

Tesis Doctoral

# Bioactividad y toxicidad de componentes de aceites esenciales vegetales, en *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) resistentes a insecticidas piretroides

Toloza, Ariel Ceferino

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Toloza, Ariel Ceferino. (2010). Bioactividad y toxicidad de componentes de aceites esenciales vegetales, en *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) resistentes a insecticidas piretroides. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Toloza, Ariel Ceferino. "Bioactividad y toxicidad de componentes de aceites esenciales vegetales, en *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) resistentes a insecticidas piretroides". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Bioactividad y toxicidad de componentes  
de aceites esenciales vegetales, en  
*Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera:  
Pediculidae) resistentes a insecticidas  
piretroides**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de las Ciencias Biológicas

**Lic. MSc. Ariel Ceferino Toloza**

Director: Dra. María Inés Picollo

Consejero de estudios: Dr. Esteban Hasson

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas  
(CIPEIN-CITEFA/CONICET)

Buenos Aires, 2010

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer de todo corazón a mi directora, la Dra. Mariné Picollo por confiar en mí, por su constante guía, apoyo, paciencia, enseñanza y ejemplo. Te merecés un “Ehh, Mariné!”.

Al Dr. Eduardo Zerba, por su manejo de todos los cipeinianos y por su constante predisposición a preguntas e ideas.

A mis compañeros del CIPEIN, por sus mates, y buena onda. Dentro de estos, quiero agradecer a quienes de una u otra manera han aportado a que esta tesis haya sido realizada de la mejor manera posible: a Gasty (por su constante inquietud académica y su búsqueda de mejorar), a Vale (por hacer el día a día agradable), a Toti (por los intercambios de información e ideas para mejorar los resultados, métodos de análisis y diversos contenidos), a Claudia y PSO (por la buena onda), a Anabella y Monica (y si, tienen que ir juntas..por esos ricos mates y charlas no científicas), a las lauritas (por tener siempre de reserva la indispensable yerba, pilar de todo trabajo), a Raúl (por la buena predisposición a consultas), a los químicos verdaderos del lab., a Emi (por los caramelos), a Gatticus (por su ayuda en el traslado de cosas a horas complicadas) y al siempre inquieto y conectado Gonza (indispensable para que la compu funcione ok).

A la ANPCyT y a CONICET, por haberme dado la posibilidad económica de realizar esta tesis.

A todas las autoridades de las escuelas y hogares de menores que nos abrieron las puertas y por supuesto a todos los chicos a los que les tiramos el pelo.

Al Dr. Julio Zygadlo por compartir información relacionada con la descripción taxonómica y la composición química de los aceites esenciales estudiados en esta tesis.

Ahora paso a la parte personal....uff, que difícil, porque uno SIEMPRE tiene en el camino a personas que están ahí para guiarlo, ayudarlo y protegerlo.....

A los mejores padres del mundo, Omar y Gladys.....por TODO (porque son tantas las cosas para agradecer).

A mi hermosa y amada Chiqui, Cynthia, la personita compañera del viaje de la vida que hace que todo sea más hermoso y fácil.....Te amooo!!!

A mi hermana Valeria, manita, por estar cerca....gracias!.

A mis abuelos José, Ramón y Nelly.....por su apoyo y amor.

A mis tíos Lili y Miguel, mis primas Naty, Lore y Gisel...por su ayuda.

A mis amigos de Plaza que a pesar de estar separados por muchos kilómetros seguimos en contacto....al Gato, puna, Truja y Néstor.

A mis amigos de acá.....Die, Adri, Tincho, Cuachai, Leo, Juaco, Eli, Pao, Ceci, Marian y Marie...con quienes hemos compartido mates, jodas, comidas, cursadas, alguna que otra cervecita y buenos momentos.

A los R+C..... por las buenas vibras.

*A mi hijo Bruno Iván “Preciosura”...por  
resplandecer y ser el centro de nuestra  
vida...*

...."Ríose Don Quijote de la interpretación que Sancho había dado al nombre y al cómputo y cuenta del cosmógrafo Ptolomeo, y díjole:

-Sabrás, Sancho, que los españoles y los que se embarcan Cádiz para ir a las Indias Orientales, una de las señales que tienen para entender que han pasado la línea equinoccial que te he dicho es que a todos los que van en el navío se les mueren los *piojos*, sin que se les quede ninguno, ni en todo el bajel le hallarán, si le pesan a oro; y así, puedes, Sancho, pasear una mano por un muslo, y si topares cosa viva, saldremos desta duda; y si no, pasado habemos"....

Don Quijote de La Mancha.....Miguel de Cervantes

## Indice

Resumen	13
Abstract	17
1. Introducción	21
1.1. Sistemática de los Phthiraptera	22
1.1.1. Evolución y sistemática	22
1.1.1.1. Fósiles	23
1.1.2. Anoplura	25
1.2. Evolución de los piojos	26
1.2.1. La anatomía de las dos especies de <i>Pediculus humanus (capitis y humanus)</i>	27
1.2.1.1. Anatomía externa (Tomado de Buxton 1946)	27
1.2.1.1.1. Diferencias sexuales	29
1.2.1.1.2. Órganos sensoriales	30
1.2.1.2. Anatomía interna	30
1.3. La biología de los <i>Pediculus</i>	31
1.3.1. Piojo de la cabeza ( <i>P.h.capitis</i> )	31
1.3.2. Piojo de la ropa ( <i>P.h.humanus</i> )	34
1.3.2.1. El rol como vector de enfermedades	35
1.3.3. Importancia médica del <i>P.h.capitis</i>	36
1.4. Métodos de control	38
1.4.1. Mecánico	38
1.4.2. Químico	38
1.4.2.1. Insecticidas neurotóxicos convencionales	38
1.4.2.1.1. Organoclorados	38
1.4.2.1.2. Piretroides	39
1.4.2.1.3. Organofosforados	39
1.4.2.1.4. Otros insecticidas	39

1.4.2.2. Insecticidas no neurotóxicos (no convencionales)	40
1.5. Resistencia a insecticidas	41
1.6. Insecticidas botánicos	42
1.6.1. Aceites esenciales	42
1.6.1.1. Composición química	45
1.6.1.1.1. Terpenos	45
1.6.1.2. Propiedades insecticidas	47
1.6.1.3. Actividad repelente	48
1.6.1.4. Sitio y modo de acción	49
1.6.1.4.1. Actividad insecticida	49
1.6.1.4. II. Actividad repelente	50
1.6.1.4.III. Metabólica	51
1.6.1.5. Relación estructura-actividad	52
1.6.1.6. Toxicidad de los aceites esenciales y sus componentes	53
1.7. Situación de la problemática de la pediculosis en Argentina	53
1.7.1. Epidemiología	54
1.7.2. Resistencia a Insecticidas	54
1.7.3. Alternativas para el control químico	55
<b>2. Objetivos de esta tesis</b>	<b>57</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>59</b>
3.1. Material Biológico	59
3.1.1. Recolección de piojos de la cabeza	59
3.2. Material Químico	60
3.2.1. Aceites esenciales	60
3.2.1.1. Identificación y caracterización química de los aceites esenciales colectados en los años 2003-04 y 2006-07	64
3.2.1.1.1. Composición química de los componentes mayoritarios	



colectados en los años 2003-2004	65
3.2.1.1.II. Composición química de los componentes mayoritarios	
colectados en los años 2006-2007	67
3.2.1.2. Análisis químico de los aceites extraídos de eucaliptos	73
3.2.1.2.1. Composición química de las cinco especies de <i>Eucalyptus</i> ,	
expresadas como porcentaje relativo del área	
total en los cromatogramas	75
3.2.2. Monoterpenoides	76
3.2.3. Determinación de resistencia	77
3.2.4. Estudio fumígeno	77
3.2.5. Estudios de repelencia	77
3.2.6. Medición enzimática de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)	77
3.2.6.1. Soluciones Stock	77
3.2.6.2. Homogenato de piojos	77
3.2.6.3. Medición de la actividad de oxidasas de función mixta (OFM)	78
3.3. Bioensayos	78
3.3.1. Epidemiología	78
3.3.2. Determinación de los niveles de resistencia a permetrina	79
3.3.3. Actividad fumígena	79
3.3.3.1. Actividad fumígena de aceites esenciales y/o monoterpenoides sobre los	
estadios postembrionarios (ninfas III y adultos)	79
3.3.3.2. Actividad fumígena de monoterpenoides sobre huevos de <i>P.h.capitis</i>	80
3.3.4. Actividad repelente	81
3.3.5. Medición enzimática de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE)	82
3.3.5.1. Síntomas de intoxicación	82
3.3.5.2. Ensayos de inhibición y actividad de acetilcolinesterasa	83
3.3.6. Rol de las oxidasas de función mixta (OFM) de los piojos	

<i>P.h.capitis</i> y <i>P.h.humanus</i> en la degradación de los compuestos	
1,8-cineol y diclorvos (DDVP)	85
3.4. Análisis estadístico	86
3.4.1. Epidemiología	86
3.4.2. Resistencia	86
3.4.3. Actividad fumígena	86
3.4.3.1. Estadios postembrionarios	86
3.4.3.2. Huevos	87
3.4.4. Actividad repelente	87
3.4.5. Medición de actividad de acetilcolinesterasa (AChE)	88
3.4.6. Rol de las oxidasas de función mixta de <i>P.h.capitis</i> y <i>P.h.humanus</i> en la degradación de los insecticidas 1,8-cineol y diclorvos (DDVP)	88
<b>4. Resultados y discusiones parciales</b>	<b>90</b>
4.1. Epidemiología	90
4.1.1. Resultados	90
4.1.2. Discusión	92
4.2. Resistencia a permetrina	95
4.2.1. Resultados	95
4.2.2. Discusión	96
4.3. Actividad fumígena	99
4.3.1. Efectividad biológica de los aceites esenciales sobre poblaciones de piojos con grados de resistencia diferencial	99
4.3.1.1. Resultados	99
4.3.1.2. Discusión	100
4.3.2. Efectividad de los vapores de aceites esenciales y componentes sobre estadios postembrionarios	101
4.3.2.1. Actividad biológica de los aceites esenciales colectados en los años	

2003-2004 sobre <i>P.h.capitis</i>	101
4.3.2.1.I. Resultados	101
4.3.2.1.II. Discusión	104
4.3.2.2. Actividad biológica de los monoterpenoides sobre <i>P.h.capitis</i>	106
4.3.2.2.I. Resultados	106
4.3.2.2.II. Discusión	111
4.3.2.3. Actividad biológica de los aceites esenciales colectados en los años	
2006-2007 sobre <i>P.h.capitis</i>	113
4.3.2.3.I. Resultados	113
4.3.2.3.II. Discusión	116
4.3.2.4. Actividad biológica de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i>	
sobre <i>P.h.capitis</i>	120
4.3.2.4.I. Resultados y discusión	120
4.3.3. Efectividad de los vapores de los monoterpenoides sobre la eclosión	
de los huevos de <i>P.h.capitis</i>	126
4.3.3.1. Resultados	126
4.3.3.2. Discusión	128
4.4. Actividad repelente	130
4.4.1. Actividad repelente de los aceites esenciales colectados en los	
años 2003-04 y de sus componentes	130
4.4.1.1. Resultados	130
4.4.1.2. Discusión	132
4.4.2. Actividad repelente de los aceites esenciales de eucaliptos	133
4.4.2.1. Resultados	133
4.4.2.2. Discusión	135
4.4.3. El efecto repelente de los monoterpenoides sobre <i>P.h.capitis</i>	136
4.4.3.1. Resultados	136

4.4.3.2. Discusión	138
4.4.4. Repelencia de Lactonas	143
4.4.4.1. Resultados	143
4.4.4.2. Discusión	144
4.5. Medición de la actividad de acetilcolinesterasa de los monoterpenoides	145
4.5.1. Resultados y discusión	145
4.5.1.1 Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa de anguila eléctrica	145
4.5.1.2. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa obtenida de homogenato de <i>P.h.capitis</i>	147
4.5.1.3. Secuencia de intoxicación de los piojos afectados a los vapores de 1,8-cineol y DDVP	149
4.5.1.4. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa obtenida de homogenato de piojos previamente expuestos a los vapores de 1,8-cineol y DDVP	152
4.5.1.4.1. Resultados y discusión	152
4.6. Rol de las oxidasas de función mixta de piojos en la degradación del monoterpeno 1,8-cineol y del organofosforado DDVP <i>in vivo</i>	155
4.6.1. Resultados y discusión	155
<b>5. Discusión y Conclusiones generales</b>	<b>163</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>165</b>
<b>7. Apéndice</b>	<b>184</b>
7.1 Trabajos publicados en revistas internaciones relacionados con esta tesis	184

# Resumen y Abstract

## Resumen

### **Bioactividad y toxicidad de componentes de aceites esenciales vegetales, en *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) resistentes a insecticidas piretroides**

Los piojos de la cabeza, *Pediculus humanus capitis* De Geer (Phthiraptera: Pediculidae) son ectoparásitos obligados de humanos. La infestación con piojos produce irritación de la piel, prurito y riesgo de infecciones secundarias como consecuencia del rascado. El control químico de esta plaga ha sido mediante el uso de insecticidas clorados (DDT y lindano), organofosforados (malatión), carbamatos (carbaril), piretrinas naturales y piretroides (deltametrina, permetrina, d-fenotrina). Actualmente el uso de estos insecticidas está limitado por el desarrollo de poblaciones de piojos resistentes. Una alternativa a los insecticidas convencionales son los compuestos botánicos tales como los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas y sus componentes, los cuales han despertado alto interés por su actividad adulticida, ovicida y repelente en varios insectos plaga. Los objetivos planteados en esta tesis fueron: a) establecer la actividad biológica de los vapores de aceites esenciales y de sus componentes provenientes de plantas autóctonas y exóticas que crecen en Argentina sobre poblaciones de huevos y adultos de piojos resistentes a piretroides; b) analizar el efecto repelente de los mencionados aceites; y c) estudiar los mecanismos involucrados en el modo de acción y el rol de las enzimas monooxigenasas en la toxicidad de los monoterpenoides sobre piojos de la cabeza.

Los piojos utilizados se recolectaron mediante el uso de peine fino de cabezas de niños de entre 3 y 13 años provenientes de escuelas primarias de Buenos Aires. Los 49 aceites esenciales fueron colectados en diversas regiones de Argentina durante la primavera de los años 2003-2004 y 2006-2007. Los 26 monoterpenoides estudiados en esta tesis fueron de origen comercial. Previo al estudio del efecto insecticida de los AEs, se determinó el grado de pediculosis (presencia de al menos una forma viable de piojo) y los niveles de resistencia a permetrina de las poblaciones a estudiar. Para el estudio de la fase vapor de los AEs y de los monoterpenoides sobre las liendres y sobre los adultos, se empleó una cámara cerrada que permitió la liberación progresiva del aceite o componente puro. En el caso de las formas eclosionadas, se midió el volteo de los piojos cada 5 min durante 1 h, y luego se calculó el tiempo de volteo necesario para afectar el 50% de los piojos ( $TV_{50}$ ). Con respecto a las liendres, las mismas fueron expuestas durante 24 hs al vapor de las sustancias en estudio y se registró el porcentaje de mortalidad (%). La actividad repelente de los AEs y de los monoterpenoides fue medida sobre una arena experimental concéntrica

diseñada para este estudio. Se midió el porcentaje de insectos que estaban en el área tratada y control, y se calculó el índice de repelencia (IR). Con respecto a la medición enzimática de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE), la misma fue determinada por un método espectrofotométrico y cinético. En primer lugar se estudió el efecto de los monoterpenoides sobre la inhibición de la AChE de anguila eléctrica. Luego se calculó la concentración de inhibición al 50% (CI<sub>50</sub>) del compuesto más efectivo usando las enzimas de AChEs de anguila eléctrica y la extraída a partir de homogenatos de piojos. Posteriormente, se expusieron piojos a los vapores del compuesto más efectivo y a los de un compuesto organofosforado volátil (diclorvos-DDVP-) del que se conoce su gran poder inhibitorio sobre la actividad de acetilcolinesterasa. Para analizar el posible rol de las enzimas monooxigenasas en la degradación de monoterpenoides, se topicaron las formas post-embrionarias de piojos con diferentes concentraciones del butóxido de piperonilo (PBO)- un conocido inhibidor de oxidasas-, y luego los piojos fueron expuestos a los vapores del monoterpenoide más efectivo y del compuesto organofosforado diclorvos-DDVP-.

