con agua purificada. Posteriormente fueron introducidas en jaulas de polimetilacrilato de 25 x 25 x 25 cm Figura 3.1. Las jaulas cuentan con mallas metálicas en los costados 20 x 20 cm y una apertura en el frente para manipular a los adultos. Los adultos fueron mantenidos en las condiciones estándar de humedad y temperatura previamente descritas. Los adultos tuvieron agua purificada y una solución al 10% de sacarosa permanentemente a disposición. Durante los periodos en los que fue necesario ayunar a los mosquitos, les fue retirada la solución de sacarosa de la jaula. Los mosquitos no utilizados en los ensayos fueron transferidos a una jaula de cría, donde contaban con pasas de uva como fuente de alimentación y superficies húmedas, en forma de discos de algodón, para la oviposición. Se les ofrecía tres veces por semana una paloma inmovilizada para la alimentación sanguínea. Los discos con huevos fueron recolectados una vez por semana, puestos a secar y almacenados para ser puestos a eclosionar posteriormente. Su vida útil es de 6 meses. En la Figura 3.1 se



Figura 3.1: Arriba izquierda: paño de algodón con huevos de *Ae. aegypti*. Arriba derecha: bandeja de cría con larvas. Abajo izquierda: pupas de *Ae. aegypti* separadas. Abajo derecha: jaula de cría.

pueden ver las distintas etapas de la cría: El paño con huevos, la bandeja con larvas, el recipiente con pupas y la jaula en donde eclosionan los mosquitos.

Los mosquitos utilizados tenían entre 3-8 días de edad y habían sido privados de sacarosa 48 hs. previas a los ensayos. Al concluir el experimento, los insectos usados fueron destruidos y descartados como residuos patológicos.

### 3.2. Plantas utilizadas en los ensayos

Se seleccionaron plantas que estuvieran disponibles localmente para ser evaluadas en los ensayos. Provinieron de dos fuentes: viveros de la Ciudad de Buenos Aires y sus alrededores y del predio de CITEDEF (<http://www.citedef.gob.ar>), institución en la cual se encuentran los laboratorios del CIPEIN, lugar de realización de esta tesis.

Las plantas usadas en los ensayos que provinieron de viveros locales fueron las siguientes (se informan según nombres científicos y entre paréntesis se incluye el nombre coloquial si lo tuviera): *Bellis perennis* (margarita común), *Lobularia maritima* (aliso), *Euryops pectinatus*, *Gazania rigens* (gazania), *Dianthus sp.* (clavelina), *Lavandula dentata* (lavanda), *Lobelia erinus* (lobelia), *Lampranthus multiradiatus* (rayito de sol),

*Ageratum conyzoides* (ageratum), *Tagetes patula* (flor copete). Las plantas que fueron colectadas del predio de CITEDEF fueron: *Lipia alba* (salvia de campo), *Plectranthus neochilus*, *Senecio madagascariensis*. La identificación de las especies colectadas en el predio, fue realizada con la ayuda de una especialista del “Instituto de Botánica Darwinion”. Las plantas adquiridas en vivero fueron enjuagadas con agua y se les permitió un tiempo de carencia de 72 hs. antes de ser utilizadas en los ensayos, con el objetivo de reducir residuos que pudieran tener. Todas las plantas fueron manipuladas con guantes de látex para evitar que queden impregnadas con compuestos volátiles de la piel. También fueron examinadas visualmente para determinar que estuvieran libres de daños mecánicos, signos de enfermedades, o ataques y/o infestaciones de plagas. La ocurrencia de daños en el tejido vegetal podría causar alteraciones en las claves olfativas y visuales de las plantas.

### 3.3. Compuestos químicos

*Solventes*: **n-hexano** > 98 %, Merck, Alemania; **acetona** > 99 %, Merck, Alemania; **diclorometano** > 99,5 %, Sintorgan, Argentina

*Compuestos volátiles identificados en plantas*: **acetofenona** > 99 %, Carlo Erba, Italia; **1-octanol** > 96 %, Merck, Alemania; **alcohol fenetílico** > 98 %, Alfa Aesar, EE.UU; **isotiocianato de bencilo** > 98 %, Sigma Aldrich, EE.UU; **isotiocianato de alilo** > 95 %, Sigma Aldrich, EE.UU; **fenilacetoniitrilo** > 98 %, Sigma Aldrich, EE.UU; **1-noneno**, Sigma Aldrich, EE.UU; **(+)-( $\alpha$ )-pineno** > 98 %, Sigma Aldrich, EE.UU; **(-)-( $\alpha$ )-pineno** > 98 %, Sigma Aldrich, EE.UU;  **$\beta$ -pineno** > 98 %, Sigma Aldrich, EE. UU.

*Serie de alcanos lineales usados para hacer el índice de retención*: **heptano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **octano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **nonano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **decano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **undecano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **dodecano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **tridecano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **tetradecano**, Sigma Aldrich, EE. UU; **pentadecano** Sigma Aldrich, EE. UU.

*Insecticida*: **imidacloprid** grado técnico 94,3 %, Bayer, Alemania.

*Componentes de las matrices de formulaciones*: **parafina 55°C**, Parafarm, Argentina; **estearina** producto técnico, Seraín Juárez, Argentina.

*Fagoestimulante*: **D-(+)-sacarosa** 96 %, Anedra, Argentina.

*Reactivos generales*: **fructosa** > 99 %, Biopack, Argentina; **resorcinol** > 98 %, Biopack, Argentina; **1-nonanol**, Sigma Aldrich, EE.UU; **ácido sulfúrico** > 95 %, Merck, Alemania; **ácido ortofosfórico** 85 %, Sigma Aldrich, EE.UU; **ácido clorhídrico** 35 – 38 %, Merck, Alemania; **sulfato de sodio anhidro**, Anedra, Argentina.

### 3.4. Construcción del olfatómetro en “Y”

Los olfatómetros son equipos ideales para determinar la preferencia de vuelo de un insecto hacia un estímulo olfativo en comparación con otro. Permiten medir la preferencia hacia un compuesto, contra un blanco o contra otro compuesto.

No hay un diseño único de olfatómetro para mosquitos. Esto se debe a que hay formas más apropiadas para medir algunos comportamientos específicos que otras. Luego de haber comparado las aptitudes de los diversos diseños de olfatómetro para nuestros experimentos, junto con las dificultades de conseguirlos, nos decidimos por el olfatómetro en “Y”. Dado que las proporciones y diseños requeridos para cada insecto son específicos, son difíciles de encontrar en forma comercial, aún a nivel internacional. Posibles proveedores locales consultados descartaron su fabricación por la complejidad que implicaba. Por falta de otras opciones recurrimos a la construcción propia artesanal, basándonos en el modelo de Geier [69]. Se procuró que la construcción fuese lo más fiel posible al diseño original.

La base fue hecha con acero inoxidable. Se utilizaron planchas de polimetilmetacrilato (Plexiglás), que fueron moldeadas en la forma cilíndrica del olfatómetro. Los tubos formados de plexiglás fueron sellados con un pegamento de cianoacrilato que no deja residuo oloroso. Se juntaron varios tubos con el mismo adhesivo, hasta obtener la forma final del equipo. Los segmentos de la base y de cada brazo tienen un diámetro mayor para poder ser acoplados por superposición al tronco central del equipo y de esta manera permitir la incorporación y la remoción de los mosquitos. La base de la “Y” se cerró con un mosquitero metálico. Las terminales de cada brazo se cerraron con discos del mismo material del tubo, los cuales fueron perforados en el centro para ser conectados con entradas de aire.

El final de cada brazo cuenta con una rejilla metálica para que los mosquitos se puedan posar y además evitar que puedan llegar hasta la entrada de aire del mismo. La distancia entre las rejillas en los brazos y las entradas de aire es la necesaria para neutralizar las turbulencias que se generan cuando el aire ingresa desde la manguera hacia el olfatómetro. La rejilla es inamovible durante los ensayos.

El espacio dentro del olfatómetro puede ser dividido en cuatro secciones por medio de compuertas compuestas de mallas metálicas. Las mallas sirven para restringir el movimiento de los mosquitos pero no el flujo de aire. Las separaciones se pueden abrir o cerrar según las necesidades durante el ensayo. Los segmentos en el equipo formados por las compuertas están en el tronco, en la parte media y una en cada brazo. Con un taladro se perforaron los puntos por donde irían los ejes de las compuertas que separan los distintos compartimentos del mismo.

Una vez armado el equipo, fue colocado dentro de un encofrado de poliestireno expandido, en donde el lado donde comienza el tronco queda descubierto. El objetivo de esta estructura fue homogeneizar los estímulos visuales, lo que limita la elección

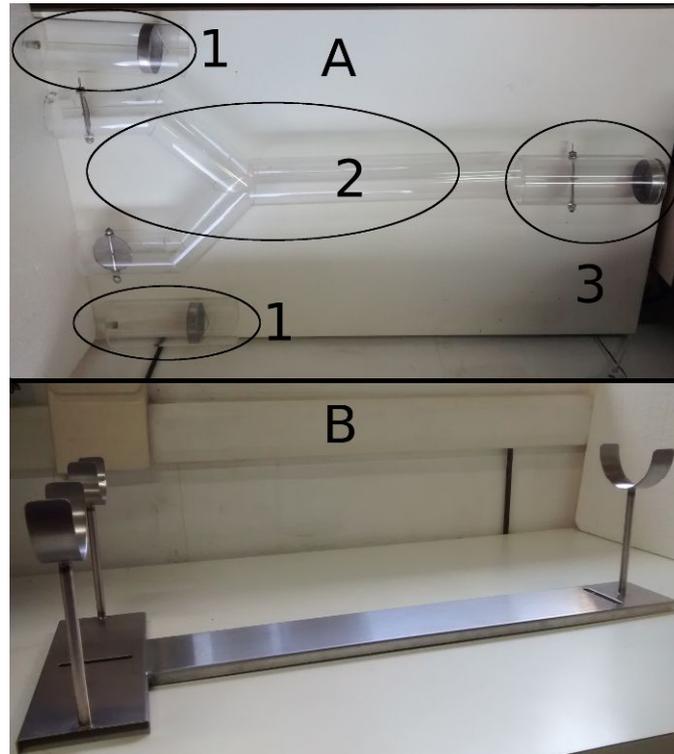


Figura 3.2: **A:** Fotografía tomada desde arriba del olfatómetro con sus segmentos desmontados y numerados. **B:** base de acero sobre la que se apoya el olfatómetro.

del brazo por parte del mosquito al estímulo olfativo. En la Figura 3.2 se pueden ver las partes del olfatómetro: los segmentos **1** son acoplados a la salida del segmento **2** más cercano, al final del segmento **1** está la entrada de aire. El disco dentro del segmento **1** tiene una malla metálica, sirve para que los mosquitos puedan posarse y crear un espacio para reducir las turbulencias y homogeneizar el flujo de aire. **2:** Segmento central del olfatómetro, en la base está el segmento **3**, que es en donde se cargan y liberan los mosquitos al iniciar el ensayo. En los brazos en donde van los segmentos **1** acoplados, tienen una compuerta compuesta por una malla metálica. Al final del experimento, el mosquito que queda en el espacio entre la compuerta del segmento **2** y la malla del segmento **1**, se lo computa como que eligió un brazo. **3:** Los mosquitos son cargados en este segmento. Pasado el tiempo de aclimatación se abre la compuerta compuesta por una malla metálica y se les permite la movilidad hacia el resto del olfatómetro.

El aire fue provisto por un compresor odontológico sin aceite, lubricado con teflón. Antes de llegar al olfatómetro el aire fue filtrado a través de carbón activado. El carbón activado retiene los compuestos volátiles orgánicos que pudiera tener el aire y fue acondicionado una vez al mes en la estufa a  $150^{\circ}\text{C}$  por una hora. A continuación del filtro de carbón activado el aire fue burbujeado a través de agua destilada para humedecerlo. Una vez tratado el aire, el flujo fue dividido en dos, una corriente hacia cada brazo del olfatómetro. Antes de llegar al brazo del olfatómetro, el aire circuló

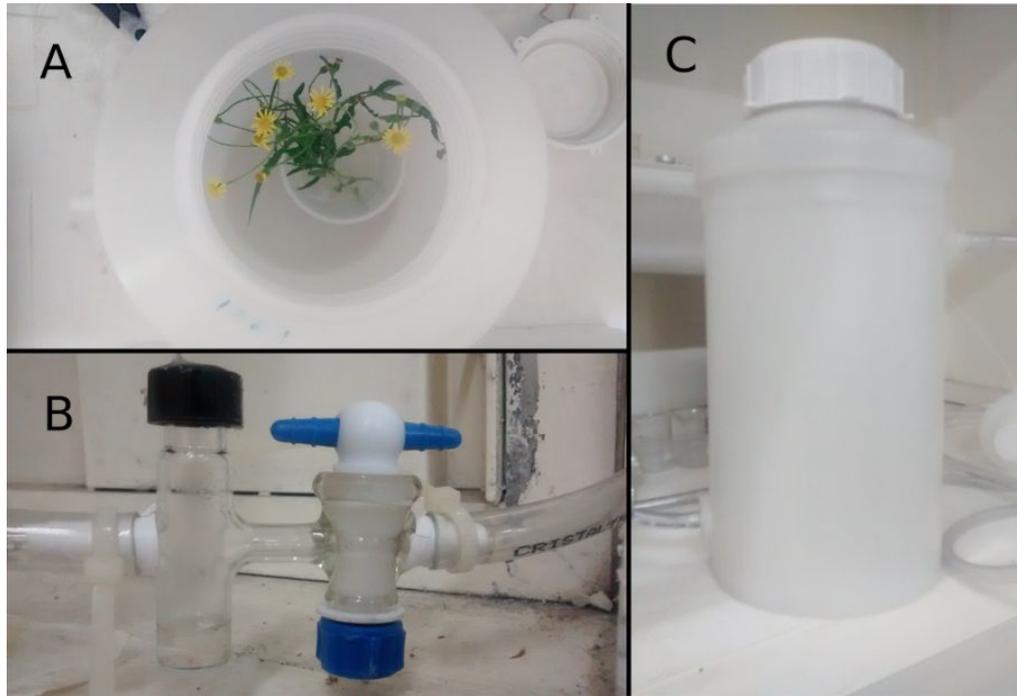


Figura 3.3: Componentes para la introducción de estímulos olfativo en el olfatómetro.

por un recipiente sellado de polipropileno de alta densidad, y un compartimento de vidrio cubierto por una tapa con septum y con 500  $\mu$ l de aceite de parafina (Fluka, Alemania) en su interior. El recipiente de polipropileno y el compartimento de vidrio se encuentran en serie, uno después del otro. El recipiente de polipropileno es de 5 l, sirve para probar las plantas en el olfatómetro. Los volátiles de las plantas dentro de dicho recipiente, son arrastrados por la corriente de aire hacia uno de los brazos del olfatómetro. Dentro del compartimento de vidrio, se inyectan a través del septum, soluciones en hexano de los compuestos volátiles a evaluar, los cuales eran posteriormente arrastrados por la corriente de aire hacia uno de los brazos. El propósito del aceite de parafina contenido en el recipiente de vidrio, es el de retardar la liberación de los volátiles inyectados hacia la corriente de aire. El aire posteriormente fue guiado hacia uno de los brazos, entra en el olfatómetro y es expulsado por el tronco al ambiente. La figura 3.3 muestra los distintos compartimentos para introducir estímulos olfativos hacia el olfatómetro: en A el recipiente de polipropileno de 5 litros con una planta en su interior, en C visto desde afuera y en B el vial modificado con aceite de parafina en su interior y cerrado con un septum. La figura 3.4 contiene un diagrama del olfatómetro y los componentes externos.

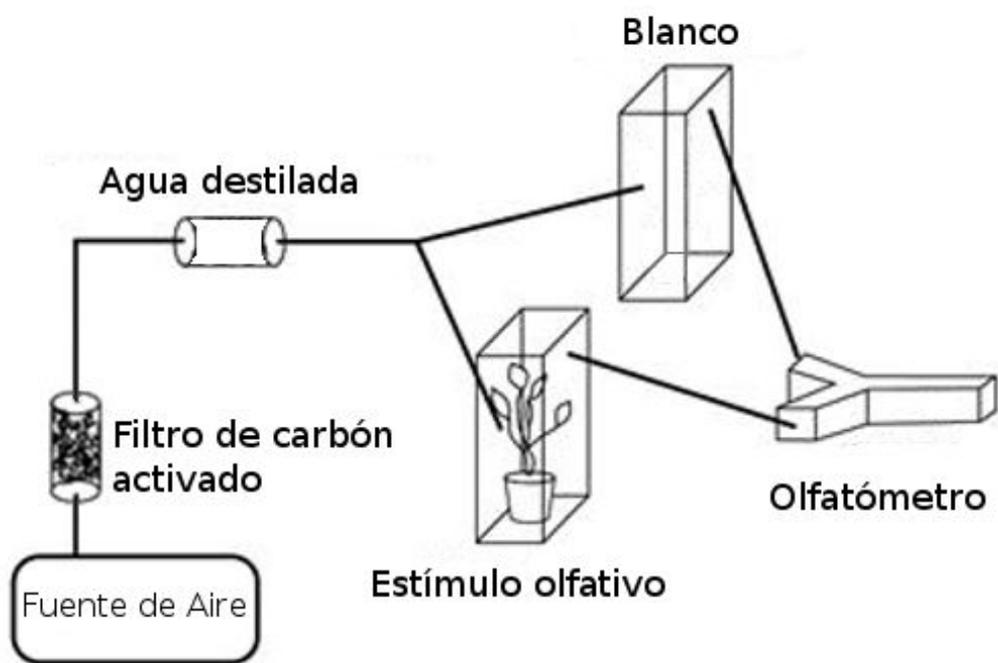


Figura 3.4: Esquema del olfatómetro y sus componentes externos.

## 4 Métodos

### 4.1. Estudios comportamentales con plantas con flores

#### 4.1.1. Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores

1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Plantas utilizadas:*

Las plantas con flores evaluadas en maceta fueron: *B. perennis*, *L. maritima*, *E. pectinatus*, *G. rigens*, *Dianthus sp*, *L. dentada*, *L. erinus*, *L. multiradiatus*, *A. conyzoides*, *T. patula*.

Las plantas con flores que tuvieron que ser cortadas para ser introducidas fueron: *L. alba*, *P. neochilus*, *S. madagascariensis*.

3. *Arena experimental:*

Jaula de polimetilacrilato de 140 x 50 x 50 cm

4. *Ensayo:*

Se utilizó una jaula de polimetilacrilato de 140 x 50 x 50 cm, con dos mallas metálicas de 50 x 50 cm en los costados y una apertura en el medio para la introducción del material.

La parte radicular y la maceta fueron aisladas con una bolsa de policarbonato (bolsas para hornear, Ideas Ce De, Argentina), la cual fue cerrada en la base del tallo. El objetivo fue el evitar que posibles compuestos volátiles de la tierra contaminaran la emisión proveniente de la parte aérea de la planta.

A las plantas que por su tamaño no podían ser introducidas enteras en la jaula de prueba, se introdujeron ramas con flores y hojas en su lugar. Se observó que no estuvieran dañadas o infestadas por alguna plaga o enfermedad. El tallo cortado fue introducido dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml con

agua purificada y aislado dentro de una bolsa de policarbonato, para evitar que volátiles provenientes del tallo cortado y ajenos a las hojas y flores afecten las respuestas comportamentales de los insectos [170]. En la Figura 4.1 se puede observar la jaula de prueba, la Figura 4.2 muestra cómo fueron preparadas las plantas antes de ser introducidas a la jaula.

Previo a los ensayos, la jaula fue rociada con alcohol con el fin de eliminar residuos y polvo ambiental. Posteriormente se dejó evaporar y disipar al alcohol por 15 minutos. Una vez acondicionada la jaula, se colocó en el medio un recipiente de polietileno de 125 ml con un algodón embebido de agua purificada, y se liberaron 50 mosquitos (25 hembras y 25 machos). Se los dejó aclimatar por 10 minutos antes de exponerlos al estímulo vegetal, el cual fue ubicado en el extremo izquierdo de la jaula Figura 4.1. El ensayo se inició con la incorporación de la planta en la jaula. Durante un periodo de 30 minutos, se registraron las respuestas de los mosquitos en intervalos de 5 minutos. Se registró la cantidad de mosquitos de cada sexo, que mostraron los comportamientos de posada y de extensión de proboscis sobre la planta. Al concluir el tiempo de ensayo, se retiró la planta y se limpió la jaula rociando con alcohol etílico toda su superficie. El alcohol tiene además la propiedad de voltear a los mosquitos, facilitando su remoción.

#### 5. *Análisis de resultados:*

Se realizaron tres réplicas por especie de planta. En cada réplica se utilizó una nueva planta. Para comparar la atracción relativa de las plantas se eligió de cada réplica el valor más alto de mosquitos posados y de extensión de proboscis. Ese valor fue promediado con el valor más alto obtenido en cada réplica de la misma especie de planta. Se decidió usar el número de mosquitos posados como valor discriminatorio, en vez de la extensión de proboscis, debido a que algunas plantas generaban únicamente comportamiento de posada.

Las plantas que presentaron en promedio seis mosquitos posados o más, fueron seleccionadas para seguir siendo evaluadas en los siguientes ensayos comportamentales.

### 4.1.2. **Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro**

#### 1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

#### 2. *Plantas usadas:*

Se eligieron las plantas que cumplieron con la condición de atracción fijada en el ensayo de preferencia de posada, las cuales fueron: *L. maritima*; *P. neochilus*; *T. patula*; *S. madagascariensis*; *E. pectinatus*.



Figura 4.1: Jaula de prueba para el ensayo de preferencia de posada. **Izq:** Planta de *L. maritima* en maceta, con la parte inferior aislada por una bolsa de policarbonato. **Centro:** Vaso de 125 ml con un algodón embebido en agua y la puerta para introducir y extraer material.

### 3. *Arena experimental:*

Olfatómetro en “Y”.

### 4. *Ensayos:*

La forma en que se introdujo la planta para evaluar el efecto de sus volátiles dependió de su volumen, ya que debía caber en el recipiente cerrado de polipropileno de 5 litros.

La evaluación en el olfatómetro de las plantas adquiridas en el vivero cuyo diámetro de maceta y volumen de la parte vegetal permitía su introducción en el recipiente fue la siguiente: la maceta y la tierra fueron aisladas con una bolsa de policarbonato (bolsas para hornear, Ideas Ce De, Argentina), dejando únicamente la parte superior del tallo expuesto.

La preparación para el olfatómetro de las plantas cuyo diámetro de maceta y/o volumen de la parte vegetal no permitía su introducción en el recipiente fue la siguiente: se les cortó una rama con hojas y flores, la parte cortada fue sumergida en agua destilada con el propósito que no se marchitara durante el experimento. El recipiente con agua y la zona del corte fueron aislados con una bolsa de policarbonato (bolsas para hornear, Ideas Ce De, Argentina) con el fin de reducir la liberación de compuestos volátiles generados en la zona del corte.

Las plantas fueron cambiadas cada hora. El recipiente de polipropileno, a través de una entrada y una salida de aire, permitió que el flujo proveniente del compresor arrastrara los compuestos volátiles liberados por la planta hacia uno de los brazos del olfatómetro. Las condiciones del aire fueron: Temperatura (T) =  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , Humedad Relativa (HR) =  $75 \pm 10\%$ . La velocidad del flujo de aire en el tronco central fue de 0,5 m/s y de 0,25 m/s en cada brazo. Al inicio



Figura 4.2: **Izq:** *S. madagascariensis* cortada en el tallo. **Der:** *L. maritima* en una maceta.

del experimento el flujo de aire estuvo cerrado. Diez mosquitos de un mismo sexo fueron cargados en la base del olfatómetro y fueron dejados a aclimatar por cinco minutos. Al cabo de los cuales se abrió el flujo de aire, por 30 segundos, antes de girar la compuerta en la base del olfatómetro y liberarlos. Se les permitió movilidad por todo el equipo, con todas las compuertas abiertas por cinco minutos. Posteriormente se cerraron todas las compuertas y se contabilizó la cantidad de mosquitos en cada segmento del olfatómetro. Hubo ocho réplicas con cada sexo, el estímulo siempre se situó en el brazo izquierdo. Al final del ensayo los mosquitos fueron extraídos con una aspiradora.

5. *Análisis estadístico:*

Los resultados fueron analizados por el método no paramétrico Kruskal-Wallis y se consideraron como estadísticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

## 4.2. Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico

### 4.2.1. Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental

El diseño de este ensayo fue adaptado del trabajo de Allan [18]. En el cual desarrolló un método para determinar las dosis letal 50 y 90 ( $LD_{50}$  y  $LD_{90}$ ) de distintas formulaciones comerciales con diferentes compuestos activos en mosquitos de las especies: *Cx. quinquefasciatus*, *Anopheles quadrimaculatus* y *Aedes taeniorhynchus*. El método de Allan consistió en introducir 10 mosquitos en un recipiente de 100 ml, cubrirlo con una tela porosa y colocar sobre la misma un pedazo de algodón odontológico embebido en una solución acuosa de sacarosa con la dosis del insecticida a evaluar. Se contabilizó la mortalidad producida por los insecticidas a las 4 y 24 horas.

1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Compuestos químicos usados:*

Imidacloprid, D-(+)-sacarosa (ver 3.3)

3. *Ensayo:*

Se preparó una solución madre de 100 mg/l, en agua destilada, de imidacloprid. A partir de esa solución madre se hicieron por dilución las demás soluciones con imidacloprid y con 10% de sacarosa e imidacloprid. Las concentraciones de las soluciones de imidacloprid probadas tuvieron una concentración de 1, 2, 5, 10

y 50 mg/l. Las soluciones preparadas por dilución fueron usadas dentro de las 24 horas.

Se introdujeron entre 5-7 mosquitos de ambos sexos, previamente anestesiados con dióxido de carbono, en recipientes de 250 ml. El recipiente fue cubierto por una tela de nylon sujeta por una banda elástica. Se permitió que los mosquitos se recuperaran durante tres horas, antes de presentarles la solución con insecticida ofrecida en forma de cebo tóxico. El cual consistió de un trozo de 0,25 g de algodón embebidos en la solución insecticida y fue posteriormente apoyado sobre la tela de nylon. Se hicieron tres réplicas de cada concentración, junto con un control por mortalidad, que consistió de una solución de sacarosa sin imidacloprid. Se registró la mortalidad a los 45, 90, 120, 180 minutos y a las 24 horas. El propósito de este ensayo fue la determinación de la concentración necesaria de imidacloprid, en solución acuosa de sacarosa, para obtener un volteo del 100 % al cabo de las 24 hs. de exposición. Este efecto fue observado a partir de 1 mg/l de concentración de imidacloprid. Se terminó eligiendo la concentración de 10 mg/l de imidacloprid en solución acuosa con sacarosa para los ensayos de 5.2.2 y 5.6.2, en los cuales se registró mortalidad por ingestión.

#### 4.2.2. Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores

1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Plantas usadas:*

Se eligieron las plantas que dieron positivo en el “Ensayo premilinar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1. La intención de este bioensayo fue el determinar la viabilidad de incorporar flores como cebo para trampas. Las flores y las cantidades usadas fueron: *L. maritima* 2 g; *P. neochilus* 10 g; *T. patula* 5 g; *S. madagascariensis* 30 g; *E. pectinatus* 7 g.

3. *Arena experimental:*

Se utilizaron jaulas de polimetilmetacrilato 40 x 30 x 40 cm. Las jaulas contaban con una malla metálica en la parte superior y una apertura en uno de los lados para manipular a los mosquitos.

4. *Ensayo:*

Previo al ensayo, la jaula fue limpiada con alcohol etílico puro 96°. Luego se distribuyeron dentro de la jaula tres recipientes de polietileno, dos de 250 ml y uno de 125 ml. Cada uno de los recipientes de 250 ml fue situado en el medio de dos lados opuestos entre sí. El de 125 ml en el medio de lado opuesto a la apertura lateral. La Figura 4.3 muestra la distribución espacial de los recipientes en la jaula de ensayo.

Dentro del vaso **A** de la Figura 4.3, se colocaron flores, suficientes como para llenar el vaso, pero sin que queden compactadas, por lo que la masa varió según la planta usada, ya que fue diseñado como ensayo cualitativo de estímulo vegetal. Una vez introducido el estímulo, se cubrió el recipiente con una tela porosa de nylon, sobre la cual se colocaron 0,25 g de algodón embebido en una solución acuosa de sacarosa al 10 % con 10 mg/l de imidacloprid. La Figura 4.4 muestra el vaso de 250 ml con el estímulo vegetal; cubierto por la tela de nylon; sobre la cual se colocaron 0,25 g de algodón embebido en la solución acuosa de sacarosa al 10 % con 10 mg/l de imidacloprid.

En el vaso **B** se colocó un algodón embebido en agua, con el propósito de evitar que se deshidraten los mosquitos durante el ensayo. El vaso **C** de la Figura 4.3, fue introducido vacío y cubierto con una tela porosa de nylon, sobre la cual se colocaron 0,25 g de algodón embebido en una solución acuosa de sacarosa al 10 % (sin imidacloprid).

Se realizó un control negativo del ensayo repitiendo el armado de la Figura 4.3, con la única diferencia que no se incluyó un estímulo vegetal en el vaso **A**. Una vez que estuvieron armadas las jaulas con el estímulo vegetal y la del blanco negativo se introdujeron diez mosquitos de cada sexo en cada una.

Al cabo de 24 hs. se determinó la mortalidad en la jaula con el estímulo vegetal y en la del control negativo. Paralelamente se realizó un control para corregir por mortalidad. El control consistió en introducir diez mosquitos de cada sexo en un recipiente de 1 litro con un algodón embebido en agua en la base. El recipiente fue cubierto por una tela porosa de nylon, para confinar los mosquitos. Se corrigió por mortalidad usando diez mosquitos de cada sexo, expuestos únicamente a agua.

#### 5. *Análisis estadístico:*

Los resultados fueron analizados por el método no paramétrico Kruskal-Wallis; se consideraron como estadísticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

### 4.3. Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores

#### 4.3.1. Recolección de volátiles de plantas con flores e identificación química

##### 1. *Material biológico:*

Plantas con flores de las especies: *L. maritima*, *E. pectinatus*, *S. madagascariensis*

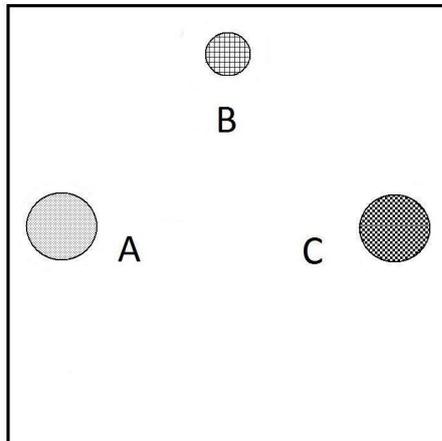


Figura 4.3: **A:** Recipiente de 250 ml con el estímulo, cubierto por una tela porosa de nylon, sobre la cual se colocó un algodón embebido en una solución de sacarosa al 10% con imidacloprid 10 mg/l. **B:** Recipiente de 125 ml con un algodón embebido en agua. **C:** Recipiente de 250 ml vacío, cubierto por una tela de nylon sobre la cual hay un algodón embebido en solución de sacarosa.



Figura 4.4: Recipiente de polietileno con las flores cortadas, cubierto por una tela porosa de nylon y con un algodón embebido en una solución de imidacloprid y sacarosa.

2. *Compuestos químicos usados:*

Acetofenona, 1-octanol, alcohol fenetílico, isotiocianato de bencilo, isotiocianato de alilo, fenilacetnitrilo, 1-noneno, (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, diclorometano (ver 3.3)

3. *Equipo:*

Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu GCMS-QP5050.

4. *Colectas:*

La captura de volátiles se realizó con una fibra de de micro-extracción en fase sólida (SPME) de Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS).

a) *Ensayos preliminares con miel de abeja:*

A los fines de determinar el tiempo y la temperatura de extracción óptima con la fibra de SPME se hicieron ensayos preliminares de prueba con miel de abeja con la metodología descrita para plantas que se describe en el próximo ítem. Se utilizó miel como estándar debido a su reproductibilidad y al contener volátiles comúnmente presentes en flores [82]. A partir de estos ensayos se estableció un tiempo óptimo de 30 minutos de pre-concentración, 30 minutos de extracción y una temperatura de 30°C. La variabilidad de las características físico-químicas de los compuestos volátiles de flores influye en la proporción de componentes que se capturan con la SPME, lo que limita su uso al análisis cualitativo.

b) *Colecta de volátiles de las plantas enteras utilizadas en el olfatómetro:*

Se determinó la composición química cualitativa de las sustancias volátiles emitidas por las plantas con flores que mostraron efecto biológico significativo en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2 .

Para obtener un perfil de compuestos volátiles lo más cercano posible al que experimentaron los mosquitos en 4.1.2, se realizó la colecta con la planta con flores en la mismas condiciones que en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro”. Si la planta estuvo dentro de una maceta durante el ensayo, la colección se realizó estando la planta dentro de la maceta. Si estuvo con el tallo cortado y se la introdujo en agua durante el ensayo, en esas mismas condiciones se hizo la extracción. En la Figura 4.5 se puede ver la extracción de volátiles de la planta. El espacio aéreo de la planta del tallo para arriba fue aislado por medio de una bolsa de policarbonato (bolsas para hornear, Ideas Ce De, Argentina). Se permitió que los compuestos volátiles se acumularan a 30°C durante media hora previo a la colecta (pre-concentración) en el espacio de cabeza formado dentro de la bolsa. Transcurrido el tiempo de acumulación, se perforó la bolsa con una fibra de (DVB/CAR/PDMS), se la expuso al espacio de

cabeza y se la dejó adsorbiendo durante media hora. Al concluir el tiempo de extracción, la fibra fue desorbida por inyección en un cromatógrafo gaseoso (CG) acoplado a un espectrómetro de masas (EM).

c) *Identificación de volátiles por CG-EM:*

Los volátiles fueron analizados en un cromatógrafo gaseoso (CG), acoplado a un espectrómetro de masas (EM) moledo "GCMS-QP5050" de marca Shimadzu (Japón) (Figura 4.6). La desorción de la fibra de SPME fue llevada a cabo a 240°C durante un minuto en el inyector. Las columnas de CG utilizadas fueron: DB-5ms (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25 mm, espesor de fase estacionaria: 0,25 µm); Cyclosil-B (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25 mm, espesor de fase estacionaria: 0,25 µm); y/o DB-Wax (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,32 mm, espesor de la fase estacionaria: 0,25 µm) de Agilent Technologies (California, EEUU). Las condiciones de temperatura de columna fueron programadas a 50°C por dos minutos, posteriormente fue incrementada a una velocidad de 7°C/min hasta alcanzar 200°C. Finalmente la temperatura fue mantenida constante durante 5 minutos. La fase móvil fue Helio (He), con un flujo volumétrico de 2,1 ml/min. El detector funcionó a 70 eV y escaneó los pesos moleculares entre 45 y 280 m/z con una temperatura de la interfase de 245°C. Los espectros de masa obtenidos fueron comparados contra los de la biblioteca Wiley 7 para determinar tentativamente la identidad de los compuestos. A los fines de establecer el peso molecular de un compuesto cuyo espectro de masa no se encontró en la biblioteca, se utilizó la técnica de Ionización Química (IQ) con metano y una columna de DB-5ms con el programa de temperatura descrito anteriormente.

d) *Determinación del índice de retención de los componentes volátiles de las plantas con flores:*

El índice de retención es un valor que se calcula a partir del tiempo de retención de un compuesto y los de una serie consecutiva de alcanos lineales. El valor obtenido es comparado contra los de una base de datos. Este sirve para reforzar o descartar una identificación tentativa de un compuesto basada en un espectro de masas. Esto se logra a partir de la co-inyección de la muestra junto con los alcanos lineales.

Se hizo una solución de 1 mg/ml en diclorometano de alcanos lineales consecutivos, partiendo del heptano hasta el pentadecano: C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>.

Una vez extraídos los volátiles de la planta con la fibra. Se vertieron tres gotas de la solución de diclorometano de la serie de alcanos consecutivos en un vial de 10 ml. Se permitió la evaporación del solvente, posteriormente el vial fue sellado con un septum de teflón. Se perforó el septum con la fibra con la muestra de compuestos volátiles de la planta y se la expuso al espacio aéreo dentro del vial por 3 segundos. La fibra fue posteriormente analizada en un equipo de CG-EM.

e) *Identificación de volátiles por co-inyección del estándar sintético:*

La única manera de confirmar definitivamente la presencia de un compuesto con un CG-EM, es a través de la co-inyección del estándar sintético junto con la muestra. Se hicieron soluciones de 1 mg/ml en diclorometano de los compuestos tentativamente identificados por CG-EM que estaban disponibles en el laboratorio.

Una vez extraídos los volátiles de la planta con la fibra. Se vertieron tres gotas de la solución de diclorometano con un compuesto tentativamente identificado por CG-EM y disponible en un vial de 10 ml. Se permitió la evaporación del solvente, posteriormente el vial fue sellado con un septum de teflón. Se perforó el septum con la fibra con la muestra de compuestos volátiles de la planta y se la expuso al espacio aéreo dentro del vial por 3 segundos. La fibra fue posteriormente analizada en un equipo de CG-EM.

### 4.3.2. Síntesis de 1-noneno

1. *Compuestos químicos utilizados:*

1-nonanol, ácido sulfúrico, ácido ortofosfórico, sulfato de sodio anhidro y bicarbonato de sodio (ver 3.3)

2. *Síntesis:*

Debido a que en el espacio de cabeza de la planta de *S. madagascariensis* se identificó tentativamente 1-noneno por similitud de EM y de índice de retención (IR), se consideró necesario sintetizarlo como estándar y por su importancia para el estudio de su efecto comportamental sobre *Ae. aegypti*.

Para la síntesis del 1-noneno se partió del 1-nonanol al cual se le hizo una reacción de deshidratación para dar un alqueno. La reacción de deshidratación puede ser catalizada por ácido sulfúrico y ácido ortofosfórico. En la Figura 4.7 se puede observar el mecanismo de deshidratación ácida de un alcohol primario.

La reacción de deshidratación se llevó a cabo por destilación y en vial.

a) Por destilación:

En un balón de 10 ml con una columna de destilación conectada, se introdujeron 1 ml de ácido sulfúrico concentrado con 2,5 ml 1-nonanol. La mezcla fue calentada a 180°C por 2 horas, la temperatura a la que fue calentado el balón es inferior a la temperatura de ebullición del ácido sulfúrico y el 1-nonanol, pero superior a la del 1-noneno. Por lo que el producto se evaporaba a medida que se fue generando. El destilado fue recolectado y analizado por CG-EM en una columna DB-5ms. Se compararon los espectros de masas y los índices de retención para determinar los componentes del resultado de la síntesis.

b) En un vial:

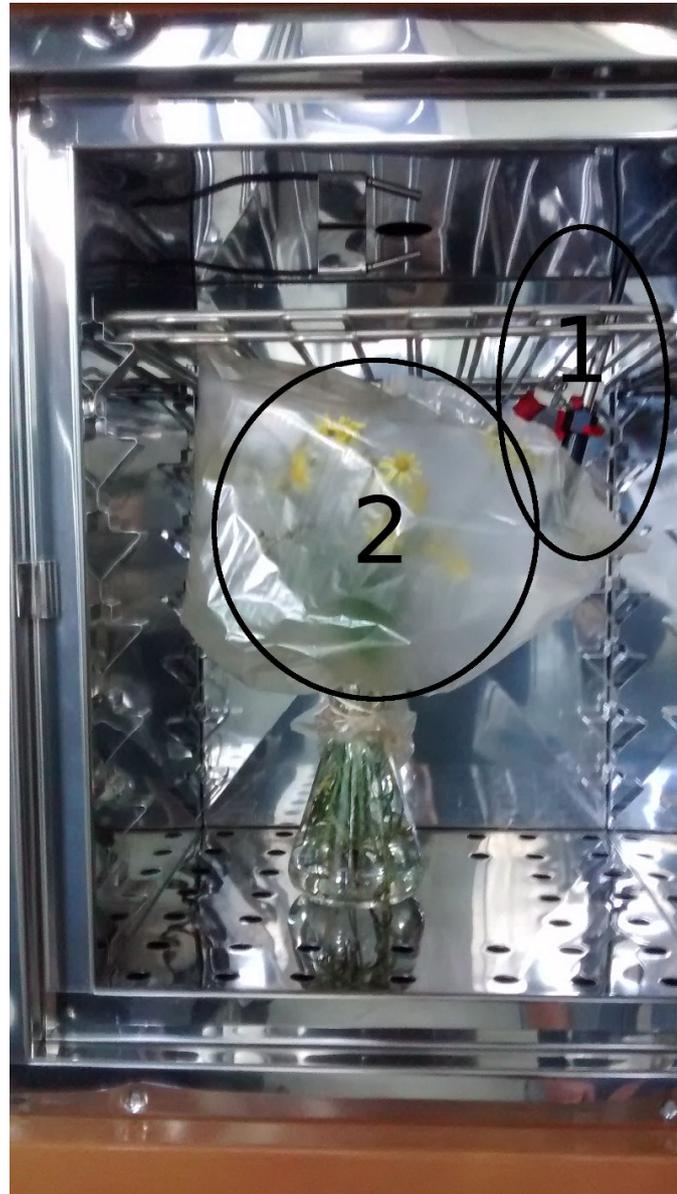


Figura 4.5: Extracción de volátiles de plantas evaluadas en el olfatómetro **1**: Sujetador de la fibra para SPME. **2**: Espacio en donde se realiza la extracción de volátiles.



Figura 4.6: Equipo CG-EM Shimadzu, modelo: GCMS-QP5050

Se prepararon tres viales con 1 ml de ácido sulfúrico y con 2 ml de 1-nonanol; y tres viales con 1 ml de ácido ortofosfórico y con 2 ml de 1-nonanol.

Un vial con cada ácido fue dejado a reposar 24 hs. a diferentes condiciones: calentado a 50°C por una hora y dejado a reposar por 23 hs.; calentado a 100°C por una hora y dejado a reposar por 23 hs. y calentado a 150°C por una hora y dejado a reposar por 23 horas.

Al concluir el tiempo de reposo, se extrajo con una pipeta la fase orgánica y se la transfirió a otro vial de 10 ml. A la fase orgánica separada se le agregó lentamente con agitación una solución de bicarbonato de sodio hasta que dejó de generarse dióxido de carbono. El objetivo del agregado de bicarbonato de sodio fue neutralizar cualquier resto de ácido que hubiera quedado. Se extrajo la fase orgánica con una pipeta y se la pasó a otro vial de 10 ml. Finalmente se le agregaron unos granos de sulfato de sodio anhidro y se agitó, con el fin de deshidratar la fase orgánica.

Las distintas fases orgánicas obtenidas fueron evaluadas por CG-EM en una columna DB-5ms para determinar su composición. La configuración del equipo fue la misma que la descrita para la identificación de volátiles.

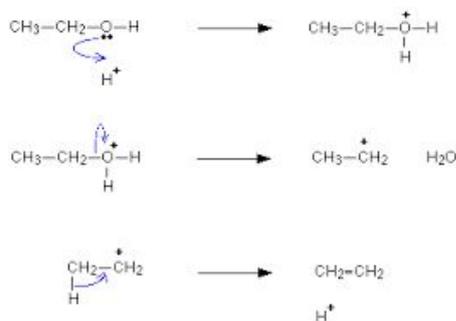


Figura 4.7: Mecanismo de la reacción de deshidratación de un alcohol primario.

## 4.4. Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores

### 4.4.1. Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores

1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Compuestos químicos usados:*

Acetofenona, 1-octanol, alcohol fenetílico, isotiocianato de bencilo, isotiocianato de alilo, fenilacetnitrilo, 1-noneno, (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, n-hexano (ver 3.3)

3. *Arena experimental:*

Olfatómetro en "Y".

4. *Ensayo:*

Se prepararon soluciones en hexano de cada compuesto que fue identificado en las emisiones florales y estuvo disponible, en tres concentraciones: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 1  $\text{mg}/\text{ml}$ . Las condiciones del flujo de aire en el olfatómetro fueron: Temperatura (T) =  $26 \pm 1$  °C, HR =  $75 \pm 10$  %. La velocidad del flujo de aire en el tronco central fue de 0,5 m/s y de 0,25 m/s en cada brazo. Inicialmente el flujo de aire se mantuvo cerrado.

Diez mosquitos de un mismo sexo fueron cargados en la base del olfatómetro y se los dejó aclimatar por cinco minutos. Durante el periodo de aclimatamiento, todas las compuertas permanecieron cerradas. Las compuertas permiten restringir o habilitar (según la posición) el movimiento de mosquitos dentro del olfatómetro, como las compuertas están construídas con mallas metálicas, en

todas las posiciones permiten el flujo de aire. A continuación, con una jeringa se inyectó 100 µl de solución del compuesto volátil en el compartimento de vidrio con septum por el que pasa el flujo de aire hacia el brazo izquierdo. En el compartimento de vidrio con septum que llevaba el flujo de aire hacia el otro brazo se inyectó un volumen equivalente de hexano puro.

Con el estímulo y los mosquitos cargados en el olfatómetro: se activó el flujo de aire por 30 segundos antes de abrir la compuerta que separa el compartimiento de la base del olfatómetro; pasados los 30 segundos iniciales, se abrieron todas las compuertas en el olfatómetro por cinco minutos, permitiendo, durante ese tiempo, la movilidad dentro de todo el área experimental del olfatómetro a los mosquitos; pasados los cinco minutos, se cerraron todas las compuertas dentro del olfatómetro, impidiendo que los mosquitos pudiesen migrar del segmento del olfatómetro en el que se encontraban. Posteriormente se contabilizó la cantidad de mosquitos que quedaron al cabo de cinco minutos en cada segmento. Se hicieron al menos seis réplicas con cada sexo.

5. *Análisis estadístico* Al final del ensayo los mosquitos fueron extraídos con una aspiradora. Los resultados fueron analizados por el método no paramétrico Kruskal-Wallis y se consideró como estadísticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

## 4.5. Estudios sobre inflorescencias cortadas de *L. maritima*

### 4.5.1. Evaluación de atracción por inflorescencias cortadas de *L. maritima* en el olfatómetro

1. *Material biológico:*  
Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.
2. *Plantas usadas:*  
*L. maritima*
3. *Arena experimental:*  
Olfatómetro en "Y".
4. *Ensayo:*

Se evaluaron los efectos comportamentales en mosquitos de las inflorescencias cortadas de *L. maritima* cuya composición de volátiles es diferente a la de la planta con flores de la misma especie.

Se pusieron 2 g de inflorescencias sobre un vidrio de reloj previamente lavado con etanol y secado en estufa a 150°C por una hora. El vidrio de reloj con las inflorescencias fue posteriormente introducido en el brazo izquierdo del olfatómetro y en el brazo derecho se colocó un vidrio de reloj vacío. Los vidrios de reloj se situaron entre la rejilla final y la compuerta situada en cada brazo. Las inflorescencias fueron cambiadas cada hora. Una vez ubicadas las flores, se activó el flujo de aire cuyas condiciones fueron: Temperatura (T) = 26±1°C, HR = 75±10 %, velocidad del aire en el tronco central 0,5 m/s y en cada brazo 0,25 m/s. Una vez armado el olfatómetro, se introdujo un mosquito en el compartimento en la base del tronco central. Se lo dejó aclimatar por dos minutos y luego se abrió la compuerta y se registró la primera elección de brazo. Si al cabo de tres minutos no se había decidido por algún brazo, se lo computaba como “no respondió”. Se evaluaron en total 40 mosquitos hembra y 40 mosquitos macho que optaron por algún brazo del olfatómetro. La cantidad que no respondió fue menor al 10 %. Para el ensayo control se colocó un vidrio de reloj limpio en cada brazo, entre la rejilla al final y la compuerta del brazo. Se probó la respuesta de 80 mosquitos hembra y 80 mosquitos macho en el control.

#### 5. *Análisis Estadístico*

Se compararon las respuestas entre el ensayo con la inflorescencia de aliso y las del control para determinar si eran estadísticamente significativas. Las respuestas fueron analizadas por medio de  $\chi^2$ . El umbral de significancia fue de  $p \leq 0,05$ .

### 4.5.2. Identificación de compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*

#### 1. *Planta usada:*

*L. maritima*

#### 2. *Compuestos químicos usados:*

Acetofenona, 1-octanol, alcohol fenético, isotiocianato de bencilo, isotiocianato de alilo, fenilacetnitrilo, 1-noneno, (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, diclorometano (ver 3.3)

#### 3. *Equipo:*

Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu GCMS-QP5050.

#### 4. *Colectas:*

La captura de volátiles se realizó con una fibra de SPME de DVB/CAR/PDMS. Dentro de un vial de 10 ml se introdujo 1 g de inflorescencias cortadas de *L. maritima*. El vial fue sellado con un septum de teflón. Se permitió que los volátiles se acumularan durante 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas, se extrajo una muestra de los volátiles emitidos por medio de una fibra de DVB/CAR/PDMS durante 30 min a 30°C. Una vez concluido el tiempo de extracción, la fibra fue desorbida en un CG-EM. En la figura 4.8 se puede ver la toma de muestra de volátiles de las inflorescencias de aliso cortadas.

#### 5. *Identificación de volátiles por CG-EM:*

Los volátiles fueron analizados en un cromatógrafo gaseoso (CG), acoplado a un espectrómetro de masas (EM) moledo “GCMS-QP5050” de marca Shimadzu (Japón). La desorción de la fibra de SPME fue llevada a cabo a 240°C durante un minuto en el inyector. Las columnas de CG utilizadas fueron: DB-5ms (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25 mm, espesor de fase estacionaria: 0,25 µm); Cyclosil-B (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25 mm, espesor de fase estacionaria: 0,25 µm); y/o DB-Wax (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,32 mm, espesor de la fase estacionaria: 0,25 µm) de Agilent Technologies (California, EEUU). Las condiciones de temperatura de columna fueron programadas a 50°C por dos minutos, posteriormente fue incrementada a una velocidad de 7°C/min hasta alcanzar 200°C. Finalmente la temperatura fue mantenida constante durante 5 minutos. La fase móvil fue Helio (He), con un flujo volumétrico de 2,1 ml/min. El detector funcionó a 70 eV y escaneó los pesos moleculares entre 45 y 280 m/z con una temperatura de la interfase de 245°C. Los espectros de masa obtenidos fueron comparados contra los de la biblioteca Wiley 7 para determinar tentativamente la identidad de los compuestos. A los fines de establecer el peso molecular de un compuesto cuyo espectro de masa no se encontró en la biblioteca, se utilizó la técnica de Ionización Química (IQ) con metano y una columna de DB-5ms con el programa de temperatura descrito anteriormente.

#### 6. *Determinación del índice de retención de los componentes volátiles de las plantas con flores:*

El índice de retención es un valor que se calcula a partir del tiempo de retención de un compuesto y los de una serie consecutiva de alcanos lineales. El valor obtenido es comparado contra los de una base de datos. Este sirve para reforzar o descartar una identificación tentativa de un compuesto basada en un espectro de masas. Esto se logra a partir de la co-inyección de la muestra junto con los alcanos lineales.

Se hizo una solución de 1 mg/ml en diclorometano de alcanos lineales consecutivos, partiendo del heptano hasta el pentadecano: C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>.

Una vez extraídos los volátiles de la planta con la fibra. Se virtieron tres gotas de la solución de diclorometano de la serie de alcanos consecutivos en un vial de 10 ml. Se permitió la evaporación del solvente, posteriormente el vial fue sellado

con un septum de teflón. Se perforó el septum con la fibra con la muestra de compuestos volátiles de la planta y se la expuso al espacio aéreo dentro del vial por 3 segundos. La fibra fue posteriormente analizada en un equipo de CG-EM.

7. *Identificación de volátiles por co-inyección del estándar sintético:*

La única manera de confirmar definitivamente la presencia de un compuesto con un CG-EM, es a través de la co-inyección del estándar sintético junto con la muestra. Se hicieron soluciones de 1 mg/ml en diclorometano de los compuestos tentativamente identificados por CG-EM que estaban disponibles en el laboratorio.

Una vez extraídos los volátiles de la planta con la fibra. Se vertieron tres gotas de la solución de diclorometano con un compuesto tentativamente identificado por CG-EM y disponible en un vial de 10 ml. Se permitió la evaporación del solvente, posteriormente el vial fue sellado con un septum de teflón. Se perforó el septum con la fibra con la muestra de compuestos volátiles de la planta y se la expuso al espacio aéreo dentro del vial por 3 segundos. La fibra fue posteriormente analizada en un equipo de CG-EM.

### 4.5.3. Bioensayo de atracción hacia compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de *L. maritima*

1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Compuestos químicos utilizados:*

Acetofenona, 1-octanol, alcohol fenético, isotiocianato de bencilo, isotiocianato de alilo, fenilacetnitrilo, acetona (ver 3.3)

3. *Arena experimental:*

Olfatómetro en "Y".

4. *Ensayo:*

Las condiciones de temperatura, humedad y la velocidad de flujo del aire, fueron similares a las del ensayo 4.1.2. El tratamiento para desodorizar a los vidrios de reloj fue el mismo y fueron colocados durante los ensayos en la misma ubicación que en el ensayo con aliso previamente descrito 4.5.2. Los mosquitos usados estuvieron en condiciones similares al ensayo antes descrito.

Se prepararon soluciones de 1 mg/ml en acetona de todos los volátiles evaluados. En el brazo izquierdo se colocó un vidrio de reloj con una alícuota de 100 µl de la solución en acetona con el compuesto volátil. En el brazo derecho se colocó un vidrio de reloj con una alícuota de 100 µl de acetona. Con los vidrios de reloj cargados dentro del olfatómetro y el flujo de aire abierto, se colocó un mosquito

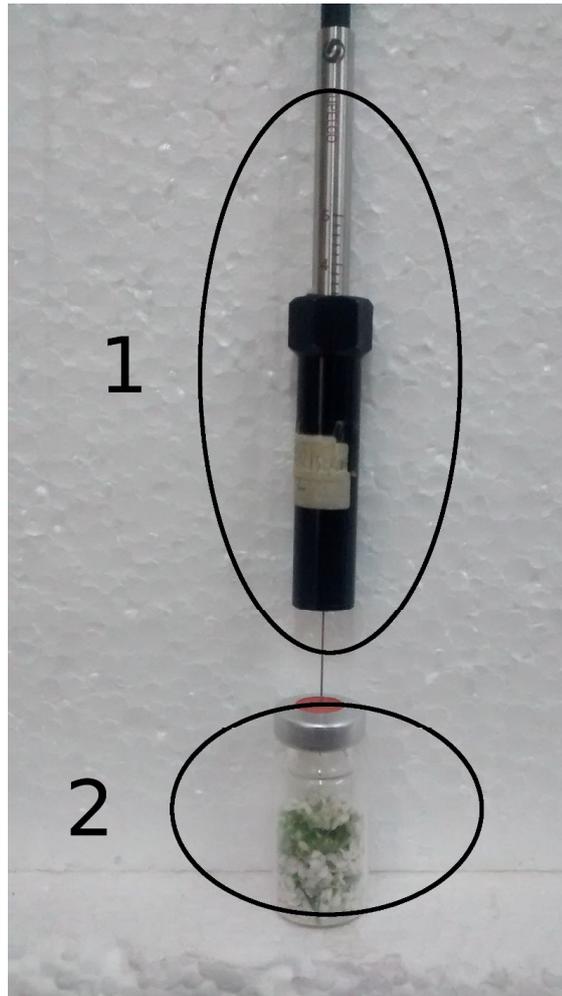


Figura 4.8: Toma de muestra de volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*. **1:** Fibra de (DVB/CAR/PDMS). **2:** Espacio en donde se realiza la emisión de volátiles.

en el compartimento del tronco central. Se lo dejó aclimatar por dos minutos antes de abrir la compuerta. Una vez abierta la compuerta se lo dejó circular por tres minutos, anotando la primera elección de brazo. Si al cabo de tres minutos no se había decidido por algún brazo, se lo computaba como “no respondió”. La cantidad de mosquitos que no respondieron fue menor que el 10%. Para realizar el blanco se repitió exactamente el procedimiento anterior, pero con acetona pura en ambos brazos del olfatómetro. Los ensayos con los compuestos volátiles de *L. maritima*, se repitieron  $40 \pm 4$  veces con hembras y machos. Los blancos con acetona se repitieron  $80 \pm 4$  veces con hembras y machos.

5. *Análisis estadístico:*

Las respuestas fueron analizadas por medio de  $\chi^2$ . El umbral de significancia fue de  $p \leq 0,05$ .

#### 4.5.4. **Determinación de una posible nectarización por *Ae. aegypti* de la flor de *L. maritima* presente en su inflorescencia. Cuantificación de ingesta de fructosa**

1. *Material biológico*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Planta usada:*

*L. maritima*

3. *Compuestos químicos usados:*

Fructosa, ácido clorhídrico, resorcinol (ver 3.3)

4. *Arena experimental:*

Los ensayos fueron realizados en jaulas de polimetilmetacrilato de 40 x 30 x 40 cm. Las jaulas contaron con una malla metálica en la parte superior y una apertura en uno de los lados para manipular a los mosquitos.

5. *Equipo:*

Espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

6. *Ensayo:*

Previo al ensayo, la jaula fue rociada con alcohol etílico 96 °y se permitió su evaporación durante 15 minutos. Se introdujo en la jaula una planta de *L. maritima* en maceta, la cual fue aislada desde la base del tallo con una bolsa de policarbonato (bolsas para hornear, Ideas Ce De, Argentina) para evitar que los mosquitos interactúen con la tierra. Se procuró que la ubicación de la planta, dentro de la jaula, fuera lo más central posible. Diez mosquitos de cada sexo fueron liberados dentro de la jaula. A las 24 hs. la planta fue removida y los

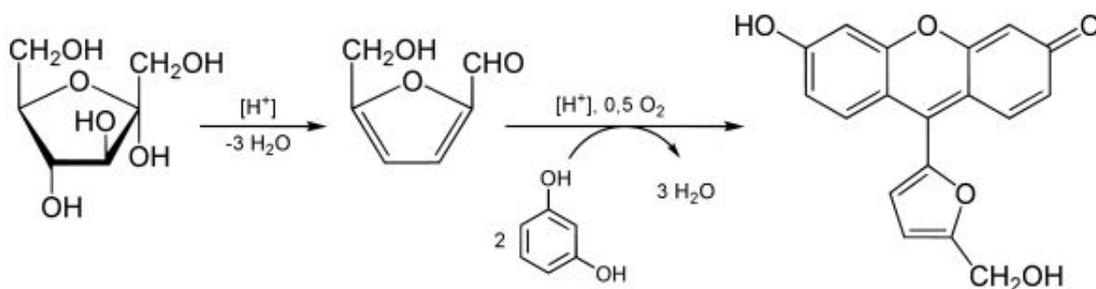


Figura 4.9: Reacción de Seliwanoff para la determinación espectrofotométrica de ketosas

mosquitos volteados con etanol 96 °. Los mosquitos fueron congelados a  $-20$  °C, hasta la cuantificación del contenido de fructosa. El método utilizado para medir la cantidad promedio de fructosa en el mosquito fue adaptada de Nunes *et al.* [15].

Los mosquitos fueron homogenizados en 150  $\mu$ l de agua destilada. El homogenato fue transferido a un vial de Eppendorf de 1,5 ml y posteriormente centrifugado a 8000 g por 15 minutos. Una alícuota de 100  $\mu$ l del sobrenadante fue transferida a un vial de vidrio de 1,5 ml, posteriormente se le agregaron 500  $\mu$ l del reactivo de Seliwanoff (0,5 g de resorcinol en 1000 ml de HCl 6N) y se lo dejó reaccionar por 3 minutos en baño de maría. Al concluir el tiempo de reacción se transfirió el producto de reacción a un vial de Eppendorf de 1,5 ml y se lo centrifugó a 8000 g por 15 minutos nuevamente. Se midió la absorbancia del sobrenadante, con un espectrofotómetro, en la frecuencia de 484 nm. La Figura 4.9 muestra la reacción de Seliwanoff, la figura 4.10 es una fotografía de los estándares usados para hacer la curva de calibración, para cuantificar la fructosa, en orden de menor a mayor concentración.

#### 7. Cuantificación de fructosa:

Para cuantificar la fructosa, se realizó una curva de calibración con cantidades de 2  $\mu$ g, 4  $\mu$ g, 8  $\mu$ g, 16  $\mu$ g, 32  $\mu$ g y 40  $\mu$ g de fructosa en 3 ml de solución (incluyendo al reactivo de Seliwanoff).