Los resultados demostraron un promedio de 29,7% de los chicos analizados tenían piojos, siendo encontrados más frecuentemente en las niñas que en los varones. Los grados de resistencia (GRs) de las poblaciones estudiadas de *P.h.capitis* variaron desde un 28,57 hasta un 71,42 (en comparación con la cepa de referencia susceptible de *P.h.humanus*). No se encontraron diferencias significativas en los valores de TV<sub>50</sub> de las poblaciones con grados de resistencia diferentes. Esto sugiere que los mecanismos de resistencia a piretroides no afectan de manera prioritaria o directa a la toxicidad a los vapores de AEs y a sus componentes. En relación a al efecto fumígeno de los AEs sobre formas eclosionadas hay que mencionar que 24 de los 49 aceites estudiados (49%) produjeron un efecto tóxico sobre los piojos resistentes a permetrina. De estos aceites los más efectivos fueron aquellos obtenidos de plantas aromáticas autóctonas tales como *Cinnamomun porphyrium*, *Myrcianthes cisplatensis*, *Aloysia citriodora* (quimiotipo 2), *Myrcianthes pseudomato*, con valores respectivos de TV<sub>50</sub> de 1,12; 1,29; 3,02 y 4,09 m. Estos aceites fueron entre 9 y 20 veces más tóxicos que los aceites que los precedieron. En relación a los compuestos monoterpenoides con mayor actividad fumígena sobre piojos, tenemos que destacar que el 1,8-cineol y el anisol fueron los más efectivos, con TV<sub>50</sub>s de 11,1 y 12,7m. Luego estuvieron los compuestos limoneno, 1S-(-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, (+)- $\alpha$ -pineno, linalol, mentona,  $\alpha$ -pineno, pulegona,  $\beta$ -mirceno y alcohol bencílico. El TV<sub>50</sub> del control positivo DDVP (un conocido fumigante) fue de 40,15 m y fue menos efectivo significativamente que los compuestos más efectivos, tales como el 1,8-cineol, el anisol y el limoneno. Se halló una correlación significativa entre los valores de TV<sub>50</sub> y la presión de vapor de estos monoterpenoides, indicando que las sustancias más efectivas son las que

poseen mayor presión de vapor. Cuando se profundizó en el estudio de aceites esenciales modificados genéticamente (híbridos de Eucaliptos), se halló que los híbridos *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus tereticornis* produjeron mayor volteo ( $TV_{50}$  = 13,6 y 12,9m) que sus formas parentales con  $TV_{50}$ s de 25,6; 31,3 y 35m. Además, se halló una correlación significativa entre el porcentaje de 1,8-cineol y el  $TV_{50}$  de los mismos. Con respecto a la toxicidad de los monoterpenoides sobre los embriones hay que destacar que los compuestos más efectivos y de manera similar fueron el 1,8-cineol, anisol, el  $\alpha$ -pineno, el  $\beta$ -pineno, el (+)- $\alpha$ -pineno, el 1S-(-)-  $\alpha$ -pineno, el anetol, la carvona, el limoneno y el linalol. Esto es similar a lo observado para formas eclosionadas.

En relación con la repelencia, el aceite esencial que produjo mayor repelencia sobre piojos de la cabeza fue el obtenido de la planta exótica *Mentha pulegium* y no difirió significativamente del control positivo piperonal. El compuesto con mayor efectividad repelente fue el alcohol bencílico con un índice de repelencia promedio de 57,74%, seguido de (-)-mentol, mentona y (+)-mentol con valores de IR respectivos de 53,56; 39,23 y 36,45%. Las lactonas estudiadas tuvieron efecto repelente en valores similares al control positivo.

Con respecto a la actividad enzimática de acetilcolinesterasa medida sobre anguila eléctrica, se encontró diferencias significativas entre los 20 monoterpenoides, siendo el 1,8-cineol el que mayor inhibición produjo con un valor de  $CI_{50}$  =  $6 \times 10^{-3}$ M. EL 1,8-cineol produjo inhibición de AChE obtenida de piojos, con una  $CI_{50}$  =  $7,7 \times 10^{-2}$ M. Cuando se estudio la actividad sintomatológica de intoxicación del 1,8-cineol y del organofosforado DDVP, y se procedió a medir la inhibición de la AChE de piojos, se encontró que el 13% de la AChE estaba inhibida por el 1,8-cineol, mientras que el 80% de la enzima fue inhibida por el DDVP. Estos resultados demostraron relación entre la toxicidad del monoterpeno 1,8-cineol y la inhibición de la actividad AChE de piojos, y sugieren que habría otros mecanismos asociados a la sintomatología de volteo de piojos.

El análisis del rol de las oxidasas de función mixta mostró una relación creciente entre la dosis subletal topicada con butóxido de piperonilo (PBO) y el  $TV_{50}$  de los piojos expuestos a los vapores del 1,8-cineol y del DDVP. Esto indica la importancia de este complejo enzimático en la degradación del monoterpeno 1,8-cineol.

Para finalizar, hay que resaltar que es la primera vez que se realiza un estudio de toxicidad y repelencia de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas de Argentina (y de sus componentes), sobre piojos resistentes a permetrina.



Adicionalmente estos resultados aportan información para avanzar en el conocimiento del efecto de los monoterpenoides sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, y del rol de las enzimas monooxigenasas en la degradación de dichos compuestos.

Palabras Clave: *Pediculus humanus capitis*, aceites esenciales, monoterpenoides, actividad fumígena, repelencia, modo de acción, Argentina

## Abstract

### Bioactivity and Toxicity of essential oils and their compounds against pyrethroid-resistant *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae)

The human head louse, *Pediculus humanus capitis* De Geer (Phthiraptera: Pediculidae) is an obligate ectoparasite of humans. The infestation with head lice is unpleasant and may cause itching, prurito and secondary skin infections due to scratching of irritated scalp. Chemical control of head lice has been based on a variety of insecticides, such as organochlorides (DDT and lindane), organophosphates (malathion), carbamaes (carbaryl), natural pyrethrins and pyrethroids (deltamethrin, permethrin, d-phenothrin). The overuse of these insecticides is limited due to the development of resistant head lice populations. Alternatives to conventional insecticides might be found in aromatic plants such as essential oils (EOs) and their monoterpenoids. Some of these natural products are repellents, adulticides and ovicidal against a wide variety of pests. The aims of the present thesis were: a) to establish the biological activity of the vapour phase of the essential oils and their main compounds obtained from aromatic plants of Argentina against eggs and adults of permethrin-resistant head lice; b) to analyzed the repellent activity of the essential oils; and c) to study the mechanisms involved in the mode of action and the role of the monooxygenases in the toxicity of the monoterpenoids against head lice.

Head lice were collected from from heads of infested children 3-13 yr old, using a fine toothed antilouse comb. Fourty nine essential oils were collected from in the spring season of 2003-2004 and 2006-2007 from different regions of Argentina. Twenty six monoterpenoids were purchased from Aldrich. Prior to the study of the insecticide effect of the essential oils, pediculosis percentage (evidence of at least one living head lice) was calculated, and the permethrin resistance levels of the studied populations. An enclosed chamber was employed to study the fumigant activity of EOs and their components against eggs and adults of head lice. This method allowed creating a saturated micro-atmosphere as a result of the evaporation of the essential or component. Adults and nymphs III were observed for evidence of knockdown every 5 min for 60 min. Then, time in minutes to knockdown of 50% of each unit's subjects ( $KT_{50}$ ). With respect to the eggs, each set was exposed to the substances for 24 h and mortality data was recorded. Repellency of EOs and components was estimated in an experimental arena with two areas. The number of lice was recorded every 5 min and each experiment was completed within 1 h. Then, a repellency index (RI) was calculated. The inhibition of the acetylcholinesterase activity (AChE) was

calculated by a spectrophotometric and kinetic method. First, the inhibition of the monoterpenoids against AChE from electric eel was measured. Then, the inhibition concentration at 50% ( $IC_{50}$ ) of the most effective monoterpenoid was recorded from either AChE from electric eel or homogenate of lice. Finally, head lice were exposed to the vapours of the most effective compound and to the organophosphate dichlorvos-DDVP-, a well known AChE inhibitor. To study the role of the monooxygenases in monoterpenoid degradation, adult insects were topicated at different piperonil butoxide (PBO) concentrations and then exposed to the vapours of the most effective monoterpenoid and DDVP.

The results showed that, in average, 29.7% of the analyzed children had lice, and with the girls being more infected than boys. The resistant ratios (RRs) of the studied populations of *P.h.capitis* varied from 28.57% to 71.42% (in comparison with the laboratory susceptible strain of *P.h.humanus*). There were no significant differences among the  $KT_{50}$  values of the different permethrin-resistant populations. These indicate that pyrethroid-resistance mechanisms were not affected by the toxicity of the EOs and monoterpenoids. About the fumigant activity of the EOs against postembryonic insects, 24 of the 49 studied (49%) oils were effective against permethrin-resistant head lice. Of these EOs, the most effective were from the native aromatic plants like *Cinnamomum porphyrium*, *Myrcianthes cisplatensis*, *Aloysia citriodora* (chemotype 2), *Myrcianthes pseudomato*,  $KT_{50}$  values of 1.12, 1.29, 3.02 and 4.09 min; respectively. The mentioned oils were 9- to 20-fold more toxic than the studied EOs. The most effective monoterpenoids were 1,8-cineole and anisole, with values of 11.1 and 12.7m; respectively. They were followed by limonene, 1S(-)- $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, (+)- $\alpha$ -pinene, linalool, mentone,  $\alpha$ -pinene, pulegone,  $\beta$ -myrcene and benzyl alcohol. The  $KT_{50}$  value of the positive control DDVP was 40.15 min, and was less effective than the three more toxic compounds like 1,8-cineole, anisole and limonene. A positive relationship was found between the  $KT_{50}$  values of the effective compounds and corresponding vapour pressures, suggesting that the more volatile the compounds, the more effective it was as a fumigant. With respect to the study of the genetically modified oils (eucalypt hybrids), it is important to show that fumigant activity of the hybrids *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus tereticornis* was higher ( $KT_{50}$ = 13.6 and 12.9 min; respectively) than that for pure species ( $KT_{50}$ = 25.6, 31.3 and 35 min). Moreover, a significant correlation was found between  $KT_{50}$  data and % of 1,8-cineole in the essential oils. The toxicity of the eggs revealed that the most effective monoterpenoids were anisole,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, (+)- $\alpha$ -pinene, 1S(-)- $\alpha$ -pinene, anethole, carvone, limonene, linalool and 1,8-cineole. It was in accordance with the pattern found in adult head lice.

The most repellent essential oil was from the exotic *Mentha pulegium* and it was not significantly more repellent than the positive control piperonal. The most repellent monoterpene was benzyl alcohol with a RI= 57.74%, followed by (-) menthol, mentone y (+)-menthol with RI values of 53.56, 39.23 and 36.45%; respectively. The studied lactones possessed similar repellent activity than the positive control.

Concerning the enzymatic activity of acetylcholinesterase from electric eel, there were significant differences among the 20 studied monoterpenoids, with the 1,8-cineole as the most inhibitor with a  $IC_{50}=6 \times 10^{-3} M$ . Moreover, 1,8-cineole was an inhibitor of the AChE obtained from homogenate of head lice with a  $IC=7.7 \times 10^{-2} M$ . The study of the sintomatology of intoxication of the 1,8-cineole and DDVP, followed by the analyses of the inhibitory activity of AChE of lice revealed that 1,8-cineole inhibited 13% of the AChE while DDVP inhibited 80%. The analysis of OFM showed a relationship between the sublethal dose of PBO and the  $KT_{50}$  of the exposed head lice to the vapours of 1,8-cineole and DDVP.

Finally, it is important to note that it is the first study of toxicity and repellency of essential oils and their compounds obtained from aromatic plants of Argentina against permethrin-resistant head lice. Additionally, the results obtained in the present thesis bring new insight into the knowledge of the mode of action of the monoterpenoids over the acetylcholinesterase activity and the role of the monooxygenases in the degradation of the mentioned components.

Keywords: *Pediculus humanus capitis*, essential oils, monoerpenoids, fumigant activity, repellency, modo of action, Argentina

# INTRODUCCIÓN

## 1. Introducción

Uno de los primeros testigos de los que tal vez se tenga registro relacionado con el interés científico de los piojos de animales fue Aristóteles (384-322 AC), a quien se le atribuye ser el padre de la clasificación biológica. Pasemos a su relato:

“Aquellos insectos que viven en los jugos succionados de la carne, sin embargo ellos no se alimentan directamente de la carne, tales como los piojos.....se aparean y subsecuentemente producen las llamadas liendres, las cuales sin embargo llevan a nada. Su reproducción ocurre así:...Los piojos crecen de la carne. En donde ellos quieren multiplicarse, se producen pequeñas úlceras sin pus. Cuando éstas son pinchadas aparecen los piojos; [...] en determinadas enfermedades ellos son vistos en gran número. Una clase de piojo llamado comúnmente “el salvaje” es más duro que los otros y es difícil de sacar del cuerpo. Los piojos son muy comunes en las cabezas de los chicos, y en menor cantidad en los hombres; ellos son más frecuentemente encontrados en el sexo femenino que en el masculino. La gente que frecuentemente tiene piojos sufre menos de los dolores de cabeza. Los piojos son también encontrados en otros animales, llamados aves, tales como el faisán, los cuales si no se sacuden en el polvo, son matados por los piojos. Este es el caso para otras aves cuyas plumas tienen un asta y también en otros animales. Solamente los burros no tienen ni piojos ni garrapatas, mientras que el buey tiene ambos; la cabra tiene solamente garrapatas, y solamente los cerdos tienen piojos grandes y duros. Sobre los perros se encuentra el piojo del perro, llamado “el destructor de perros” kynoraistes. Todas las clases de piojos se multiplican en los animales sobre los que viven, y más aún cuando cambian el lugar donde toman agua donde frecuentemente se bañan”. (Aristóteles, tomado de Mey 2003).

### *Con respecto a los *Pediculus humanus capitis*.....*

Los piojos han estado asociados con los humanos desde los tiempos de nuestros ancestros pre homínidos, y se dispersaron por el mundo a través de los primeros migrantes humanos (Reed et al. 2004). El piojo de la cabeza, científicamente denominado *Pediculus humanus capitis*, es probablemente el ectoparásito permanente obligado más antiguo de los seres humanos del género *Homo*. Se han encontrado liendres adheridas a pelos de momias provenientes de Brasil con una antigüedad de aproximadamente 10.000 años y de restos de pelos provenientes de un individuo que vivió hace 9.000 años atrás en una cueva de Nahal Hemar cerca del mar muerto (Araujo et al. 2000; Zias y Mumcuoglu 1991). Los piojos han parasitado a los antiguos habitantes del medio este, tales como los sumerios, acadianos, egipcios y hebreos. Se han encontrado ejemplares

de piojos de la cabeza y liendres en el pelo de momias egipcias, como así también peines de dientes finos provenientes de las familias reales de Egipto empleados para remover piojos, con una antigüedad estimada de 1500 años AP (Ewing 1924; Kamal 1967). En Asia, se encontró la momia denominada como “La bella de Loulan”, de 1,55 mts de altura cuya cabellera estaba repleta de piojos y liendres. Esta momia de 3800 años de antigüedad fue encontrada en pleno desierto Chino en la zona de Loulan, ciudad antigua en Xinjiang del siglo II AP, e importante poblado en la ruta de la Seda. En Europa, diversos ejemplares de piojos de la cabeza fueron encontrados por Bresciani et al. (1989) en el pelo de momias de vikingos con una antigüedad de 1475 años atrás. En América del Norte, liendres y piojos fueron encontrados en momias procedentes de indios prehistóricos procedentes del sudoeste americano, como así también en sitios de cazadores-recolectores en USA y en Méjico central. Los habitantes de estas áreas controlaban los piojos mediante la ingesta de los mismos extraídos de los cabellos de familiares cercanos (un método muy común empleado hoy en día en algunas culturas tribales), ya que se han encontrado restos de piojos adultos en las matrices de coprolitos. En América del Sur, fueron encontrados piojos en una momia de una princesa Inca quien vivió hace aproximadamente 500 años atrás, y de una momia perteneciente a los indios pre-colombinos del Perú (Raoult et al. 2008). Además, fueron encontrados piojos en algunas muestras de cabello tomadas de momias de Camarones, Chile con una antigüedad estimada entre 1900-1500 AP.

La mayoría de los peines sacapiojos encontrados en los sitios arqueológicos del desierto de Judea, Masada y Qumram eran de doble cara, con una de ellas para abrir los nudos, mientras que los dientes finos de la segunda cara eran usados para remover piojos y liendres. Estos estaban fabricados en madera, aunque algunos eran de marfil o de hueso (Mumcuoglu 2008).

## **1.1. Sistemática de los Phthiraptera**

### **1.1.1. Evolución y sistemática**

Se acepta generalmente que los piojos (Phthiraptera) derivan del orden de insectos Psocoptera, llamados generalmente piojos de los libros o de bibliotecas. Todos los Phthiraptera (piojos verdaderos) son ápteros, aplanados dorso-ventralmente, con ojos ausentes o muy reducidos, con antenas reducidas entre los segmentos tres y cinco, con partes bucales altamente modificadas, y un ovipositor distintivo. Los huevos de los piojos (liendres) son generalmente grandes en comparación con el cuerpo de los adultos, son pocos en número (una hembra puede poner entre 1-10 huevos por día) y están adheridos al pelo o a las plumas de sus huéspedes mediante la secreción de una glándula accesoria que

“cementa” a las mismas a sus huéspedes. Los huevos poseen una tapa denominada opérculo y algunos presentan ornamentos en su forma. Entre todos los artrópodos ectoparásitos de vertebrados, los piojos son los únicos -con excepción de los ácaros- que viven todo su ciclo de vida exclusivamente sobre sus huéspedes. Como resultado de esta dependencia extrema existe una gran especificidad de huésped. Todo esto hace que los piojos sean modelos de estudios evolutivos de coespeciación dada por la especificidad de huésped mencionada. Dependiendo del grupo de piojos al que nos refiramos, los piojos se alimentan de la queratina en los pelos o en las plumas, de secreciones aceitosas o de sangre. La mayoría de los grupos de aves son parasitadas, y entre los mamíferos los únicos que no se ven afectados por éstos son los monotremas (ornitorrinco, echidnos australianos), armadillos, cetáceos (ballenas, delfines), sirénidos, y murciélagos. Se cree que los monotremas son un grupo ancestral que nunca adquirió piojos, a pesar de ser menos antiguos que las aves. Por otro lado, la ausencia de piojos en armadillos, osos hormigueros y murciélagos permanece sin explicación (Grimaldi & Engel 2005).

#### 1.1.1.1. Fósiles

Debido a que los piojos se encuentran altamente asociados a los huéspedes que parasitan, la preservación de los mismos en material rocoso o fosilización depende de su hospedador. Se considera que el período de origen de los piojos fue hace 66- 320 millones de años (Ma), a fines del Cretácico. Con la excepción de un huevo de piojo hallado en un pedazo de ámbar proveniente del Báltico (que carece de valor taxonómico) y de un artrópodo llamado *Saurodectes vrsanskyi* de forma parecida a un piojo proveniente de una formación de Zaza (Cretácico temprano, 130 Ma), de Baissa, Rusia Central; no existen fósiles que puedan servir para tener información directa acerca de la evolución de los piojos. El único fósil definitivo de piojo es *Megamenopon rasnitsyni*, un Amblycera perteneciente a la familia Menoponidae de una formación del Eoceno (44,3 Ma), hallado en Eckfeld, Alemania (Wappler et al. 2004). Este material es tan rico en información ya que no solo se encuentra bien conservado, sino que además se puede apreciar las bárbulas de las plumas preservadas en el intestino de este artrópodo, una prueba definitiva de que fue un piojo masticador (**Figura 1**).





**Figura 1.** Exoesqueleto completo de *Megamenopon rasnitsyni*. Barra de escala: 2mm. (Gentileza de Vince Smith).

El orden Phthiraptera fue tradicionalmente clasificado en dos subórdenes, los piojos masticados o Mallophaga, y los piojos chupadores o Anoplura. A pesar de que esta clasificación es sustentada por algunos (Kim & Ludwig 1978; Kim 1985), solo el grupo de los Anoplura es monofilético. Los piojos mordedores pertenecen en la actualidad a tres subórdenes: Amblycera, Ischnocera y Rhynchophthirina. Esto está avalado por trabajos morfológicos, y más recientemente por trabajos sistemáticos de Lyal (1985), además de estar sustentados por análisis moleculares (Johnson & Whiting 2002; Barker et al. 2003). Otros estudios moleculares no resuelven (Cruikshank et al. 2001) la monofilia o las relaciones entre la mayoría de los subórdenes-aún de los altamente modificados Anoplura. Esto se debe quizás, en parte, a que los autores usaron solo las secuencias mínimas de ADN (347 pb del gen alfa EF-1). El estudio a nivel de taxón de Johnson & Whiting (2002) involucró solo 21 géneros, versus los 70 géneros empleados por Cruikshank et al. (2001). Sin embargo, ambos trabajos contemplaron todos los subórdenes y el primero de los trabajos analizó secuencias en casi un orden más de magnitud: 2130 pb de un gen mitocondrial y de dos genes nucleares (COI, alfa EF-1 y 18s).

Todas las especies de Anoplura y Rhynchophthirina son exclusivas de mamíferos, mientras que algunas especies de Ischnocera y Amblycera parasitan tanto aves como mamíferos. Los dos primeros subórdenes comparten muchos rasgos morfológicos derivados y comparten un ancestro común con Ischnocera, y todos ellos forman un taxón hermano del suborden más basal- los Amblycera. Hasta el año 1999 se han descrito 4384 especies válidas de piojos masticadores pertenecientes a 3910 diferentes huéspedes (3508 aves y 402 mamíferos).

### 1.1.2. Anoplura

El suborden Anoplura presenta modificaciones en la cabeza y en las partes bucales (Hirsch 1986), y todas las 550 especies válidas (distribuidas en 15 familias) se alimentan sobre 812 especies diferentes de mamíferos (Smith 2004; Grimaldi & Engel 2005).

En términos técnicos los Anoplura pueden ser definidos de acuerdo a la clasificación de Kim & Ludwig (1978):

*Insectos* pequeños, sin alas y con cuerpo aplanado dorso ventralmente. El tamaño de los mismos varía desde 0,5 a 8 mm. La *cabeza* es cónica, y las antenas son pequeñas, filiformes y usualmente de 5 segmentos (aunque pueden tener entre 3 y 4 segmentos). Los segmentos cuarto y quinto poseen un sensilio coeloconicum (ausente cuando estos segmentos no están), el quinto segmento posee un par de órganos del poro y un número de órganos peg ubicados distalmente. Los ojos están reducidos o ausentes y los ocelos ausentes. Las partes bucales están altamente modificadas para penetrar o succionar sangre de sus huéspedes, y se encuentran retraídas cuando no están en uso. La proboscis es pequeña, en forma de punta, compuesta de dos estiletes de origen hipofaríngeo y labial retraídos dentro de la bolsa trófica. El *tórax* es relativamente pequeño y fusionado, y presenta un par de espiráculos en el mesotórax. El notum está reducido a un área media estrecha, generalmente esclerotizado aunque a veces tiene un apodema notal que forma una cavidad media. El dorso está formado por componentes pleurales o subcoxales. El ventro es generalmente membranoso y con una placa esternal media. Los palpos están ausentes y los segmentos torácicos están fusionados entre sí y sin el último rudimento de alas. Las *patas* son cortas, fuertemente adaptadas para trepar al pelo de sus hospedadores, con leves modificaciones de la tibia y el tarso para un agarre efectivo. Los tarsos no están segmentados y tienen una fuerte garra, el trocánter presenta cinco sensilias campaniformes, dos anteriores y tres posteriores.

El *abdomen* carece de cerco y presenta nueve segmentos visibles. El tergo y la esterna están débilmente esclerotizados, los paratergitos tienen un gran desarrollo, y hay seis pares de espiráculos abiertos lateralmente entre los segmentos 3-8. La genitalia es externa y bien desarrollada en ambos sexos: la hembra tiene dos pares de gonoporos, uno en el segmento 8 con un cluster de setas y otro en el segmento 9 con pequeños lóbulos. La placa esternal del segmento 8 posee forma lobulada y forma una placa genital esclerotizada; la genitalia masculina posee un apodema basal, un par de parámetros, el aedeo con gonoporo dorsal y un pseudopene.

La *anatomía interna*: El canal alimenticio presenta un cibario modificado y una faringe que forman una poderosa bomba succionadora provista de músculos dilatadores. El estómago es grande con caeca en su extremo final, y el intestino grueso tiene una moderada convolución recibida de los túbulos de Malpighi. El recto aumenta anteriormente y con seis papilas esclerotizadas circulares. Poseen vesículas dorsales grandes y una aorta con un corazón bulboso localizado en los segmentos 7 y 8. El sistema nervioso está muy concentrado, los ganglios se agrupan en racimos de tejido conectivo, uno en el tórax y otro conteniendo los ganglios meta torácicos y abdominales.

Los *órganos reproductivos femeninos* poseen cinco ovarias politróficas por ovario y un par de glándulas accesorias. La espermateca no siempre está presente o se puede distinguir. El *sistema reproductivo masculino* posee un par de testículos compactos bilobulados y vasos deferentes que salen de la porción opuesta con presión de cada testículo. El micetoma es variable, sobre o dentro del intestino medio. Los huevos son estrechos, ovalados con opérculo y micrópilos unidos a su huésped con cemento. Después de la eclosión, los mismos atraviesan un proceso de metamorfosis simple con tres estadios ninfales. Bajo condiciones normales, el desarrollo de las ninfas tarda entre 2 a 3 semanas. Los instares o ninfas difieren entre ellos por su tamaño o la proporción de las partes, en el grado de esclerotización y en el desarrollo del aparato reproductivo. Cada estadio posee generalmente una distintiva densidad setal y quetotaxia.

## 1.2. Evolución de los piojos

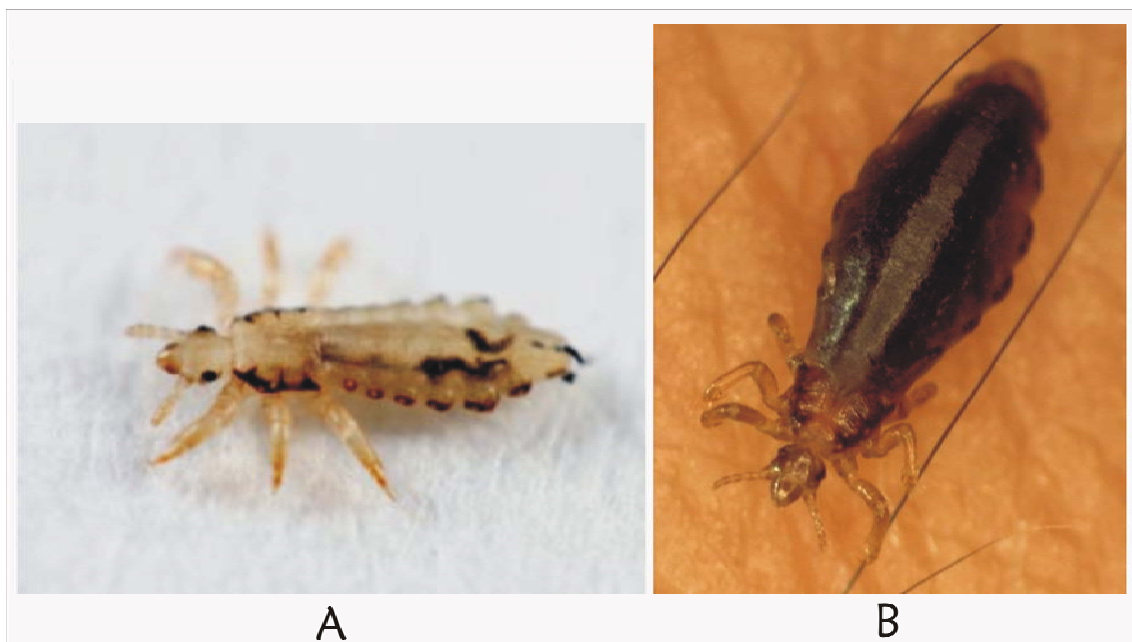
El estilo de vida parasítico de los piojos sobre los primates se remonta desde hace aproximadamente 25 millones de años, los cuales han coevolucionado con sus hospedadores. Los humanos (*Homo sapiens*) son parasitados por dos géneros de piojos chupadores, uno compartido con chimpancés (*Pan spp.*) y el otro compartido con gorilas (*Gorilla gorilla*). Los piojos de los chimpancés y los de los humanos comparten un ancestro común hace seis millones de años, una divergencia que es contemporánea con sus huéspedes. Los piojos humanos de la cabeza y del cuerpo, al igual que los piojos de los chimpancés son miembros del mismo género denominado *Pediculus* (*Pediculus humanus* y *Pediculus schaeffi*, respectivamente). No hay especie de *Pediculus* que parasite a los gorilas. El piojo púbico de los humanos, comúnmente llamado ladilla, y el piojo de los gorilas pertenecen al género *Phthirus* con sus dos representantes (*Phthirus pubis* y *Phthirus gorillae*, respectivamente). No hay piojos de este género que parasiten a los chimpancés. Según datos morfológicos y moleculares, *Pediculus* y *Phthirus* son monofiléticos y taxa hermanos. La edad del ancestro común más reciente de las

dos especies de *Pediculus* concuerda con la edad de divergencia entre sus huéspedes (ca. 6 Ma), mientras que esto no se ajusta para el género *Phthirus*. Las dos especies de *Phthirus* comparten un ancestro común de 3-4 Ma, el cual es considerablemente más temprano que el tiempo de divergencia de sus huéspedes (gorilas y humanos), que es de aproximadamente de 7 Ma. Un análisis de reconciliación en base a la distribución de piojos de primates determinó que hay dos posibles explicaciones alternativas, siendo la solución más parsimoniosa aquella que sugiere que las especies de *Phthirus* pasaron de gorilas a humanos (Reed et al. 2004, 2007).

### 1.2.1. La anatomía de las dos especies de *Pediculus humanus* (*capitis* y *humanus*)

#### 1.2.1.1. Anatomía externa (Tomado de Buxton 1946)

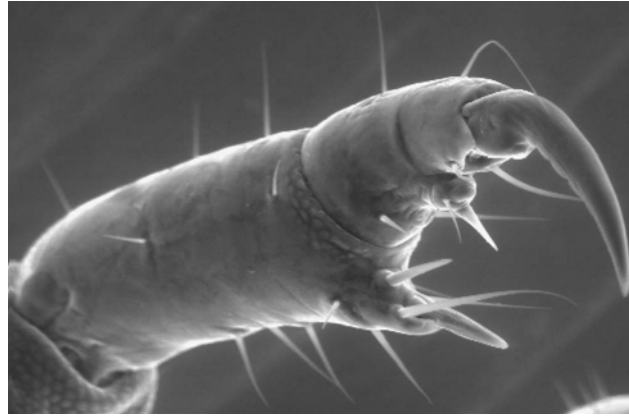
La relación general de las distintas partes que componen el cuerpo de los piojos se aprecia en la **Figura 2 a y b**.



**Figura 2.** Fotografía de los piojos: A) *Pediculus humanus capitis* (piojo de la cabeza) y B) *Pediculus humanus humanus* (piojo del cuerpo o de la ropa). El tamaño corporal de los adultos de ambas subespecies es de aproximadamente 2-4mm.

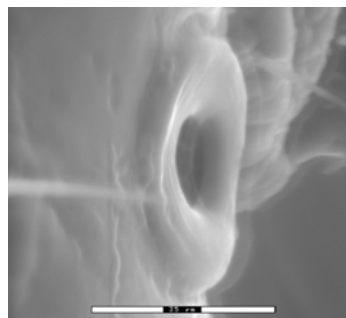
Como se puede observar, la cabeza, el tórax y el abdomen están claramente separados uno de otro. El tórax presenta signos externos de segmentación y el abdomen posee siete segmentos distinguibles. Estos insectos son (al igual que la mayoría de los piojos) aplanados en el eje dorso ventral. Hay solamente un espiráculo torácico el cual pertenece probablemente al prototórax. La pata de

*Pediculus* es característica de los Anoplura (**Figura 3**). La misma es corta y robusta. La tibia es corta y posee un pulgar en la cara interna del vértice que termina en espinas y pelos. El único tarso unido es corto y tiene una única garra grande desigual a través de su concavidad. Entre el pulgar y la garra el piojo se sujeta al pelo o a la ropa de su huésped.



**Figura 3.** Fotografía de microscopio electrónico de una pata de *P.h.capitis*.

Los tres pares de patas son similares en estructura. El abdomen posee siete segmentos y dos segmentos anteceden al primer segmento que se aprecia de manera evidente y que posee el primer par de espiráculos abdominales, indicando que probablemente este segmento junto con el primer par de espiráculos corresponda a tercer segmento. Existen seis pares de espiráculos abdominales ubicados en los segmentos 3 a 8. Todos los espiráculos (incluyendo los del tórax) poseen un sistema de cierre que funciona por compresión de la tráquea a una corta distancia debajo de la superficie del cuerpo (**Figura 4**). Se cree que los piojos cierran los mismos para evitar la pérdida de agua dentro del sistema respiratorio.



**Figura 4.** Fotografía de microscopio electrónico de un espiráculo de *P.h.capitis*.

### 1.2.1.1.I. Diferencias sexuales

Existen diferencias marcadas entre los machos y las hembras. El macho es generalmente de menor tamaño que la hembra y puede distinguirse por la presencia de bandas transversales oscuras sobre el dorso del abdomen. La forma del tramo posterior del abdomen de la hembra es más ancha (que la del macho), y también existen marcadas diferencias en las patas. La pata anterior del macho es más marcada y provista con un pulgar tibial grande y una garra en el tarso. El extremo posterior del abdomen del macho es redondeado y la superficie ventral se curva hacia arriba para acercar el ano y el orificio sexual hacia la superficie superior. En el orificio sexual se puede distinguir la punta negra del dilatador del macho. En la hembra, el abdomen termina en dos lóbulos posteriores grandes y fáciles de distinguir a simple vista que dan la apariencia bilobulada del mismo. En una vista ventral, se puede observar el par de gonoporos a cada lado del orificio vaginal y un área pigmentada en forma de escudo. El comportamiento de apareamiento sucede de la siguiente manera: El macho se acerca a la hembra por detrás de esta y camina hacia delante aproximando su abdomen al de ella, luego ajusta el primer par de patas a la base de la femora de la hembra. Los piojos asumen luego una posición vertical, cabeza hacia abajo, con el macho completamente levantado de la superficie horizontal. En ese momento el macho saca el dilatador, el cual se engancha dentro de la vagina y penetra profundamente. Luego este se retira y en ese instante el pene o aedeagus pasa a la vagina. Una gran porción del pene consiste en pared delgada quitinosa (la vesica), la cual es anclada a una porción dentada de la vagina manteniendo a los animales juntos. Es solo después esto, que se produce la eyaculación del órgano. En los machos, el orificio anal es una cavidad minúscula que se encuentra sobre la superficie superior enfrente del orificio sexual transverso. En las hembras, este se encuentra en el extremo posterior final del cuerpo, entre el lóbulo posterior y dorsal a los gonoporos y vagina (**Figura 5 A y B**).



**Figura 5.** Vista dorsal de los gonoporos de: A) machos y B) hembras de *Pediculus humanus capitis*.

### 1.2.1.1.II. Órganos sensoriales

La antena posee sensilias de tres tipos:

Órganos peg. Se encuentran en la quinta articulación de la antena en un número entre nueve y diez. Su forma es angulosa, de paredes finas, y la cavidad contiene un proceso o filamento agrupado dentro de células sensoriales.

Órganos tuft. Se encuentran en las articulaciones cuarta y quinta de las antenas. Cada una consiste de un pequeño cono que subyace en una profunda cavidad. En el ápice del cono está un tuft de cuatro pelos diminutos. La base de este órgano está conectada aparentemente por un bastón o filamento a un grupo de células nerviosas.

Pelos táctiles. Se encuentran distribuidos en pequeños números en todas las partes de la antena. Los mismos son una delgada cerda articulada conectada con células sensoriales.