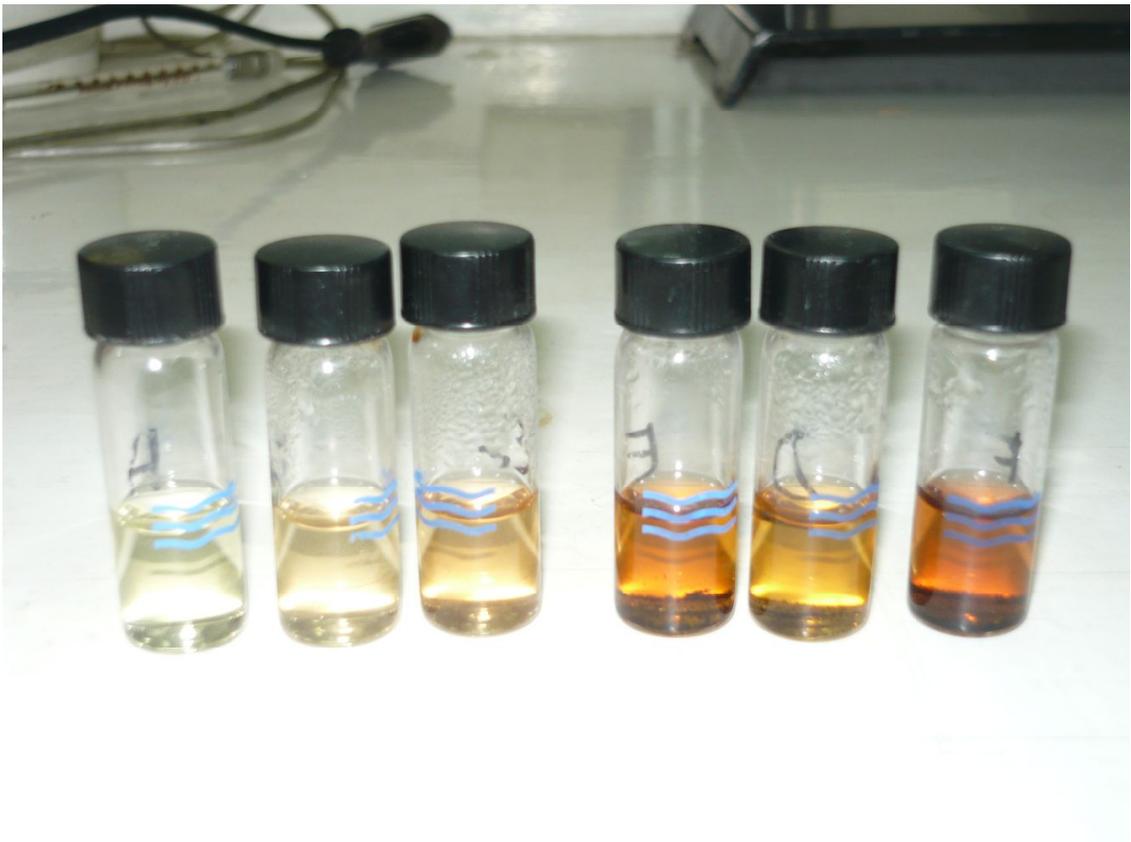


Figura 4.10: Viales de vidrio con estándares de la reacción de Seliwanoff con fructosa, para realizar la curva de calibración.

## 4.6. Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico

### 4.6.1. Formulación de compuestos atractantes de mosquitos en parafina y estearina

1. *Compuestos químicos usados:*

Parafina 55°C, estearina, 1-noneno, acetofenona (ver 3.3)

2. *Preparación de formulados sólidos conteniendo compuestos volátiles:*

Se prepararon discos de 10 ml de parafina o estearina formulados con 10 mg, 1 mg y 0,5 mg de acetofenona o 1-noneno. Para preparar los discos de estearina o parafina se fundió el material base en baño de maría en un vaso de precipitado de 250 ml. Una vez derretido el compuesto fueron vertidos 10 ml del líquido resultante a un vaso de precipitado de 25 ml.

El vaso de precipitado de 25 ml con el material del disco fue mantenido en estado líquido en baño de maría. Luego se le agregó con fuerte agitación una solución de diclorometano con 5 mg/ml del compuesto a incorporar (acetofenona o 1-noneno) en cantidad suficiente para obtener 10 mg, 1 mg y 0,5 mg finales en el disco de 10 ml. Para tal fin de utilizaron alícuotas de 2 ml, 200  $\mu$ l y 100  $\mu$ l respectivamente de la solución de acetofenona o 1-noneno en diclorometano. Se eligió el diclorometano como solvente de los compuestos a incorporar en los discos; por su bajo punto de ebullición (39°C), inferior a los puntos de fusión de la estearina (54-75°C) y de la parafina (52-54°C), favoreciendo la evaporación del solvente. Los puntos de ebullición de los compuestos volátiles incorporados a los discos, acetofenona y 1-noneno, son 202°C y 146,9°C respectivamente. Dichas temperaturas de ebullición son mayores a las de fusión de la estearina y la parafina, e incluso superior a los 100°C, que es la temperatura máxima obtenible con un baño de maría. Una vez incorporado el compuesto volátil, se vertió la mezcla en un molde de aluminio cilíndrico y abierto en ambos lados, con 6 cm de diámetro. El molde fue apoyado sobre una lámina de policarbonato y la unión entre el cilindro y la base, fue sellada con plastilina. Se le permitió solidificar al disco durante tres horas a temperatura ambiente, antes de ser retirado del molde para ser utilizado en el bioensayo con punto-final toxicológico. En la Figura 4.11 se puede ver un disco de parafina terminado.

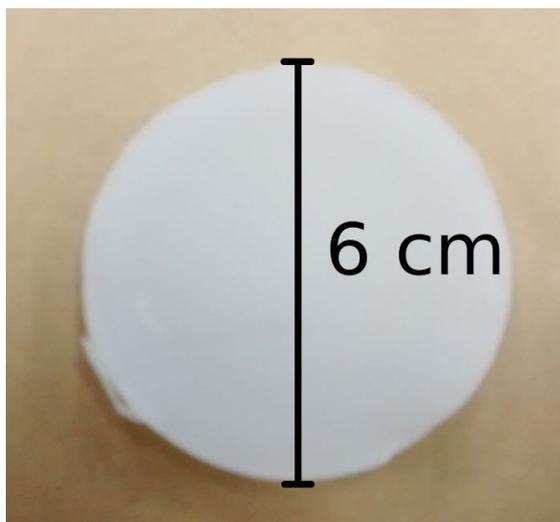


Figura 4.11: Disco de parafina

#### 4.6.2. Ensayo de atracción de mosquitos por formulados sólidos con punto-final toxicológico

1. *Material biológico:*

Mosquitos de 3-8 días de edad, privados de sacarosa 48 hs. previas al ensayo.

2. *Compuestos químicos usados:*

Parafina 55°C, estearina, 1-noneno, acetofenona, imidacloprid, diclorometando, D-(+)-sacarosa (ver 3.3)

3. *Arena experimental:*

Los ensayos fueron hechos en jaulas de marco de aluminio 80 x 40 x 40 cm envueltas en una tela blanca de nylon, con una apertura en cada extremo de la jaula.

4. *Ensayo:*

Los bioensayos de comportamiento attractante con punto-final toxicológico fueron realizados con los discos de parafina o estearina conteniendo distintas concentraciones de acetofenona o 1-noneno. Estos discos son los descritos en 4.6.

Cada jaula fue ubicada sobre una lámina de polimetilmetacrilato y provista de tres recipientes de polietileno, dos de 250 ml y uno de 125 ml. Los dos de 250 ml fueron situados uno en cada extremo y el de 125 ml en el medio. Dentro de uno de los vasos de 250 ml se colocó un disco de parafina o de estearina formulados con compuestos volátiles attractantes (acetofenona o 1-noneno).

Una vez que el disco fue introducido en el recipiente de 250 ml, este fue cubierto con una tela porosa de nylon, sobre la cual se colocó un trozo de 0,25 g de



Figura 4.12: Recipiente de polietileno con el disco de parafina, cubierto por una tela porosa de nylon y con un algodón embebido en una solución de imidacloprid y sacarosa.

algodón embebido en una solución de sacarosa al 10 % con 10 mg/l de imidacloprid. El otro recipiente en el extremo opuesto se dejó vacío y también fue cubierto con una tela porosa de nylon, sobre la cual se colocó un trozo de 0,25 g de algodón embebido en una solución de sacarosa al 10 % sin insecticida.

El ensayo control consistió en un diseño idéntico al ya descrito. Excepto que el recipiente sobre el cual se colocó un trozo de 0,25 g de algodón embebido en una solución de sacarosa al 10 % con 10 mg/l de imidacloprid, contuvo un disco de parafina o estearina, según el caso, sin ningún compuesto volátil attractante incorporado al mismo. Una vez armada la jaula experimental y la del control, se introdujeron en cada una, doce mosquitos de cada sexo.

A las 24 hs. se midió mortalidad y se la comparó con el control. Se corrigió por mortalidad con un control de 10 mosquitos de cada sexo expuesto únicamente a agua, dentro de un recipiente de 1 litro. En la Figura 4.12 se puede ver el armado del recipiente con el disco, cubierto por una tela de nylon, sobre el cual se apoya un algodón embebido en una solución acuosa de sacarosa al 10 % con 10 mg/l de imidacloprid. La Figura 4.13 muestra la jaula, en donde se llevó a cabo el ensayo.

##### 5. *Análisis estadístico:*

Los resultados fueron analizados por el método no paramétrico Kruskal-Wallis y se consideró como estadísticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .



Figura 4.13: Área experimental para evaluar los discos con compuesto volátil incorporado.

## 5 Resultados

### 5.1. Estudios comportamentales con plantas con flores

#### 5.1.1. Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores

El objetivo de este ensayo fue llevar a cabo una pre-selección de las plantas con flores que posteriormente fueron evaluadas en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 5.1.2 y en el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 5.2.2. A pesar de tener un diseño simple como fue descrito en Métodos 4.1.1, permite evaluar la preferencia relativa del mosquito hacia muchas plantas con flores en poco tiempo. Tiene la limitación de no permitir discriminar entre los distintos estímulos (visuales y/u olfativos) que podrían estar provocando la atracción de *Ae. aegypti* hacia las plantas con flores. Por lo tanto es sólo un ensayo exploratorio orientativo. La ventaja es que puede dar, en poco tiempo, una información preliminar sobre las plantas con flores que podrían contener volátiles atractantes que se podrían introducir, ellas o sus componentes activos, en forma de cebo en una trampa para mosquitos. Se hicieron tres réplicas independientes por planta. En la Figura 5.1 se pueden ver el número de mosquitos adultos, de ambos sexos, posados y probando por planta. Las plantas con flores seleccionadas para los ensayos posteriores son las que están marcadas con (\*). Fueron elegidas para los siguientes ensayos, las que tuvieron seis o más mosquitos posados. En ningún caso se observó algún mosquito posado sobre el algodón húmedo, probablemente porque el *Ae. aegypti* prefiere superficies oscuras y sólo se hubieran posado sobre el algodón blanco en caso de necesitar agua, lo que no ocurrió. Se evaluaron algunas plantas en maceta con tierra y otras dentro de un matraz Erlenmeyer. A pesar de que la presentación de la planta, en el experimento, podría alterar la composición de volátiles y por lo tanto la respuesta comportamental de los mosquitos. Lo anterior no impide que las plantas en ambas presentaciones sean evaluadas, debido a que el propósito del screening es encontrar plantas, independientemente de su presentación, que contengan volátiles atractantes.

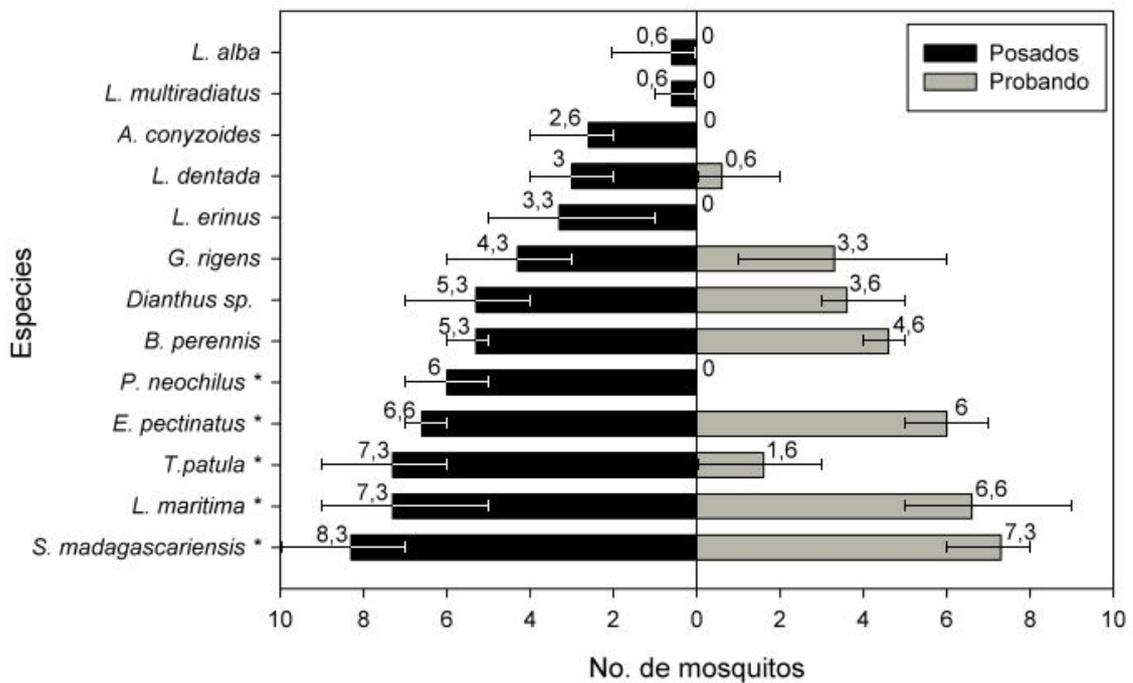


Figura 5.1: **Izq:** Promedio de mosquitos posados sobre cada planta. **Der:** Promedio de mosquitos probando cada planta.

### 5.1.2. Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro

Las plantas con flores que resultaron seleccionadas del “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 5.1.1 fueron: *E. pectinatus*, *P. neochilus*, *L. maritima*, *S. madagascariensis* y *T. patula*. La Tabla 5.1 contiene el promedio de hembras que eligen el brazo del olfatómetro con la planta estímulo y el análisis estadístico correspondiente, el cual fue calculado con el Test de Kruskal-Wallis. En el otro brazo no había ningún tipo de estímulo, sirviendo de control. La Tabla 5.2 contiene el promedio de machos que eligen el brazo con la planta estímulo y el análisis estadístico correspondiente, el cual fue calculado con el Test de Kruskal-Wallis. En el otro brazo (control) no había ningún tipo de estímulo.

Las plantas con flores que mostraron un efecto attractante significativo fueron *E. Pectinatus*, *L. maritima* en machos y en hembras y *S. madagascariensis* en machos. *P. neochilus* mostró un efecto de aversión al vuelo en ambos sexos, pero sólo en machos fue este estadísticamente significativo  $p \leq 0,05$ . Durante los ensayos menos del 20 % de los mosquitos fueron los que no abandonaron el segmento de liberación, los cuales no fueron considerados para determinar la proporción de respuesta al estímulo. El abandono del segmento de liberación no implica que hubieran elegido algún brazo del olfatómetro, debido a que hubieran podido permanecer en el tronco central.

Planta	Respuesta al estímulo	Mediana	Desviación estándar	H	Valor de p
blanco	0,47	0,47	0,16	0	1
<i>E. pectinatus*</i>	0,70	0,73	0,14	5,97	0,0124
<i>P. neochilus</i>	0,34	0,29	0,14	3,65	0,0531
<i>L. maritima*</i>	0,67	0,75	0,14	5,34	0,0171
<i>S. madagascariensis</i>	0,59	0,5	0,20	1,90	0,1686
<i>T. patula</i>	0,54	0,58	0,22	0,64	0,4406

Tabla 5.1: Respuesta de elección de hembras de *Ae. aegypti* en un olfatómetro de dos vías hacia las plantas con flores seleccionadas sin contacto visual. Los asteriscos indican diferencias significativas en la respuesta,  $p \leq 0,05$ .

Planta	Respuesta al estímulo	Mediana	Desviación estándar	H	Valor de p
blanco	0,51	0,50	0,14	0	1
<i>E. pectinatus*</i>	0,71	0,66	0,13	8,08	0,0028
<i>P. neochilus*</i>	0,27	0,28	0,15	7,34	0,0045
<i>L. maritima*</i>	0,73	0,71	0,15	7,83	0,0027
<i>S. madagascariensis*</i>	0,76	0,66	0,14	10,95	0,0008
<i>T. patula</i>	0,62	0,67	0,22	2,28	0,1317

Tabla 5.2: Respuesta de elección de machos de *Ae. aegypti* en un olfatómetro de dos vías hacia las plantas con flores seleccionadas sin contacto visual. Los asteriscos indican diferencias significativas en la respuesta,  $p \leq 0,05$ .

## 5.2. Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico

### 5.2.1. Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental

Las plantas con flores que resultaron seleccionadas en el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 5.1.1 para ser evaluadas en el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 5.2.2 fueron: *E. pectinatus*, *P. neochilus*, *L. maritima.*, *S. madagascariensis* y *T. patula*. Este ensayo compara las mortalidades de mosquitos adultos expuestos a un cebo tóxico en presencia de las emisiones de plantas con flores, comparativamente con los blancos, como fue descrito en Métodos 4.2.2. Como cebos atractantes se utilizaron las plantas con flores previamente mencionadas; como tóxico se utilizó una solución acuosa de sacarosa al 10 % y el insecticida sistémico imidacloprid. La sacarosa se incluyó como fagoestimulante.

En este ensayo previo se buscó cuál es la concentración de imidacloprid necesaria para obtener un 100 % de mortalidad en el tiempo del ensayo. Este ensayo previo para determinar la concentración de imidacloprid que se usaría posteriormente en el bioensayo toxicológico fue realizado una única vez (sin réplicas) por ser sólo una orientación para establecer la concentración adecuada de imidacloprid para el ensayo toxicológico con las plantas con flores. En la Tabla 5.3 se pueden ver la supervivencia de ambos sexos sumados a distintos tiempos, distintas concentraciones de insecticida y con o sin sacarosa. El número de mosquitos en cada ensayo fue de 5 a 7.

Los resultados que muestra la Tabla 5.3 sugirieron como óptima una concentración de 10 mg/l de imidacloprid en 10 % de sacarosa que produce una mortalidad de 100 % en 90 minutos como la más adecuada para realizar los ensayos con punto-final toxicológico con las diferentes plantas con flores que en las evaluaciones previas mostraron la capacidad de atraer *Ae. aegypti*.

El ensayo con punto-final toxicológico permitió observar que los mosquitos no ingieren la solución con imidacloprid si no hay un fagoestimulante presente, en este caso la sacarosa. Se encontró que la concentración mínima evaluada de 1 mg/l de imidacloprid con 10 % de sacarosa mostró una mortalidad de 100 % al cabo de 24 horas. Este resultado indica que la LD<sub>99</sub> de imidacloprid en *Ae. aegypti* por ingesta debe ser necesariamente menor que esa concentración.

Concentración		Porcentaje de supervivencia de mosquitos a distintos tiempos en horas.					
imidacloprid mg/l	sacarosa %	0	0,75	1,5	2	3	24
1	0	100	100	100	100	100	100
1	10	100	84	50	34	17	0
2	0	100	100	100	100	80	80
2	10	100	86	29	29	29	0
5	0	100	86	86	86	86	86
5	10	100	60	0	0	0	0
10	0	100	84	84	66	66	66
10	10	100	40	0	0	0	0
20	0	100	100	100	100	100	100
50	0	100	100	100	86	86	86
100	0	100	100	100	100	100	100

Tabla 5.3: Porcentaje de supervivencia de mosquitos *Ae. aegypti* adultos expuestos a distintas concentraciones de imidacloprid, con o sin sacarosa, a distintos tiempos de exposición.

Planta	Número de Réplicas	Promedio de mortalidad en %	Mediana	Desviación estándar	H	Valor de p
<i>E. pectinatus</i> *	4	84	0,89	0,13	5,33	0,0286
<i>E. pectinatus</i> blanco	4	38	0,37	0,09	-	-
<i>P. neochilus</i>	11	36	0,38	0,21	0,48	0,4894
<i>P. neochilus</i> blanco	11	44	0,47	0,15	-	-
<i>L. maritima</i> *	11	60	0,6	0,17	4,55	0,0326
<i>L. maritima</i> blanco	11	39	0,4	0,24	-	-
<i>S. madagascariensis</i>	4	38	0,35	0,25	0,08	0,8286
<i>S. madagascariensis</i> blanco	4	37	0,37	0,04	-	-
<i>T. patula</i>	11	37	0,38	0,23	0,0011	0,9737
<i>T. patula</i> blanco	11	34	0,36	0,16	-	-

Tabla 5.4: Mortalidad de *Ae. aegypti* hembras por cebo tóxico en presencia o ausencia de flores. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el blanco para la misma planta,  $p \leq 0,05$ .

### 5.2.2. Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores

El ensayo previo con soluciones de imidacloprid y sacarosa permitió determinar la concentración de tóxico adecuada para estudiar el efecto de una potencial atracción, modulada por las emisiones volátiles de las plantas con flores, sobre la toxicidad de los cebos.

La mortalidad de mosquitos machos y hembras expuestos a soluciones de sacarosa conteniendo imidacloprid en presencia o ausencia de las flores seleccionadas se muestran en las Tablas 5.4 y 5.5, para hembras y machos respectivamente. Se realizó una medición de blanco para cada planta. En el blanco se repitió el ensayo, pero sin incluir el estímulo vegetal. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el Test de Kruskal-Wallis. En ambos casos se usaron las plantas con flores para las cuales se había determinado mayor preferencia de posada como indicador de atracción hacia el mosquito.

Se pudo observar un aumento estadísticamente significativo de la mortalidad producida en hembras por la solución de imidacloprid en presencia de plantas con flores de *E. pectinatus* y *L. maritima*; y en machos en presencia de las plantas con flores de *E. pectinatus*, *L. maritima* y *S. madagascariensis*.

Planta	Número de Réplicas	Promedio de mortalidad en %	Mediana	Desviación estándar	H	Valor de p
<i>E. pectinatus</i> *	4	68	0,67	0,06	5,33	0,0286
<i>E. pectinatus</i> blanco	4	25	0,23	0,11	-	-
<i>P. neochilus</i>	11	23	0,27	0,14	0,79	0,3744
<i>P. neochilus</i> blanco	11	32	0,31	0,22	-	-
<i>L. maritima</i> *	11	49	0,54	0,17	7,07	0,0074
<i>L. maritima</i> blanco	11	19	0,1	0,24	-	-
<i>S. madagascariensis</i> *	4	50	0,5	0,08	5,33	0,0286
<i>S. madagascariensis</i> blanco	4	23	0,23	0,03	-	-
<i>T. patula</i>	11	48	0,54	0,27	0,0011	0,9738
<i>T. patula</i> blanco	11	47	0,44	0,26	-	-

Tabla 5.5: Mortalidad de *Ae. aegypti* machos por cebo tóxico en presencia o ausencia de flores. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el blanco para la misma planta,  $p \leq 0,05$ .

### 5.3. Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores

#### 5.3.1. Recolección de volátiles de plantas con flores e identificación química

Se procedió a la recolección y posterior análisis de los volátiles emitidos por las plantas con flores que mostraron en uno o ambos sexos de mosquitos una respuesta comportamental positiva y estadísticamente significativa en los ensayos de olfatómetro.

Las plantas con flores en las que se analizaron los compuestos volátiles según el criterio antedicho fueron: *E. pectinatus*, *L. maritima* y *S. madagascariensis*.

La recolección de volátiles de las plantas con flores fue realizada como se describiera en Métodos 4.3.1, con la técnica de SPME en una fibra tricomponente de DVB/CAR/PDMS. Los volátiles adsorbidos fueron posteriormente desorbidos en un equipo de CG-EM.

Para determinar el índice de retención o de Kovats (IR) de los compuestos en la columna se co-adsorbieron e inyectaron secuencias de alcanos lineales. El método de colección de volátiles por SPME tiene la limitante de que no es posible cuantificar la composición de la mezcla adsorbida ya que debido a la selectividad del material adsorbente de la fibra sólo permite establecer un perfil cualitativo de la misma. Aun así, se puede obtener un perfil semi-cuantitativo sobre las cantidades relativas de los volátiles químicamente relacionados.

Tiempo de Retención	Área en %	Compuesto	IR de DB-5ms	Similitud EM en %	IR bibliografía de DB-5ms
5,68	0,59	$\alpha$ -tujona	927	80	929 [106]
7,12	0,65	1-deceno	990	86	989 [159]
7,47	0,32	$\alpha$ -felandreno	1005	90	1003 [106]
9,48	81,07	1-undeceno	1091	98	1091 [165]
11,69	0,24	1-dodeceno	1188	96	1189 [159]
12,47	0,94	benzotiazol	1224	95	1224 [41]
15,63	3	$\alpha$ -copaeno	1374	96	1372 [19]
16,52	4,91	trans- $\beta$ -cariofileno	1419	96	1419 [106]
17,27	0,53	$\alpha$ -humuleno	1458	96	1458 [44]
17,99	0,68	$\alpha$ -muuroleno	1496	94	1497 [186]

Tabla 5.6: Compuestos volátiles de *E. pectinatus* identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros y por comparación del IR medido para la columna DB-5ms contra una biblioteca.

Los resultados de las composiciones de los volátiles de las plantas con flores analizadas se describen a continuación.

### 5.3.2. Identificación de volátiles de *E. pectinatus*.

Los compuestos volátiles encontrados en los espacios de cabeza de *E. pectinatus* provenientes de la parte aérea de la planta enraizada confinada en una bolsa de policarbonato, se muestran en la Tabla 5.6. La captura de volátiles y su posterior análisis por CG-EM con una columna DB-5ms, incluyendo la incorporación de alcanos para determinar el IR, se realizaron como fue descrito en Métodos 4.3.1. Los compuestos identificados fueron en su mayoría 1-alquenos y terpenos. Los terpenos tentativamente identificados fueron:  $\alpha$ -tujona,  $\alpha$ -felandreno; sesquiterpenos:  $\alpha$ -copaeno, trans- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -muuroleno. Los 1-alquenos fueron: 1-deceno, 1-undeceno y 1-dodeceno. A pesar de que la técnica usada no fue apta para análisis cuantitativo, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que 1-undeceno es el compuesto volátil más importante en las emisiones volátiles de *E. pectinatus*. En la Tabla 5.6 se informan los tiempos de retención, área relativa, IR calculado, Porcentaje de similitud del EM contra el de la biblioteca, identidad adjudicada e IR de bibliografía de los compuestos aislados.

Los compuestos mayoritarios encontrados como componentes volátiles de *E. pectinatus* fueron, según la biblioteca de EM, el 1-undeceno y el trans- $\beta$ -cariofileno. Estos compuestos no estuvieron disponibles ni eran comercialmente accesibles, por lo que no fue posible una posterior evaluación de los mismos individualmente para determinar cuáles podrían tener un efecto attractante hacia mosquitos. Aun así los resultados obtenidos del análisis de espacio de cabeza, van a ser tenidos en cuenta en conclusiones

Tiempo de Retención	Área en %	Compuesto	IR de DB-5ms	Similitud EM en %	IR bibliografía de DB-5ms
4,89	75,7	1-noneno	891	97	889 [159]
5,81	9,2	$\alpha$ -pineno	933	98	933 [41]
6,65	0,3	sabineno	967	92	969 [19]
6,79	5,19	$\beta$ -pineno	976	96	976 [186]
7,40	4,77	acetato de 4-hexen-1-ol	1003	97	-
8,00	1,34	$\beta$ -felandreno	1028	88	1028 [185]
9,40	0,25	1-undeceno	1088	90	1091 [165]

Tabla 5.7: Compuestos volátiles de *S. madagascariensis* identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros y por comparación del IR calculado para la columna DB-5ms contra una biblioteca.

y en elección de sustancias para ensayos futuros.

### 5.3.3. Identificación de volátiles de *S. madagascariensis*.

Los compuestos volátiles encontrados en los espacios de cabeza de *S. madagascariensis* provenientes de la parte aérea de la planta con el tallo cortado, dentro de un matraz Erlenmeyer con agua purificada y confinada en una bolsa de policarbonato, se muestran en la Tabla 5.7. La captura de volátiles y su posterior análisis por CG-EM con una columna DB-5ms, incluyendo la incorporación de alcanos para determinar el IR, se realizaron como fue descrito en Métodos 4.3.1. En la Tabla 5.7 se informan los tiempos de retención, área relativa, IR, Porcentaje de similitud del EM contra el de la biblioteca, identidad adjudicada e IR de bibliografía de los compuestos identificados. El perfil del tipo de compuestos volátiles de *S. madagascariensis* es muy parecido al de *E. pectinatus*, ya que en ambos casos se identificaron terpenos y 1-alquenos principalmente. Todos los terpenos identificados en esta planta pertenecen al grupo de los monoterpenos y son: (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, sabineno y felandreno. Los 1-alquenos encontrados fueron: 1-noneno y 1-undeceno.

Las identidades del 1-noneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno se confirmaron además por co-inyección de los estándares sintéticos junto a los volátiles extraídos de la planta. Los volátiles fueron también analizados en la columna quiral Cyclosil-B. Los resultados obtenidos en la columna quiral Cyclosil-B sirven para determinar cuál o cuáles enantiómeros están presentes de una molécula quiral, en este caso el  $\alpha$ -pineno. La co-inyección de ambos enantiómeros de  $\alpha$ -pineno mostró que ambos isómeros estaban presentes en los volátiles encontrados en los espacios de cabeza de *S. madagascariensis*, aunque la proporción del enantiómero (+)- $\alpha$ -pineno en comparación con el enantiómero (-)- $\alpha$ -pineno, fue de 200 a 1.