Órganos escolopidiales. Dentro del segundo segmento de la antena se encuentran células que se cree que le permiten a los piojos registrar los movimientos y brindar información acerca de la posición de la antena.

No existen diferencias entre los órganos sensoriales presentes en las antenas de los machos y de las hembras (Slifer & Sekhon 1980). El ojo es un ocelo simple y se encuentran en los laterales de la cabeza de los piojos. Existen numerosos órganos sensoriales en muchas partes del cuerpo que les permiten registrar la información proveniente de sus articulaciones.

### 1.2.1.2. Anatomía interna

Partes bucales. Las partes bucales se encuentran invaginadas dentro de la cabeza y solo son extraídas cada vez que el animal quiere alimentarse. Las partes son:

El haustelo, que se encuentra en la parte frontal de la cabeza y consiste de un pequeño tubo eversible provisto de dientes que se cree que se forma a partir del labio. El canal alimentario consiste de cuatro regiones: La parte más anterior se denomina funnel bucal rígido. Detrás de éste están la bomba cibariana y la faringe, cada una puede ser individualmente movida por músculos dorsales provenientes de la cápsula de la cabeza y separados entre sí. Entre ellos se encuentra el ganglio frontal. La faringe posee potentes músculos y detrás de la parte posterior de la misma se encuentra el comienzo del esófago que es angosto y sin músculos. En la parte basal del funnel bucal está la apertura del saco de estiletes. Dentro de este saco están tres estiletes, uno por encima del otro. Se cree

que los estiletes dorsales y ventrales son formados a partir de un rudimento de la segunda maxila, la cual se une para formar el labio en la mayoría de los insectos. Estos dos estiletes mencionados son similares en forma y están separados por detrás pero unidos en el frente y en su punta hay dientes muy afilados. Debajo del estilete superior se encuentra un tubo fino que está formado por una parte de la hipofaringe y unido con el conducto salivar, al cual se le denomina estilete intermedio. Los tres estiletes mencionados arriba son llevados hacia delante por músculos protractores y que cuando no son empleados están completamente dentro de la cabeza.

Alimentación. Luego de que los estiletes perforan la piel, el insecto libera saliva que sale a través de la hipofaringe y luego desemboca en el conducto salival. El mecanismo de toma de sangre es: el haustelo presiona sobre la piel y la presión sanguínea de los capilares es suficiente para permitir que la misma salga hacia la boca. La presión ejercida por los músculos de la bomba cibariana contribuye también en la succión. Cuando el insecto comienza a alimentarse, una pequeña cantidad de sangre pasa rápidamente desde el intestino medio al posterior, e incluso pueden observarse pequeñas gotas de sangre sin digerir en el ano. Durante el proceso de digestión, todo el material nutricional obtenido de la sangre es mantenido en el intestino posterior. En la parte anterior está el fluido y en la segunda parte del intestino posterior (la cual está rodeada por las papilas rectales) el agua es extraída de las heces y las mismas son excretadas como pellets secos adheridos entre sí. Cuando la digestión ha finalizado, las papilas también extraen agua de la excreción de los túbulos de malpighi y la concentran en un fluido semi sólido.

### 1.3. La biología de los *Pediculus*.

#### 1.3.1. Piojo de la cabeza (*P.h.capitis*)

Los piojos de la cabeza viven sobre la piel que está entre los pelos de la cabeza de los humanos, quienes son sus únicos huéspedes. Es una subespecie cosmopolita. Las liendres son puestas por las hembras sobre los pelos y las mismas son adheridas con un cemento proteico que las mantienen firmes y estables de todo movimiento que sea realizado por el huésped. Las liendres son adheridas mayoritariamente detrás de las orejas y en la región de la nuca (**Figura 6**).





**Figura 6.** Preferencia de ubicación de las liendres de *P.h.capitis*.

Los animales pueden vivir en la cabeza de su huésped aproximadamente 30 días y requieren de las condiciones de temperatura y humedad casi constantes de la misma. Los piojos de la cabeza no pueden vivir más de 24 hs fuera de la cabeza de su hospedador ya que necesitan alimentarse frecuentemente a lo largo del día. Los huevos eclosionan luego de 5-10 días de haber sido puestos, y las ninfas que eclosionan pueden comenzar a alimentarse inmediatamente. Los piojos se alimentan 4-5 veces tanto de día como de noche.

Los piojos de la cabeza presentan un sistema de reproducción amfimítico diploide, es decir que hay una división mitótica que precede a la meiosis durante la espermatogénesis, no son partenogénéticos, son sexualmente dimórficos y no se han registrado casos de individuos hermafroditas (Buxton 1946); aunque en la actualidad parece haber indicios de una baja proporción de individuos hermafroditas dentro de una población (Perotti et al. 2004). El número cromosómico diploide es 12 para ambos sexos y  $n=6$  en la gametogénesis masculina (Toloza et al 2007). Los individuos presentan un dimorfismo sexual con respecto al tamaño corporal, siendo mayor en las hembras. Ambos sexos eclosionan al mismo tiempo, el apareamiento puede ocurrir un día después de la eclosión, los machos son promiscuos, las hembras no poseen espermotecas para almacenar esperma y se requiere de una elevada frecuencia de cópulas para que las mismas puedan oviponer huevos fértiles (Buxton 1946).

Los piojos poseen órganos micetomas (Bacterioma, bacteriotoma). Estos son circulares, de color amarillento y presentan simbiontes bacterianos que migran desde los discos estomacales hasta los ovarios de las hembras, permitiendo una transmisión transovárica (Perotti et al. 2007).

Los individuos adultos de ambos sexos presentan un comportamiento de dispersión similar que difiere de los demás estadios ninfales y que tiene una gran importancia en las transmisiones de cabeza a cabeza. Además, los adultos (tanto machos como hembras) se mueven más rápido que las ninfas cuando se priva a los animales de alimento por unas horas; pero cuando se los expone a una dieta

de sangre proveniente exclusivamente de hombres o mujeres no varió su tasa de ingesta (Lee et al. 2005). Por otro lado, en el trabajo de Canyon & Speare (2007) se encontró que piojos sumergidos en soluciones acuosas permanecían adheridos a los pelos y que se recuperaban luego de pasado su período de estásis (inmovilidad) de un minuto aproximadamente.

El trabajo realizado por Perotti et al (2004) mostró que en todas las escuelas analizadas existía un desvío en la proporción de sexos a favor hacia las hembras. Estos resultados se corresponden con los encontrados en los trabajos mencionados anteriormente (Buxton 1941, Roy & Ghosh 1944, Lang 1976). Existen reportes sobre el posible rol de bacterias (del género *Wolbachia*) heredadas vía materna que pueden sesgar la proporción de sexos a favor de las hembras (Cosmides & Tooby, 1981). El trabajo de Perotti et al. (2004) reveló la presencia de dos cepas diferentes de *Wolbachia* en todas las poblaciones estudiadas de piojos de la cabeza. La presencia de estas bacterias parecería estar afectando en cierta manera la proporción de sexos diferencial encontrada en las poblaciones de *P.h.capitis*.

Las ninfas tardan entre 18 y 20 días en madurar y pasar por tres estadios ninfales, luego pasan a adultos (Figura 7).

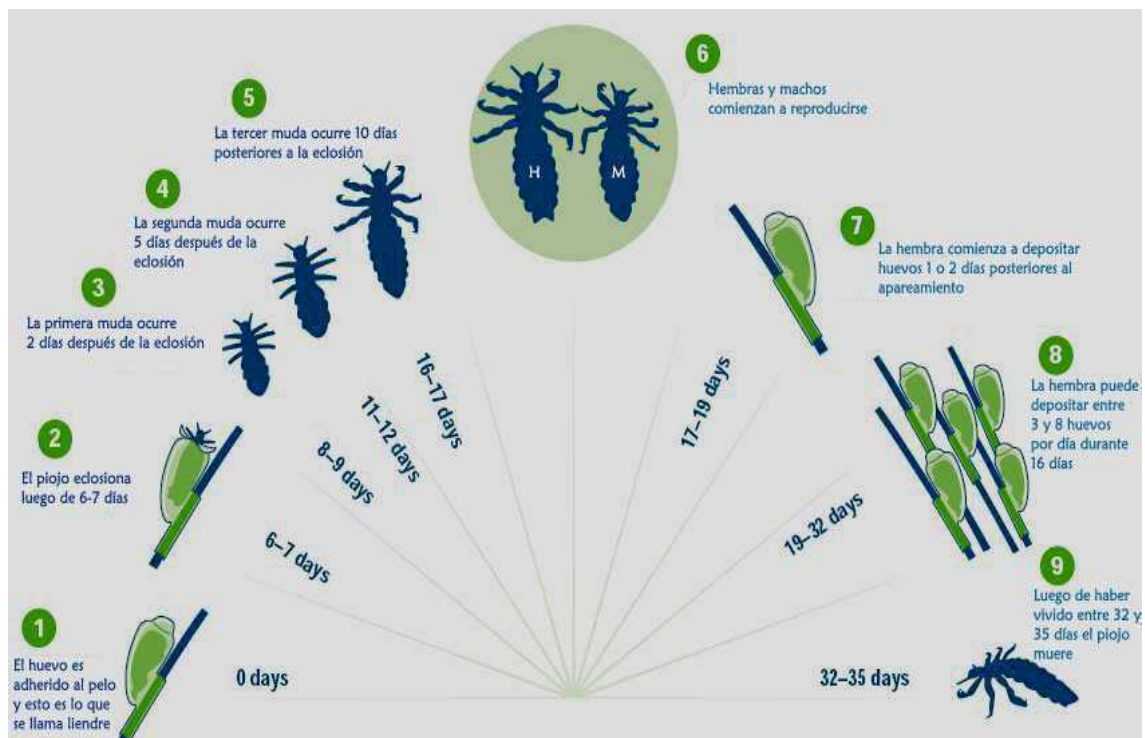


Figura 7. Ciclo de vida del piojo de la cabeza (Modificado de Nitpickers, <http://nitpickers.com.au>).

Con respecto a los huevos, estos son ovales, bastante grandes en comparación con el tamaño corporal de los adultos y son aproximadamente de 0,8 mm de largo y de 0,3 mm de ancho. El color es blanco amarillento y debido a que el corion es transparente, el embrión puede apreciarse dentro de éste. El huevo presenta una tapa en la parte anterior del mismo con forma circular angulada, luego cuando se rompe, el embrión eclosiona. Un lado de esta tapa difiere del resto del huevo ya que posee dos capas de grandes células de aire entre ellas, permitiendo el intercambio de aire atmosférico entre el exterior y el interior.

Cuando la hembra está por oviponer, rodea con sus gonoporos al pelo y el huevo es depositado con el extremo posterior en primer lugar. En este preciso momento hay un flujo de cemento de glándulas que se abren cerca del oviducto común. Este cemento une el lado posterior del huevo con el pelo permitiendo su fijación, y su flujo se interrumpe cuando se aproxima a la tapa del huevo. Los huevos son puestos orientados en el mismo eje axial que el de los pelos. Esta subespecie coloca los huevos con la tapa orientada en dirección opuesta al cuero cabelludo y cercano a la base del pelo. Los sitios preferidos de oviposición son en las áreas detrás de las orejas y en la base de la nuca. La oviposición comienza 24 hs posteriores a la cópula y una hembra puede depositar durante toda su vida entre 50-150 huevos. Las hembras cesan de oviponer uno o dos días antes de su muerte. El ciclo de vida de huevo a adulto es de 3 semanas (Buxton 1946, Gratz 1997, Goddard 2003).

### 1.3.2. Piojo de la ropa (*P.h.humanus*)

Los piojos del cuerpo (o de la ropa) son insectos delgados cuyo tamaño varía entre 2-4 mm, de cuerpo blando, de color claro y no poseen alas. Al igual que los piojos de la cabeza, su cuerpo es aplanado en el eje dorsoventral, su cabeza presenta una forma ovoidal y el abdomen consta de nueve segmentos. Los huevos son pequeños (aprox. 1mm), de color blanco-tiza y presentan una tapa en la parte superior de los mismos (similares a los piojos de la cabeza). La cabeza presenta un par de ojos ubicados lateralmente y un par de antenas con cinco segmentos. Son generalmente entre un 15-20% más grandes que los piojos de la cabeza. Existen modificaciones en sus garras que les permiten sujetarse fuertemente a pelos o ropa mientras los animales se alimentan. Las hembras depositan los huevos en la tela de la ropa.

Estos piojos presentan una distribución mundial. Con respecto a la biología podemos mencionar que esta subespecie vive sobre la ropa de las personas que infesta y se mueve hacia las áreas adyacentes del cuerpo para alimentarse. En países en vías de desarrollo esta subespecie es encontrada generalmente en gente

vagabunda sin hogar permanente (homeless) o en áreas de desplazados por guerras.

Los huevos son adheridos a las fibras de las telas usadas por sus huéspedes con una sustancia pegajosa y son colocados especialmente en las partes de las telas que se encuentran en contacto cercano con la piel. Los huevos eclosionan entre 5 y 11 días (dependiendo de la temperatura) posteriores a su puesta y las ninfas comienzan a alimentarse ni bien eclosionan. Las mismas se alimentan y mudan varias veces antes de pasar a adultos. El ciclo de vida de huevo a adulto tarda aproximadamente entre 3 y 5 semanas. Los piojos del cuerpo pueden sobrevivir en la ropa si son removidos durante la noche pero se mueren si en uno o dos días la ropa no es utilizada de nuevo (Goddard 2003). Existe un comportamiento de agregación por parte de los piojos a sus productos excretados, entre los compuestos que podemos mencionar se encuentran las sales de amonio (Mumcuoglu et al. 1986).

#### 1.3.2.1. El rol como vector de enfermedades

La presencia de un gran número de estos insectos en un huésped ha sido clasificada como la enfermedad del vagabundo y puede observarse áreas de la piel oscuras y duras (morbus errora) debido al continuo rascado producido por la alimentación de los piojos y que generalmente siguen el mismo diseño que las fibras de la ropa.

La enfermedad tifus está causada por *Rickettsia prowazeki* y los humanos son reservorios de esta enfermedad. Los *P.h.humanus* adquieren el patógeno de la sangre de una persona infectada durante los primeros diez días de la enfermedad, luego las *Rickettsia* se multiplican en las células epiteliales y del lumen del intestino medio de los piojos. Estas células se rompen liberando grandes cantidades de patógenos que son pasados a las heces de los insectos. Los piojos mueren entre los siete y los diez días posteriores a la infección. Los patógenos pueden permanecer infectivos hasta tres meses para los humanos, por lo que el tifus puede ser adquirido por una persona que no tuvo piojos (Ibarra 1993, Houhamdi et al. 2002).

La bacteria gran negativa *Bartonella Quintana* es la causante de la denominada fiebre de las trincheras (nombrada así porque produjo la muerte de más de 1 millón de soldados durante la primera guerra mundial), cuyos síntomas son similares a los de la tifus con la excepción de dos eventos sucesivos de fiebre (Raoult et al. 2005).

La fiebre recurrente es causada por espiroquetas de *Borrelia recurrentis*. Esta enfermedad no es una zoonosis ya que los humanos son los únicos reservorios y

el piojo es un transmisor mecánico. El *P.h.humanus* se infecta cuando se alimenta de una persona infectada, y luego de cuatro días las espiroquetas comienzan a circular por la hemolinfa donde se reproducen. Una persona se infecta con las mismas cuando aplasta un insecto infectado y es muy poco común que una persona sin piojos se contagie con *B. recurrentis* (Ibarra 1993).

Hace unos pocos años, un estudio reveló la asociación posible de *P.h.humanus* con otras dos bacterias, *Serratia marcescens* y *Acinetobacter* sp. (La Scola et al. 2001).

### 1.3.3. Importancia médica del *P. h. capitis*

La infestación generada por la presencia de piojos de la cabeza se denomina *Pediculosis capitis*. Dicha infestación puede ser asintomática (en la mayoría de los afectados), o causar síntomas como prurito el cual se incrementa dentro de las 3-4 semanas posteriores a la infestación inicial. Esto ocurre debido a la reacción sensible de la piel de la persona afectada a la saliva de los piojos y/o a los antígenos de las heces, llevando en algunos casos a escoriaciones e infecciones bacterianas secundarias producto del intensivo rascado. En raras ocasiones puede haber una inflamación en los nódulos linfáticos, fiebre y reacciones alérgicas (Malcolm & Bergman 2007, Mumcuoglu et al. 2009). El estudio de Speare et al. (2006) mostró que chicos con estados nutricionales saludables y que presentan una alta infestación de piojos no van a sufrir deficiencia de hierro, pero que esto va a ser de importancia médica en chicos mal nutridos.

También se han encontrado evidencias que mencionan que los piojos de la cabeza pueden generar reacciones inmunológicas específicas que llevan a cuadros clínicos de alergia e incluso de asma (Lafeber 1984, Fernandez et al. 2006).

Los piojos pasan a un nuevo hospedero cuando hay un contacto cercano entre los individuos. Las interacciones sociales entre chicos y los contactos entre padre- chico hacen que estas sean las rutas más importantes de infestación, aunque las vías indirectas denominadas “fomito”, tales como compartir peines, cepillos, toallas, ropas, etc. no deben ser descartadas (Lee et al. 2005). La vía más importante de transmisión es el contacto cabeza a cabeza. Los factores más significativos en la infestación con piojos de la cabeza dependen del número de chicos por familia, el intercambio de ropas de cama o de baño, los hábitos de lavado, las costumbres locales, los contactos sociales y el cuidado de la salud en un ámbito particular (e.g. escuela) (Willems et al. 2005, Silva et al. 2008).

Más de 10 millones de chicos son infestados por piojos al año en los Estados Unidos de América y más de 1000 millones de dólares son gastados en su control total directo e indirecto (Hansen & O´Haver 2004, West 2004). Según Ibarra (1993) se han reportado más casos de *pediculosis capitis* entre chicos de edad escolar que todas las demás enfermedades comunicables combinadas, con excepción del resfrío común. Si bien se conocen casos de que miles o cientos de piojos pueden vivir en la cabeza de una sola persona, el patrón general es que se encuentren menos de diez piojos por cabeza (Buxton 1946). La parasitación con piojos es un proceso dinámico que puede aumentar de manera hipergeométrica en ambientes cerrados tales como colegios y ciertas barrios (Falagas et al. 2008). Además, dentro un área determinada (e.g. aula, sala, etc.), solo unos pocos chicos tienen piojos. Los chicos de entre 4 y 13 años son los principales afectados por piojos, y existen numerosos trabajos que indican que las niñas son en promedio más infestadas que los varones (Buxton 1946, Gratz 1997). En años recientes se ha registrado un incremento en la tasa de infestación por piojos a nivel mundial (Burgess 2004, Falagas et al. 2008). Según Mumcuoglu et al. (2009), las causas de esto pueden ser atribuidas a:

a) La venta de pediculicidas inefectivos como resultado de cambios en la formulación, procesos de manufactura o el decaimiento de los ingredientes activos a lo largo del tiempo; b) El uso incorrecto de pediculicidas, e.g. una sola aplicación de formulaciones pediculicidas las cuales no son 100% ovicidas, formulaciones del tipo de los shampoos que diluyen mucho el ingrediente activo o la aplicación de formulados del tipo crême rinse en pelo mojado; c) El empleo de remedios alternativos y de métodos cuya eficacia no ha sido demostrada correctamente en ensayos de laboratorios in-vitro e in-vivo con piojos; d) El desarrollo de resistencia de los piojos a insecticidas tales como el DDT, lindano, permetrina, d-fenotrina, malatión; e) Desestimar la transmisión de piojos por rutas indirectas o fomite; f) Dificultad en el diagnóstico de las infestaciones con piojos debido a inexperiencia del personal médico, conocimiento, tiempo o equipamiento (buenas condiciones de luz, peines pediculicidas, magnificadores); g) Evitar reportar los casos de piojos debido a vergüenza y prejuicio social.

Si bien no existen evidencias históricas suficientes para atribuir a *P.h.capitis* como el responsable de las epidemias de tifus y de fiebre de las trincheras, trabajos recientes sugieren que el piojo de la cabeza podría ser potencial vector de *Rickettsia prowazekii* (responsable del tifus) y de *Bartonella quintana* (fiebre de las trincheras) (Robinson et al. 2003, Sasaki et al. 2006). Esta aparente diferencia de capacidad vectorial con el piojo del cuerpo o de la ropa *P.h.humanus* podría deberse a diferencias en la respuesta inmune de estos piojos a las bacterias simbiotes (Perotti et al. 2007).

## 1.4. Métodos de control

### 1.4.1. Mecánico

La remoción mecánica mediante el empleo de peines finos de metal o de plástico suele ser efectiva si se realiza diariamente o cada dos días durante 12-14 días. También es recomendable que el pelo está húmedo para facilitar el desplazamiento del peine. El trabajo de Speare et al. (2007) comparó la efectividad entre dos peines, uno de metal y otro de plástico, y no se encontraron diferencias en la remoción de cualquier forma móvil. Sin embargo, el peine metálico fue mucho más efectivo en remover liendres. Esta técnica es particularmente efectiva en chicos con tipo de pelo liso o ligeramente enrollado y si el largo de pelo es corto o medio. Un punto importante de mencionar es que el empleo de peines plásticos puede generar corriente estática y hacer que los piojos “vuelen por el aire” (Mumcuoglu et al. 2009).

### 1.4.2. Químico

Los productos químicos empleados como pediculicidas contienen una gran variedad de ingredientes activos que pertenecen a varias familias de insecticidas. Dentro de un marco ideal, el producto químico empleado debería ser barato, estar fácilmente disponible, ser fácil de usar y de quitar del pelo, no ser tóxico e irritante para los humanos, no ser inflamable, letal para el piojo, poseer una penetración lo suficiente como para alcanzar el embrión, no dejar residuos en el ambiente y no generar resistencia en los insectos que se quieren controlar.

Es importante separar aquellos compuestos pediculicidas que tienen acción sobre el sistema nervioso (neurotóxicos) de aquellos que no.

#### 1.4.2.1. Insecticidas neurotóxicos convencionales

##### 1.4.2.1.1. Organoclorados.

DDT. Este compuesto fue el primer pediculicida utilizado para controlar las poblaciones de piojos de la ropa o del cuerpo causantes de la epidemia de tifus en Nápoles en el año 1943. Actualmente se encuentra prohibido debido a su persistencia en el ambiente.

Lindano (hexacloro ciclo hexano). La absorción del lindano a través del exoesqueleto del piojo es mayor que a través de la piel. Es un inhibidor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico produciendo una estimulación excesiva del sistema nervioso central que conlleva a la muerte del insecto. Este compuesto es fácilmente absorbido en tejidos neurales y adiposos y se han registrado casos de

neurotoxicidad y anemia en pacientes (Friedman 1987). Este compuesto está actualmente recomendado como una alternativa secundaria bajo estricto control médico.

#### 1.4.2.1.II. Piretroides.

Las piretrinas naturales o sinergizadas son una mezcla de seis extractos activos provenientes de plantas del crisantemo *Chrysanthemum cinerariae folium*. Las piretrinas bloquean la repolarización de los canales de sodio de las neuronas, llevando a la parálisis y muerte de los insectos. Las piretrinas son inestables a la luz y al calor haciendo que tengan una muy baja persistencia en el ambiente. Además, poseen un perfil toxicológico seguro y con mínima absorción percutánea. Se han registrado casos de reacciones alérgicas (especialmente al crisantemo o a plantas relacionadas), edemas, pruritus y eritema.

Permetrina, ( $\pm$ )-3-fenoxibencil 3-(2,2 diclorovinil)-2,2-dimetil ciclopropaneocarboxilato, es una mezcla sintética de isómeros *cis* y *trans* de la piretrina químicamente modificada para mejorar la estabilidad a la luz y al calor (Phipps 1991). Es el insecticida de elección en los tratamientos de pediculosis y actúa de la misma forma que las piretrinas naturales, causando una disrupción neuronal de los canales de sodio voltaje dependientes que llevan a la parálisis y muerte de los insectos.

#### 1.4.2.1.III. Organosfosforados

Malatión. Es un inhibidor irreversible de la colinesterasa que produce la acumulación de la acetilcolina en el sitio de su receptor, produciendo parálisis respiratoria en el piojo y posterior muerte. Este compuesto se une a los átomos sulfuros en el pelo, produciendo una protección residual extra contra los piojos (Carlson et al. 1988). Existen reportes que mencionan que el malatión produce cambios en células de Sertoli de animales y las intoxicaciones agudas solamente han sido registradas en ambientes agrícolas. Este compuesto es muy oloroso y puede causar irritación punzante en la piel y los ojos. También deben tenerse recaudos si el principio activo está mezclado en una base alcohólica, ya que es inflamable y se debe evitar el uso de secadores de pelo luego de la aplicación. Los metabolitos activos son rápidamente inactivados por las carboxiesterasas del plasma de los mamíferos, y no se han registrado casos de crisis colinérgicas durante la aplicación de productos pediculicidas (Jones & English 2003).

#### 1.4.2.1.IV. Otros insecticidas

Spinosad. Este compuesto derivado de la bacteria *Saccharopolyspora spinosina* interfiere en primer lugar con el receptor nicotínico de la acetilcolina y con el



receptor GABA de las células nerviosas de los insectos. Actualmente no está registrado como pediculicida aunque se haya demostrado su gran efectividad en piojos de la cabeza y del cuerpo (Mougabure et al. 2006).

Ivermectina. Es una lactona macrocíclica que es estructuralmente similar a los antibióticos macrólidos, a pesar de no poseer actividad bacteriana. Además, es un derivado de las avermectinas aisladas en los 70s del microorganismo del suelo *Streptomyces avermitilis* y con una gran actividad antihelmíntica. Existen avermectinas tipo B<sub>1a</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>2a</sub>, B<sub>2b</sub> que son biológicamente más activas que las del tipo A<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>, A<sub>2a</sub> y A<sub>2b</sub>. Además, las avermectinas del tipo B<sub>1</sub> son más efectivas contra varias plagas de insectos que las B<sub>2</sub>. La ivermectina se une con gran afinidad a los canales de cloruro mediados por glutamato en las células nerviosas de invertebrados. El movimiento libre de cloruros a través de los canales iónicos abiertos de cloruro trae aparejado la despolarización con parálisis secundaria y muerte (Jones & English 2003). La ivermectina aplicada sobre piojos de la cabeza resistentes a permetrina demostró ser una buena herramienta para el control de estos insectos, demostrándose de esta manera que es un buen pediculicida (Strycharz et al. 2008). En la actualidad este producto se encuentra en fase IV de experimentación clínica.

#### 1.4.2.2. Insecticidas no neurotóxicos (no convencionales)

Deshidratadores del exoesqueleto: Dentro de este marco podemos mencionar a los productos que contienen compuestos químicos tales como el miristato de isopropilo y ciclometiconas, los cuales actúan disolviendo la cera del exoesqueleto y deshidratando los piojos llevándolos eventualmente a la muerte. Estos compuestos son inodoros, de color transparente y con una textura similar a la de un aceite con cierta viscosidad que deben ser aplicados en pelo seco. Un producto posee 50 % de ambos compuestos, mientras que existen otros productos conteniendo concentraciones > 4% de dimeticona con buenos resultados en estudios *in-vitro* e *in-vivo* (Burgess et al. 2005, Oliveira et al. 2007). Recientemente, Burgess (2009) demostró que el modo de acción de una loción de dimeticona al 4% usada para el control de piojos de la cabeza es mediante el bloqueo del tracto respiratorio externo, inhibiendo la excreción de agua y causando stress que llevan al animal a un prolongado período de inmovilización y a la disrupción de los órganos internos tales como el intestino.

El miristato de isopropilo es empleado como emulsionante y en bajas concentraciones en productos cosméticos tales como aceites, cremas, lociones, maquillajes, desodorantes y productos capilares (Malcolm & Bergman 2007).

## 1.5. Resistencia a insecticidas

El desarrollo de resistencia es un fenómeno que resulta de la presión selectiva ejercida sobre la población de una plaga por la exposición a un insecticida (Thacker 2002). La resistencia a insecticidas es un fenómeno evolutivo y es un claro ejemplo de selección natural producido por la acción del hombre (Dobzhansky 1951).

Como definición de resistencia podemos mencionar a aquella que es considerada como la tradicional y que dice que es “el desarrollo de una población capaz de sobrevivir a una dosis la cual es letal para la mayoría de los individuos dentro de una población normal”. Ffrench-Constant & Roush (1990) recopilan varias definiciones de resistencia y mencionan que Sawicki (1987) consideró que la definición tradicional presentaba cierta ambigüedad y que dicho autor enunció la siguiente definición: “La resistencia es el cambio genético (poblacional) en respuesta a la selección producida por un tóxico que puede llevar a afectar el control en campo”.

El impacto producido por el desarrollo de especies plaga resistentes a insecticidas ha variado en el mundo y hacia fines del 2001 se han reportado más de 700 especies de artrópodos resistentes a diferentes tipos de insecticidas (Thacker 2002).

Por supuesto que el manejo de la infestación con piojos de la cabeza dentro de un ámbito particular tiene una desventaja mayor si se la compara con el manejo de otros insectos plagas. En muchos casos un granjero puede tener éxito protegiendo sus cultivos si logra reducir la población plaga de insectos entre un 30 y 40%, y una similar reducción en mosquitos puede interrumpir la transmisión de vectores de enfermedad. Aún en el control de plagas domésticas, la reducción de la frecuencia de la población ente el 50 y el 80% asegura el éxito en el control. En cambio en el caso de los piojos de la cabeza, la eliminación debe ser total ya que es la única que es aceptada por la gente. Como resultado de ello, la mayoría de las poblaciones de piojos han estado sujetas a los más altos niveles de presión de selección con el consiguiente desarrollo de resistencia a los insecticidas empleados (Burgess 2001). Es por eso que existen reportes de casos de resistencia a insecticidas tales como el lindano, el DDT, carbaril, malatión y piretroides desde los años 50 hasta el presente en muchos países del mundo (Eddy 1952, Wright & Pal 1965, Muller 1972, Rupes et al. 1995, Gratz 1997, Picollo et al. 1998, Downs et al. 1999, Burgess 2004). Estos problemas han tenido dos resultados. El primero ha sido el aumento no buscado o deseado en el uso de los productos pediculicidas que ha aumentado casi cualquier grado de resistencia bajo presente en los piojos como consecuencia de esta presión de

selección adicional. Y segundo, que esto ha traído aparejado un incremento en el uso de productos sin licencias o inadecuados y/o de metodologías alternativas para el control de la pediculosis (Burgess 2001).

Una de las nuevas alternativas a los insecticidas convencionales es el empleo de compuestos botánicos provenientes de plantas aromáticas.

## **1.6. Insecticidas Botánicos**

A pesar del creciente interés del público sobre los efectos de los plaguicidas sintéticos sobre la salud y el ambiente, los insecticidas de origen botánico no han tenido la repercusión que se merecen. Los productos insecticidas provenientes de plantas más utilizados son aquellos derivados del piretro y ocupan solamente el 1% del mercado de insecticidas a nivel mundial. A comienzos de los 90, acciones gubernamentales de los Estados Unidos de América (USA) llevaron a la creación del acta de protección de calidad de los alimentos, en el cual se restringió el uso de insecticidas convencionales desarrollados antes de 1980 (e.g. organoclorados, carbamatos y organofosforados). Estos cambios en las regulaciones ambientales generaron una brecha en el mercado para el desarrollo y utilización de productos insecticidas alternativos denominados de “riesgo reducido” por la agencia de protección ambiental (EPA) de los Estados Unidos (Isman 2000, 2006). Es por esto que los insecticidas naturales provenientes de aceites esenciales de plantas aromáticas son una alternativa viable y desafiante que debe ser tomada en consideración para el estudio y desarrollo de nuevos productos amigables con el ambiente.

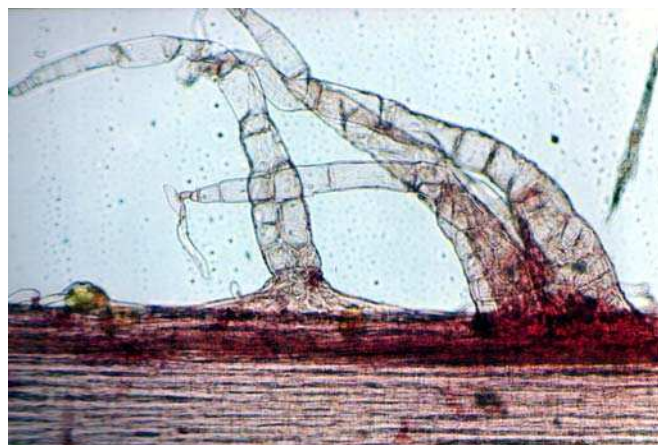
### **1.6.1. Aceites esenciales**

A modo de reseña histórica podemos mencionar que en los comienzos de la humanidad, el hombre ha mostrado gran interés en la preservación de los olores emanados por las plantas. Los hombres de antaño llegaron a comprender que el calentamiento de las plantas causaba los principios odoríferos que estaban en fase vapor y que luego se condensaban y enfriaban, y las gotas formadas a partir de ello producían un líquido con dos fases bien definidas- agua y aceite. Posteriormente, el agua proveniente de las plantas fue empleado como vehículo sobre los aceites, y se obtuvieron mejores fracciones que permitieron mejorar la calidad y el rendimiento de los aceites. El término “aceites esenciales” AEs (o aceites etéreos) fue definido por Guenther (1948) como: “el aceite volátil obtenido de la destilación por arrastre con vapor de agua de las plantas”. Con

ello se pretende diferenciar entre los aceites pesados de los volátiles. Otra definición es aquella dada por Bandoni (2002) en la que dice que un AE “es una parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente de terpenos, que están asociados o no a otros componentes, siendo la mayoría de ellos volátiles y que en su conjunto generan el olor de dicho vegetal”.

Los aceites esenciales son obtenidos de plantas aromáticas mediante la fracción arrastrada por vapor de agua en la destilación y que a temperatura ambiente se encuentran en estado líquido. Existen cerca de 17500 especies aromáticas pertenecientes a las plantas superiores (Bruneton 1999). Los géneros de donde proceden la mayoría de los componentes que forman parte de los aceites esenciales pertenecen a las familias de las Myrtaceae, Lauraceae, Compositae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae, Verbenaceae, Anacardiaceae y Chenopodiaceae. Se caracterizan por tener olores intensos y su producción dentro de la planta como metabolitos secundarios ha sido seleccionada como defensa producto de la presión ejercida por los insectos fitófagos y herbívoros. Así de esta coevolución planta-hospedador, la liberación de compuestos que alteran el comportamiento de los insectos (alimentación, cópula, atracción hacia polinizadores, repelencia) ha tenido un rol principal en la síntesis y modificación de los mencionados compuestos (Ryan & Byrne 1988). El proceso de coevolución ha sido propuesto como el principal factor responsable de promover la diversidad de compuestos químicos en las plantas, ya que los efectos selectivos continuos del ataque de los herbívoros y por otra parte de la defensa de las plantas han sido responsables del aumento en la elaboración y proliferación de los compuestos secundarios de las plantas y de los mecanismos detoxificantes de los insectos (Becerra 2007). De esta “guerra armamentista” producida en la naturaleza en la que cada parte está continuamente evolucionando para contrarrestar a la otra, es la que ha permitido esta biblioteca química de compuestos que podemos encontrar en las plantas.