Tiempo de Retención	Área en %	Compuesto	IR de DB-5ms	Similitud EM en %	IR bibliografía de DB-5ms
6,95	1,39	4-isotiocianato-1-buteno	982	82	-
8,07	5,65	limoneno	1030	93	1030 [185]
8,91	13,47	acetofenona	1067	97	1063 [92]
10,00	1,13	alcohol fenetílico	1113	87	1112 [161]
10,59	0,14	fenilacetónitrilo	1139	80	1150 [142]
15,93	2,93	compuesto desconocido	1390	-	-

Tabla 5.8: Compuestos volátiles de *L. maritima* identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros y por comparación del IR calculado para la columna DB-5ms contra una biblioteca.

### 5.3.4. Identificación de volátiles de *L. maritima*

Los compuestos volátiles encontrados en los espacios de cabeza de *L. maritima* provenientes de la parte aérea de la planta enraizada y confinada en una bolsa de policarbonato, se muestran en la Tabla 5.8. La captura de volátiles y su posterior análisis por CG-EM con una columna DB-5ms, incluyendo la incorporación de alcanos para determinar el IR, se realizaron como fue descrito en Métodos 4.3.1. En la Tabla 5.8 se informan los tiempos de retención, área relativa, IR calculado, Porcentaje de similitud del EM contra el de la biblioteca, identidad adjudicada e IR de bibliografía de los compuestos aislados. Los compuestos aromáticos identificados fueron acetofenona, alcohol fenetílico y fenilacetónitrilo. Los terpenos presentes fueron identificados como limoneno, que es un monoterpeno y un compuesto desconocido. Se confirmó por co-inyección del estándar sintético, junto a los volátiles extraídos de la planta, la presencia de acetofenona, alcohol fenetílico y fenilacetónitrilo.

En la columna DB-5ms se registró un compuesto cuyo espectro de masa no se asemejaba a ninguno de la biblioteca. El IR calculado del compuesto desconocido en DB-5ms fue de 1390 y en DB-Wax fue de 1490. El peso molecular determinado por medio de la EM-IQ, resultó ser de 204 m/z. En la Tabla 5.9 se pueden observar las intensidades relativas y absolutas de los fragmentos ionizados por IE. La Tabla 5.10 muestra el patrón de fragmentación en el EM del compuesto desconocido. Analizando el patrón de fragmentación, se puede especular, que el pico base 134 m/z es el resultado del desprendimiento de un penteno 70 m/z de la molécula inicial de 204 m/z. El pico de 119 m/z se produciría por pérdida de un metilo de la molécula del pico base.

### 5.3.5. Síntesis de 1-noneno

La identificación tentativa por medio del EM e IR del 1-noneno como el principal componente de la planta *S. madagascariensis* que mostró atracción hacia machos pero no hacia hembras de *Ae. aegypti*, en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores

Peso Molecular m/z	Intensidad Absoluta	Intensidad Relativa
51	18	1,8
53,05	36	3,6
55,05	63	6,3
65	39	3,9
67,05	24	2,4
69,85	14	1,4
77	50	5
78	24	2,4
79	45	4,5
91	222	22,2
92	210	21
103	12	1,2
105	86	8,6
106	48	4,8
114,95	27	2,7
117	39	3,9
119	388	38,8
120	38	3,8
133	33	3,3
134	1000	100
135	114	11,4
161,1	14	1,4

Tabla 5.9: Intensidades relativas y absolutas de los fragmentos del espectro de masas, generados por IE, del compuesto desconocido de  $t_R = 15,93$

Compuesto	Patrón de Fragmentación
Compuesto desconocido de masa 204 m/z.	161(M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> , 1), 134(M - C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> , 100), 119(M - C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> , 39), 91(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> , 22), 77(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> , 5), 55(C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> , 6)

Tabla 5.10: Patrón de fragmentación del compuesto desconocido. Principales fragmentos del espectro de masa.

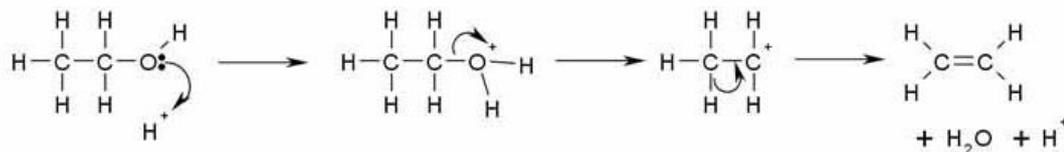


Figura 5.2: Esquema del mecanismo de la deshidratación de un alcohol primario.

en olfatómetro” 5.1.2 y en el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 5.2.2 , despertó un especial interés por este compuesto. Potencialmente se trataría de un attractante sólo de machos y que no había sido previamente informado como attractante en ninguna otra especie de culícidos. Al no disponerse del estándar sintético de 1-noneno, el cual no sólo es indispensable para hacer los ensayos comportamentales, sino para también confirmar la presencia del compuesto como el principal componente volátil de *S. madagascariensis*, se intentó su síntesis en el laboratorio.

Como se describe en Métodos 4.3.2, se utilizó la reacción de deshidratación de alcoholes primarios que se muestra en la Figura 5.2 [12].

El primer intento se realizó por columna de destilación como fue descrito en Métodos 4.3.2. La reacción se llevó a cabo entre el 1-nonanol y el ácido sulfúrico como agente deshidratante. La temperatura se seleccionó para que sea mayor a la de vaporización del 1-noneno, pero menor a la del 1-nonanol y del ácido sulfúrico, con el objetivo que el producto se separara de los reactivos, ni bien se formara, promoviendo el equilibrio químico hacia el lado del producto. El producto de la síntesis analizado por CG-EM mostró cuatro picos principales y dos menores, que fueron atribuidos por similitud con la información de la biblioteca Wiley 7 a los isómeros lineales, cis y trans, del n-noneno. Debido a las limitaciones del método, no es posible determinar la posición del doble enlace, ni el isómero geométrico del n-noneno. La existencia de isómeros cis y trans, se dedujo debido a que se detectaron seis isómeros de n-noneno. La molécula tiene tres isómeros cis, tres isómeros trans y el 1-noneno. Para poder explicar la detección de esa cantidad de isómeros, es necesaria la presencia de isómeros cis y trans.

Posteriormente se realizó la misma reacción, pero en un vial de 20 ml en diferentes condiciones de temperatura de acuerdo a lo descrito en Métodos 4.3.2. El producto de la síntesis a 50°C analizado por CG-EM mostró cuatro picos principales, de los cuales, tres fueron atribuidos por similitud con la información de la biblioteca Wiley 7 a isómeros del n-noneno y uno a 1-nonanol sin reaccionar.

Cuando la temperatura de reacción fue de 100°C el análisis por CG-EM mostró dos picos principales tentativamente identificados por similitud con la información de la biblioteca Wiley 7, uno mayoritario de éter dinonílico y el otro menor de 1-nonanol sin reaccionar.

La misma reacción llevada a cabo a 150°C dio un producto cuyo análisis por CG-EM mostró cinco picos principales tentativamente identificados por similitud con la información de la biblioteca Wiley 7, el más pequeño como 1-nonanol residual y los otros cuatro como isómeros lineales de n-noneno.

Finalmente en la reacción en vial de 20 ml se cambió el ácido sulfúrico como catalizador de deshidratación por el ácido ortofosfórico. A 50°C y 100°C la reacción dio productos similares cuyo análisis por CG-EM mostraron dos picos principales y uno menor tentativamente identificados por similitud con la información de la biblioteca Wiley 7, uno de ellos como 1-nonanol residual que no reaccionó y el otro como ácido nonanoico. El menor fue tentativamente identificado como dinoniléter. La mayor temperatura de reacción dio lugar a un esperable incremento de ácido nonanoico, del éter y una disminución del alcohol sin reaccionar. Sorpresivamente esta reacción realizada a 150°C mostró por identificación con la información de la biblioteca Wiley 7 la formación de una cantidad menor de dinoniléter y una mayor formación de ácido nonanoico. Posiblemente a esta temperatura se favorecía la oxidación del 1-noneno en ácido nonanoico y otros compuestos volátiles que se pudieran haber formado (en ningún caso se midió rendimiento de las reacciones).

Todas las síntesis que se hicieron con ácido sulfúrico como catalizador, resultaron en un mezcla de isómeros lineales de noneno, según la comparación de los espectros de masa obtenidos con la biblioteca. Debido a que una vez ionizada la molécula en la cámara de ionización del espectrómetro de masas, el radical libre migra con igual probabilidad hacia los otros carbonos de la cadena, el patrón de fragmentaciones que se produce a continuación es similar para los distintos isómeros de posición del n-noneno. Hasta no probar con el estándar sintético, no es prudente afirmar la identidad del isómero de posición de un alqueno lineal. Por este motivo no es posible adjudicarle una posición exacta al doble enlace de los isómeros de n-noneno obtenidos en la síntesis.

Por otra parte, las síntesis de 1-noneno con ácido ortofosfórico como catalizador, no resultaron en la detección de un pico compatible con este compuesto.

Como resultado de los intentos de síntesis de 1-noneno, se obtuvieron mezclas isoméricas con la potencial presencia del isómero. Debido a las dificultades que encontramos en la purificación y aislamiento de los isómeros, se descartaron las mezclas obtenidas por síntesis y se trabajó en adelante con el estándar comercial de alta pureza isomérica tanto para corroborar por co-adsorción la identidad del principal compuesto volátil de *S. madagascariensis* 5.3.3 como para realizar los estudios comportamentales que se presentan en esta tesis.

## 5.4. Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores

### 5.4.1. Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores

Se identificaron varios compuestos de las plantas con flores evaluadas: por medio de la comparación de los espectros de masa obtenidos en el CG-EM, contra los de la biblioteca Wiley 7 y por comparación de los IR contra los de una referencia bibliográfica. Se co-inyectaron los estándares sintéticos para confirmar la identidad de los compuestos que estaban disponibles y que eran de interés. El criterio para determinar los compuestos a ser evaluados biológicamente fue variado. Algunos compuestos fueron elegidos porque son relativamente volátiles (IR en DB-5ms menor a 1200), accesibles comercialmente y/o relativamente económicos: acetofenona, alcohol fenetílico, 1-octanol, fenilacetoneitrilo,  $\beta$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno y (+)- $\alpha$ -pineno, criterios que los vuelven viables para ser potencialmente incluidos en trampas a escala comercial. El compuesto 1-noneno fue elegido porque dos plantas con flores, *S. madagascariensis* y *E. pectinatus*, contenían mayoritariamente un alqueno. Como el undeceno de *E. pectinatus* no estaba disponible ni es accesible, probamos el 1-noneno de *S. madagascariensis*. Los isotiocianatos probados, el isotiocianato de alilo y el isotiocianato de bencilo, fueron elegidos porque eran los únicos isotiocianatos presentes en el análisis de volátiles disponibles a nivel comercial.

El efecto de los compuestos químicos sobre el comportamiento es altamente dependiente de su cantidad, por lo que se evaluaron tres cantidades de cada uno, con un orden de magnitud de diferencia entre cada una de ellas con el objetivo de determinar si existe una relación masa-respuesta.

La Tabla 5.11 muestra los efectos comportamentales en hembras de *Ae. aegypti*, de los siguientes compuestos en tres cantidades distintas (1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g y 100  $\mu$ g): acetofenona, 1-octanol, fenilacetoneitrilo, isotiocianato de alilo, alcohol fenetílico, isotiocianato de bencilo, 1-noneno,  $\beta$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno y (+)- $\alpha$ -pineno, junto con el análisis estadístico correspondiente, el cual fue calculado con el Test de Kruskal-Wallis.

La Tabla 5.12 muestra los efectos comportamentales en machos adulto de *Ae. aegypti*, hacia los siguientes compuestos en tres cantidades distintas (1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g y 100  $\mu$ g): acetofenona, 1-octanol, fenilacetoneitrilo, isotiocianato de alilo, alcohol fenetílico, isotiocianato de bencilo, 1-noneno,  $\beta$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno y (+)- $\alpha$ -pineno, junto con el análisis estadístico correspondiente calculado con el Test de Kruskal-Wallis.

En hembras, los compuestos que resultaron ser atractantes con significancia es-

Compuesto	Número de Réplicas	Proporción de elección de brazo con el estímulo	Desviación estándar	H	Valor de p	Número de mosquitos
acetofenona blanco	9	0,55	0,18	0	1	90
acetofenona 1 µg *	6	0,75	0,14	6,42	0,0068	60
acetofenona 10 µg	6	0,57	0,24	0,01	0,9123	60
acetofenona 100 µg	6	0,61	0,21	0,68	0,4102	60
1-octanol blanco	9	0,5	0,13	0	1	90
1-octanol 1 µg	6	0,5	0,22	0,01	0,9373	60
1-octanol 10 µg	6	0,64	0,19	1,39	0,2298	60
1-octanol 100 µg *	6	0,15	0,17	8	0,0008	60
fenilacetoniitrilo blanco	9	0,49	0,27	0	1	90
fenilacetoniitrilo 1 µg	6	0,50	0,19	0	1	60
fenilacetoniitrilo 10 µg	6	0,75	0,20	3,56	0,0647	60
fenilacetoniitrilo 100 µg	6	0,42	0,21	1,39	0,2601	60
isotiocianato de alilo blanco	9	0,54	0,19	0	1	90
isotiocianato de alilo 1 µg	6	0,59	0,21	0,35	0,5578	60
isotiocianato de alilo 10 µg	6	0,42	0,19	2,53	0,1283	60
isotiocianato de alilo 100 µg	6	0,40	0,15	2,92	0,0833	60
alcohol fenetílico blanco	9	0,56	0,2	0	1	90
alcohol fenetílico 1 µg	8	0,68	0,18	1,95	0,1596	80
alcohol fenetílico 10 µg	8	0,58	0,19	0,06	0,8283	80
alcohol fenetílico 100 µg	8	0,44	0,13	1,33	0,2547	80
isotiocianato de bencilo blanco	9	0,52	0,12	0	1	90
isotiocianato de bencilo 1 µg	6	0,53	0,18	0,09	0,8092	60
isotiocianato de bencilo 10 µg	6	0,58	0,24	0,68	0,4533	60
isotiocianato de bencilo 100 µg	6	0,49	0,17	0,01	0,9261	60
1-noneno blanco	9	0,53	0,32	0	1	90
1-noneno 1 µg	9	0,39	0,10	1,87	0,1671	90
1-noneno 10 µg	10	0,60	0,26	0,14	0,7307	100
1-noneno 100 µg	9	0,50	0,16	0,05	0,8513	90
β-pineno blanco	9	0,55	0,19	0	1	90
β-pineno 1 µg	10	0,50	0,16	0,2	0,6619	100
β-pineno 10 µg	10	0,51	0,18	0,06	0,8265	100
β-pineno 100 µg	10	0,56	0,19	0,54	0,4653	100
(-)-α-pineno blanco	9	0,49	0,3	0	1	90
(-)-α-pineno 1 µg	10	0,47	0,18	0,1	0,7717	100
(-)-α-pineno 10 µg	10	0,47	0,31	0,02	0,8858	100
(-)-α-pineno 100 µg	10	0,45	0,16	0,2	0,6732	100
(+)-α-pineno blanco	9	0,48	0,26	0	1	90
(+)-α-pineno 1 µg	9	0,48	0,21	0,002	0,9878	90
(+)-α-pineno 10 µg *	11	0,70	0,18	5,37	0,0145	110
(+)-α-pineno 100 µg	9	0,49	0,29	0,19	0,6908	90

Tabla 5.11: Respuesta en olfatómetro de hembras de *Ae. aegypti* hacia los compuestos presentes en flores atractantes. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el blanco del mismo solvente,  $p \leq 0,05$ .

Compuesto	Número de Réplicas	Proporción de elección de brazo con el estímulo	Desviación estándar	H	Valor de p	Número de mosquitos
acetofenona blanco	9	0,56	0,18	0	1	90
acetofenona 1 µg	6	0,58	0,24	0,003	0,9798	60
acetofenona 10 µg	6	0,67	0,23	1,13	0,2923	60
acetofenona 100 µg	6	0,56	0,16	0,09	0,816	60
1-octanol blanco	9	0,49	0,13	0	1	90
1-octanol 1 µg	6	0,47	0,25	0,13	0,7305	60
1-octanol 10 µg	6	0,36	0,19	1,68	0,1964	60
1-octanol 100 µg *	6	0,25	0,22	4,5	0,0306	60
fenilacetnitrilo blanco	9	0,57	0,17	0	1	90
fenilacetnitrilo 1 µg	6	0,50	0,2	0,42	0,5413	60
fenilacetnitrilo 10 µg	6	0,40	0,21	2,35	0,1341	60
fenilacetnitrilo 100 µg	6	0,50	0,2	0,89	0,3457	60
isotiocianato de alilo blanco	9	0,47	0,26	0	1	90
isotiocianato de alilo 1 µg	6	0,47	0,21	0,003	0,9826	60
isotiocianato de alilo 10 µg	6	0,43	0,26	0,01	0,9355	60
isotiocianato de alilo 100 µg	6	0,45	0,18	0,03	0,8911	60
alcohol fenetílico blanco	9	0,58	0,21	0	1	90
alcohol fenetílico 1 µg	8	0,6	0,09	0,002	0,9751	80
alcohol fenetílico 10 µg	8	0,58	0,22	0,01	0,9315	80
alcohol fenetílico 100 µg	8	0,44	0,16	2,37	0,1236	80
isotiocianato de bencilo blanco	9	0,55	0,18	0	1	90
isotiocianato de bencilo 1 µg	6	0,51	0,15	0,06	0,8188	60
isotiocianato de bencilo 10 µg *	6	0,2	0,19	8	0,0022	60
isotiocianato de bencilo 100 µg *	6	0,27	0,27	4,5	0,0266	60
1-noneno blanco	9	0,54	0,2	0	1	90
1-noneno 1 µg	10	0,61	0,18	0,94	0,3009	100
1-noneno 10 µg *	12	0,85	0,2	7,49	0,0041	120
1-noneno 100 µg	10	0,52	0,22	0,03	0,8992	100
β-pineno blanco	9	0,55	0,3	0	1	90
β-pineno 1 µg	10	0,64	0,16	1,31	0,2541	100
β-pineno 10 µg	10	0,66	0,14	2,94	0,0839	100
β-pineno 100 µg	10	0,54	0,15	0,43	0,5311	100
(-)-α-pineno blanco	9	0,51	0,14	0	1	90
(-)-α-pineno 1 µg	9	0,5	0,21	0,02	0,9135	90
(-)-α-pineno 10 µg	8	0,33	0,15	3,7	0,0531	80
(-)-α-pineno 100 µg	9	0,58	0,18	0,44	0,529	90
(+)-α-pineno blanco	9	0,56	0,19	0	1	90
(+)-α-pineno 1 µg	9	0,46	0,31	0,19	0,6149	90
(+)-α-pineno 10 µg	9	0,53	0,31	0,02	0,9124	90
(+)-α-pineno 100 µg	9	0,46	0,19	1,03	0,3032	90

Tabla 5.12: Respuesta en olfatómetro de machos de *Ae. aegypti* hacia los compuestos presentes en flores atractantes. Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el blanco del mismo solvente,  $p \leq 0,05$ .

tadística,  $p \leq 0,05$ , son acetofenona en la cantidad de 1  $\mu\text{g}$  y (+)- $\alpha$ -pineno en la cantidad de 10  $\mu\text{g}$ . La masa de 100  $\mu\text{g}$  de 1-octanol generó un comportamiento estadísticamente significativo,  $p \leq 0,05$ , de aversión de vuelo hacia el brazo con el estímulo, lo que sugiere que es un potencial repelente de *Ae. aegypti* hembras. Fenilacetónitrilo (10  $\mu\text{g}$ ) es el compuesto que presenta, en hembras, una respuesta comportamental positiva cercana al umbral de significancia estadística,  $0,05 < p \leq 0,10$ . Isotiocianato de alilo (100  $\mu\text{g}$ ) es el compuesto que presenta, en hembras, una respuesta comportamental negativa cercana al umbral de significancia estadística,  $0,05 < p \leq 0,10$ .

En machos, el compuesto que resultó ser atractante con significancia estadística,  $p \leq 0,05$ , fue el 1-noneno en la cantidad de 10  $\mu\text{g}$ . Las masas de 10 y 100  $\mu\text{g}$  de isotiocianato de bencilo y la de 100  $\mu\text{g}$  de 1-octanol, generaron un comportamiento estadísticamente significativo,  $p \leq 0,05$ , de aversión de vuelo hacia el brazo con el estímulo, lo que sugiere que son potenciales repelente de *Ae. aegypti* machos. El compuesto (-)- $\alpha$ -pineno, en la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  generó una respuesta comportamental negativa cercana al umbral de significancia estadística,  $0,05 < p \leq 0,10$ . La cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -pineno presentó, en machos, una respuesta comportamental positiva cercana al umbral de significancia estadística,  $0,05 < p \leq 0,10$ .

## 5.5. Estudios sobre inflorescencias cortadas de *L. maritima*

### 5.5.1. Evaluación de atracción por inflorescencia cortadas de *L. maritima* en el olfatómetro

La inflorescencia es la disposición de las flores sobre las ramas o la extremidad del tallo; su límite está determinado por una hoja normal.

Debido a la buena performance de la planta *L. maritima* en atracción de mosquitos *Aedes* de ambos géneros y los cambios que ésta sufre en sus emisiones volátiles por daño [166], fue de interés realizar un estudio comportamental con sus inflorescencias cortadas. Como miembro de las brasicáceas, esta planta libera alquenal isotiocianatos y alquil epitionitrilos cuando es dañada mecánicamente. En el ensayo en olfatómetro anteriormente presentado, se empleó la planta entera, por lo que los volátiles liberados por el corte no estaban presentes. El objetivo de este ensayo fue evaluar si los volátiles generados y liberados por las inflorescencias cortadas influían en la orientación de vuelo positiva hacia el brazo del estímulo.

La introducción directa de las inflorescencias cortadas en el cilindro donde eran ubicadas las plantas con flores enteras para ser evaluadas en el olfatómetro, no fue posible. Por lo tanto se introdujeron las inflorescencias cortadas directamente en un brazo del olfatómetro.

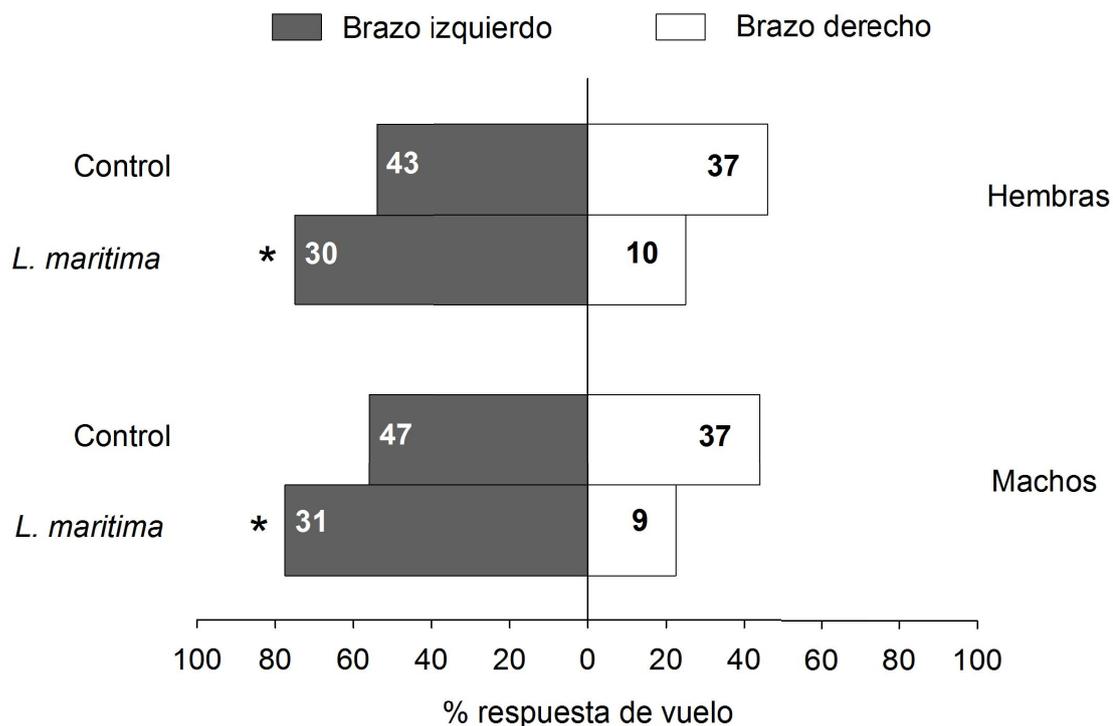


Figura 5.3: Respuesta de elección de ambos sexos de *Ae. aegypti* en el olfatómetro hacia inflorescencias de *L. maritima*.

En la Figura 5.3 se puede observar la cantidad y porcentaje de mosquitos de cada sexo que eligió cada brazo: el blanco o el estímulo con inflorescencia cortada de *L. maritima*. Cada barra horizontal representa la preferencia por algún brazo, el número dentro de la barra indica la cantidad de mosquitos que se decidieron por ese brazo. El brazo izquierdo contenía al estímulo olfativo, el brazo derecho, el control. El asterisco señala si la cantidad de mosquitos que eligió un brazo sobre el otro es estadísticamente significativa, analizados en comparación con el blanco por  $\chi^2$ : (Hembras:  $\chi^2 = 5,40$ ; machos:  $\chi^2 = 5,05$ ; en ambos  $d.f. = 1, p \leq 0,05$ ).

### 5.5.2. Identificación de compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*

La planta *L. maritima* es miembro de la familia de las brassicáceas, las cuales se caracterizan por contener en sus tejidos glucosinolatos. Los mismos son liberados e hidrolizados cuando la planta es dañada mecánicamente, ya sea por un corte o la mordedura de un herbívoro. Los glucosinolatos se descomponen rápidamente por hidrólisis al entrar en contacto con la mirosinasa. La planta almacena la enzima y los glucosinolatos en compartimentos separados, los cuales se combinan cuando ocurre un daño mecánico. Los productos de la descomposición de los glucosinolatos son 1-alquenil isotiocianatos y epitionitrilos. La proporción en la que se generan los productos

de hidrólisis está determinada por la velocidad relativa de formación de cada uno. Tanto los 1-alquencil isotiocianatos como los epitionitrilos, son sospechados de tener algún efecto disuasivo hacia herbívoros por ser altamente irritantes.

El interés en el análisis de los compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima* estuvo basado en los resultados obtenidos en: el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 5.2.2 y en la “Evaluación de atracción por inflorescencias cortadas de *L. maritima* en el olfatómetro” 5.5.1.

Para esto se introdujo 1 g de inflorescencias de *L. maritima* en un vial de 10 ml sellado con un septa de teflón, se expuso la fibra SPME al espacio de cabeza y los volátiles extraídos fueron analizados en un equipo CG-EM en una columna no polar DB-5ms y con una columna quiral Cyclosil-B, como se describió en Métodos 4.5.2. Posteriormente se repitió la extracción, pero se expuso la fibra en una segunda etapa a una serie de alcanos lineales, para poder calcular los índices de retención. En la Tabla 5.13 están los resultados de los compuestos analizados en la columna DB-5ms. Se informan los tiempos de retención, área relativa, IR calculado, Porcentaje de similitud del EM contra el de la biblioteca, identidad adjudicada e IR de bibliografía de los compuestos aislados.

Los probables isotiocianatos identificados inicialmente fueron: isotiocianato de alilo, 4-isotiocianato-1-buteno, 5-isotiocianato-1-penteno, isotiocianato de 4-metilpentilo, isotiocianato de hexilo y isotiocianato de bencilo. Los probables compuestos aromáticos identificados fueron: fenilacetaldehído, acetofenona, alcohol fenético, fenilacetnitrilo, 4-vinil-2-metoxi-fenol. Los probables epitionitrilos identificados: 3,4-epitiobutilnitrilo y 4,5-epitiopentilnitrilo. Probables compuestos que son únicos en su categoría: 1-octanol y el compuesto desconocido.

Se confirmaron posteriormente, por medio de la co-inyección del patrón los siguientes compuestos identificados: isotiocianato de alilo, acetofenona, 1-octanol, alcohol fenético, fenilacetnitrilo y isotiocianato de bencilo. No se pudo conseguir el estándar del compuesto que mostró el pico con mayor área, el 4-isotiocianato-1-buteno. Su limitada disponibilidad comercial lo hubiera hecho inviable para ser utilizado como atrayente en trampas comerciales para mosquitos.

Como era de esperar, el perfil de los volátiles detectados cambió en comparación con el de la planta entera. Se detectaron más 1-alquencil isotiocianatos y epitionitrilos, producto de la hidrólisis de los glucosinolatos.

Los epitionitrilos son moléculas complejas, de las cuales únicamente el 3,4-epitiobutilnitrilo se encuentra en la biblioteca de espectros de masa. El pico de 4,5-epitiopentilnitrilo fue adjudicado en base a la interpretación del espectro de masas de 3,4-epitiobutilnitrilo y comparando los patrones de ruptura de ambos epitionitrilos. En la tabla 5.16 están los patrones de fragmentación de ambos epitionitrilos. Se puede observar como los principales fragmentos del 4,5-epitiopentilnitrilo, pesan 14 m/z más que los de 3,4-epitiobutilnitrilo. Diferencia que se puede atribuir al metil extra del 4,5-epitiopentilnitrilo.

Tiempo de Retención	Área en %	Compuesto	IR de DB-5ms	Similitud EM en %	IR bibliografía de DB-5ms
4,67	0,02	isotiocianato de alilo	879	84	-
7,02	86,96	4-isotiocianato-1-buteno	985	97	-
8,42	0,19	fenilacetaldehido	1045	89	1045 [35]
8,92	0,01	acetofenona	1067	75	1065 [92]
9,05	0,07	1-octanol	1072	90	1071 [168]
9,26	2,42	5-isotiocianato-1-penteno	1081	-	-
10,03	0,3	alcohol fenético	1115	90	1112 [161]
10,28	6,31	3,4-epitiobutilnitrilo	1126	84	-
10,60	0,13	fenilacetoneitrilo	1140	90	1150 [142]
11,07	0,54	isotiocianato de 4-metil-pentilo	1161	92	-
11,91	0,11	isotiocianato de hexilo	1198	85	-
12,96	0,54	4,5-epitiopentilnitrilo	1246	-	-
14,37	0,05	4-vinil-2-metoxi-fenol	1312	83	1312 [40]
15,46	0,19	isotiocianato de bencilo	1366	92	1389 [34]
15,96	0,4	compuesto desconocido	1390	-	-

Tabla 5.13: Compuestos volátiles de inflorescencias de *L. martima* cortadas, identificados por: comparación del EM contra una biblioteca de espectros; comparación del IR medido para la columna DB-5ms contra una biblioteca.

El análisis de la muestra en una columna quiral Cyclosil-B, mostró la presencia de dos picos de igual EM separados por un tiempo de  $\sim 0,06$  minutos (o 4 segundos) cada uno, ambos con un área bajo la curva similar, reforzando la hipótesis de la presencia de mezclas racémicas de epitionitros.

Las mezclas racémicas son producto de la hidrólisis no enzimática de los glucosinolatos. En la Tabla 5.14 se puede ver el espectro de masa de 3,4-epitiobutilnitrilo, en la Tabla 5.15 el espectro de masa de 4,5-epitiopentilnitrilo y en la Tabla 5.16 una comparación de los patrones de fragmentación de ambos epitionitros.

### 5.5.3. Bioensayo de atracción hacia compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de *L. maritima*

La Figura 5.4 contiene los resultados de la evaluación del efecto en hembras de los compuestos volátiles identificados y disponibles del espacio de cabeza de *L. maritima* cortadas. Cada barra horizontal representa la preferencia por algún brazo, el número dentro de la barra indica la cantidad de mosquitos que se decidieron por ese brazo. El brazo izquierdo contenía al estímulo olfativo. El asterisco denota una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento y el blanco control,  $p \leq 0,05$ , la cual fue determinada por medio de la prueba de  $\chi^2$ . La acetofenona presentó una respuesta de vuelo positiva estadísticamente significativa: ( $\chi^2 = 7,84, d.f. = 1, p < 0,01$ ). No se registró un comportamiento de vuelo estadísticamente significativo para el isotiocianato de alilo ( $\chi^2 = 0,002$ ), el fenilacetoneitrilo ( $\chi^2 = 0,41$ ), el isotiocianato

Peso Molecular m/z	Intensidad Absoluta	Intensidad Relativa
45	1000	100
46	292	29,2
47	378	37,8
50	41	4,1
51	73	7,3
52	114	11,4
53	277	27,7
54	231	23,1
57	39	3,9
58	128	12,8
59	172	17,2
60	343	34,3
67	193	19,3
68	44	4,4
71	56	5,6
72	28	2,8
73	317	31,7
80	95	9,5
81	19	1,9
85	100	10
86	151	15,1
98	26	2,6
112	27	2,7
113	598	59,8

Tabla 5.14: Intensidades relativas y absolutas de los picos del espectro de masa, generados por IE del 3,4-epitiobutilnitrilo.

Peso Molecular m/z	Intensidad Absoluta	Intensidad Relativa
45	1000	100
46	567	56,7
47	380	38
53	286	28,6
54	384	38,4
55	722	72,2
58	132	13,2
59	250	25
60	314	31,4
66	219	21,9
67	500	50
68	153	15,3
73	308	30,8
74	211	21,1
80	96	9,6
81	97	9,7
85	213	21,3
86	106	10,6
87	133	13,3
94	191	19,1
95	42	4,2
99	66	6,6
100	39	3,9
112	28	2,8
127	347	34,7

Tabla 5.15: Intensidades relativas y absolutas de los picos del espectro de masa, generados por IE del 4,5-epitiopentilnitrilo.

Compuesto	Patrón de Fragmentación
3,4-epitiobutilnitrilo	113(M <sup>+</sup> , 60), 98(M - CH <sub>3</sub> , 3), 86(M - HCN, 15), 80(M - SH, 10), 45(CHS <sup>+</sup> , 100)
4,5-epitiopentilnitrilo	127(M <sup>+</sup> , 38), 112(M - CH <sub>3</sub> , 3), 100(M - HCN, 8), 94(M - SH, 21), 45(CHS <sup>+</sup> , 100)

Tabla 5.16: Patrones de fragmentación de 3,4-epitiobutilnitrilo y de 4,5-epitiopentilnitrilo. Principales fragmentos del espectro de masa de ambos compuestos.

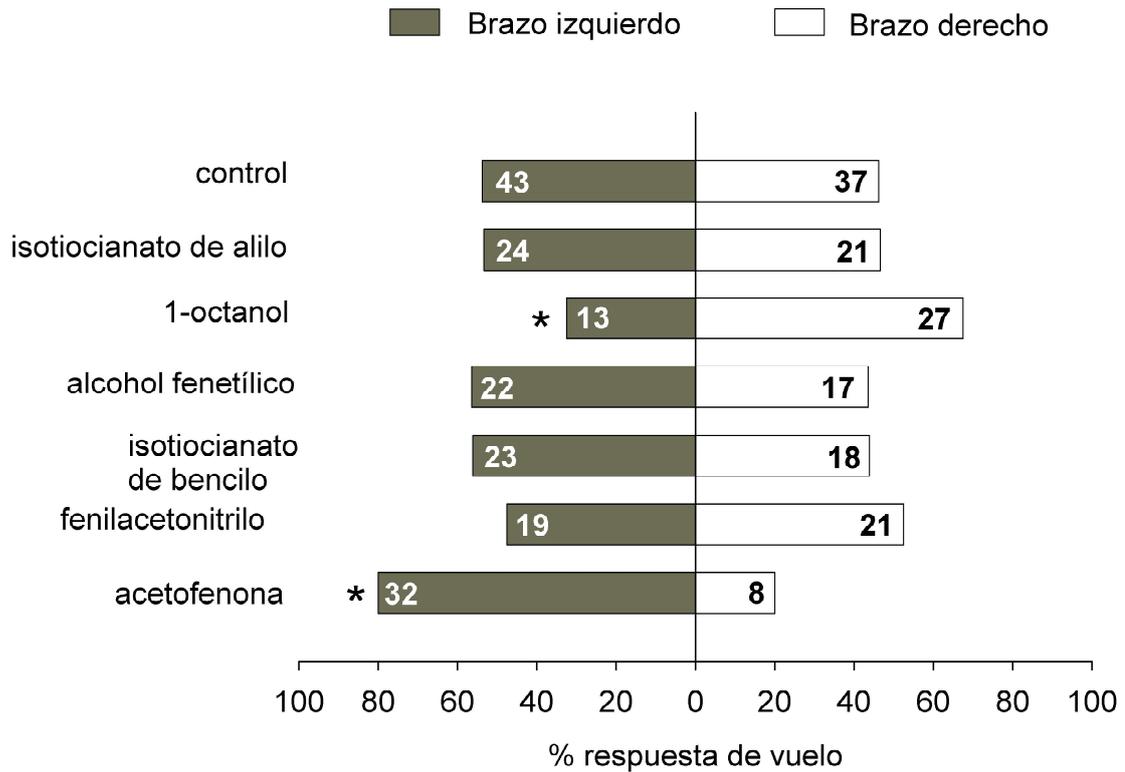


Figura 5.4: Respuesta de elección de hembras de *Ae. aegypti* en el olfactómetro en “Y” hacia seis compuestos volátiles identificados en *L. maritima*.

de bencilo ( $\chi^2 = 0,002$ ) y el alcohol fenético ( $\chi^2 = 0,075$ ); para todas: ( $d.f. = 1, p > 0,05$ ). El ensayo con 1-octanol tuvo una respuesta de vuelo negativa en hembras estadísticamente significativa: ( $\chi^2 = 4,84, d.f. = 1, p \leq 0,05$ ).

La Figura 5.5 contiene los resultados de la evaluación del efecto en machos de los compuestos volátiles identificados y disponibles del espacio de cabeza de *L. maritima* cortadas. Cada barra horizontal representa la preferencia por algún brazo; el número dentro de la barra indica la cantidad de mosquitos que se decidieron por ese brazo. El brazo izquierdo contenía al estímulo olfativo. El asterisco denota una diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento y el blanco control, ( $p \leq 0,05$ ), la cual fue determinada por medio de la prueba de  $\chi^2$ . La acetofenona presentó una respuesta de vuelo positiva estadísticamente significativa: ( $\chi^2 = 6,65, d.f. = 1, p < 0,01$ ). No se registró un comportamiento de vuelo estadísticamente significativo para el isotiocianato de alilo ( $\chi^2 = 0,1504$ ), el fenilacetónitrilo ( $\chi^2 = 2,04$ ), el isotiocianato de bencilo ( $\chi^2 = 2,04$ ), el alcohol fenético ( $\chi^2 = 0,26$ ) y 1-octanol ( $\chi^2 = 2,03$ ); para todas: ( $d.f. = 1, p > 0,05$ ).

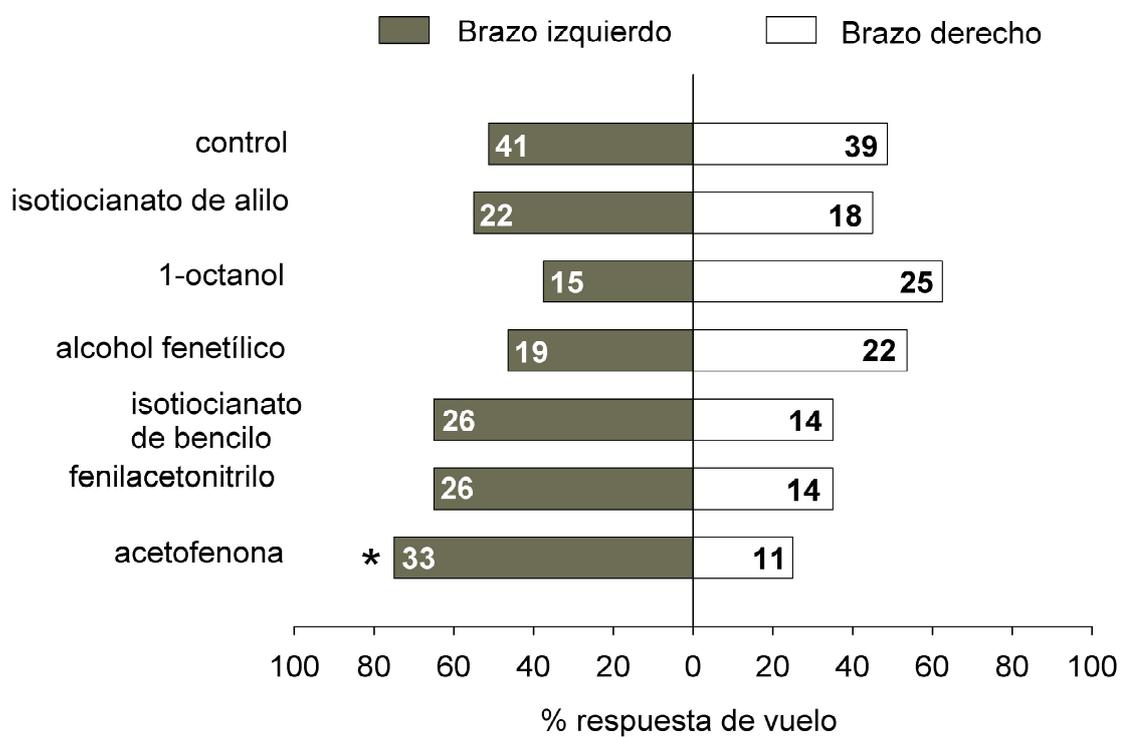


Figura 5.5: Respuesta de elección de machos de *Ae. aegypti* en el olfatómetro en “Y” hacia seis compuestos volátiles identificados en *L. maritima*.

#### 5.5.4. Determinación de una posible nectarización por *Ae. aegypti* de la flor de *L. maritima* presente en su inflorescencia. Cuantificación de ingesta de fructosa

Dados los resultados obtenidos que mostraron un efecto attractante de *L. maritima* y su inflorescencia sobre *Ae. aegypti*, fue de interés corroborar si efectivamente el mosquito se alimenta de la planta. Es decir, determinar si la flor de *L. maritima* es nectarizable por *Ae. aegypti*.

Estudiar esta propiedad tiene como finalidad evaluar el potencial de las flores de *L. maritima* para ser utilizadas como cebos combinadas con insecticidas, como parte de un control integral del mosquito.

Para esto se cuantificó la cantidad de fructosa extraída de individuos de *Ae. aegypti* luego de la exposición a la planta, debido a que por ser ésta uno de los principales componentes del néctar, su presencia permite determinar si hubo ingesta de azúcar de las flores. Este azúcar no puede ser generado por el insecto y además es metabolizado rápidamente, por lo que su detección endógena es indicio de una ingestión reciente. El control negativo se realizó privando al mosquito de una fuente de azúcar por 24 horas. El control positivo se realizó administrándole sacarosa *ad libitum*, considerando que esta cantidad se acerca mucho a la cantidad máxima de azúcar que puede ingerir el mosquito. Este control positivo sirve para contrastar con la cantidad detectada en *L. maritima* y obtener una noción de la cantidad máxima de fructosa que se puede cuantificar por mosquito.

La curva de calibración de la absorción a 484 nm del complejo de resorcinol-fructosa abarcó cantidades entre 0 y 40  $\mu\text{g}$  y tuvo valor de  $R^2$  de 0,9677, con tendencia a formar una curva logarítmica. Debido a la falta de linealidad de la curva en todo el rango de masas medidas, para calcular la masa de fructosa en cada punto se interpoló la absorbancia entre los dos valores más cercanos de la curva de calibración. Ej. Si la cuantificación daba 0,3 de absorbancia, ese 0,3 se encuentra entre los medidos de la curva de calibración de 0,217 (4  $\mu\text{g}$  de fructosa) y 0,325 (8  $\mu\text{g}$  de fructosa). Los resultados de la cantidad de fructosa por mosquito calculada dieron positivo al ser evaluados para normalidad por el método Shapiro-Wilks modificado, con un valor de  $p > 0,05$ . Al haber determinado que los resultados presentaban normalidad, fueron analizados con la prueba de t-student para detectar diferencias estadísticamente significativas, para un valor de  $p \leq 0,05$ .

La Tabla 5.17 contiene los resultados de contenido de fructosa para el blanco de alimentación, para la alimentación en presencia de la planta de *L. maritima* y el control positivo. El análisis estadístico compara los resultados del blanco sin alimentación, de la alimentación con *L. maritima* y la alimentación con sacarosa.

Los resultados de la Tabla 5.17 muestran que la diferencia en contenido de fructosa en hembras es estadísticamente significativa entre el blanco de alimentación y

	Número de Réplicas	Promedio de fructosa por mosquito $\mu\text{g}$	t con el blanco	Valor de p contra el blanco	t con la sacarosa	Valor de p contra la sacarosa
blanco hembras	3	0,35	0	1	-	-
blanco machos	3	0,13	0	1	-	-
Hembras + <i>L. maritima</i> *	3	0,99	-6,93	0,0011	-5,83	0,0281
Machos + <i>L. maritima</i> *	3	4,98	-3,46	0,0372	-1,57	0,1906
Hembras + sacarosa*	3	33,97	-5,95	0,0136	0	1
Machos + sacarosa*	3	9,18	-3,99	0,0287	0	1

Tabla 5.17: Cantidad de fructosa promedio en: mosquitos ayunados, alimentados con *L. maritima* y alimentados con sacarosa. Comparación de los resultados del blanco de alimentación, de la alimentación con *L. maritima* y la alimentación con sacarosa entre sí. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

la alimentación con *L. maritima*; entre el blanco de alimentación y la alimentación con sacarosa; y entre la alimentación con *L. maritima* y la alimentación con sacarosa. Los resultados de la Tabla 5.17 muestran que la diferencia en contenido de fructosa en machos es estadísticamente significativa entre el blanco de alimentación y la alimentación con *L. maritima*; y entre el blanco de alimentación y la alimentación con sacarosa. Los resultados descritos indican que machos y hembras de *Ae. aegypti* efectivamente se alimentan de *L. maritima*.

## 5.6. Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico

### 5.6.1. Formulación de compuestos atractantes de mosquitos en parafina y estearina

Previos estudios de nuestro laboratorio demostraron que la inclusión de compuestos activos en soluciones sólidas de parafina o estearina da lugar a la liberación lenta de los mismos conformando formulaciones con buenas propiedades de actividad prolongada [166]. Por tal razón fue de interés establecer si alguno de los volátiles de plantas con flores que resultaron atractantes de *Ae. aegypti* en los bioensayos anteriores, podrían ser formulados, y en qué concentraciones, como soluciones monolíticas en matrices de parafina y estearina.

Entre todos los volátiles de flores ensayados que resultaron promisorios, se decidió la evaluación del 1-noneno y la acetofenona. El 1-noneno se eligió por mostrar atracción hacia mosquitos machos pero no hacia las hembras en el “Bioensayo en

olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores” 5.4.1 . Las flores de *S. madagascariensis* y *E. pectinatus* que resultaron altamente atractantes en el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 5.1.1 y en el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 5.2.2, tienen como componente volátil principal un 1-alqueno lineal: el de *S. madagascariensis* es el 1-noneno y el de *E. pectinatus* es el 1-undeceno, lo cual sugiere que los 1-alquenos lineales podrían tener un efecto promisorio en cebos atractantes de mosquitos.

La acetofenona fue elegida por ser el único compuesto que fue atractante hacia ambos sexos en el “Bioensayo de atracción hacia los compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de *L. maritima*” 5.5.3, siendo muy probablemente el compuesto volátil involucrado en el comportamiento de atracción en el: “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 5.2.2 con *L. maritima*.

Las mezclas monolíticas de compuestos atractantes con la parafina y la estearina fundida se llevaron a cabo como se describe en Métodos 4.6.1. Se observó una buena disolución tanto de 1-noneno como de acetofenona en las matrices fundidas por lo que la agitación intensa permitió obtener una solución monolítica sólida de ambos compuestos atractantes de mosquitos en ambas matrices a las cuales se les dio forma de disco para su evaluación biológica.

### 5.6.2. Ensayo de atracción de mosquitos por formulados sólidos con punto-final toxicológico

Los resultados descritos en el “Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental” 5.2.1 fueron tenidos en cuenta en el desarrollo de las formulaciones sólidas de compuestos atractantes, para incrementar el efecto tóxico hacia mosquitos *Ae. aegypti* expuestos a una solución acuosa de imidacloprid 10 mg/l y sacarosa al 10%.

De acuerdo a lo descrito en Métodos 4.6.2 se evaluaron en el área experimental, el disco formulado dentro de un vaso de 250 ml cubierto con tela porosa sobre la cual se puso un algodón embebido en la solución acuosa de imidacloprid 10 mg/l y sacarosa al 10%, con otro vaso similar en el extremo opuesto vacío (sin formulado) también cubierto con una tela porosa de nylon, sobre la cual se colocaron 0,25 g de algodón embebido en una solución acuosa de sacarosa al 10% (sin imidacloprid).

Se comparó con un blanco con similar diseño experimental, excepto que no se incluyó en la formulación del disco un compuesto atractante. Tanto en la arena experimental como en el control se incluyó un vaso de 125 ml con 2 g de algodón, embebido a saturación en agua. Este vaso fue situado entre ambos vasos experimentales de 250 ml. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 5.18 a 5.21.

En la Tabla 5.18 se puede ver el efecto sobre la mortalidad de hembras de

Concentración mg/ml	Número de Réplicas	Promedio de mortalidad en %	Desviación estándar	H	Valor de p	Número de mosquitos
blanco	6	13	0,12	0	1	72
1-noneno 0,05	4	30	0,08	3,68	0,0762	48
1-noneno 0,1	4	37	0,22	3,68	0,0762	48
1-noneno 1*	4	33	0,12	4,55	0,0286	48
acetofenona 0,05*	4	55	0,24	6,01	0,019	48
acetofenona 0,1*	4	57	0,13	6,55	0,0048	48
acetofenona 1*	4	47	0,22	6,01	0,019	48

Tabla 5.18: Mortalidad de hembras de *Ae aegypti* por efecto de discos de estearina conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. El asterisco indica que la diferencia es considerada estadísticamente significativa en comparación con el blanco,  $p \leq 0,05$ .

*Ae. aegypti* de los ensayos con matrices de estearina, a las que fueron incorporadas acetofenona o 1-noneno en distintas concentraciones, en comparación con la matriz de estearina pura y con su correspondiente prueba estadística de Kruskal-Wallis.

En la Tabla 5.19 se puede ver el efecto sobre la mortalidad de machos de *Ae. aegypti* de los ensayos con matrices de estearina, a las que fueron incorporadas acetofenona o 1-noneno en distintas concentraciones, en comparación con la matriz de estearina pura y con su correspondiente prueba estadística de Kruskal-Wallis.

En la Tabla 5.20 se puede ver el efecto sobre la mortalidad de hembras de *Ae. aegypti* de los ensayos con matrices de parafina 55°C, a las que fueron incorporadas acetofenona o 1-noneno en distintas concentraciones, en comparación con la matriz pura y con su correspondiente prueba estadística de Kruskal-Wallis.

En la Tabla 5.21 se puede ver el efecto sobre la mortalidad de machos de *Ae. aegypti* de los ensayos con matrices de parafina 55°C, a las que fueron incorporadas acetofenona o 1-noneno en distintas concentraciones, en comparación con la matriz pura y con su correspondiente prueba estadística de Kruskal-Wallis.

Los resultados obtenidos indicaron que en la matriz de estearina la liberación de acetofenona produce un claro efecto attractante sobre hembras, lo que resulta en un aumento estadísticamente significativo,  $p \leq 0,05$ , de la mortalidad para las concentraciones de 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml y 1 mg/ml respecto al blanco. El 1-noneno en concentración de 1 mg/ml también mostró efecto attractante, que resultó en una mayor mortalidad de hembras con una significancia estadística,  $p \leq 0,05$ .

En machos, se observó para los discos de estearina conteniendo el attractante, una mayor mortalidad de machos estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$ , en comparación con el blanco, para las concentraciones de 0,05 mg/ml y 1 mg/ml de 1-noneno y las concentraciones de 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml y 1 mg/ml de acetofenona.

Para los discos de parafina 55°C conteniendo el attractante, se observó en hembras

Concentración mg/ml	Número de Réplicas	Promedio de mortalidad en %	Desviación estándar	H	Valor de p	Número de mosquitos
blanco	6	18	0,08	0	1	72
1-noneno 0,05*	4	37	0,05	6,01	0,019	48
1-noneno 0,1	4	27	0,21	0,18	0,7143	48
1-noneno 1*	4	48	0,18	5,5	0,019	48
acetofenona 0,05*	4	52	0,22	6,01	0,019	48
acetofenona 0,1*	4	60	0,14	6,55	0,0048	48
acetofenona 1*	4	42	0,1	6,01	0,019	48

Tabla 5.19: Mortalidad de machos de *Ae. aegypti* por efecto de discos de estearina conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. El asterisco indica que la diferencia es considerada estadísticamente significativa en comparación con el blanco,  $p \leq 0,05$ .

Concentración mg/ml	Número de Réplicas	Promedio de mortalidad en %	Desviación estándar	H	Valor de p	Número de mosquitos
blanco	6	23	0,15	0	1	72
1-noneno 0,05	4	37	0,13	1,92	0,1905	48
1-noneno 0,1	4	25	0,21	0,05	0,8762	48
1-noneno 1*	4	55	0,1	5,01	0,0333	48
acetofenona 0,05	4	25	0,17	0,01	0,9952	48
acetofenona 0,1*	4	65	0,13	6,01	0,0143	48
acetofenona 1*	4	72	0,1	6,55	0,0095	48

Tabla 5.20: Mortalidad de hembras de *Ae. aegypti* por efecto de discos de parafina 55°C conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. El asterisco indica que la diferencia es considerada estadísticamente significativa en comparación con el blanco,  $p \leq 0,05$ .

Concentración mg/ml	Número de Réplicas	Promedio de mortalidad en %	Desviación estándar	H	Valor de p	Número de mosquitos
blanco	6	23	0,18	0	1	72
1-noneno 0,05	4	50	0,16	3,68	0,0762	48
1-noneno 0,1	4	20	0,08	0,1	0,8429	48
1-noneno 1*	4	57	0,17	5,01	0,0238	48
acetofenona 0,05	4	15	0,24	0,73	0,4381	48
acetofenona 0,1*	4	62	0,15	5,5	0,0238	48
acetofenona 1*	4	80	0,08	6,55	0,0048	48

Tabla 5.21: Mortalidad de machos de *Ae. aegypti* por efecto de discos de parafina 55°C conteniendo imidacloprid con el agregado o no de atractantes 1-noneno y acetofenona en distintas concentraciones. El asterisco indica que la diferencia es considerada estadísticamente significativa en comparación con el blanco,  $p \leq 0,05$ .

una mayor mortalidad estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$ , en comparación con el blanco, para la concentración de 1 mg/ml de 1-noneno y las concentraciones de 0,1 mg/ml y 1 mg/ml de acetofenona.

Se observó para los discos de parafina 55°C conteniendo el atrayente una mortalidad mayor de machos estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$ , en comparación con el blanco, para la concentración de 1 mg/ml de 1-noneno y las concentraciones de 0,1 mg/ml y 1 mg/ml de acetofenona.

## 6 Discusión de Resultados

### 6.1. Estudios comportamentales con plantas con flores

#### 6.1.1. Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores

Este ensayo se planteó con el objetivo de identificar cuáles de las plantas seleccionadas para este estudio se presentaban como posibles atractantes para el mosquito de *Ae. aegypti*. La medición del número de mosquitos posados (probando o no) sobre ellas en un período de media hora, permitió tener una orientación sobre cuál o cuáles posibles especies eran preferidas como fuente de alimentación en forma reproducible, aunque el diseño experimental no permitió discriminar si la preferencia se debe a factores visuales, químicos o una combinación de ambos.

Los resultados permitieron la identificación de plantas con potencial capacidad atractante para *Ae. aegypti*, las cuales fueron: *E. pectinatus*, *P. neochilus*, *L. maritima*, *S. madagascariensis* y *T. patula*.

Otros autores realizaron ensayos de preferencias de plantas en los que expusieron las plantas a los mosquitos durante la noche entera. En un trabajo de Manda *et al.* [108], se registró el número de mosquitos de *An. gambiae* probando sobre las plantas por noche, durante cuatro intervalos de una hora, en ensayos con una elección y con múltiple elección de plantas. Las principales diferencias de este ensayo en comparación con el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1 fueron: el uso de *An. gambiae*; el uso de grupos de doscientos mosquitos; la realización de mediciones con plantas individuales y con todas presentes; las observaciones tuvieron duraciones de una hora entre cada intervalo; se midió la ingesta de néctar al final del ensayo; se usó el número promedio de posados. Las ventajas de este trabajo en comparación con el de la tesis fueron: Se comparó la atractancia de una planta en comparación con las otras, pudiendo determinar cuáles eran las más atractantes; se midió la alimentación de néctar al final de los ensayos, pudiendo determinar cuáles les proveían la mayor cantidad de alimento a los mosquitos. A pesar de ser un trabajo muy completo y bien planeado, la aplicación de esta metodología hubiera requerido

considerablemente más tiempo y recursos, debido a: las arenas experimentales eran de 3,5 x 3,5 x 2 m y se podía realizar una réplica por noche. En este trabajo concluyeron que hay plantas más atractantes que otras y que existe una correlación entre cantidad de mosquitos posados sobre una planta y su oferta de néctar.

En un trabajo de Müller *et al.* [120], se colocaron trampas adhesivas alrededor de las plantas y al caer la noche y a la mañana siguiente, los autores contabilizaron la cantidad de mosquitos *An. gambiae* atrapados. Las principales diferencias de este ensayo en comparación con el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1 fueron: la presencia de *An. gambiae* y que los ensayos fueron hechos a campo. La ventaja de hacerlo en el hábitat natural del insecto, es que permite evaluar la capacidad real atractante de cada planta; con la gran desventajas de que se requiere una gran superficie y no se pueden controlar las variables externas como en el laboratorio. El ensayo a campo es para evaluar la atractancia de una planta o de un compuesto, debido a su complejidad, no son prácticos para ser empleados durante un screening. Concluyeron que hay plantas más atractantes que otras. De las veintiséis plantas con flores evaluadas: *Acacia macrostachya* resultó ser la más atractante; nueve fueron atractantes hacia hembras y ocho hacia machos.

### 6.1.2. Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro

Este ensayo permitió evaluar la respuesta comportamental de los mosquitos hacia los compuestos volátiles emitidos por la planta sin la interferencia de las claves visuales. Este diseño experimental hizo posible que cualquier atracción observada fuera atribuible a las claves olfativas exclusivamente. Los valores de  $p$  obtenidos en los resultados, comparando la misma planta, con hembras fueron mayores a los obtenidos con machos. Un menor valor de  $p$  obtenido en los machos sugiere que estos resultaron más atraídos hacia las plantas, pero habría que hacer otros ensayos para poder hacer esta afirmación. Esta diferencia no puede ser atribuida al diseño del ensayo, ya que los mosquitos de ambos sexos fueron utilizados en las mismas condiciones experimentales. Las plantas que resultaron atractantes con significancia estadística fueron, en hembras: *E. pectinatus* y *L. maritima*; y en machos: *E. pectinatus*, *L. maritima* y *S. madagascariensis*. La planta que resultó atractante, cerca del umbral de significancia estadística,  $0,05 < p \leq 0,10$ , fue *S. madagascariensis* en hembras.

Todas las plantas que mostraron un efecto estadísticamente significativo de atracción en hembras también lo mostraron en machos, pero no a la inversa. Una explicación sobre la diferencia en la respuesta comportamental entre hembras y machos: es que los machos, por ser de menor tamaño, tienen menores reservas energéticas y como su alimentación es exclusivamente de plantas, son más sensibles a las claves olfativas de sus potenciales fuentes de alimentación.

Otra razón en la diferencia en la respuesta comportamental entre machos y hem-

bras, puede ser explicada, teniendo en cuenta la diferencia anatómica entre la antena del mosquito macho y la de la hembra [42]. Esta diferencia se traduce en que las funciones y proporciones de las sensilias no sean iguales entre ambos sexos. Las sensilias son órganos sensoriales cuya función es detectar estímulos térmicos, químicos y/o mecánicos. La detección selectiva de algunos compuestos por un solo género ya ha sido documentada. En su trabajo Jhumur *et al.* [87], evaluó por EAG los compuestos volátiles de la flor de *S. otites* en ambos sexos de mosquitos. Los compuestos (Z)-3-hexen-1-ol, hexanol y acetato de 3-hexenilo, dieron una respuesta medible en hembras pero no en machos.