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, límpidos, raramente coloreados, solubles en lípidos y en solventes orgánicos, y presentan densidades menores a la del agua. Pueden ser sintetizados (dependiendo de la planta) en varios órganos de las plantas tales como: brotes, flores, hojas, tallos, semillas, frutos, raíces y cortezas. Su almacenamiento se produce dentro de glándulas secretoras, cavidades, células epidérmicas o tricomas glandulares (**Figura 8**).



**Figura 8.** Tricomas glandulares que sirven de almacenamiento a los compuestos volátiles de las plantas.

Existen varios métodos de extracción de los aceites esenciales, los cuales pueden incluir el uso de dióxido de carbono líquido, pero principalmente se produce por la destilación a baja o alta presión de agua en estado de ebullición o por aire caliente. Es por eso que el perfil químico de los productos de aceites esenciales difiere no solo en el número de moléculas sino también en el tipo de estereoquímica de las mismas. La presencia o no de determinadas moléculas va a estar afectado por el tipo de extracción, la cual a vez dependerá del propósito de uso del producto en cuestión. El producto de extracción puede variar en cantidad, calidad de acuerdo al clima, composición del suelo, órgano de la planta, edad y ciclo vegetativo (Angioni et al. 2006). Por lo tanto, de manera de obtener una composición constante del aceite esencial, se tiene que tener presente que la extracción se debe realizar de manera tal que las condiciones originales se mantengan lo más constantes a lo largo de todo el estudio. En otras palabras, la extracción debe hacerse del mismo órgano de la planta que ha sido crecido sobre el mismo tipo de suelo, bajo el mismo clima y la colecta realizarse durante la misma estación.

El efecto de la madurez de la planta en el tiempo de producción del aceite y de la existencia de diferencias quimiotípicas pueden afectar considerablemente la composición, indicando que las condiciones ecológicas y/o los estados fisiológicos pueden interferir con la presencia de componentes biológicamente activos en la planta. La mayoría de los aceites esenciales comercializados son caracterizados químicamente mediante el análisis de cromatografía gaseosa y espectrometría de masa. Hasta el presente, existen aproximadamente 3000 aceites esenciales conocidos, 300 de los cuales poseen importancia económica para las industrias cosméticas, de perfumes, farmacéutica, agronómica, alimenticia y sanitaria (Bakkali et al. 2008). Los aceites esenciales o sus productos son usados en perfumes, productos cosméticos, sanitarios, en la agricultura, en

productos odontológicos, saborizantes de alimentos, aditivos alimentarios y como remedios naturales (Tisserand & Balacs 1995).

#### 1.6.1.1. Composición química

La composición química de los aceites esenciales consiste de una mezcla compleja de varios componentes (en general de entre 10-60) en diferentes concentraciones. En general se puede mencionar que están caracterizados por dos o tres componentes en alta concentración (20-70%) y por los demás componentes presentes en cantidades denominadas de traza (<1%). En muchos de los casos son estos componentes principales quienes determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales. Los componentes incluyen a dos grupos de origen biosintético diferente (Pichersky et al. 2006). El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides, y el otro por constituyentes aromáticos y alifáticos; todos caracterizados por un bajo peso molecular.

##### 1.6.1.1.1. Terpenos

Como fue definido por Guenther (1948), los terpenos son todos aquellos compuestos que tienen una relación estructural y química relacionada con la molécula simple  $C_5H_8$ , y con todos aquellos compuestos de 10 átomos de carbono derivados de  $C_{10}H_{16}$ . Para esta última molécula y su correspondiente fórmula molecular tenemos las siguientes posibilidades:

(Acíclico-sin anillo-3 dobles ligaduras); (monocíclico-un anillo-2 dobles ligaduras); (bicíclico-dos anillos-1 doble ligadura); (tricíclico-tres anillos-sin doble ligadura).

Los terpenos forman clases estructurales y funcionales diferentes. Los mismos derivan de combinaciones de varias unidades base de 5 carbonos ( $C_5$ ) llamadas isoprenos. La biosíntesis de los terpenos consiste de los siguientes pasos: 1) la síntesis del precursor isopentil difosfato (IPP), 2) adición repetitiva de varios IPPs para formar el precursor prenildifosfato de las varias clases de terpenos, 3) la modificación del prenildifosfato alílico por medio de las sintetasas específicas de terpenos que forman el esqueleto terpénico y 4) la modificación enzimática secundaria (reacción redox) el esqueleto para conferirle las propiedades funcionales a los diferentes terpenos (Bakkali et al. 2008).

Los principales terpenos son los hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y politerpenos ( $C_n$ ). Los terpenos que contiene oxígeno se denominan terpenoides y su fórmula molecular puede ser  $C_{10}H_{16}O$  y  $C_{10}H_{18}O$ .

Los monoterpenos formados de la unión de 2 unidades isopreno ( $C_{10}$ ) son las moléculas más representativas dentro de los aceites esenciales y constituyen cerca del 90% de la composición de los mismos. Toda esta gran diversidad permite una gran variedad de estructuras con funciones particulares que pueden clasificarse en:

- a) Hidrocarburos: -acíclicos: mirceno, ocimeno, etc.; -Monocíclicos: terpinenos, p-cimeno, etc.; - bicíclicos: pinenos, canfeno, sabineno, etc.;
- b) Alcoholes: -acíclicos: geraniol, linalol, citronelol, etc.; -Monocíclicos: mentol,  $\alpha$ -terpineol, carveol, etc.; - bicíclicos: borneol, etc.
- c) Aldehídos: -acíclicos: geranial, neral, citronelal, etc.
- d) Cetonas: -acíclicos: tagetona, etc.; -Monocíclicos: mentona, carvona, pulegona, piperitona, etc.; - bicíclicos: canfor, fenchona, pinocarvona, etc.
- e) Esteres: -acíclicos: acetato de linalilo, acetato de citronelilo, etc.; - Monocíclicos: mentilo o acetato de  $\alpha$ -terpinilo, etc.;- bicíclicos: acetato de isobornilo, etc.
- f) Eteres: 1,8-cineol, mentofurano, etc.
- g) Peróxidos: Ascaridol, etc.
- h) Fenoles: Timol, carvacrol, etc.

Compuestos quirales. Cuando la molécula es ópticamente activa (presencia de uno o varios átomos de carbono asimétricos con actividad óptica), existen dos enantiómeros que pueden o no estar presentes en el mismo aceite. Por ejemplo, el (-) linalol se encuentra presente en grandes proporciones en el aceite de coriandro y el (+) linalol lo está en algunos árboles de alcanfor (Bakkali et al. 2008). En la mayoría de las veces, es la forma racémica la que está presente en mayor proporción. Existen numerosos casos indicando que los enantiómeros presentan diferencias en la actividad biológica contra un gran número de insectos (Lahlou 2004).

Isomería de compuestos. Existen compuestos aislados de la misma planta que presentan isomería cis y trans y son similares en su estructura, salvo que difieren en la posición de dobles ligaduras. Por ejemplo, los isómeros cis y trans de asarona obtenido en el AE aislado de los rizomas de *Acorus calamus* (Araceae) mostraron diferente respuesta biológica en el efecto antialimentario del lepidóptero *Peridroma saucia*. El isómero cis-asarona agregado a la dieta inhibió

el crecimiento y la alimentación de larvas I, III y IV, mientras que el isómero trans produjo solamente efecto antialimentario. Esto sugiere que la toxicidad de cis-asarone se debe a la configuración cis, en vez de la posición de la doble ligadura (Lahlou 2004).

Diferentes quimiotipos. La existencia de diferencias químicas intraespecíficas de algunas plantas aromáticas (o quimiovariedades) significa que plantas morfológicamente idénticas pueden poseer metabolitos secundarios diferentes. Esto se debe a que los quimiotipos evolucionaron en el tiempo como respuesta a la exposición a condiciones ambientales diferentes.

Compuestos aromáticos. Están presentes en los aceites esenciales en menor proporción que los terpenos. Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropanato. Las rutas metabólicas biosintéticas relacionadas con los terpenos y los derivados fenilpropánicos se encuentran separados en las plantas, aunque pueden coexistir en otras (si así fuera el caso una vía predominará sobre la otra) (Bakkali et al. 2008).

#### 1.6.1.2. Propiedades insecticidas

Existe un gran número de aceites esenciales y componentes en los que se ha comprobado la actividad insecticida contra plagas agrícolas, de granos almacenados, de importancia sanitaria, veterinaria y médica (Isman 1999). Por mencionar algunos casos, Regnault-Roger & Hamraoui (1995) reportaron efectividad fumígena e inhibición en la reproducción de 13 monoterpenos contra el brúquido *Acanthoscelides obtectus*. De estos compuestos, los más efectivos fueron aquellos que estaban oxigenados tales como el carvacrol, timol, eugenol, linalol y terpineol. De manera similar, Huang et al. (1998) observaron los efectos antialimentarios de monoterpenoides sobre gorgojos plaga de granos almacenados. El efecto ovicida, larvicida y adulticida de 22 monoterpenoides estructuralmente relacionados fue estudiado sobre la mosca común, *Musca domestica* (Rice & Coats 1994). Además, los autores encontraron similitudes y diferencias en la efectividad biológica de los mismos compuestos evaluados en otras especies, indicando que la toxicidad de los monoterpenoides es especie-específica y que puede verse afectado por la metodología empleada para evaluarlos. La toxicidad de más de 40 extractos de plantas orientales en comparación con los insecticidas sintéticos empleados para controlar uno de los ácaros hematófagos más importantes en establecimientos avícolas, el *Dermanyssus gallinae* fue estudiada por Kim et al. (2007); mostrando que los AEs tuvieron buena efectividad y que la mortalidad hallada fue del orden de los insecticidas sintéticos. Con respecto a los vectores de enfermedades, se puede



mencionar que la buena efectividad de 20 de los 63 componentes de AEs evaluados sobre las vinchucas transmisoras del mal de Chagas, *Triatoma infestans*, indicó que los mismos poseen efectos tóxicos sobre huevos y ninfas (Laurent et al. 1997). Asimismo, Lucía et al. (2007) encontraron que los aceites esenciales de *Eucalyptus grandis* y de resina de pino (terpineno) interrumpieron el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti*, principal vector del virus del dengue.

La efectividad pediculicida de ciertos aceites esenciales y de sus componentes ha sido comprobada en ensayos in-vitro por varios autores (Veal 1996, Lahlou et al. 2000).

### 1.6.1.3. Actividad repelente

El uso de repelentes para evitar las picaduras de artrópodos apareció tal vez hace miles-y tal vez millones- de años atrás. Se ha observado que varias especies de primates frotan sobre su piel milípedos y plantas para evitar ser picados por insectos hematófagos. Por ejemplo, los monos capuchinos llorones *Cebus olivaceus* frotan milípedos de la especie *Orthoporus dorsovittatus* durante los períodos de máxima actividad de mosquitos (Valderrama et al. 2000). Se ha encontrado que estos milípedos contienen compuestos químicos llamados benzoquinonas los cuales se ha determinado en ensayos experimentales que son repelentes de insectos (Moore & Debboun 2007).

Antes de proseguir con el uso de plantas como repelentes es importante definir ¿Qué es un repelente?. La definición más aceptada es aquella que dice: “Un repelente es cualquier estímulo que produce una reacción de evitación” (Dethier 1956). Además, este autor mencionó que en teoría pueden existir tantos repelentes como clases de estímulos externos existan y definió dos categorías principales: física y química, estando esta última compuesta de repelentes olfativos (vapor) y gustativos (contacto).

Otra definición un poco más amplia es la dada por Browne (1977) que dice: “un repelente es un compuesto químico o mezcla de compuestos que actúan en la fase vapor causando que el insecto se mueva o se desplace en dirección opuesta a la fuente inicial”. Otra definición algo más “experimental” es la dada por Rogoff (1952) es la que dice que “un repelente es cualquier cosa que reduce el número de insectos sobre la superficie tratada”.

Existe una gran cantidad de trabajos –especialmente en mosquitos- de la actividad repelente de los aceites esenciales y de sus componentes (ver resumen

en Moore et al 2007). Por mencionar algún trabajo, podemos citar el estudio de Gillij et al. (2008) en el que el 70% de los AEs extraídos de catorce plantas aromáticas estudiadas mostraron efecto repelente sobre el mosquito vector del dengue *Aedes aegypti*. Además, el efecto repelente tuvo una duración de 60 minutos o más y los componentes principales con mayor efecto repelente fueron el limoneno y el alcanfor. El estudio de Trongtokit et al. (2005) reveló que los AEs de plantas pertenecientes a las familias botánicas Lamiaceae, Myrtaceae y Poaceae presentaron actividad repelente sobre *A.aegypti* desde 10 a 120 minutos. Otro repelente de origen botánico que tiene una gran aceptación en cuanto a su uso y residualidad es el aceite esencial de citronela. Sin embargo, muy pocos tienen la residualidad de la N, N- dietil-m-toluamida (DEET) quien es considerado como el repelente universal de preferencia. Existen productos conteniendo DEET que ofrecen una protección de hasta 8 horas, aunque esto varía con la concentración empleada y con las condiciones de exposición de las personas (Moore & Debboun 2007). En la actualidad está discutiéndose la toxicidad del DEET ya que existen varios reportes que sostienen que este compuesto sintético puede ser tóxico y generar diversas reacciones adversas en niños y adultos tales como encefalopatías, alergias y muertes. Además, este compuesto ha sido considerado como uno de los responsables del síndrome de la guerra del Golfo (Frances 2007).

#### 1.6.1.4. Sitio y modo de acción

##### 1.6.1.4.1. Actividad insecticida

Acetilcolinesterasa (AChE). Existen reportes que indican que los aceites esenciales o sus componentes monoterpenoides producen intoxicación del tipo neurotóxica, similar a la producida por los organofosforados y carbamatos, inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Isman 1999, Houghton et al. 2006). El efecto neurotóxico se produce cuando en la transmisión del impulso nervioso, la acetilcolina (ACh) es liberada de las vesículas de las terminales nerviosas cuando éstas son despolarizadas, luego la ACh ingresa a la sinapsis y se une al receptor post sináptico. La ACh posee una vida media corta debido a la presencia de la AChE, una enzima que hidroliza la unión éster de la molécula generando la interrupción de la actividad estimuladora. La inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) produce que la transmisión eléctrica se prolongue ya que la ACh está estimulada (Houghton et al. 2006).

Los síntomas de intoxicación son hiperactividad, convulsiones, temblores en las extremidades seguidos de parálisis, postración y muerte del insecto. Por ejemplo, Grundy & Still (1985) encontraron que el epóxido 1,2-pulegona inhibió

irreversiblemente la AChE de anguila eléctrica. Además, encontraron que los grupos ceto y epoxi de los demás monoterpenos estudiados produjeron un efecto similar de inhibición. Sin embargo, la inhibición producida fue encontrada solamente en los estudios in-vitro pero no en lo in-vivo.

Octopamina. En un estudio comparativo de la acción fumígena de los aceites esenciales ZP51 y SEM 76 obtenidos de plantas de la familia Labiatae y del (+)-limoneno sobre adultos de *R. dominica*, Kostyukovsky et al (2002) observaron que la acción inhibitoria sobre la AChE del AE ZP51 fue fuerte (65%), moderada del SEM 76 (27%) y solamente del 2% para el (+)-limoneno. Además, estos autores vieron que los dos AEs incrementaron significativamente los niveles de AMP cíclico (aún a muy bajas concentraciones), sugiriendo una posible acción sobre la octopamina. Resultados similares fueron obtenidos por Enan (2001) en moscas y cucarachas expuestas a eugenol y  $\alpha$ -terpineol.

La octopamina está presente en el sistema nervioso de todos los insectos actuando como neurotransmisor, neurohormona y neuromodulador (Evans 1980). Además, existen evidencias que sugieren que la octopamina es un transmisor periférico en invertebrados superiores (Woodring et al. 1989). Otra función atribuida a esta molécula es la relacionada con el comportamiento activo o de “atención”, la cual ha sido denominada como la hormona de “luchar o volar”, y ha sido sugerido que es parte de un sistema general que prepara al insecto para su actividad vigorosa (Evans 1980). Como fue mencionado por Orchard (1982), la octopamina es más abundante en el sistema nervioso de los insectos que la norepinefrina, sugiriendo una función similar a la epinefrina y norepinefrina en los vertebrados.

GABA. Por último, el único trabajo realizado en el que se deduce que el terpeno timol actúa sobre los receptores GABA fue realizado sobre *Drosophila melanogaster* (Priestley et al. 2003).

#### 1.6.1.4. II. Actividad repelente

Con respecto a la acción de los compuestos químicos con acción repelente podemos decir que los mismos actúan sobre los sentidos del gusto y del olfato causando reacciones directas de evitación. Por ejemplo, experimentos realizados sobre la extirpación de las antenas de moscas domésticas (los principales receptores olfativos), éstas fueron incapaces de alejarse de la fuente de vapor con el principio repelente. En el caso de los repelentes de contacto, los mismos parecen actuar sobre quimiorreceptores específicos que no son normalmente sensibles a vapores (Dethier 1956). Dicho de otra manera, podemos relacionar a

la repelencia como el efecto comportamental que altera la percepción al nivel del sistema nervioso periférico (SNP) y que genera que el insecto no muerda o succione, y que se aleje de su fuente de alimento (Pickett et al. 2008).