Se trabajó con mosquitos ayunados, debido a que en un trabajo previo realizado por Hancock *et al.* [111], se demostró que la sensibilidad hacia volátiles de posibles fuentes de energía aumenta con el ayuno. Este hallazgo sugiere que la respuesta hacia los compuestos volátiles de las flores, podría verse incrementada, al privar a los mosquitos de alimento previo al ensayo. En su trabajo Hancock comparó la respuesta comportamental, en un olfatómetro en “Y”, de hembras ayunadas y de hembras recientemente alimentadas con sacarosa, hacia compuestos volátiles de la miel. Observó que las hembras ayunadas tienen una mayor preferencia hacia el brazo con los compuestos volátiles de la miel, que las hembras previamente alimentadas con sacarosa. La gran limitante de su trabajo, a la hora de aplicarlo en esta tesis, es que el aumento de respuesta con el ayuno sólo fue evaluado en hembras. No hay motivos para suponer que en machos el ayuno no tenga un efecto parecido.

La planta de *T. patula*, resultó ser atractante en el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1. Sin embargo, en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro”, los mosquitos no mostraron una respuesta estadísticamente significativa,  $p \leq 0,05$ , hacia el brazo del olfatómetro con los volátiles de la planta con flores. Esto sugiere que la atracción hacia la planta podría estar mediada no sólo por claves químicas sino que también por las visuales, que no estuvieron presentes en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2. Otra explicación posible, es que las concentraciones en el aire del estímulo olfativo de la planta que percibe el mosquito, sean diferentes entre ambos ensayos. En su trabajo sobre la alimentación de néctar y la elección de plantas en *Aedes cantator* y *Aedes sollicitans*, Magnarelli [105] observó que las claves visuales eran importantes para la ubicación de las fuentes de néctar y que estas mediaban la atractancia de los mosquitos a largas distancias. Los estímulos olfativos son relevantes a cortas distancias y sirven para evaluar el contenido de néctar de las flores antes de posarse. Esto es importante debido a que en muchos casos hay muchas flores de la misma especie, cercanas unas de otras, con distinta cantidad de néctar. La ausencia de estímulos visuales puede haber causado que los mosquitos no relacionaran los volátiles de *T. patula* con una potencial fuente de alimento y por lo tanto no se hayan acercado. Otra explicación posible, es que las plantas hayan sido visitadas por otros insectos que se alimentan de néctar previo al ensayo, por lo que los volátiles emitidos no les indicaban a los mosquitos la presencia de una fuente de alimentación.

Los compuestos volátiles de *P. neochilus* mostraron una respuesta de aversión

al vuelo en el olfatómetro en ambos sexos, la cual resultó ser estadísticamente significativa sólo en machos y estuvo cerca del umbral de significancia estadística en hembras. Este comportamiento sugiere que algún compuesto volátil presente en la planta podría tener algún efecto repelente. Debido a que no es el propósito de este trabajo el estudiar repelentes florales, no se le dio más seguimiento a esta observación.

En el caso de la planta de *P. neochilus*, se observó una diferencia en la respuesta de ambos sexos entre el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1 y el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2. En el primero la planta resultaba atractante, debido a que los mosquitos, tanto machos como hembras, se posaban sobre ella. Sin embargo, en el segundo ensayo 4.1.2, los mosquitos evitaron el brazo del olfatómetro con los volátiles de la planta. En el caso de los machos, la aversión fue estadísticamente significativa y en las hembras la aversión estuvo cerca del umbral de significancia. La diferencia en respuesta de preferencia, puede haberse debido a que en el primer ensayo esta estaba mediada por estímulos visuales, los cuales estuvieron ausentes en el ensayo con el olfatómetro, o a que las concentraciones en el aire de los distintos componentes del estímulo olfativo de la planta que percibe el mosquito, sean diferentes entre ambos ensayos. Otra posible explicación es que la planta de *P. neochilus* sea elegida por los mosquitos como refugio. Las interacciones entre los mosquitos y plantas son un nicho poco explorado con alto potencial de desarrollo. No se han reportado plantas específicas que sean elegidas por *Ae. aegypti* únicamente como refugio. Se ha reportado que el mosquito tiene preferencia como refugio, en el exterior, hacia lugares con sombra, húmedos y con poco movimiento de aire [116, 117]. El follaje de la planta de *P. neochilus*, tiende a ser tupido y genera muchos sitios protegidos contra el viento y las precipitaciones. Aún no se ha demostrado que el mosquito ubique los refugios por claves olfativas y viendo la importancia que tienen las claves visuales en la búsqueda del alimento [105], es probable que estas medien el comportamiento de búsqueda de refugio. La hipótesis de que usan a la planta de *P. neochilus* como refugio, se ve reforzada por el hecho de que ningún mosquito, durante el ensayo, trató de alimentarse de la misma.

## **6.2. Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico**

### **6.2.1. Ensayo previo para establecer una concentración tóxica de imidacloprid para el ensayo comportamental**

La elección de imidacloprid como insecticida para este ensayo estuvo basada en su baja toxicidad por inhalación y por contacto en *Ae. aegypti* [140, 135]. Estas características permitirían atribuir el efecto tóxico observado a la ingestión del insecticida. En todos los casos en que el imidacloprid se ofertó en solución sin sacarosa, aún en las dosis más altas, no se registró mortalidad, demostrando que en las condiciones del

ensayo, el mosquito no ingiere una solución con únicamente imidacloprid. En base a los resultados obtenidos, se eligió la concentración de imidacloprid de 10 mg/l debido a que provocó una mortalidad del 100 % en 90 minutos.

El imidacloprid es un insecticida sistémico por ingestión, que pertenece a la familia de los neo-nicotinoides y que fue desarrollado para el sector agrícola [11]. Su aplicación en el control de mosquitos ha empezado a ser explorada en los últimos años y se encuentra en la fase experimental. Aun no existe en el mercado un formulado basado en este insecticida diseñado para el control de mosquitos. Se han evaluado los efectos del imidacloprid tanto en larvas como en mosquitos adultos en condiciones de laboratorio [18, 135, 148].

Ensayos con larvas en el cuarto estadio de *Ae. aegypti*, determinaron que la LD<sub>50</sub> de imidacloprid era de 84 µg/l en 72 horas [135]. Ensayos con cebos tóxicos en hembras adultas de *Ae. taeniorhynchus*, *Cx. quinquefasciatus* y *An. quadrimaculatus* encontraron que las LD<sub>90</sub> son 47,6 mg/l, 494,2 mg/l y 2,1 mg/l respectivamente. Para determinar las concentraciones de LD<sub>90</sub>, previamente mencionadas, se utilizó el formulado Quickbayt de Bayer con una concentración de 0,5 % del compuesto activo. Hay que ser prudentes a la hora de determinar la toxicidad de una molécula con un formulado, debido a que este puede incluir sustancias que afecten la toxicidad del compuesto activo. Los resultados obtenidos muestran que hay una gran variación en la toxicidad del imidacloprid según la especie de mosquito [18]. Según nuestros resultados, la LD<sub>100</sub> de *Ae. aegypti*, debería ser de una concentración < 0,05 mg/l. En Argentina el imidacloprid viene formulado en granulos dispersables en agua al 70 % y su uso se da casi exclusivamente en el sector agrícola [6].

### 6.2.2. Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores

El principal objetivo del experimento fue determinar si las plantas con flores que resultaron seleccionadas en el “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1, podrían ser utilizadas como cebo de una trampa letal para *Ae. aegypti*. Este cebo combinaría la presencia de una planta atractante o mezcla de plantas atractantes con una superficie tóxica o una solución tóxica con un fagoestimulante. Las trampas cebadas con plantas atractantes sirven principalmente para censar la población, debido a que atraen a mosquitos adultos de ambos sexos. A diferencia de las trampas cebadas con compuestos volátiles de vertebrados, que sólo capturan a hembras en busca de un huésped sanguíneo [61].

Se optó por usar sólo flores y no las plantas enteras en maceta o con el tallo sumergido en agua, con la intención de reducir el peso y el volumen del estímulo atractante, en comparación con los de las trampas comerciales que son voluminosas y con equipamiento costoso. Esto último, aumenta el riesgo de robo, costos de compra y mantenimiento. Los estímulos vegetales se podrían incorporar, en el futuro, a trampas

atractantes de *Ae. aegypti* basadas en estos resultados directamente. Por otra parte trabajos previos sugieren que la capacidad atractiva de las plantas se concentra en las flores [119, 62].

Los resultados del estímulo floral, contra el blanco del estímulo del “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2, no pudieron ser analizados estadísticamente por t-student: por no cumplir con los requisitos de normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk. El distinto número de réplicas en algunas plantas se debió a limitaciones temporales y estacionales, que restringieron su disponibilidad.

En hembras se observó una mortalidad estadísticamente significativa en presencia de las plantas *E. pectinatus* y *L. maritima*. Mientras que en machos se registró una mortalidad estadísticamente significativa para: *E. pectinatus*, *L. maritima* y *S. madagascariensis*. Estos resultados muestran que las plantas pueden tener un efecto comportamental diferente para cada sexo, lo que ya fue observado en el ensayo con el olfatómetro y discutido para el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2.

La diferencia de atracción entre sexos para compuestos de plantas ya había sido informada por Fikrig *et al.* previamente [59]. En su trabajo probó la atracción, en ensayos de semi-campo, de jugos de *Psidium guajava* (guayaba) y *Mangifera indica* (mango) hacia machos y hembras de *Ae. aegypti* adultos. Los volátiles vegetales fueron usados como cebo para trampas de captura. A través de los ensayos, observó que los volátiles de los jugos de las frutas previamente mencionadas, sólo eran atractantes hacia machos.

Las mortalidades causadas en ambos sexos en el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2 por la presencia de *T. patula*, no difirieron significativamente del blanco, lo que sugiere que sus emisiones volátiles no son atractantes para *Ae. aegypti*.

El resultado obtenido para el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2 en presencia de *P. neochilus*, mostró que tanto en hembras como en machos de *Ae. aegypti* una mortalidad menor a la del blanco. Si bien este resultado no fue estadísticamente significativo, el resultado es coherente con el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en el olfatómetro” 4.1.2, para el cual se observó una aversión al vuelo hacia el brazo con la planta. Una posible interpretación de ambos resultados sería la presencia de algún compuesto volátil repelente hacia *Ae. aegypti* en *P. neochilus*. Debido a que no es el propósito de este trabajo el estudiar repelentes vegetales, no se le dio más seguimiento a la observación.

Los resultados del “Ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores” 4.1.1 y del “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2, no son comparables: no sólo porque los fundamentos metodológicos fueron distintos, sino porque tuvieron diferentes objetivos, los cuales fueron descritos en Resultados. Desde el punto de vista del plan de trabajo de esta

tesis ambos ensayos fueron complementarios para el objetivo general propuesto, de identificar plantas con flores en general y flores en particular atractivas para *Ae. aegypti*. Especies que tengan esta propiedad son potencialmente útiles para metodologías de control basadas en cebos o tratamientos insecticidas selectivos [108, 181, 120].

Es llamativo que en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2 y en el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2, la planta de *S. madagascariensis* haya resultado atractiva hacia machos, con significancia estadística y no hacia hembras. Este resultado sugiere que alguno de los compuestos que emite es exclusivamente attractante para machos o que la concentración en la que muestra efectos de atracción dicho compuesto, varía entre machos y hembras. Una observación en los ensayos con *S. madagascariensis* sugirió que las flores en vías de marchitarse producían el efecto attractante descrito con mayor intensidad que las nuevas. Puede deberse diferencias en la composición de los compuestos volátiles. Esta observación no fue profundizada y debería ser encarada en un trabajo de investigación diferente al de esta tesis.

Como nuestro objetivo es desarrollar nuevas metodologías del control del mosquito de bajo impacto ambiental. El descubrimiento de una planta, que sea attractante sólo para machos, es relevante dentro de las nuevas técnicas para el control de *Ae. aegypti*. En especial para el control con machos estériles. Se podrían introducir en un ambiente, trampas cebadas con flores attractantes sólo hacia machos y retirarlas previo a la liberación de los machos estériles, de esta manera se aumentaría su eficacia al reducir la competencia [101].

En ensayos de campo realizados por Müller y colaboradores [119], se logró capturar hasta setenta y cinco veces más mosquitos de *An. sergentii* en trampas cebadas con flores de *Acacia raddiana* que en trampas cebadas con ramas de *A. raddiana* sin flores. Como parte del mismo trabajo, en un oasis de Malí, se rociaron las flores de dicha acacia con una solución acuosa con sacarosa, un colorante y un insecticida. Para evaluar la presencia de mosquitos en los oasis, se colocaron trampas de luz, las cuales fueron censadas a diario. La cantidad de mosquitos capturados fue cayendo día tras día, para el día catorce no se capturaban más mosquitos, el ensayo duró cuarenta y cinco días. En el análisis de resultados de la experiencia de campo, los autores concluyeron que la población de mosquitos se podría considerar eliminada de los oasis en donde llevó a cabo el experimento [119]. Este trabajo respalda la factibilidad de usar flores con insecticidas como trampas para el manejo de poblaciones de mosquitos.

## 6.3. Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores

### 6.3.1. Recolección de volátiles de plantas con flores e identificación química

Los volátiles de las plantas con flores que mostraron un comportamiento attractante en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2 se recolectaron, como se describe en Métodos, por medio de una fibra de SPME y se analizaron químicamente.

Es importante destacar que el efecto comportamental en los ensayos con olfatómetro se debe únicamente a los compuestos volátiles y no a las claves visuales. El método de extracción con fibra de SPME es de alta sensibilidad, pero su aplicación fundamental se circunscribe al análisis cualitativo y semi-cuantitativo [20].

### 6.3.2. Identificación de volátiles de *E. pectinatus*

El compuesto que fue ampliamente mayoritario fue el 1-undeceno, seguido por el trans-cariofileno y  $\alpha$ -copaeno. Los compuestos que estuvieron presentes en proporciones minoritarias (< 5% de área) fueron:  $\alpha$ -tujona, 1-deceno,  $\alpha$ -felandreno, 1-dodeceno, benzotiazol,  $\alpha$ -humuleno y  $\alpha$ -muuroleno.

Entre los volátiles tentativamente identificado por EM e IR en *E. pectinatus*, se encuentra el benzotiazol, que se usa como insecticida y agente aromatizante de los alimentos [24]. El mismo no es un compuesto que haya sido previamente informado como componente de volátiles de origen botánico. Por lo que su identificación entre las emisiones volátiles de *E. pectinatus* podría atribuirse a alguna contaminación externa. No se encontró en la bibliografía algún antecedente en donde se haya informado la composición de las emisiones volátiles de *E. pectinatus*.

La composición del aceite esencial de la flor de *Euryops arabicus*, fue evaluada por Mothana *et al.* [115]. En su trabajo encontró que el 80% de los componentes del aceite esencial eran terpenos, siendo el más frecuente el óxido de cariofileno. Seguido, en orden de concentración descendente, por:  $\tau$ -cadinol, espatulenol,  $\beta$ -cariofileno, 2-epi- $\beta$ -cariofileno. La gran limitación que presenta este trabajo, es que se basó en los EM y los IR de una columna, para identificar los compuestos del aceite esencial, sin la co-inyección del estándar sintético. Sin el estándar, sólo es posible hacer una identificación tentativa.

Nyasembe *et al.* [176] evaluó en EAG con hembras de *An. gambiae*, los componentes de los volátiles de la planta previamente identificada como attractante, *P.*

*hysterophorus*. Luego evaluó distintas cantidades de los compuestos que mostraron respuestas en el EAG en un olfatómetro. Observó atracción para una cantidad de los terpenos  $\beta$ -pineno y limoneno. Con ambos compuestos, los mosquitos mostraron una respuesta de aversión al vuelo, con cantidades apenas cuatro veces mayores a las atractantes. Lo que sugiere que ambos terpenos tienen rango muy acotado de cantidades en donde presentan atracción.

### 6.3.3. Identificación de volátiles de *S. madagascariensis*

Los volátiles de *S. madagascariensis* fueron identificados por medio de EM e IR. El compuesto mayoritario fue 1-noneno, seguido por  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno en cantidades considerables y en menores proporciones ( $< 5\%$  de área) se detectó: sabineno, acetato de 4-hexen-ol,  $\beta$ -felandreno y 1-undeceno. La presencia del acetato de 4-hexenol podría atribuirse a las emisiones de las hojas de la planta, ya que es considerado un volátil de hojas verdes [153]. Debido a la posibilidad de migrar de carbono de la carga positiva, en el producto de ionización de alquenos lineales, es indispensable la co-inyección del estándar sintético para poder determinar la ubicación del doble enlace. No encontramos registros en la bibliografía donde se haya informado la composición de las emisiones de compuestos volátiles de *S. madagascariensis*.

El 1-noneno ha sido encontrado entre los compuestos volátiles de varias especies de plantas, entre los que se encuentran: *Ruta chalepensis*; *Arabidopsis thaliana*; *Larrea tridentata* ;y *Vigna unguiculata* [75, 91, 84, 103]. No se ha encontrado en la bibliografía científica, registro que haya sido utilizado como attractante en alguna especie de insecto.

### 6.3.4. Identificación de volátiles de *L. maritima*

Los compuestos mayoritarios de *L. maritima* fueron: acetofenona y limoneno. En menores concentraciones ( $< 5\%$  de área) se detectaron los siguientes compuestos: 4-isotiocianato-1-buteno, alcohol fenético, fenilacetnitrilo y un compuesto desconocido.

Los compuestos identificados entre los volátiles de *L. maritima* pertenecen a grupos muy diversos: 1-alquencil isotiocianatos, terpenos, compuestos aromáticos y un compuesto que no pudo ser identificado.

Si bien no se pudo determinar la identidad del compuesto desconocido, después de haber analizado el EM, haber calculado los IR en dos columnas y haber determinado el peso molecular por medio de la IQ, se puede afirmar que se trata de un terpeno o compuesto terpenoide con una masa de 204 m/z. La estructura química no fue posible determinarla. Dos trabajos previamente publicados sobre los volátiles de la planta entera de *L. maritima* no mencionan algún compuesto, ni identificado ni no

identificado, atribuible al desconocido presente en nuestros análisis [151, 145].

En la primera de estas publicaciones se describe la extracción de los volátiles por medio de la técnica de espacio de cabeza dinámico. Los volátiles fueron adsorbidos en un filtro con Super Q, posteriormente fueron extraídos con un solvente y analizados en un equipo de CG-EM. El único compuesto identificado fehacientemente fue la acetofenona [151], en consonancia con nuestro estudio con *L. maritima*.

En el segundo trabajo se analizaron los volátiles del espacio de cabezal estático de la planta entera, extraído con una fibra de PDMS. Los compuestos extraídos fueron analizados por medio de CG-EM. Los compuestos identificados tentativamente, los cuales coincidieron con nuestros resultados fueron: limoneno, acetofenona y 4-isotiocianato-1-buteno. El método empleado en este estudio es meramente orientativo, debido a que sólo identifica los compuestos tentativamente por comparación del EM con una biblioteca [145].

Los 1-alquenil isotiocianatos son productos de la hidrólisis de los glucosinolatos, reacción que sucede cuando la planta es dañada mecánicamente. Se especula con que la liberación de los productos de hidrólisis de los glucosinolatos forman parte de los mecanismos de defensa de la planta ante animales herbívoros [149]. En los volátiles de la flor cortada, la abundancia de isotiociantos fue mayor y se discute oportunamente.

### 6.3.5. Síntesis de 1-noneno

El análisis de las emisiones volátiles de *S. madagascariensis* mostró que su principal constituyente es el hidrocarburo 1-noneno. Teniendo en cuenta que tanto en *E. pectinatus* como en *S. madagascariensis* los resultados del análisis de volátiles mostraban que un alqueno (undeceno en el primer caso y noneno en el segundo) es el compuesto volátil más importante y que ambas plantas resultaron atractantes de *Ae. aegypti*, fue de interés sintetizar el 1-noneno.

Por otra parte *S. madagascariensis*, según los resultados del “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2, manifiesta poder atrayente sólo para machos. Esta propiedad le proporciona al 1-noneno un interés particular, como es el de ser un potencial atrayente selectivo, que actuaría sólo sobre mosquitos machos.

Se intentaron dos métodos para la síntesis de 1-noneno, a partir del 1-nonanol y un ácido fuerte [177]: el primero en una columna de destilación con ácido sulfúrico; el segundo en viales con distintos ácidos y temperaturas.

El método con ácido sulfúrico y 1-nonanol en la columna de destilación, dio como producto una mezcla de n-nonenos. No esperábamos este resultado, porque debido a lo informado en los libros de texto, el mecanismo por el cual se produce la deshidratación de un alcohol primario en un medio ácido fuerte, es por una eliminación E<sub>2</sub>. [177].

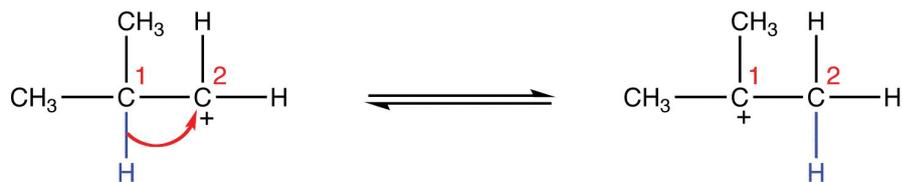


Figura 6.1: Muestra el desplazamiento híbrido de la carga positiva entre los carbonos adyacentes.

En este tipo de reacción, la eliminación del grupo hidroxilo y la formación del doble enlace, suceden de manera simultánea. No es de esperar que haya un desplazamiento del carbocatión. Pero el comportamiento observado es claramente una eliminación tipo  $E_1$  en donde se elimina primero el grupo hidroxilo generándose el carbocatión y después este se desplaza [177]. La carga positiva del carbocatión en el carbono primario terminal, migra hacia los carbonos secundarios en la cadena. Estos carbonos tienen mucho mayor capacidad de estabilizarlo, por lo tanto la probabilidad que la carga positiva se encuentre en un carbono secundario es más alta que en uno primario. Eventualmente se elimina un  $H^+$  formándose el doble enlace.

En la Figura 6.1 se puede ver un esquema de desplazamiento del carbocatión [5]. Los motivos por los cuales no se dio el tipo de reacción de eliminación esperada, pueden ser varios y exceden el alcance de esta tesis. Se descartó una isomerización del alqueno debido a que no está informado que en las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción ocurra este proceso.

Finalmente ante la imposibilidad de obtener 1-noneno puro, se decidió limitar los estudios con este compuesto a los que consideraron de mayor importancia, para lo cual se utilizó un estándar comercial de alto costo, accesible en cantidades bajas.

## 6.4. Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores

### 6.4.1. Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores

En los ensayos de olfatómetro, las hembras y los machos fueron evaluados en grupos de a diez, con todos los mosquitos del mismo sexo. Se adoptó este criterio para asegurar que la respuesta comportamental no tuviera alguna potencial interferencia debido a la presencia de mosquitos del género opuesto.

Por otra parte, un objetivo importante de esta evaluación de compuestos poten-

cialmente atractantes es establecer si existe una respuesta diferencial entre machos y hembras. Se evaluaron diez compuestos en tres cantidades en ambos sexos de *Ae. aegypti*.

Se evaluaron entonces, de *S. madagascariensis*: 1-noneno,  $\beta$ -pineno, (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno; y de *L. maritima*: acetofenona, 1-octanol, fenilacetoniitrilo, isotiocianato de alilo, alcohol fenétílico, isotiocianato de bencilo.

Además incluimos en los ensayos de olfatómetro con esta metodología a los compuestos volátiles identificados provenientes de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*, según lo descrito en 4.4.1.

El objetivo de estos ensayos fue el de establecer a cuál/cuales de entre los compuestos identificados, se le podría adjudicar un rol en la respuesta comportamental observada para las flores descrita en 4.1.2.

Para el 1-octanol se pudo registrar un comportamiento de aversión estadísticamente significativo con 100  $\mu\text{g}$  en hembras y machos. El isotiocianato de bencilo generó una respuesta de aversión al vuelo, estadísticamente significativa, para las cantidades de 10 y 100  $\mu\text{g}$  en machos. En hembras no se observó ninguna respuesta estadísticamente significativa, ni cercana de ser estadísticamente significativa, con el isotiocianato de bencilo. Los resultados con este compuesto son interesantes, debido a que se trataría de un potencial repelente sólo de machos.

El ensayo en este olfatómetro no permite definir si una sustancia es repelente o no. Para probar repelencia, habría que observar a los mosquitos alejarse de una fuente de emisión del compuesto. Acá sólo se puede determinar si eligen o no, el brazo con el compuesto, lo cual no es equivalente. Muy probablemente los compuestos que generaron un comportamiento de aversión al vuelo, también sean repelentes. Los potenciales efectos repelentes, de 1-octanol e isotiocianato de bencilo, no fueron posteriormente estudiados. Debido a que la búsqueda de este tipo de compuestos para *Ae. aegypti* no está dentro de los objetivos de esta tesis.

En machos se registró un comportamiento estadísticamente significativo de atracción hacia la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de 1-noneno. En hembras la cantidad de 1  $\mu\text{g}$ , fue la única masa de 1-noneno cuyo resultado estuvo cerca del umbral de significancia  $0,05 < p \leq 0,1$ . Lo que permite especular que el compuesto podría ser atractante para las hembras en cantidades aún menores.

Las hembras mostraron un comportamiento de atracción hacia la cantidad de acetofenona de 1  $\mu\text{g}$  y hacia la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de (+)- $\alpha$ -pineno. La acetofenona ni el (+)- $\alpha$ -pineno resultaron ser atractantes hacia machos. Probablemente los ensayos con mayores cantidades de acetofenona en hembras, les hayan provocado saturación de los receptores olfativos, lo que se tradujo en un comportamiento de vuelo al azar [132].

Entre los compuestos que mostraron efecto atractante para machos y/o hembras,

no hubo un uno que resultara atractante de ambos, en las cantidades evaluadas.

El 1-octanol es considerado un compuesto volátil de la piel, ha sido empleado con éxito, en mezclas atractantes basados en compuestos volátiles de vertebrados en *An. gambiae* [160]. Se ha registrado también una respuesta en EAG con 1-octanol en *Cx. quinquefasciatus* [141].

No hay registros en la bibliografía científica con el uso de alil isotiocianato, fenilacetoneitrilo y bencil isotiocianato en mosquitos. Con excepción de una publicación que fue escrita como resultado de este trabajo de tesis [129].

El fenilacetoneitrilo es considerado una feromona de agregación para la especie de langosta *Schistocerca gregaria* [180]. De haber resultado ser atractante en mosquitos, su uso en trampas se hubiera podido ver limitado, al atraer especies no blanco.

Reportes de ensayos de EAG realizados con 1-noneno en hembras de *An. gambiae* y *Cx. Pipiens* no mostraron una respuesta estadísticamente significativa para ambas especies, aunque sólo se realizó la prueba con dos hembras para cada especie [132].

Se han reportado respuestas electroantenográficas positivas con la acetofenona en mediciones realizadas con antenas de *Ae. aegypti* en ambos sexos [87], aunque esta respuesta no puede ser asociada con una respuesta comportamental. Los autores no profundizaron en estudios sobre las implicancias de las respuestas electroantenográficas en el comportamiento.

Según trabajos previos, ya se había observado una respuesta diferente entre ambos sexos de mosquitos, hacia una concentración de un compuesto volátil [59]. La diferencia en respuesta hacia compuestos volátiles, está fundamentada en el tipo de alimentación de cada sexo: Los machos son fitófagos; y a diferencia de los machos, las hembras son hematófagas. La ingesta de sangre es imprescindible para completar el ciclo de vida [60].

En el trabajo de De Lima, se encontró que cantidades de  $\beta$ -pineno entre 0,2 y 1,2  $\mu\text{g}$  provocan una respuesta de repelencia en hembras de *Ae. aegypti* en olfatómetro [47] y estudios electroantenográficos realizados por Campbell *et al.* demostraron que este compuesto es detectado por hembras de *Ae. aegypti* [36].

El EAG con ambos enantiómeros de  $\alpha$ -pineno no mostró respuesta en hembras de *Ae. aegypti*, sugiriendo que los  $\alpha$ -pinenos no son detectados por los mosquitos y por lo tanto no producirían un efecto comportamental [36]. Estos resultados del EAG con los  $\alpha$ -pinenos en *Ae. aegypti*, son consistentes con los nuestros antes descritos para el compuesto (-)- $\alpha$ -pineno. En donde, los estudios que se informan en esta tesis mostraron que no hay una respuesta estadísticamente significativa en el olfatómetro, a ninguna cantidad de (-)- $\alpha$ -pineno, para ninguno de los sexos de *Ae. aegypti*. En el caso para el (+)- $\alpha$ -pineno se observó una respuesta estadísticamente significativa para la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de (+)- $\alpha$ -pineno. Mathew *et al.* observó un efecto repelente de *Ae. aegypti* hacia una mezcla racémica de  $\alpha$ -pineno. Sugiriendo que el efecto com-

portamental del  $\alpha$ -pineno no está totalmente determinado por el resultado del EAG [109].

En el trabajo de Nyasembe *et al.* en *An. gambiae*, se observó que el  $\beta$ -pineno era atractante hacia el mosquito. Evaluaciones del compuesto previamente mencionado, con *An. gambiae* en el EAG, dieron una señal. Lo que prueba que el mosquito es capaz de registrar al compuesto [128].

No siempre el efecto atractante del blend completo de una planta observado en el olfatómetro, se correlaciona con un similar efecto producido por sus componentes volátiles. Por ejemplo, un extracto de *Asclepias syriaca* resultó ser atractante de *Cx. pipiens pipiens* [110] y el análisis cromatográfico del espacio de cabeza del extracto mostró la presencia mayoritaria de alcohol fenético y alcohol bencílico. Sin embargo, una mezcla de ambos compuestos no mostró un comportamiento atractante en *Cx. pipiens pipiens* en el olfatómetro [110].

## 6.5. Estudios sobre inflorescencias cortadas de *L. maritima*

### 6.5.1. Evaluación de atracción por inflorescencias cortadas de *L. maritima* en el olfatómetro

Los resultados del “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro.” 4.1.2, mostraron que la planta con flores de *L. maritima* presenta una capacidad atractante interesante para ambos sexos de *Ae. aegypti*, particularmente para hembras. Por otra parte el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2, permitió observar que el efecto atractante de las flores de esta especie causa un incremento de la toxicidad del tratamiento con imidacloprid.