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios realizados para profundizar en el conocimiento del modo de acción de los compuestos repelentes han sido sobre el repelente universal DEET y sobre mosquitos de importancia médica.

Por ejemplo, McGiver (1981) propuso que el compuesto sintético DEET empleado mundialmente como repelente en insectos voladores actúa (en fase vapor) a nivel de las membranas lipídicas, alterando la organización de las membranas dendríticas e impidiendo que se produzca la respuesta normal de los insectos hacia los compuestos atractantes (odorantes emanados por la piel de voluntarios, CO<sub>2</sub>, ácido láctico, etc.). Más recientemente, Syed & Leal (2008) propusieron un nuevo mecanismo en el que los mosquitos detectarían el DEET mediante olfacción y que esto sería la causa directa del comportamiento de evitación. Estos autores demostraron que algunos insectos poseen neuronas receptoras específicas (siglas en inglés, ORNs) ubicadas en los palpos antenales y maxilares, que serían las encargadas de responder al DEET. Estas neuronas también responden electrofisiológicamente (a concentraciones de un orden de magnitud menor) a terpenoides tales como la tujona, eucaliptol y linalol.

#### 1.6.1.4.III. Metabólica

Citocromo P450. Los monoterpenos pueden ser degradados por el sistema de monooxigenasas dependientes del citocromo P450. Hasta el presente, más de 200 enzimas P450 pertenecientes a las familias CYP 4, 6, 9, 12, 15, 18 y 28 han sido descritas en insectos. A modo de ejemplo, la unidad CYP6D1 fue detectada en el año 1982 en moscas domésticas provenientes de New York con grados de resistencia a piretroides >5000. La CYP6D1 produce una hidroxilación aromática que resulta en la formación de metabolitos 4'-OH de fenoxibencil piretroides (Scott et al. 1998).

El citocromo P450LM2 derivado de conejos está involucrado en la metabolización mediante procesos de hidroxilación de monoterpenos entre los que se incluyen el geraniol y el nerol (Licht & Coscia 1978). En insectos, cuando el escarabajo *Paropsisterna tigrina* fue alimentado con hojas del árbol australiano Tea tree *Melaleuca alternifolia*, el 1,8-cineol fue metabolizado a 2β-hidroxicineol (Southwell et al. 1995). Como fue demostrado por Brattsten & Wilkinson (1977), los monoterpenos con un grupo funcional hidroxilo disponible inducen

significativamente los microsomas del P450 y la actividad epoxidasa en la oruga *Spodoptera litura*. Cuando larvas de esta especie fueron alimentadas con una dieta rica en alcanfor, se demostró que la ruta metabólica involucrada en su biotransformación estaba mediada por las monooxigenasas dependientes del citocromo P450. Además, se observó que el producto principal obtenido por esta ruta era el mismo que se obtuvo en conejos, indicando una similitud en la ruta metabólica (Miyazawa & Miyamoto 2004).

#### 1.6.1.5. Relación estructura-actividad

Las bases fisicoquímicas de los compuestos monoterpenoides con actividad insecticida no es una tarea fácil de abordar debido a la naturaleza compleja de la interacción entre los compuestos y el insecto. Sin embargo, existen determinadas variables que pueden ser consideradas cuando se pretende estudiar la relación estructura química de la molécula y la actividad biológica sobre el insecto. Dichos parámetros son: el coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y la presión de vapor (Pv). Estos dos últimos determinando la lipofilicidad y volatilidad de los compuestos en estudio. Por lo tanto, se puede hipotetizar que los compuestos aplicados mediante los métodos de contacto directo (tópico del insecticida, impregnación de papeles de filtro con insecticida) o fumígeno (exposición de los insectos a los vapores de los compuestos o aceites esenciales) con gran poder insecticida necesitan en primer lugar penetrar la cutícula lipofílica, con lo que es de esperar que aquellos que posean un alto ( $K_{ow}$ ) serán efectivos; mientras que compuestos con alta efectividad fumígena tendrán altas presiones de vapor (Rossini et al. 2008).

La correlación de la actividad insecticida de los aceites esenciales estudiados por Papachristos et al. (2004) y su composición química reveló que la misma estaba dada de forma directa por los monoterpenoides oxigenados y que era inversamente proporcional con los monoterpenoides hidrocarbonados. De manera similar, la fuerte actividad de los AEs que contenían monoterpenoides oxigenados en comparación con aquellos ricos en hidrocarburos fue reportado por Regnault-Roger & Hamraoui (1995) para *A. obtectus* y por Shaaya et al. (1991) para *Rhyzoperta dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae*.

Sin embargo, la actividad insecticida de los aceites esenciales estudiados por Papachristos et al. (2004) no fue linealmente dependiente de su composición química. Además, las cetonas fueron más efectivas que los alcoholes y estos más activos que los hidrocarburos.

#### 1.6.1.6. Toxicidad de los aceites esenciales y sus componentes

Quizás el atractivo principal de los AEs y de sus componentes para ser empleados en el control de insectos es la baja toxicidad hacia mamíferos. Algunos de los compuestos puros de AEs presentan una muy baja o nula toxicidad, con valores de toxicidad aguda oral en ratas de LD<sub>50</sub> de 2-5 g kg<sup>-1</sup>. Este último valor es el límite superior de toxicidad aguda requerido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (siglas en inglés EPA) (Isman 1999). Sin embargo, existen excepciones como la *α*-pulegona, a quién se le ha reconocido efectos tóxicos en el hígado de mamíferos debido a que se metaboliza a epóxidos, y se ha restringido su uso como aditivo alimenticio (Tisserand & Balacs 1995). El hecho saliente es que la mayoría de los componentes de AEs en los que se ha reportado actividad biológica, la Administración de Alimentos y Drogas de Estados Unidos los ha incorporado a la lista de productos considerados generalmente como seguros (en inglés, GRAS), y los mismos han estado exentos de ciertos requerimientos toxicológicos de la EPA (Isman 2000).

Estudios ecotoxicológicos realizados para comprobar la toxicidad aguda del componente eugenol sobre peces demostró que este compuesto es 1500 y 15000 veces menos tóxico que los insecticidas piretro y azinfosmetilo respectivamente (Stroh et al. 1998). Además, Misra & Pavlostathis (1997) demostraron con varios ensayos de laboratorio que el compuesto mencionado arriba junto con otros no son persistentes ni en agua dulce ni en el suelo. Por ejemplo, los autores estudiaron que bajo condiciones aeróbicas a 23°C, el tiempo de vida medio del *α*-eugenol varió entre 30-40 hs, y con una degradación completa a las 50 hs. Además, se vio que el eugenol es degradado en su totalidad por bacterias del suelo del tipo *Pseudomonas* y transformado en ácidos orgánicos. Esta baja persistencia en el ambiente puede deberse en parte a que los compuestos poseen una lipofiliencia media y una alta presión de vapor, que hace predecir que casi ninguno de ellos alcance las capas freáticas de agua o persista en los sedimentos o en el suelo (Isman 1999).

#### 1.7. Situación de la problemática de la pediculosis en Argentina

Sabemos que la pediculosis no es exclusiva de algún país en especial, sino que su distribución es mundial y afecta a todas las clases sociales sin distinción de razas, sexos e ingreso económico. Por ello, Argentina no es la excepción y la infestación con el ectoparásito *Pediculus humanus capitis* es un importante problema médico que presenta connotaciones a nivel social ya que los individuos que lo padecen son en muchas ocasiones regresados del ámbito

escolar a su hogar hasta tanto se solucione el problema-incluso si solo se hayan detectado liendres- a pesar de que su presencia muchas veces no implique un riesgo de contagio de piojos. Como resultado de estas medidas, los chicos infestados son excluidos con la consecuente pérdida de clases que ello implica. Esto es de mayor importancia en los sectores de la sociedad en donde en las escuelas se sirven desayunos, almuerzos y meriendas para los chicos, siendo muchas veces su única fuente de alimento. Sumado a ello, está el posible ausentismo de los padres o tutores en su trabajo debido a que deben hacerse cargo de ellos en horarios escolares.

### 1.7.1. Epidemiología

Con respecto a los estudios epidemiológicos en Argentina debemos mencionar que quizás el primero de ellos haya sido el realizado en los años 1992-1993 por Castro et al. (1994) en la región sanitaria XI de la Provincia de Buenos Aires. En este estudio los autores demostraron que la prevalencia de piojos varió en los meses entre el 12% y el 57%, con una media anual de 38%. Luego, en el año 1997, se realizaron dos estudios, el primero fue realizado en escuelas primarias de la ciudad de Córdoba en donde el porcentaje de infestación con piojos fue del 45% y las niñas estuvieron más afectadas que los varones (Doucet et al. 1997). El segundo trabajo fue realizado en una escuela primaria perteneciente a la ciudad autónoma de Buenos Aires, en donde además de los chicos se revisó el personal docente y no docente. La evaluación inicial en el grupo infestado indicó que la infestación fue del 32%, siendo las áreas temporales y occipitales de la cabeza en donde se registró la mayor presencia de *P.h.capitis* (Chouela et al. 1997).

### 1.7.2. Resistencia a Insecticidas

Esto ha llevado al empleo de productos pediculicidas para controlar las poblaciones de piojos de la cabeza. Han sido numerosos los productos utilizados en Argentina durante las últimas dos décadas, conteniendo la mayoría de ellos piretroides como principios activos, entre los que se pueden mencionar a la permetrina y a la deltametrina. También se emplearon insecticidas fosforados como el malatión y los organoclorados DDT y lindano (Picollo 1999). Sin embargo, el uso repetido e indiscriminado de los productos llevó a la evolución de resistencia a insecticidas piretroides detectada por primera vez en Argentina en el año 1998 (Picollo et al. 1998). La resistencia fue determinada a los insecticidas permetrina, deltametrina y d-fenotrina. Luego estudios posteriores complementarios permitieron detectar resistencia cruzada a otros piretroides tales como la  $\beta$ -cipermetrina, y del incremento en el metabolismo de esterasas y

de monooxigenasas (citocromo P450) encargadas de degradar los insecticidas empleados (Picollo et al. 2000, González Audino et al. 2005). En estudios posteriores se detectaron nuevas poblaciones de piojos resistentes y además se determinaron por primera vez huevos de *P.h.capitis* resistencia a piretroides pero susceptibles a spinosad (Vassena et al. 2003, Mougabure Cueto et al. 2006a, 2008).

### 1.7.3. Alternativas para el control químico

Con lo expuesto acerca de las poblaciones de piojos de Argentina resistentes a piretroides, surgió como alternativa la incorporación de alcoholes alifáticos como sinergistas de las formulaciones pediculicidas. Con ello se pretendió contrarrestar los problemas ocasionados de la falta de efectividad en los productos presentes en el mercado (Mougabure Cueto et al. 2002).

En la actualidad, la imperiosa necesidad de nuevos formulados pediculicidas que reemplacen a los tradicionales (o sintéticos) ha llevado a la búsqueda de productos de origen botánico con el claim de “naturales” que permita la mayor aceptación de un público cada vez más enemigo de lo no-natural. Los compuestos de origen botánico, entre los que podemos mencionar a los aceites esenciales y sus componentes, tienen la ventaja de ser poco tóxicos para los mamíferos, con baja residualidad en el ambiente y por poder registrarse como productos cosméticos (lo que permite que el producto esté disponible en el mercado más rápidamente que un insecticida sintético).



# Objetivos de esta Tesis

## 2. Objetivos de esta Tesis

Establecer la actividad biológica de los vapores de los aceites esenciales (y de sus componentes principales) provenientes de plantas autóctonas de diferentes regiones fitogeográficas de la República Argentina, sobre poblaciones de *Pediculus humanus capitis* (estadios adulto y huevo) resistentes a permetrina.

Analizar si los aceites esenciales y sus componentes principales producen efecto repelente sobre los individuos adultos de piojos de la cabeza.

Analizar algunos de los posibles mecanismos involucrados en el modo de acción de la toxicidad de los monoterpenoides sobre los piojos de la cabeza.

Analizar la degradación de las enzimas degradativas dependientes del citocromo P450 sobre los componentes de aceites esenciales de piojos resistentes a insecticidas.

# **Materiales y Métodos**

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Material Biológico

##### 3.1.1. Recolección de piojos de la cabeza

Las ninfas, adultos y liendres de piojos de la cabeza *P.h.capitis* empleados en el presente trabajo fueron recolectados de las cabezas de más de 5000 chicos infestados de entre 3-13 años de edad que concurrían a escuelas primarias y hogares de menores de la Ciudad de Buenos Aires y alrededores. Para su recolección se utilizó un peine fino metálico de la marca ASSY sin dientes acanalados para evitar tirar el cabello de los chicos y que además permite la remoción de los distintos estadios con el menor daño posible. Los piojos recolectados fueron transportados hasta nuestro laboratorio donde fueron usados en los diferentes estudios realizados en esta tesis.

Como fue mencionado por trabajos previos de nuestro laboratorio, se consideró a una población de piojos de la cabeza como aquella perteneciente a una escuela u hogar en particular, ya que esto permitía obtener un perfil toxicológico similar (Picollo et al. 1998). Las poblaciones de piojos de la cabeza empleados en esta tesis (EB, PR, RG, HB, E14) fueron previamente caracterizadas en su nivel de resistencia a permetrina mediante el bioensayo de tóxico determinado por Vassena et al. (2003).

Se utilizó como población susceptible de referencia (en la determinación de resistencia a permetrina) una colonia de piojos de la ropa o del cuerpo, *Pediculus humanus humanus*, criada en el CIPEIN desde el año 2001 proveniente de una colonia de laboratorio del Dr. Steve Barker del Departamento de Parasitología de la Universidad de Queensland, Australia. Esta colonia se encuentra alimentada sobre conejos una vez por día por un período de 20-30 minutos y con una frecuencia de 6 veces por semana. Una vez alimentados, los piojos son regresados a los pedazos de tela corderoy, colocados dentro de un recipiente plástico cerrado herméticamente para mantener las condiciones de humedad relativa del  $50 \pm 1\%$  y mantenidos a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C bajo un fotoperíodo de luz: oscuridad de 12:12. Estas condiciones son logradas mediante una cámara ambiental marca VELP Científica FOC225E.

## 3.2. Material Químico

### 3.2.1. Aceites esenciales

La obtención de los aceites esenciales y su respectiva identificación fue realizada por dos grupos de trabajo:

a) -La cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, físicas y naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV-CONICET, Córdoba, Argentina.

Todo el material vegetal fue colectado por el Dr. Julio Zygodlo y sus colaboradores como parte de un proyecto en conjunto de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Código 01/12108.

Todo el material colectado fue realizado durante la estación de primavera de los años 2003-2004, y 2006-2007 en las diferentes regiones fitogeográficas de la República Argentina donde fue identificado taxonómicamente en el INDELLAR (La Rioja) por el Dr. Fernando Biurrún. Un ejemplar representativo de cada espécimen fue depositado en el herbario del Museo Botánico de Córdoba (Universidad de Córdoba, Córdoba) y en el INDELLAR-Chamical (Universidad de La Rioja, La Rioja).

La extracción y caracterización química cuali y cuantitativa que permitió identificar y determinar los componentes y las proporciones de los diferentes componentes dentro de los aceites esenciales fue realizada por el Dr. Julio Zygodlo, perteneciente a la cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, físicas y naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV-CONICET y siguiendo la metodología descrita en el trabajo de Toloza et al. (2006). Es importante de mencionar que los aceites esenciales obtenidos en diferentes regiones fitogeográficas de la República Argentina se pueden separar en aquellos colectados durante el período 2003-2004 (**Tabla 1**) y los colectados durante el período 2006-2007 (**Tabla 2**).

**Tabla 1.** Aceites esenciales de plantas colectados en los años 2003-2004.

Familia Botánica	Aceite esencial	Localidad de origen
Anacardiaceae	<i>Schinus areira</i> <sup>a</sup>	Córdoba
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> <sup>a</sup>	La Rioja
Compositae	<i>Artemisia verlotorum</i> <sup>a</sup>	Córdoba
	<i>Psila spartioides</i> <sup>a</sup>	Córdoba
Lamiaceae	<i>Minthostachys verticillata</i> <sup>a</sup>	Muestra comercial sintética
	<i>Mentha pulegium</i> <sup>b</sup>	Córdoba
	<i>Origanum vulgare</i> <sup>b</sup>	Muestra comercial sintética
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i> <sup>b</sup>	Muestra comercial sintética
Myrtaceae	<i>Eucalyptus tereticornis</i> <sup>b</sup>	Córdoba
	<i>Eucalyptus viminalis</i> <sup>b</sup>	Córdoba
	<i>Eucalyptus cinerea</i> <sup>b</sup>	Córdoba
	<i>Eucalyptus citriodora</i> <sup>b</sup>	Córdoba
	<i>Eucalyptus saligna</i> <sup>b</sup>	Córdoba
	<i>Myrcianthes cisplatensis</i> <sup>a</sup>	San Salvador de Jujuy
Verbenaceae	<i>Aloysia polystachia</i> <sup>a</sup>	Córdoba
	<i>Acantholippia riojana</i> <sup>a</sup>	La Rioja

<sup>a</sup> Planta autóctona o nativa.

<sup>b</sup> Planta exótica o no nativa.

Tabla 2. Aceites esenciales de plantas colectados en los años 2006-2007.