Sobre la base de estos resultados fue de interés profundizar los estudios sobre esta especie, particularmente en el rol de la flor en su capacidad atractante. Por tal razón se llevó a cabo el ensayo en el olfatómetro, pero con inflorescencias cortadas de *L. maritima*.

La “Evaluación de atracción por inflorescencias cortadas de *L. maritima* en el olfatómetro” 4.5.1 se hizo con las flores hasta una hora después de cortadas, teniendo en cuenta que los productos de hidrólisis de los glucosinolatos son de propósito defensivo, y por lo tanto son liberados casi inmediatamente después de suceder el daño mecánico [149].

Los mosquitos fueron evaluados de a uno a la vez, para poder controlar el ingreso del mosquito a la zona de la planta y cerrar la compuerta una vez que tome contacto con la planta. Para evitar el la posible influencia del estímulo visual, se tomó como

positiva la primera elección de brazo, hecho que sucede antes de que ocurra el referido estímulo.

Las inflorescencias cortadas resultaron ser atractivas para ambos sexos de mosquitos, según los resultados analizados por la prueba de  $\chi^2$ . Este resultado está en consonancia con lo observado en el “Ensayo de preferencia de plantas con flores en olfatómetro” 4.1.2 y con el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2. Por otra parte, encuadra en la sugerencia de trabajos previos, respecto a que la capacidad atractante de las plantas se concentra en las flores [119].

En su trabajo Müller *et al.* [119], compararon la captura de *An. sergentii* en trampas cebadas con flores de: *A. raddiana*, *Tamarix nilotica* y *Ochrandenus baccatus*. Contra trampas cebadas con ramas sin flores de las mismas especies. Según la planta, las flores fueron entre 35-75 veces más atractantes que las ramas solas. En el mismo trabajo, se describe como logró controlar a la población de *An. sergentii* en un oasis, a través del rociado de todas las flores de *A. raddiana* presentes con una solución de sacarosa y un insecticida por ingestión.

### 6.5.2. Identificación de compuestos volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*

El compuesto que fue ampliamente mayoritario fue el 4-isotiocianato-1-buteno, seguido por el 3,4-epitiobutilnitrilo. Los compuestos que estuvieron presentes en proporciones minoritarias (< 5 % de área) fueron: isotiocianato de alilo, fenilacetaldehído, acetofenona, 1-octanol, 5-isotiocianato-1-penteno, alcohol fenético, fenilacetónitrilo, isotiocianato de 4-metil-pentilo, isotiocianato de hexilo, 4,5-epitiopentilnitrilo, 4-vinil-2-metoxi-fenol, isotiocianato de bencilo y el compuesto desconocido.

Las brassicáceas como *L. maritima*, contienen glucosinolatos que son hidrolizados cuando la planta sufre un daño mecánico. Los productos de dicha hidrólisis son 1-alquénil isotiocianatos y epitionitrilos principalmente. La reacción de hidrólisis de los glucosinolatos es catalizada por la enzima mirosinasa, generando a un compuesto intermedio inestable. El producto final de dicho compuesto intermedio es dependiente de la naturaleza de la cadena lateral de carbonos y las condiciones del medio. Los isotiocianatos se forman a  $\text{pH} > 7$ , los nitrilos se forman a  $\text{pH} < 4$ . Oxazilidina-2-tiones se forman en presencia de cadenas laterales  $\beta$ -hidroxiladas. Un enlace doble terminal en la cadena lateral, con la presencia de iones de  $\text{Fe}^{+2}$  y proteínas específicas, resultan en la formación de epitionitrilos [28, 53, 57]. En la Figura 6.2 se pueden ver el mecanismo y los productos de la hidrólisis de los glucosinolatos, la Figura fue adaptada de Halkier *et al.* [76] y Poulton *et al.* [139]

En la planta intacta la enzima mirosinasa se encuentra dentro de células específicas de mirosina, lo que resulta en que los glucosinolatos estén físicamente separados de

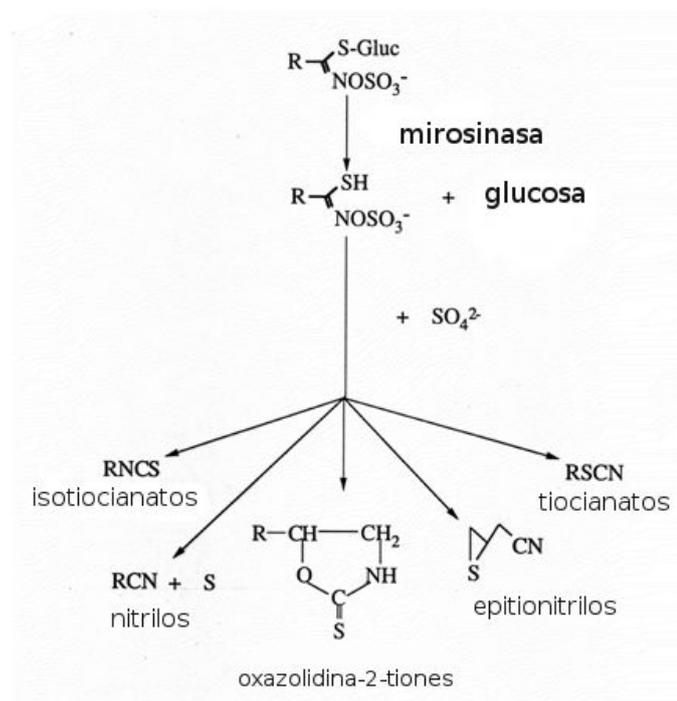


Figura 6.2: Mecanismos y los productos de la hidrólisis de glucosinolatos.

la mirosinasa [53]. Las células de mirosina actúan como una especie de mina tóxica, que se detonan cuando son dañadas mecánicamente [169].

En el análisis de los volátiles de la planta entera de *L. maritima*, el compuesto que registró el pico de mayor área fue el de acetofenona. En el análisis de los volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima* el compuesto que registró el pico de mayor área fue el de 4-isotiocianato-1-buteno. El compuesto que fue detectado en la planta entera, pero no en las inflorescencias cortadas fue: el limoneno. Los compuestos que fueron detectados en las inflorescencias cortadas, pero no en la planta entera fueron: isotiocianato de alilo, fenilacetaldehído, 5-isotiocianato-1-penteno, 3,4-epitiobutilnitrilo, isotiocianato de 4-metil-pentilo, isotiocianato de hexilo, 4,5-epitiopentilnitrilo, 4-vinil-2-metoxi-fenol e isotiocianato de bencilo. La diferencia en los volátiles registrados se debe a que al cortar las inflorescencias de la planta, se induce un daño mecánico que permite la hidrólisis de los glucosinolatos [46].

A pesar de no haber dispuesto de los estándares de 4-isotiocianato-1-buteno, 5-isotiocianato-1-penteno, 3,4-epitiobutilnitrilo y 4,5-epitiopentilnitrilo, su presencia se postula no sólo en base a sus espectros de masas, sino a que su presencia era esperada como productos de descomposición de los glucosinolatos. El glucosinolato que produce 4-isotiocianato-1-buteno, es el mismo que también genera 3,4-epitiobutilnitrilo por otra ruta metabólica. El glucosinolato que produce 5-isotiocianato-1-penteno es el mismo que también genera 4,5-epitiopentilnitrilo.

Los epitionitrilos son compuestos quirales, cuya mezcla racémica se forma por la

hidrólisis de los glucosinolatos. Se encontró la mezcla racémica cuando los volátiles de *L. maritima* fueron analizados en una columna quirál.

Actualmente no existen en la literatura científica registros, en mosquitos, de ensayos comportamentales con isotiocianatos o epitionitrilos.

En su trabajo Pope *et al.* [138] evaluaron compuestos de degradación de los glucosinolatos en *Diaeretiella rapae*, un insecto parasitoide de áfidos. La justificación detrás del estudio, es que los isotiocianatos y epitiocianatos, podrían señalar al parasitoide la presencia potencial del huésped. Evaluaron dos isotiocianatos y dos epitionitrilo en EAG y en un olfatómetro en “Y”. Se determinó que *D. rapae* es capaz de detectar a estos compuestos de degradación de los glucosinolatos en EAG y tienen una respuesta de vuelo positiva, en el olfatómetro, hacia estos compuestos.

### 6.5.3. Bioensayo de atracción hacia compuestos volátiles de inflorescencias cortadas de *L. maritima*

Los compuestos volátiles identificados y disponibles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*, fueron evaluadas en el olfatómetro colocando las sustancias a evaluar sobre un vidrio de reloj en forma similar a como se habían presentado las flores. El propósito de este método fue el de imitar la emisión de volátiles que ocurren cuando se cortaron y evaluaron las inflorescencias de aliso.

El método fue adaptado de un trabajo sobre feromonas atractantes hacia *Ae. aegypti*, realizado por Fawaz *et al.* [56]. De ahí adaptamos el solvente, la dilución, el uso de vidrio de reloj y la dosis de los compuestos.

En hembras, los compuestos que dieron una respuesta estadísticamente significativa fueron: la acetofenona y el 1-octanol. La acetofenona mostró un comportamiento attractante, mientras que 1-octanol de aversión al vuelo.

En machos el único compuesto que dio una respuesta estadísticamente significativa fue la acetofenona, mostrando un comportamiento attractante.

Los resultados de este ensayo son consistentes con los obtenidos en el “Bioensayo en olfatómetro de los compuestos volátiles identificados y disponibles de partes aéreas de plantas con flores” 4.4.1. La acetofenona fue establecida como un compuesto attractante para machos y hembras de *Ae. aegypti*, lo que sugiere su potencial para ser utilizado en trampas o cebos en estrategias de manejo de poblaciones de *Ae. aegypti*.

En ambos ensayos el 1-octanol demostró tener una capacidad de aversión al vuelo con significancia estadística sólo en hembras. En machos se observó también un comportamiento de aversión al vuelo, con un valor de  $p$  cercano al de la significancia estadística.

#### 6.5.4. Determinación de una posible nectarización por *Ae. aegypti* de la flor de *L. maritima* presente en su inflorescencia. Cuantificación de ingesta de fructosa

Como parte de los estudios de la inflorescencia de *L. maritima* consideramos como objetivo de importancia determinar si dentro de su patrón de comportamiento, los mosquitos *Ae. aegypti* son capaces de alimentarse del néctar de esta flor. Para la mayoría de las especies de mosquitos, el néctar floral y los fluidos vegetales extraflorales son la principal fuente dietética de la hembra y la única fuente de nutrientes del macho [60, 184].

La relevancia de esta posible interacción entre *L. maritima* y *Ae. aegypti* no es menor, ya que podría tomarse como base de una posible trampa letal, a través de la incorporación a la planta de un insecticida de contacto o sistémico. En el “Bioensayo con punto-final toxicológico de atracción de mosquitos hacia flores” 4.2.2, las pruebas que incluyeron a la planta de *L. maritima*, fueron las que mostraron la mortalidad con mayor significancia estadística.

Se utilizó sacarosa como blanco positivo debido a que ésta es hidrolizada por el mosquito rápidamente después de ser ingerida a glucosa y fructosa [127]. La cantidad de fructosa detectada se reduce fuertemente dentro de las 24 horas después de la ingestión. Pasadas las 48 horas se detectan trazas del azúcar sólo en algunos casos. Los tiempos de detección de fructosa en *Ae. aegypti*, fueron determinados en estudios realizados con machos y hembras, alimentados con una solución de sacarosa al 10 % y/o sangre. Estos estudios también evaluaron el volumen de solución de azúcar ingerido [45].

En nuestros resultados detectamos la presencia de fructosa en cantidad estadísticamente significativa, con respecto al control negativo para ambos sexos, luego de haber estado expuestos a las inflorescencias de *L. maritima* y al control positivo que consistía en una solución de sacarosa. En hembras, en el control positivo se detectó mayor cantidad de fructosa por mosquito que en el control positivo de machos. Esta diferencia entre sexos coinciden con resultados previos. Nunes *et al.* informaron que las hembras ingieren hasta 2,5 veces más azúcares que los machos [127].

Nuestros resultados con las inflorescencias de *L. maritima* mostraron que al contrario que con la solución de sacarosa, en los machos detectamos alrededor de tres veces más fructosa que en las hembras. Si consideramos que la cantidad observada en la administración de sacarosa (control positivo) debería asemejarse al valor de repleción, entonces las dos explicaciones más probables son: 1) los machos tienen menores reservas energéticas debido a su menor tamaño promedio, por lo tanto estarían más afectados por el ayuno, y además detectarían con mayor facilidad de la fuente de alimentación debido a que son huéspedes obligados del néctar floral. En cambio las hembras disponen de otra fuente de alimentación. Lo que hizo que los primeros consumieran los recursos antes que las hembras. 2) Otra explicación posible es que

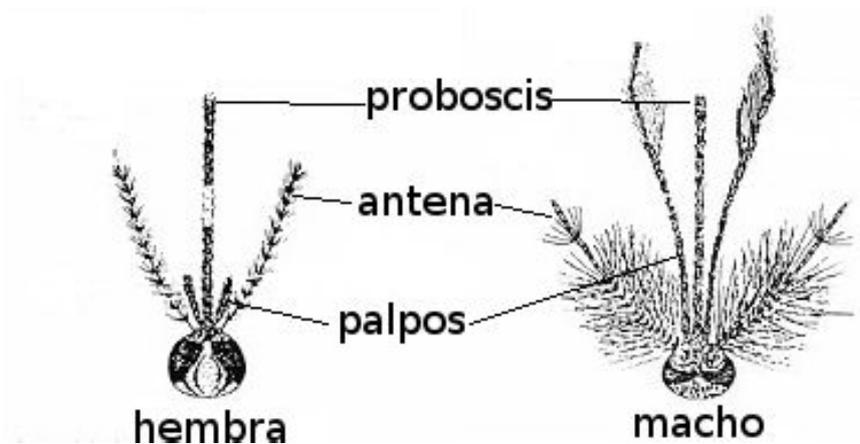


Figura 6.3: Esquema de los aparatos bucales de culicidos hembras y machos.

el aparato bucal de los machos pueda permitirles extraer mejor el néctar de las inflorescencias que las hembras. En la sacarosa no habría habido efecto en la capacidad de alimentación. En la Figura 6.3 se puede ver un esquema, la comparación de los aparatos bucales entre culicidos hembras y machos, imagen adaptada de [2].

El hecho de que el aliso sea una planta atractante, que estimula a que el mosquito se acerque, y además que se alimente efectivamente de su néctar. Plantea la posibilidad de en condiciones de laboratorio agregar insecticidas sistémicos a la planta entera de aliso y evaluar posteriormente si se produce un incremento en la mortalidad observada de los mosquitos expuestos. Se podría estudiar también cuanto dura el efecto de incremento de mortalidad.

Si esta hipótesis se verificara, sería interesante proponer si a campo se pueden lograr reducciones poblacionales por la presencia de aliso más insecticidas. Si bien esta propuesta incluiría el uso de insecticidas, este sería de un uso focalizado y no tendría el mismo impacto que un rociado espacial, como los que se utilizan habitualmente.

Un eventual uso de plantas “tóxicas”, por incorporación de insecticidas sistémicos, como una herramienta de manejo integrado de mosquitos, requeriría una cuidadosa evaluación de su impacto ambiental. Sólo sería factible evitando el efecto insecticida sobre otras especies de insectos benéficos, como las abejas, que también se alimentan del néctar. Por tal razón un posible uso de esta metodología debería sólo implementarse en escenarios acotados, en donde el único insecto que acceda al néctar fuera el mosquito.

## **6.6. Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico**

### **6.6.1. Formulación de compuestos atractantes de mosquitos en parafina y estearina**

Nuestro laboratorio posee amplia experiencia en la fabricación de matrices de liberación controlada de semioquímicos utilizando ceras y polímeros naturales y biodegradables [81, 38, 64].

En este trabajo utilizamos parafina y estearina como matrices para formular los atractantes, por ser ambos compuestos económicamente accesibles, no tóxicos, estables, de fácil manejo y de los que obtuvimos muy buenos resultados en nuestros trabajos anteriores. Como son compuestos muy poco solubles en agua, se tomó como referencia de la polaridad, su proporción de solubilidad entre tolueno y 2-propanol ( $\frac{\text{tolueno}}{2\text{-propanol}}$ ). La estearina tiene un valor de 3 mientras que la parafina de 90. Cuanto más bajo es el valor más polar es la molécula [166]. La polaridad influye en la solubilidad del activo en el sentido en que a mayor afinidad con el activo, se esperaría una menor velocidad de su liberación al ambiente.

Al ser los compuestos atractantes incluidos mientras las matrices estaban en estado líquido (80°C), se eligió el diclorometano como solvente, debido a que por su bajo punto de ebullición (38°C) se garantizaba que no estaría presente en las matrices durante los ensayos.

### **6.6.2. Ensayo de atracción de mosquitos por formulados sólidos con punto-final toxicológico**

La mortalidad producida por los discos de estearina conteniendo 1-noneno 0,05 mg/ml resultó ser estadísticamente significativa en machos pero no en hembras. Peculiarmente la concentración 0,1 mg/ml en disco de estearina no dio un aumento de la mortalidad estadísticamente significativo en ninguno de los sexos, pero sí la dosis de 1 mg/ml en ambos sexos. La gran incógnita es: ¿por qué la concentración intermedia de 1-noneno de 0,1 mg/ml no dio un efecto de mayor mortalidad en machos, mientras que las concentraciones de 1 mg/ml y 0,05 mg/ml sí dieron?

La explicación más plausible que encontramos, es que en los ensayos con los discos de estearina con 0,1 mg/ml de 1-noneno, hayan habido factores que escapan a nuestro control, que influyeron en la sensibilidad de los mosquitos al compuesto. Comparan-

do las desviaciones estándar entre las tres concentraciones de 1-noneno (0,05, 0,1 y 1 mg/ml) en estearina. Se puede ver que la desviación estándar para la concentración de 0,1 mg/ml, es mucho mayor que para las otras dos concentraciones, reforzando la hipótesis de que hubo un factor externo involucrado.

Los resultados sugieren que la acetofenona es en general, independientemente del material de la matriz, un attractante más efectivo a concentraciones menores que el 1-noneno. Pero para poder hacer esa afirmación, habría que conocer la razón de liberación de cada uno de los volátiles de las matrices, podría ser el caso, que el 1-noneno fuera liberado del disco a una velocidad mucho menor que la acetofenona, por lo tanto la cantidad de 1-noneno volatilizada fuera menor, aun a concentraciones altas.

El ensayo fue exitoso, en tanto que pudimos demostrar la viabilidad de formular trampas letales de *Ae. aegypti* con compuestos volátiles sintéticos vegetales, en condiciones de laboratorio. El efecto comportamental de ambos compuestos volátiles usados fue descubierto por nosotros. En el caso de la acetofenona, ya se había reportado un efecto attractante en otra especie de mosquitos, mientras que para el 1-noneno no habían ensayos comportamentales previos en mosquitos.

# 7 Conclusiones

## 7.1. Conclusiones particulares

### 7.1.1. Estudios comportamentales con plantas con flores

El ensayo preliminar de preferencia de posada de mosquitos en plantas con flores mostró que algunas de ellas, comúnmente disponibles en el entorno doméstico, como *L. maritima*, *P. neochilus*, *T. patula*, *S. madagascariensis* y *E. pectinatus*, resultaron atractantes para mosquitos adultos de *Ae. aegypti*. En las que fueron atractantes se pudo observar un comportamiento de extensión de proboscis, actividad que sugiere un intento de alimentación, por parte del mosquito, de la planta. Como excepción, se observó en *P. neochilus* un gran número de mosquitos posados, pero sin extensión de proboscis. Lo que sugirió que *P. neochilus* provocaba un comportamiento de búsqueda de refugio en los mosquitos. No hay antecedentes en la bibliografía sobre estudios que identifiquen plantas atractantes de *Ae. aegypti*. En mosquitos, sólo para *An. gambiae* se publicó un estudio comportamental en el que se estableció preferencia de comportamiento de alimentación sobre algunas plantas en condiciones de laboratorio [108].

En el “Ensayo en olfatómetro de preferencia de plantas con flores”, los mosquitos machos mostraron preferencia, con significancia estadística, por un mayor número de plantas (*E. pectinatus*, *L. maritima* y *S. madagascariensis*), en comparación con las hembras (*E. pectinatus* y *L. maritima*). Se observó un comportamiento de aversión, con significancia estadística al vuelo sólo en machos hacia *P. neochilus* y un comportamiento de atracción, también sólo en machos, para *S. madagascariensis*. Estos resultados indican que cada sexo de *Ae. aegypti* tiene una respuesta comportamental diferente hacia los volátiles de las plantas evaluadas.

### 7.1.2. Estudios de atracción de mosquitos hacia flores con punto-final toxicológico

Cuando se combinó en un bioensayo el efecto atrayente de las flores, con un cebo de sacarosa e imidacloprid, se obtuvo una respuesta de mayor efecto tóxico del insecticida en *Ae. aegypti*. Se observó un aumento en la mortalidad, estadísticamente significativa, en ambos sexos para *L. maritima* y *E. pectinatus*. Para *S. madagascariensis* el incremento del efecto insecticida sólo se observó en machos. Los resultados del bioensayo sugieren que se podrían usar cebos de flores cortadas para captura o para el control, por efecto insecticida, de *Ae. aegypti* en condiciones de campo. La recolección de volátiles de plantas con flores y su posterior identificación química, permitió determinar la presencia en *L. maritima*, *E. pectinatus* y *S. madagascariensis*, de compuestos volátiles anteriormente identificados como atrayentes para otras especies de mosquitos, como acetofenona,  $\beta$ -pineno y limoneno [176, 87]. En el caso de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*, los isotiocianatos derivados de la hidrólisis de los glucosinolatos detectados encuadran en resultados previos para estos procesos botánicos de descomposición [43]. Se pudo confirmar la identidad de isotiocianato de bencilo y el isotiocianato de alilo por medio de la co-inyección de estándares sintéticos.

### 7.1.3. Composición química de las emisiones volátiles de plantas con flores

El análisis de las emisiones de plantas con flores permitió identificar una serie de compuestos, e incluso uno no informado en la literatura previamente. En *E. pectinatus* fueron identificados los terpenos  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -felandreno; sesquiterpenos:  $\alpha$ -copaeno, trans- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -muuruleno; y los alquenos 1-deceno, 1-undeceno y 1-dodeceno. *S. madagascariensis* mostró una composición de volátiles muy parecida a la de *E. pectinatus*; para ambas especies se identificaron terpenos y 1-alquenos principalmente. Los terpenos identificados en *S. madagascariensis* fueron (+)- $\alpha$ -pineno, (-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, sabineno y felandreno. Los 1-alquenos encontrados fueron 1-noneno y 1-undeceno. También se identificó el acetato de 4-hexenol atribuible, por los antecedentes previos, a las emisiones de las hojas verdes. En *L. maritima* los compuestos volátiles identificados pertenecen a grupos muy diversos: 1-alquenil isotiocianatos, terpenos, compuestos aromáticos y un compuesto que no pudo ser identificado. El 1-alquenil isotiocianato identificado fue 4-isotiocianato-1-buteno, atribuible a la hidrólisis de los glucosinolatos, reacción que sucede cuando la planta es dañada mecánicamente. Los compuestos aromáticos encontrados fueron acetofenona, alcohol fenético y fenilacetnitrilo. Los terpenos presentes fueron identificados como limoneno y un compuesto desconocido, el cual probablemente sea un terpeno.

#### 7.1.4. Estudios comportamentales con componentes volátiles de plantas con flores

En el bioensayo en olfatómetro con los compuestos volátiles identificados de partes aéreas de plantas con flores, se observó en hembras un comportamiento estadísticamente significativo de atracción para las dosis de 1 µg de acetofenona y 10 µg de (+)-α-pineno. El 1-noneno da lugar a un efecto attractante sólo en machos y sólo en un estrecho rango de masas, debido a que sólo se observó un efecto attractante en la cantidad media de 10 µg. Las cantidades de 10 µg y 100 µg de isotiocianato de bencilo, generaron en machos un comportamiento de aversión al vuelo, sugiriendo la posibilidad de que este compuesto sea un potencial repelente sólo de machos. Para la cantidad de 100 µg de 1-octanol se determinó una aversión al vuelo estadísticamente significativa en hembras y machos, sugiriendo que podría ser un potencial repelente. No se han encontrado en la bibliografía antecedentes del uso de 1-octanol y el isotiocianato de bencilo como repelentes para *Ae. aegypti*.

#### 7.1.5. Estudios sobre inflorescencias cortadas de *L. maritima*

Los resultados con plantas enteras con inflorescencias de *L. maritima* mostraron una capacidad attractante interesante para ambos sexos de *Ae. aegypti*, particularmente para hembras. Como además el efecto attractante de las flores de esta especie causó un incremento de la toxicidad por exposición al imidacloprid, se planteó la necesidad de profundizar el rol de esta flor en el comportamiento de *Ae. aegypti*. Por tal razón se estudió el efecto sobre *Ae. aegypti* de inflorescencias cortadas de *L. maritima*. Dichas inflorescencias cortadas resultaron attractantes para machos y hembras. Este resultado abre la posibilidad de que las inflorescencias cortadas de *L. maritima* sean utilizadas en futuras trampas cebadas para *Ae. aegypti*. El análisis de los volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima* y su identificación mostró un pico principal de 4-isotiocianato-1-buteno, seguramente atribuible, a que por la inducción de un daño mecánico en la planta se produce la hidrólisis de glucosinatos. Asimismo se identificaron isotiocianato de alilo, 4-isotiocianato-1-buteno, isotiocianato de 4-metil-pentilo, isotiocianato de hexilo, 5-isotiocianato-1-penteno e isotiocianato de bencilo. Los compuestos aromáticos identificados fueron: fenilacetaldehído, acetofenona, alcohol fenético, fenilacetnitrilo, 4-vinil-2-metoxi-fenol; y las mezclas racémicas de 3,4-epitiobutilnitrilo y 4,5-epitiopentilnitrilo. El 1-octanol y un compuesto desconocido también fueron encontrados en la emisión de volátiles de las inflorescencias cortadas de *L. maritima*. Los estudios de atracción de *Ae. aegypti* para ambos sexos por componentes volátiles de inflorescencias cortadas de *L. maritima*, mostraron como resultado que para la acetofenona el comportamiento fue de atracción, mientras que para el 1-octanol fue de aversión al vuelo, sólo en hembras fue el efecto de aversión al vuelo estadísticamente significativo.

En los estudios de la inflorescencia de *L. maritima* un objetivo de importancia fue determinar si dentro de su patrón de comportamiento, los mosquitos *Ae. aegypti* son capaces de alimentarse del néctar de esta flor. En la mayoría de las especies de mosquitos, el néctar floral y los fluidos vegetales extraflorales son la principal fuente de azúcar dietética de la hembra y la única fuente de nutrientes del macho. Cuantificando la ingesta de fructosa se determinó la capacidad de *Ae. aegypti* de ingerir néctar de la planta *L. maritima*. Este resultado es interesante, porque abre la posibilidad de desarrollar trampas letales, a través de la incorporación de un insecticida sistémico a *L. maritima*.

#### **7.1.6. Formulación en matrices de parafina y estearina de componentes de plantas con flores atractantes de mosquitos y su evaluación biológica con punto-final toxicológico**

Se realizó un ensayo de atracción de mosquitos por discos de formulados sólidos con matrices de parafina y estearina, el cual tuvo un punto-final toxicológico causado por un algodón embebido en una solución de sacarosa e imidacloprid. Como resultado se observó cómo los compuestos volátiles vegetales incorporados en una matriz sólida actúan como cebo atractante de mosquitos, lo que se manifiesta por el incremento de la mortalidad causada por el imidacloprid en solución de sacarosa de los insectos atraídos en comparación con el blanco.

Tanto acetofenona como 1-noneno mostraron concentraciones en las que fueron atractantes. Todos los discos formulados que mostraron una mortalidad con significancia estadística en hembras, también lo fueron en machos con significancia estadística. El disco de estearina con 0,5 mg de 1-noneno mostró una mortalidad significativa en machos únicamente, sugiriendo que los machos son más atraídos por dicho compuesto en las concentraciones emitidas por los formulados. A pesar de que la acetofenona fue atractante a menores concentraciones en los discos que el 1-noneno, no se puede afirmar que este sea más atractante, debido a que el efecto puede haber sido debido a una cinética de liberación de la acetofenona más rápida. Hasta nuestro conocimiento bibliográfico, no se han informado hasta el momento ensayos a campo con trampas cebadas con volátiles vegetales con resultados destacables.

## **7.2. Conclusión general**

Se estableció que algunas de las plantas con flores estudiadas son atractantes de machos y hembras de *Ae. aegypti*. Sobre las más promisorias como atractantes, se identificaron sus compuestos volátiles y algunos de ellos fueron caracterizados por su capacidad de atraer mosquitos machos y/o hembras. A partir de estos resultados

se demostró la viabilidad de la incorporación de los compuestos volátiles vegetales atractantes en matrices naturales, dando lugar a soluciones sólidas de liberación controlada.

Estas formulaciones sólidas fueron caracterizadas como cebos tóxicos en condiciones de laboratorio. Los resultados de esta tesis no sólo aportaron nuevas descripciones de composición de volátiles de flores con componentes atractantes sobre *Ae. aegypti*, sino que también abrieron la posibilidad de diseñar nuevas trampas y cebos para el control y/o el monitoreo de poblaciones de mosquitos.

Debido a las fallas en los métodos habituales de control de vectores, que se manifestaron en la última década, la OMS estableció como prioritario el desarrollo de nuevas herramientas de control de mosquitos para ser utilizados como parte de un manejo integrado de los vectores. Entre las nuevas herramientas en desarrollo para el control de mosquitos, tanto para *Aedes spp.* como para *Anopheles spp.*, se encuentran los cebos azucarados conteniendo compuestos atractantes de mosquitos e insecticidas [65, 130].

# Bibliografía

- [1] Center for Disease Control and Prevention. [www.bvsde.paho.org/bvsair/e/repindex/rep178/pagina/matedu/prof.htm](http://www.bvsde.paho.org/bvsair/e/repindex/rep178/pagina/matedu/prof.htm). Visitado: 17/7/2017.
- [2] Distribución de *Senecio madagascariensis*. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?403707>. Visitado: 17/7/2017.
- [3] Formas de uso de imidacloprid en la Argentina. [http://cropscience.bayer.com.ar/common/download\\_file.php?file\\_managerID=31&fileID=2465](http://cropscience.bayer.com.ar/common/download_file.php?file_managerID=31&fileID=2465). Visitado: 17/07/2017.
- [4] Información sobre *Euryops pectinatus*. [http://zipcodezoo.com/index.php/Euryops\\_pectinatus](http://zipcodezoo.com/index.php/Euryops_pectinatus). Visitado: 17/7/2017.
- [5] Informaciones generales sobre imidacloprid. <http://extoxnet.orst.edu/pips/imidaclo.htm>. Visitado: 17/07/2017.
- [6] Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología, 2009. Sala de situación de coyuntura de dengue, 16 de junio de 2009.
- [7] Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>. Visitado: 17/7/2017.
- [8] Organización Panamericana de la Salud. <http://www1.paho.org/english/hcp/hct/vbd/dengue-nueva-generacion.htm>. Visitado: 17/7/2017.
- [9] **Abdel-Malek**, AA: Study of the feeding habits of male *Anopheles sergenti* Theo. at Siwa Oasis using radio-phosphorus. *Bulletin of the World Health Organization*, 30(1):137, 1964.
- [10] **Abdel-Malek**, AA y **WF Baldwin**: Specificity of plant feeding in mosquitoes as determined by radioactive phosphorus. *Nature*, 192:178–179, 1961.
- [11] **Allan**, SA: Susceptibility of adult mosquitoes to insecticides in aqueous sucrose baits. *Journal of Vector Ecology*, 36(1):59–67, 2011.
- [12] **Angioni**, A, **A Barra**, **V Coroneo**, **S Dessi** y **P Cabras**: Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas L. ssp. stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(12):4364–4370, 2006.

- [13] **Arthur**, CL y **J Pawliszyn**: Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*, 62(19):2145–2148, 1990.
- [14] **Aviles**, G, **G Rangeón**, **V Vorndam**, **A Briones**, **P Baroni**, **D Enria** y **MS Sabattini**: Dengue reemergence in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 5(4):575, 1999.
- [15] **Baker**, HG y **I Baker**: The occurrence and significance of amino acids in floral nectar. *Plant systematics and evolution*, 151(3-4):175–186, 1986.
- [16] **Bates**, M y *cols.*: The natural history of mosquitoes. *The Natural History of Mosquitoes.*, 1949.
- [17] **Bellavia**, V, **M Natangelo**, **R Fanelli** y **D Rotilio**: Analysis of benzothiazole in Italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(4):1239–1242, 2000.
- [18] **Bisset**, J, **S Blanco**, **I Braga**, **H Coto**, **H Masuh**, **A Moncayo**, **M Nathan**, **P Orellano**, **J Vázquez** y **E Zerba**: Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. *Documento propuesto por la Red Latinoamericana de Control de Vectores*, 2005.
- [19] **Boffi**, R: Erradicación y reinfestación por el *Aedes aegypti* en la Republica Argentina. Tesis de Doctorado, Master dissertation, Universidad Nacional General San Martin, Argentina, 2002.
- [20] **Bolling**, BG, **CG Moore**, **SL Anderson**, **CD Blair** y **BJ Beaty**: Entomological studies along the Colorado Front Range during a period of intense West Nile virus activity. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(1):37–46, 2007.
- [21] **Bones**, AM y **JT Rossiter**: The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 97(1):194–208, 1996.
- [22] **Bowen**, MF: Terpene-sensitive receptors in female *Culex pipiens* mosquitoes: electrophysiology and behaviour. *Journal of Insect Physiology*, 38(10):759–764, 1992.
- [23] **Braks**, MAH, **SA Juliano** y **LP Lounibos**: Superior reproductive success on human blood without sugar is not limited to highly anthropophilic mosquito species. *Medical and veterinary entomology*, 20(1):53–59, 2006.
- [24] **Brantjes**, NBM y **JAAM Leemans**: *Silene otites* (Caryophyllaceae) pollinated by nocturnal Lepidoptera and mosquitoes. *Acta botanica neerlandica*, 25(4):281–295, 1976.

- [25] **Bruce**, TJ, LJ **Wadhams** y CM **Woodcock**: Insect host location: a volatile situation. *Trends in plant science*, 10(6):269–274, 2005.
- [26] **Burkett**, DA, DL **Kline** y DA **Carlson**: Sugar meal composition of five north central Florida mosquito species (Diptera: Culicidae) as determined by gas chromatography. *Journal of medical entomology*, 36(4):462–467, 1999.
- [27] **Cadwallader**, KR y J **Heo**: Aroma of roasted sesame oil: characterization by direct thermal desorption-gas chromatography-olfactometry and sample dilution analysis. ACS Publications, 2001.
- [28] **Cajka**, T, J **Hajlov**, J **Cochran**, K **Holadov** y E **Klimnkov**: Original Paper Solid phase microextraction–comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *J. Sep. Sci.*, 30:534–546, 2007.
- [29] **Campbell**, C, R **Gries** y G **Gries**: Forty-two compounds in eleven essential oils elicit antennal responses from *Aedes aegypti*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 138(1):21–32, 2011.
- [30] **Cardé**, RT: Odour plumes and odour-mediated flight in insects. *Olfaction in mosquito-host interactions*, 200:54–70, 1996.
- [31] **Ceriani-Nakamurakare**, E, M **Slodowicz**, C **Carmaran** y P **Gonzalez-Audino**: Development of natural waxes dispensers for pheromones and use in mating disruption of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* in poplar (*Populus* spp) plantations. *Agroforestry Systems*, 91(3):415–421, 2017.
- [32] **Chapman**, RF, EA **Bernays** y T **Wyatt**: Chemical aspects of host-plant specificity in three *Larrea*-feeding grasshoppers. *Journal of Chemical Ecology*, 14(2):561–579, 1988.
- [33] **Chassagne**, D, R **Boulanger** y J **Crouzet**: Enzymatic hydrolysis of edible *Passiflora* fruit glycosides. *Food chemistry*, 66(3):281–288, 1999.
- [34] **Cho**, IH, H J **Namgung**, H K **Choi** y Y S **Kim**: Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry*, 106(1):71–76, 2008.
- [35] **Clements**, AN: The biology of mosquitoes: development, nutrition and reproduction vol. 1. *Wallingford, UK: CAB International*, 1992.
- [36] **Cole**, RA: Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. *Phytochemistry*, 15(5):759–762, 1976.
- [37] **Congiu**, R, D **Falconieri**, B **Marongiu**, A **Piras** y S **Porcedda**: Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Flavour and fragrance journal*, 17(4):239–244, 2002.

- [38] **Costero, A, GM Attardo, TW Scott y JD Edman:** An experimental study on the detection of fructose in *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(3):234–242, 1998.
- [39] **Daxenbichler, ME, GF Spencer, DG Carlson, GB Rose, AM Brinker y RG Powell:** Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry*, 30(8):2623–2638, 1991.
- [40] **De Lima, GP, TM De Souza, G De Paula Freire, DF Farias, AP Cunha, NM Ricardo, SM de Morais y AF Carvalho:** Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *Parasitology research*, 112(5):1953–1958, 2013.
- [41] **Degenhardt, J, TG Köllner y J Gershenzon:** Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15):1621–1637, 2009.
- [42] **DeGennaro, M, CS McBride, L Seeholzer, T Nakagawa, EJ Dennis, C Goldman, N Jasinskiene, AA James y LB Vosshall:** orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature*, 498(7455):487, 2013.
- [43] **Dicke, Marcel y Maurice W Sabelis:** Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, páginas 131–139, 1988.
- [44] **Diosque, M:** Boletín integrado de vigilancia.
- [45] **D’Mello, JP, CM Duffus y JH Duffus:** Toxic substances in crop plants. Woodhead Publishing, 1991.
- [46] **Edwards, CJ:** Immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever. Tesis de Doctorado, Imperial College London, 2011.
- [47] **Eisenreich, W, M Schwarz, A Cartayrade, D Arigoni, MH Zenk y A Bacher:** The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry & biology*, 5(9):R221–R233, 1998.
- [48] **Fawaz, EY, SA Allan, UR Bernier, PJ Obenauer y JW Diclaro II:** Swarming mechanisms in the yellow fever mosquito: aggregation pheromones are involved in the mating behavior of *Aedes aegypti*. *Journal of Vector Ecology*, 39(2):347–354, 2014.
- [49] **Fenwick, GR, RK Heaney, WJ Mullin y CH VanEtten:** Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2):123–201, 1983.
- [50] **Fernandes, L y H Briegel:** Reproductive physiology of *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *Journal of Vector Ecology*, 30(1):11, 2005.

- [51] **Fikrig, K, BJ Johnson, D Fish y SA Ritchie:** Assessment of synthetic floral-based attractants and sugar baits to capture male and female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 10(1):32, 2017.
- [52] **Foster, WA:** Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual review of entomology*, 40(1):443–474, 1995.
- [53] **Foster, WA:** Phytochemicals as population sampling lures. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(1):138–146, 2008.
- [54] **Foster, WA y RG Hancock:** Nectar-related olfactory and visual attractants for mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(2 Pt 2):288–296, 1994.
- [55] **Foster, WA y W Takken:** Nectar-related vs. human-related volatiles: behavioural response and choice by female and male *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) between emergence and first feeding. *Bulletin of entomological research*, 94(02):145–157, 2004.
- [56] **Funes, H, R Griffo, E Zerba y P Gonzalez-Audino:** Mating disruption of the ambrosia beetle *Megaplatypus mutatus* in poplar and hazelnut plantations using reservoir systems for pheromones. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139(3):226–234, 2011.
- [57] **Galili, A.:** Attractive Toxic Baited Traps. Conference in Bringing Innovation to the Frontline: Tools to Advance the Global Response to Vector-Borne Diseases. Fundación Ramón Areces, Madrid, 2017.
- [58] **Gardner, DR, MS Thorne, RJ Molyneux, JA Pfister y AA Seawright:** Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. *Biochemical systematics and ecology*, 34(10):736–744, 2006.
- [59] **Gary, RE y WA Foster:** Effects of available sugar on the reproductive fitness and vectorial capacity of the malaria vector *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(1):22–28, 2001.
- [60] **Gary, RE y WA Foster:** *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of peridomestic plants. *Medical and veterinary entomology*, 18(2):102–107, 2004.
- [61] **Geier, M y J Boeckh:** A new Y-tube olfactometer for mosquitoes to measure the attractiveness of host odours. *Entomologia experimentalis et applicata*, 92(1):9–19, 1999.
- [62] **Gleiser, RM, AJ Mackay, A Roy, MM Yates, RH Vaeth, GM Faget, AE Folsom, WF Augustine Jr, RA Wells y MJ Perich:** West Nile virus surveillance in East Baton Rouge Parish, Louisiana. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(1):29–36, 2007.

- [63] **Gouagna, LC, RS Poueme, KR Dabiré, JB Ouédraogo, D Fontenille y F Simard:** Patterns of sugar feeding and host plant preferences in adult males of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 35(2):267–276, 2010.
- [64] **Grech, M, A Visintin, M Laurito, E Estallo, P Lorenzo, I Roccia, M Korin, F Goya, F Ludueña-Almeida y W Almirón:** New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. *Revista de saude publica*, 46(2):387–389, 2012.
- [65] **Gubler, DJ:** Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*, 11(3):480–496, 1998.
- [66] **Haddouchi, F, TM Chaouche, Y Zaouali, R Ksouri, A Attou y A Benmansour:** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food chemistry*, 141(1):253–258, 2013.
- [67] **Hancock, RG y WA Foster:** Effects of preblood-meal sugar on sugar seeking and upwind flight by gravid and parous *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 30(2):353–359, 1993.
- [68] **Hancock, RG y WA Foster:** Larval and adult nutrition effects on blood/nectar choice of *Culex nigripalpus* mosquitoes. *Medical and veterinary entomology*, 11(2):112–122, 1997.
- [69] **Hancock, RG y WA Foster:** Exogenous juvenile hormone and methoprene, but not male accessory gland substances or ovariectomy, affect the blood/nectar choice of female *Culex nigripalpus* mosquitoes. *Medical and veterinary entomology*, 14(4):376–382, 2000.
- [70] **Harborne, AJ:** Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. springer science & business media, 1998.
- [71] **Harburguer, L, S Licastro, H Masuh y E Zerba:** Biological and Chemical Characterization of a New Larvicide Ovitrap Made of Plastic With Pyriproxyfen Incorporated for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Control. *Journal of medical entomology*, página tjw022, 2016.
- [72] **Infeciosas, Enfermedades:** Dengue, Guía para los Equipos de Salud. *Ministerio de Salud de Argentina, Presidencia de la Nación, Año*, 2009.
- [73] **Jakobsen, HB y CE Olsen:** Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta*, 192(3):365–371, 1994.
- [74] **Jardine, K, L Abrell, SA Kurc, T Huxman, J Ortega y A Guenther:** Volatile organic compound emissions from *Larrea tridentata* (creosotebush). *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10(24):12191–12206, 2010.

- [75] **Jepson, PC y TP Healy**: The location of floral nectar sources by mosquitoes: an advanced bioassay for volatile plant odours and initial studies with *Aedes aegypti* (L.)(Diptera: Culicidae). *Bulletin of entomological research*, 78(04):641–650, 1988.
- [76] **Jhumur, Umma Salma, Stefan Dötterl y Andreas Jürgens**: Floral odors of *Silene otites*: their variability and attractiveness to mosquitoes. *Journal of chemical ecology*, 34(1):14, 2008.
- [77] **Jhumur, US, S Dötterl y A Jürgens**: Electrophysiological and behavioural responses of mosquitoes to volatiles of *Silene otites* (Caryophyllaceae). *Arthropod-Plant Interactions*, 1(4):245, 2007.
- [78] **Joseph, SR y cols.**: Fruit feeding of mosquitoes in nature. *Proceedings. New Jersey Mosquito Extermination Association*, 57:125–131, 1970.
- [79] **Jürgens, A, T Witt y G Gottsberger**: Flower scent composition in night-flowering *Silene* species (Caryophyllaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(5):383–397, 2002.
- [80] **Kegge, W, BT Weldegergis, R Soler, MV Eijk, M Dicke, LA Voesenek y R Pierik**: Canopy light cues affect emission of constitutive and methyl jasmonate-induced volatile organic compounds in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 200(3):861–874, 2013.
- [81] **Kim, TH, SM Lee, YS Kim, KH Kim, S Oh y HJ Lee**: Aroma dilution method using GC injector split ratio for volatile compounds extracted by headspace solid phase microextraction. *Food Chemistry*, 83(1):151–158, 2003.
- [82] **Kline, DL, W Takken, JR Wood y DA Carlson**: Field studies on the potential of butanone, carbon dioxide, honey extract, l-octen-3-ol, L-lactic acid and phenols as attractants for mosquitoes. *Medical and veterinary entomology*, 4(4):383–391, 1990.
- [83] **Knab, F**: Mosquitoes as flower visitors. *Journal of the New York Entomological Society*, 15(4):215–219, 1907.
- [84] **Knudsen, JT, L Tollsten y LG Bergström**: Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33(2):253–280, 1993.
- [85] **Kunst, L y AL Samuels**: Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in lipid research*, 42(1):51–80, 2003.
- [86] **Kydonieus, AF**: Controlled release technologies: methods, theory, and applications. 1980.
- [87] **Lacher, V**: Elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Geruchsrezeptoren auf den Antennen weiblicher Moskitos (*Aedes aegypti* L.). *Journal of Insect Physiology*, 13(10):1461IN31465–14641470, 1967.

- [88] **Lacroix, R, AR McKemey, N Raduan, LK Wee, WH Ming, TG Ney, AA Siti Rahidah, S Salman, S Subramaniam, O Nordin** *y cols.*: Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS one*, 7(8):e42771, 2012.
- [89] **Lichtenthaler, HK, J Schwender, A Disch y M Rohmer**: Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters*, 400(3):271–274, 1997.
- [90] **Lwande, W, PG McDowell, H Amiani y P Amoke**: Analysis of airborne volatiles of cowpea. *Phytochemistry*, 28(2):421–423, 1989.
- [91] **Magnarelli, LA**: Nectar feeding by *Aedes sollicitans* and its relation to gonotrophic activity. *Environmental Entomology*, 6(2):237–242, 1977.
- [92] **Magnarelli, LA**: Diurnal nectar-feeding of *Aedes cantator* and *Aedes sollicitans* (Diptera: Culicidae). *Environmental Entomology*, 8(5):949–955, 1979.
- [93] **Maia, JG, EH Andrade, AC da Silva, J Oliveira, LM Carreira y JS Araújo**: Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species. *Flavour and fragrance journal*, 20(5):474–477, 2005.
- [94] **Manda, H, LC Gouagna, WA Foster, RR Jackson, JC Beier, JI Githure y A Hassanali**: Effect of discriminative plant-sugar feeding on the survival and fecundity of *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 6(1):113, 2007.
- [95] **Manda, H, LC Gouagna, E Nyandat, EW Kabiru, RR Jackson, WA Foster, JI Githure, JC Beier y A Hassanali**: Discriminative feeding behaviour of *Anopheles gambiae* ss on endemic plants in western Kenya. *Medical and veterinary entomology*, 21(1):103–111, 2007.
- [96] **Mathew, Nisha, Elango Ayyanar, Sabesan Shanmugavelu y Kalyanasundaram Muthuswamy**: Mosquito attractant blends to trap host seeking *Aedes aegypti*. *Parasitology research*, 112(3):1305–1312, 2013.
- [97] **Mauer, DJ y WA Rowley**: Attraction of *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) to flower volatiles. *Journal of medical entomology*, 36(4):503–507, 1999.
- [98] **McIver, SB**: Sensilla of mosquitoes (diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 19(5):489–535, 1982.
- [99] **Meillon, B de, A Sebastian y ZH Khan**: Cane-sugar feeding in *Culex pipiens fatigans*. *Bulletin of the World Health Organization*, 36(1):53, 1967.
- [100] **Metcalf, RL y M Kogan**: Plant volatiles as insect attractants. *Critical reviews in plant sciences*, 5(3):251–301, 1987.
- [101] **Millar, JG y JJ Sims**: Preparation, cleanup, and preliminary fractionation of extracts. *Methods in chemical ecology*, 1:1–37, 1998.

- [102] **Mothana**, RA, MS **Alsaid** y NM **Al-Musayeib**: Phytochemical analysis and in vitro antimicrobial and free-radical-scavenging activities of the essential oils from *Euryops arabicus* and *Laggera decurrens*. *Molecules*, 16(6):5149–5158, 2011.
- [103] **Müller**, G y Y **Schlein**: Plant tissues: the frugal diet of mosquitoes in adverse conditions. *Medical and veterinary entomology*, 19(4):413–422, 2005.
- [104] **Müller**, G y Y **Schlein**: Sugar questing mosquitoes in arid areas gather on scarce blossoms that can be used for control. *International journal for parasitology*, 36(10):1077–1080, 2006.
- [105] **Müller**, GC, JC **Beier**, SF **Traore**, MB **Toure**, MM **Traore**, S **Bah**, S **Doumbia** y Y **Schlein**: Field experiments of *Anopheles gambiae* attraction to local fruits/seedpods and flowering plants in Mali to optimize strategies for malaria vector control in Africa using attractive toxic sugar bait methods. *Malaria journal*, 9(1):262, 2010.
- [106] **Müller**, GC, A **Junnila** y Y **Schlein**: Effective control of adult *Culex pipiens* by spraying an attractive toxic sugar bait solution in the vegetation near larval habitats. *Journal of medical entomology*, 47(1):63–66, 2010.
- [107] **Müller**, GC, VD **Kravchenko** y Y **Schlein**: Decline of *Anopheles sergentii* and *Aedes caspius* populations following presentation of attractive toxic (spinosad) sugar bait stations in an oasis. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24(1):147–149, 2008.
- [108] **Nación Argentina.**, Ministerios de Salud de la: De la epidemia a la eficacia, 2010. Antecedentes, implementación y resultados del Plan Nacional de Prevención y Control del Dengue y la Fiebre Amarilla., 2010.
- [109] **Nayar**, JK y DM **Sauerman**: The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes Part 3. Utilization of blood and sugar for fecundity. *Journal of medical entomology*, 12(2):220–225, 1975.
- [110] **Nelson**, MJ: *Aedes aegypti*: biología y ecología. 1986.
- [111] **Nunes**, Rodrigo Dutra, Ricardo Lourenço **De Oliveira** y Glória Regina Cardoso **Braz**: A novel method for measuring fructose ingestion by mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 33(2):225–231, 2008.
- [112] **Nyaseembe**, Vincent O, Peter EA **Teal**, Wolfgang R **Mukabana**, James H **Tumlinson** y Baldwyn **Torto**: Behavioural response of the malaria vector *Anopheles gambiae* to host plant volatiles and synthetic blends. *Parasites & vectors*, 5(1):234, 2012.
- [113] **Oppen**, S, H **Masuh**, S **Licastro**, E **Zerba** y P **Gonzalez-Audino**: A floral-derived attractant for *Aedes aegypti* mosquitoes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155(3):184–192, 2015.

- [114] **Organization**, World Health *y cols.*: WHO position statement on integrated vector management, 2008. Geneva: World Health Organization.
- [115] **Otienoburu**, PE, B **Ebrahimi**, PL **Phelan** y WA **Foster**: Analysis and optimization of a synthetic milkweed floral attractant for mosquitoes. *Journal of chemical ecology*, 38(7):873–881, 2012.
- [116] **Otienoburu**, Philip E: Plant Semiochemicals as Mosquito Attractants. Tesis de Doctorado, The Ohio State University, 2011.
- [117] **Paré**, PW y JH **Tumlinson**: De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant physiology*, 114(4):1161–1167, 1997.
- [118] **Patterson**, RS, BJ **Smittle** y RT **DeNeve**: Feeding habits of male southern house mosquitoes on <sup>32</sup>P-labeled and unlabeled plants. *Journal of economic entomology*, 62(6):1455–1458, 1969.
- [119] **Paul**, A, LC **Harrington** y JG **Scott**: Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 43(1):55–60, 2006.
- [120] **Pichersky**, E y J **Gershenzon**: The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, 5(3):237–243, 2002.
- [121] **Pichersky**, E, JP **Noel** y N **Dudareva**: Biosynthesis of plant volatiles: nature’s diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762):808–811, 2006.
- [122] **Pope**, TW, R **Kissen**, M **Grant**, JA **Pickett**, JT **Rossiter** y G **Powell**: Comparative innate responses of the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae* to alkenyl glucosinolate derived isothiocyanates, nitriles, and epithionitriles. *Journal of chemical ecology*, 34(10):1302–1310, 2008.
- [123] **Pridgeon**, JW, RM **Pereira**, JJ **Becnel**, SA **Allan**, GG **Clark** y KJ **Lint-hicum**: Susceptibility of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles quadrimaculatus* to 19 pesticides with different modes of action. *Journal of medical entomology*, 45(1):82–87, 2008.
- [124] **Puri**, SN, MJ **Mendki**, D **Sukumaran**, K **Ganesan**, S **Prakash** y K **Sekhar**: Electroantennogram and behavioral responses of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) females to chemicals found in human skin emanations. *Journal of medical entomology*, 43(2):207–213, 2006.
- [125] **Radulović**, N, M **Mišić**, J **Aleksić**, D **Đoković**, R **Palić** y G **Stojanović**: Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. *Fitoterapia*, 78(7):565–570, 2007.
- [126] **Raguso**, RA: Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. *Cognitive ecology of pollination*. Cambridge University Press, Cambridge, páginas 83–105, 2001.

- [127] **Raguso**, RA: Why are some floral nectars scented? *Ecology*, 85(6):1486–1494, 2004.
- [128] **Rännbäck**, LM: Flower attractiveness and nectar accessibility for *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae) with implications for the control by *Trybliographa rapae* (Hymenoptera: Figitidae). Tesis de Doctorado, slu, 2008.
- [129] **Reinert**, JF, RE **Harbach** y IJ **Kitching**: Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 142(3):289–368, 2004.
- [130] **Reisen**, WK, RP **Meyer** y MM **Milby**: Patterns of fructose feeding by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 23(4):366–373, 1986.
- [131] **Riaz**, MA, A **Chandor-Proust**, C **Dauphin-Villemant**, R **Poupardin**, CM **Jones**, C **Strode**, M **Régent-Kloeckner**, JP **David** y S **Reynaud**: Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquatic Toxicology*, 126:326–337, 2013.
- [132] **Rodman**, JE y FS **Chew**: Phytochemical correlates of herbivory in a community of native and naturalized Cruciferae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8(1):43–50, 1980.
- [133] **Roe**, JH y RE **Dailey**: Determination of glycogen with the anthrone reagent. *Analytical biochemistry*, 15(2):245–250, 1966.
- [134] **Rohrig**, E, J **Sivinski**, P **Teal**, C **Stuhl** y M **Aluja**: A floral-derived compound attractive to the tephritid fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of chemical ecology*, 34(4):549–557, 2008.
- [135] **Rose**, RI: Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. *Emerging infectious diseases*, 7(1):17, 2001.
- [136] **Ruther**, J: Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 890(2):313–319, 2000.
- [137] **Salud**, Organizacion Panamericana de la, Pan American Sanitary **Bureau** y Pan American Sanitary Bureau **Staff**: Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Número 548. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 1995.
- [138] **Sandholm**, HA y RD **Price**: Field observations on the nectar feeding habits of some Minnesota mosquitoes. *Mosquito News*, 22:346–349, 1962.

- [139] **Sanz, C, JM Olias y AG Perez:** Aroma biochemistry of fruits and vegetables. En Proceedings-Phytochemical Society of Europe, volumen 41, páginas 125–156. Oxford University Press Inc., 1996.
- [140] **Schlein, Y y G Muller:** Assessment of plant tissue feeding by sand flies (Diptera: Psychodidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 32(6):882–887, 1995.
- [141] **Schneider, JMPH, D Droll y cols.:** A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences. *Division of Disease Prevention and Control*, 2001.
- [142] **Schoenmakers, PJ, JL Oomen, J Blomberg, W Genuit y G van Velzen:** Comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry for the characterization of complex hydrocarbon mixtures. *Journal of Chromatography A*, 892(1):29–46, 2000.
- [143] **Schreck, CE, DL Kline y DA Carlson:** Mosquito attraction to substances from the skin of different humans. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(3):406–410, 1990.
- [144] **Schwambach, SL y DG Peterson:** Reduction of stale flavor development in low-heat skim milk powder via epicatechin addition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(2):502–508, 2006.
- [145] **Scott, TW, A Naksathit, JF Day, P Kittayapong y JD Edman:** A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(2):235–239, 1997.
- [146] **Seccacini, E, H Masuh, SA Licastro y EN Zerba:** Laboratory and scaled up evaluation of cis-permethrin applied as a new ultra low volume formulation against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Acta tropica*, 97(1):1–4, 2006.
- [147] **Seijo, A, B Cernigoj y B Deodato:** Dengue importado del Paraguay a Buenos Aires. Estudio clínico y epidemiológico de 38 casos. *Medicina (Buenos Aires)*, 61(2):137–141, 2001.
- [148] **Shimizu, Y, Y Imayoshi, M Kato, K Maeda, H Iwabuchi y K Shimomura:** Volatiles from leaves of field-grown plants and shoot cultures of *Gynura bicolor* DC. *Flavour and fragrance journal*, 24(5):251–258, 2009.
- [149] **Slodowicz, MP, E Ceriani-Nakamurakare, C Carmarán y PA González-Audino:** Physicochemical Properties and Field Evaluation of Monolithic Wax Formulations for the Controlled Release of a Forest Pest Pheromone. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(2):348–359, 2017.

- [150] **Suriyaphan, O, MA Drake, XQ Chen y KR Cadwallader:** Characteristic aroma components of British Farmhouse Cheddar cheese. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(3):1382–1387, 2001.
- [151] **Thangstad, OP, P Winge, H Husebye y A Bones:** The myrosinase (thio-glucoside glucohydrolase) gene family in Brassicaceae. *Plant molecular biology*, 23(3):511–524, 1993.
- [152] **Tholl, D, W Boland, A Hansel, F Loreto, US Röse y JP Schnitzler:** Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45(4):540–560, 2006.
- [153] **Thorsteinson, AJ, RA Brust y cols.:** The influence of flower scents on aggregations of caged adult *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 22(4), 1962.
- [154] **Van Handel, E:** Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical biochemistry*, 11(2):256–265, 1965.
- [155] **Van Handel, E, JS Haeger y CW Hansen:** The sugars of some Florida nectars. *American Journal of Botany*, páginas 1030–1032, 1972.
- [156] **Vargo, AM y WA Foster:** Responsiveness of female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to flower extracts. *Journal of Medical Entomology*, 19(6):710–718, 1982.
- [157] **Vezzani, D y AE Carbajo:** *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1):66–74, 2008.
- [158] **Visser, JH:** Host odor perception in phytophagous insects. *Annual review of entomology*, 31(1):121–144, 1986.
- [159] **Vollhardt, KP y NE Schore:** Organic chemistry: structure and function. WH Freeman, 2007.
- [160] **Wensler, RJ:** The effect of odors on the behavior of adult *Aedes aegypti* and some factors limiting responsiveness. *Canadian journal of zoology*, 50(4):415–420, 1972.
- [161] **Wittie, J:** The effect of sugar and blood-host type on the survival, fecundity, biting frequency, and persistence of the eastern tree-hole mosquito, *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). Tesis de Doctorado, The Ohio State University, 2003.
- [162] **Wittstock, U, N Agerbirk, EJ Stauber, CE Olsen, M Hippler, T Mitchell-Olds, J Gershenzon y H Vogel:** Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14):4859–4864, 2004.

- [163] **Yang, CF, JN Hou, TH Chen y WJ Chen:** Discriminable roles of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in establishment of dengue outbreaks in Taiwan. *Acta tropica*, 130:17–23, 2014.
- [164] **Yee, WL y WA Foster:** Diel sugar-feeding and host-seeking rhythms in mosquitoes (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. *Journal of medical entomology*, 29(5):784–791, 1992.
- [165] **Yuval, B:** The other habit: sugar feeding by mosquitoes. *Bulletin of the Society of Vector Ecologists*, 17(2):150–156, 1992.
- [166] **Zheng, CH, KH Kim, TH Kim y HJ Lee:** Analysis and characterization of aroma-active compounds of *Schizandra chinensis* (omiija) leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1):161–166, 2005.
- [167] **Zheng, CH, TH Kim, KH Kim, YH Leem y HJ Lee:** Characterization of potent aroma compounds in *Chrysanthemum coronarium* L.(Garland) using aroma extract dilution analysis. *Flavour and Fragrance Journal*, 19(5):401–405, 2004.