Familia Botánica	Aceite esencial	Localidad de origen
Apiaceae	<i>Azorella</i> sp. <sup>a</sup>	San Juan
	<i>Pimpinella anisum</i> <sup>b</sup>	Muestra comercial sintética
Asteraceae	<i>Tagetes filifolia</i> <sup>a</sup>	Córdoba
	<i>Tagetes mendocina</i> <sup>a</sup>	San Juan
	<i>Baccharis salicifolia</i> (1) <sup>a</sup>	Famatina (La Rioja)
	<i>Baccharis salicifolia</i> (2) <sup>a</sup>	Famatina (La Rioja)
	<i>Baccharis vernicosa</i> <sup>a</sup>	Cerro Cruz (La Rioja)
	<i>Artemisia annua</i> <sup>a</sup>	Córdoba
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i> <sup>b</sup> (1)	Tucumán
	<i>Chenopodium ambrosioides</i> <sup>b</sup> (2)	Córdoba
Cupressaceae	<i>Juniperus scopularum</i> <sup>a</sup>	Esquel
Euphorbiaceae	<i>Croton piluliferum</i> <sup>a</sup>	Yungas (Jujuy)
Fabaceae	<i>Zuccagnia punctata</i> <sup>a</sup>	San Juan
	<i>Adesmia boronioides</i> <sup>a</sup>	Esquel
Lamiaceae	<i>Satureja parvifolia</i> <sup>a</sup> (1)	Famatina (La Rioja)
	<i>Satureja parvifolia</i> <sup>a</sup> (2)	Talampaya (La Rioja)
	<i>Thymus vulgaris</i> <sup>b</sup>	Muestra comercial sintética
Lauraceae	<i>Cinnamomun porphyrium</i> <sup>a</sup>	Yungas (Jujuy)
Loganiaceae	<i>Buddleja mendozensis</i> <sup>a</sup>	La Rioja
Monimiaceae	<i>Peumus boldus</i> <sup>b</sup>	Muestra comercial sintética
Myrtaceae	<i>Myrcianthes pseudomato</i> <sup>a</sup>	Córdoba
	<i>Syzygium aromaticum</i> <sup>b</sup>	Muestra comercial sintética
Schizaeaceae	<i>Anemia tomentosa</i> <sup>a</sup>	Córdoba
Verbenaceae	<i>Aloysia citriodora</i> <sup>a</sup> (1)	Yungas (Jujuy)
	<i>Aloysia citriodora</i> <sup>a</sup> (2)	Famatina (La Rioja)

*Aloysia catamarquensis*<sup>a</sup>

La Rioja

---

<sup>a</sup> Planta autóctona o nativa.

<sup>b</sup> Planta exótica o no nativa.

(1) y (2) representan quimiotipos diferentes de la misma especie de planta.



### 3.2.1.1. Identificación y caracterización química de los AEs colectados en los años 2003-04 y 2006-07

El análisis de los aceites esenciales fue realizado en un cromatógrafo gaseoso (GC) marca Shimadzu GC-R1A con detector de llama ionizante y equipado con una columna capilar de 30 metros de longitud x 0,25 mm de diámetro interno (0,25- $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria) (**Tablas 3-16**). Las condiciones del GC fueron las siguientes: La temperatura de la columna fue programada desde 40 a 230°C a 2°C/min. La temperatura del inyector y del detector fue ajustada a 240 °C. Se utilizó nitrógeno como gas portador a un flujo constante de 0,9ml/min, y 0,3  $\mu\text{l}$  de cada material fue inyectada dentro del cromatógrafo.

Los componentes de los aceites esenciales fueron identificados mediante la combinación de diversas metodologías: 1) Comparación del índice de retención GC determinados con referencia a una serie homóloga de n-alcános ( $\text{C}_{12}\text{-C}_{25}$ ); 2) Comparación de los tiempos de retención con las muestras puras auténticas de Sigma-Aldrich y Fluka; 3) Enriquecimiento de picos mediante coinyección con estándares auténticos, cuando éstos estaban disponibles; 4) Comparación del espectro de masas de los componentes del aceite esencial con el espectro de masas disponible en las librerías espectrales (Adams & Nist); y 5) Comparación mediante la inspección visual del espectro de masas de los componentes del aceite esencial con el espectro de masas de los componentes de aceites esenciales presentes en la literatura. Los análisis fueron realizados con un PerkinElmer Q-700 equipado con una columna capilar SE-30 (30 m x 0,25mm; 0,25- $\mu\text{m}$  de espesor). Las condiciones analíticas fueron las siguientes: temperatura de 40° a 230°C a 2°C/min, el gas transportador fue helio a un flujo constante de 0,9 ml/min, y la fuente estuvo a 70eV.

3.2.1.1.1. Composición química de los componentes mayoritarios colectados en los años 2003-2004.

**Tabla 3.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a las familias botánicas Anacardiaceae y Chenopodiaceae.

Componentes	%	
	Anacardiaceae	Chenopodiaceae
	<i>Schinus areira</i>	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
Limoneno	7,8	-
$\alpha$ -pineno	23,0	-
$\beta$ -pineno	36,7	-
$\gamma$ -cadineno	5,0	-
$\tau$ -cadinol	14,4	-
p-cymeno	-	27,2
$\alpha$ -terpineol	-	68,2

**Tabla 4.** Composición química de los componentes mayoritarios perteneciente a la familia botánica Compositae.

Componentes	(%)	
	Compositae	
	<i>Artemisia verlotorum</i>	<i>Psila spartioides</i>
Limoneno	-	9,3
$\alpha$ -tujona	7,3	-
1,8-cineol	84,6	-
Alcanfor	-	55,5
$\alpha$ -terpineol	-	6,3

**Tabla 5.** Composición química de los componentes mayoritarios perteneciente a la familia botánica Lamiaceae.

Componentes	(%)		
	Lamiaceae		
	<i>Menta pulegium</i>	<i>Minthostachys verticillata</i>	<i>Origanum vulgare</i>
Mentona	34,8	30,7	-
Pulegona	51,1	51,2	-
Carvacrol	-	-	80,5
Timol	-	-	9,0

**Tabla 6.** Composición química de los componentes mayoritarios perteneciente a la familia botánica Lauraceae.

Componentes	(%)
	Lauraceae
	<i>Laurus nobilis</i>
$\alpha$ -pineno	5,2
Sabineno	8,1
1,8-cineol	50,8
Eugenol	15,0

**Tabla 7.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a la familia botánica Myrtaceae.

Componentes	(%)					
	Myrtaceae					
	<i>E.cinerea</i>	<i>E.citriodora</i>	<i>E.saligna</i>	<i>E.tereticornis</i>	<i>E.viminalis</i>	<i>M.cisplatensis</i>
Limoneno	6,1	-	-	5,2	-	27,1
$\gamma$ -terpineno	-	-	-	10,8	23,2	-
$\alpha$ -pineno	5,2	-	-	-	-	-
p-cymeno	11,2	-	-	22,0	17,4	-
Borneol	-	-	-	7,6	-	-
Isopulegol	-	9,0	-	-	-	-
Terpinen-4ol	-	-	-	5,2	-	-
$\alpha$ -terpineol	-	-	-	-	-	7,7
1,8-cineol	62,1	-	93,2	37,5	46,9	45,7
Citronelal	-	76,0	-	-	-	-
Acetato de citronelilo	-	7,3	-	-	-	-
Espatunelol	-	-	-	5,0	-	-

**Tabla 8.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a la familia botánica Verbenaceae.

Componentes	(%)	
	Verbenaceae	
	<i>Acantholippia riojana</i>	<i>Aloysia polystachia</i>
Limoneno	-	6,0
Carvona	-	6,1
$\alpha$ -tujona	93,4	71,9

3.2.1.1.II. Composición química de los componentes mayoritarios colectados en los años 2006-2007.

**Tabla 9.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a la familia botánica Apiaceae.

Componentes (%)	Familia botánica	
	Apiaceae	
	<i>Azorella sp.</i>	<i>Pimpinella anisum</i>
Guaiol	40,3	-
Bulnesol	55,2	-
Trans-Anetol	-	90,1

**Tabla 10.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a la familia botánica Asteraceae.

Componentes	Asteraceae					
	(%)					
	<i>T.filifolia</i> <sup>a</sup>	<i>T.mendocina</i> <sup>b</sup>	<i>B.salicifolia</i> (1)	<i>B.salicifolia</i> (2)	<i>B.vernicosa</i>	<i>A.annua</i>
$\alpha$ -pineno	-	5,5	16,8	10,28	-	7
(E) $\beta$ -ocimeno	-	28,6	-	-	-	-
(E) tagetona	-	11,7	-	-	-	-
(Z) tagetona	-	28,0	-	-	-	-
(Z) ocimenona	-	7,3	-	-	-	-
Trans pinocarveol	-	-	-	-	12,5	7,6
Óxido de cariofileno	-	-	15,7	5,73	10,42	-
Espatulenol	-	-	32,3	12,33	38,13	-
$\alpha$ -muurolol	-	-	6,4	6,45	-	-
$\alpha$ -tujeno	-	-	-	5,01	-	-
Mirceno	-	-	-	5,12	-	-
Limoneno	-	-	-	12,1	-	-
4-terpineol	-	-	-	10,44	-	-
1,8-cineol	-	-	-	-	-	16,7
Artemisia cetona	-	-	-	-	-	24
Alcanfor	-	-	-	-	-	7
Pinocarvona	-	-	-	-	-	9
$\beta$ -selineno	-	-	-	-	-	5,1
Anetol	74,5	-	-	-	-	-
Estragol	23,7	-	-	-	-	-
$\alpha$ -humaleno	-	-	2,2	2,18	-	-
$\beta$ -cariofileno	-	-	-	4,51	-	-

<sup>a</sup> Composición química tomada de Gillij et al. (2008), <sup>b</sup> Composición química tomada de Lima et al. (2009).

**Tabla 11.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a las familias botánicas Chenopodiaceae y Cupressaceae.

Componentes	Chenopodiaceae <sup>a</sup>			Cupressaceae <i>Juniperus scopularum</i>
	C.ambrosioides			
	(1)	(2)		
Ascaridol	-	99,4	-	
Carvona	5,3	-	-	
Trans-Pinocarveol	42,4	-	-	
Acetato de trans-Pinocarvilo	22,4	-	-	
Cis-Carveol	10,6	-	-	
Acetato de cis-Verbenilo	9,1	-	-	
Sabineno	-	-	86,5	

<sup>a</sup> Composición química tomada de Gillij et al. (2008).

**Tabla 12.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a las familias botánicas Euphorbiaceae y Fabaceae.

Componentes	Euphorbiaceae			Fabaceae	
	<i>Croton piluliferum</i>		<i>Zuccagnia punctata</i>	<i>Adesmia boronioides</i> <sup>a</sup>	
$\alpha$ -pineno	15,78		9,1		-
6-Canfenona	-		62,4		-
$\delta$ -Cadineno	-		-		5,8
Esquel-6-en-9-ona	-		-		19,1
$\alpha$ -Copaen-11-ol	-		-		8,5
Esquel-7-en-9-ona	-		-		12,5
$\beta$ -pineno	20,01		-		-
$\alpha$ -gurjeneno	6,66		-		-
$\beta$ -cariofileno	20,17		-		-
Alo aromadendreno	5,63		-		-

<sup>a</sup> Composición química tomada de González et al. (2004).

**Tabla 13.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a la familia botánica Lamiaceae.

Componentes	Lamiaceae (%)		
	<i>S.parvifolia</i> (1) <sup>a</sup>	<i>S.parvifolia</i> (2) <sup>a</sup>	<i>Thymus vulgaris</i>
	Piperitona	41,9	46
Óxido de piperitona	50,1	49,3	-
Mirceno	-	-	4,4
$\gamma$ -Terpineno	-	-	-
Timol	-	-	68,2
Para-cimeno	-	-	11

<sup>a</sup> Composición química tomada de Dambolena et al. (2009a).

**Tabla 14.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a las familias botánicas Lauraceae, Loganiaceae y Monimiaceae.

Componentes	Lauraceae (%)			Loganiaceae (%)	Monimiaceae (%)
	<i>Cinnamomun porphyrium</i>			<i>Buddleja mendozensis</i>	<i>Peumus boldus</i>
	Longifoleno	18,6			-
Farnesol cis trans	13,2			-	-
Farnesol cis cis	7,25			-	-
Delta cadineno	7,72			-	-
Acetato de farnesilo cis trans	8,36			-	-
Óxido de himachileno	10,01			-	-
Acetato de fenchilo	-			85,0	-
Canfeno	-			-	4,8
Ascaridol	-			-	41,5
Para-cimeno	-			-	12
Óxido de cariofileno	-			-	8,1



**Tabla 15.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a la familia botánica Myrtaceae.

Componentes	(%)	
	Myrtaceae	
	<i>Myrcianthes pseudomato</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
$\alpha$ -pínenol	6,0	-
1,8-cineol	34,1	-
Sabineno	7,1	-
$\beta$ -cariofileno	21,0	-
$\gamma$ -elemeno	6,7	-
Aromadendreno	5,4	-
Eugenol	-	54,9
Cariofileno	-	18,6
Acetato de eugenol	-	20,2

**Tabla 16.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a las familias botánicas Schizaeaceae y Verbenaceae.

Componentes	(%)			
	Schizaeaceae		Verbenaceae <sup>b</sup>	
	<i>Anemia tomentosa</i> <sup>a</sup>	<i>A.citriodora</i> (1)	<i>A.citriodora</i> (2)	<i>A.catamarcensis</i>
Pulegona	-	85,7	82,3	-
Geranial	6,9	12,1	-	-
$\alpha$ -bisabolol	51,4	-	-	-
Neral	-	-	6,0	-
Carvona	-	-	-	98,7

<sup>a</sup> Composición química tomada de Gillij et al. (2008).

<sup>b</sup> Composición química tomada de Dambolena et al. (2009b).

b)- La División Química del Control de Plagas, Laboratorio de Química de Insecticidas y Productos Naturales del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina.

La extracción y análisis químico de los aceites esenciales de diferentes especies del género *Eucalyptus* fue realizado por el Ing. Forestal MSc. Alejandro Lucía y por los Doctores Héctor Masuh y Eduardo Zerba como parte del proyecto conjunto otorgado por la Agencian Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyY) bajo el código PICT-38310.

Los plantines de un año de edad certificados por calidad y origen fueron plantados en una parcela experimental ubicada en el CIPEIN (CITEFA-CONICET) (34° 33' 42" S, 58° 30' 39" W), localizado en Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina. Luego de 18 meses de crecimiento, las hojas frescas de los eucaliptos fueron extraídas por el Ing. Forestal MSc. Alejandro Lucía y se procedió a la obtención de los aceites esenciales correspondientes. La caracterización química, cuali y cuantitativa de los aceites esenciales fue realizada por el Dr. Héctor Masuh y el Ing. Forestal MSc. Alejandro Lucía siguiendo la metodología descrita en Lucía et al. (2007) y en Toloza et al. (2008) (Tabla 17).

### 3.2.1.2. Análisis químico de los aceites esenciales extraídos de eucaliptos

El análisis químico de los aceites esenciales de *Eucalyptus* se llevó a cabo mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, usando un cromatógrafo gaseoso GCMS-QP 5050 A (Shimadzu, Japan) equipado con una columna capilar HP-1 (Crosslinked Methyl Silicone Gum) (50 metros de long. x 0.32 mm diámetro interno x 0.52 µm espesor de la fase estacionaria). Se inyectaron 0.4 µl de una solución en hexano del aceite esencial o componente a analizar a una concentración de 1mg/ml. Para la cuantificación de los componentes se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas; La temperatura de la columna fue programada: Temperatura inicial: 50 °C durante 10 min., temperatura programada de 50 °C hasta 68°C a razón de 1°C/min, temperatura programada de 68 °C a 75 °C a razón de 0.5 °C/min, temperatura programada de 75 °C a 250 °C a razón de 20 °C/min y finalmente la temperatura fue mantenida a 280 ° C durante 10 min. La temperatura del inyector y la interface fueron ajustadas a 250 y 285 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador y la relación de split fue de 11:1. La presión de la columna fue fijada a 35 Kpa, el flujo total a 15,8 ml/min y el flujo de columna a 1,3 ml/min. La ganancia del detector fue de 1,49 Kv.

Para la identificación de los componentes se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas: La temperatura de la columna fue programada; Temperatura inicial: 50 °C durante 10 min., luego fue programada de 50 °C hasta 280 °C a razón de 5 °C/min, finalmente, 280 °C durante 4 min.

La temperatura del inyector y la interface fueron ajustadas a 250 y 285 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador y la relación de split fue de 11:1. La presión de la columna fue fijada a 35 Kpa, el flujo total a 15,8 ml/min y el flujo de columna a 1,3 ml/min. La ganancia del detector fue de 1,47 Kv.

Los componentes de los aceites esenciales fueron identificados mediante la combinación de diversas metodologías: 1) Comparación del índice de retención relativo de los componentes del aceite esencial sobre una columna HP-1, determinados con referencia a una serie homóloga de n-alcanos (C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>) con nuestros valores experimentales de las sustancias patrones, cuando la misma estaba disponible comercialmente. 2) Comparación del espectro de masas de los componentes de la muestra con el espectro de masas de las sustancias patrones, cuando la misma estaba disponible comercialmente. 3) Comparación del espectro de masas de los componentes del aceite esencial con el espectro de masas disponible en las librerías espectrales del sistema GC-MS (NIST; Willey 229), del cual se desprende el índice de Similitud (*similarity index*). 4) Comparación mediante la inspección visual del espectro de masas de los componentes del aceite esencial con el espectro de masas de los componentes de aceites esenciales presentes en la literatura (Adams, 2007). 5) Comparación del índice de retención relativo (Índices de Kovats´) de los componentes del aceite esencial sobre una columna HP-1 determinados con referencia a una serie homóloga de n-alcanos (C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>), con los valores reportados en la literatura en columnas equivalentes.

3.2.1.2.1. Composición química de las cinco especies de *Eucalyptus*, expresadas como porcentaje relativo del área total en los cromatogramas.

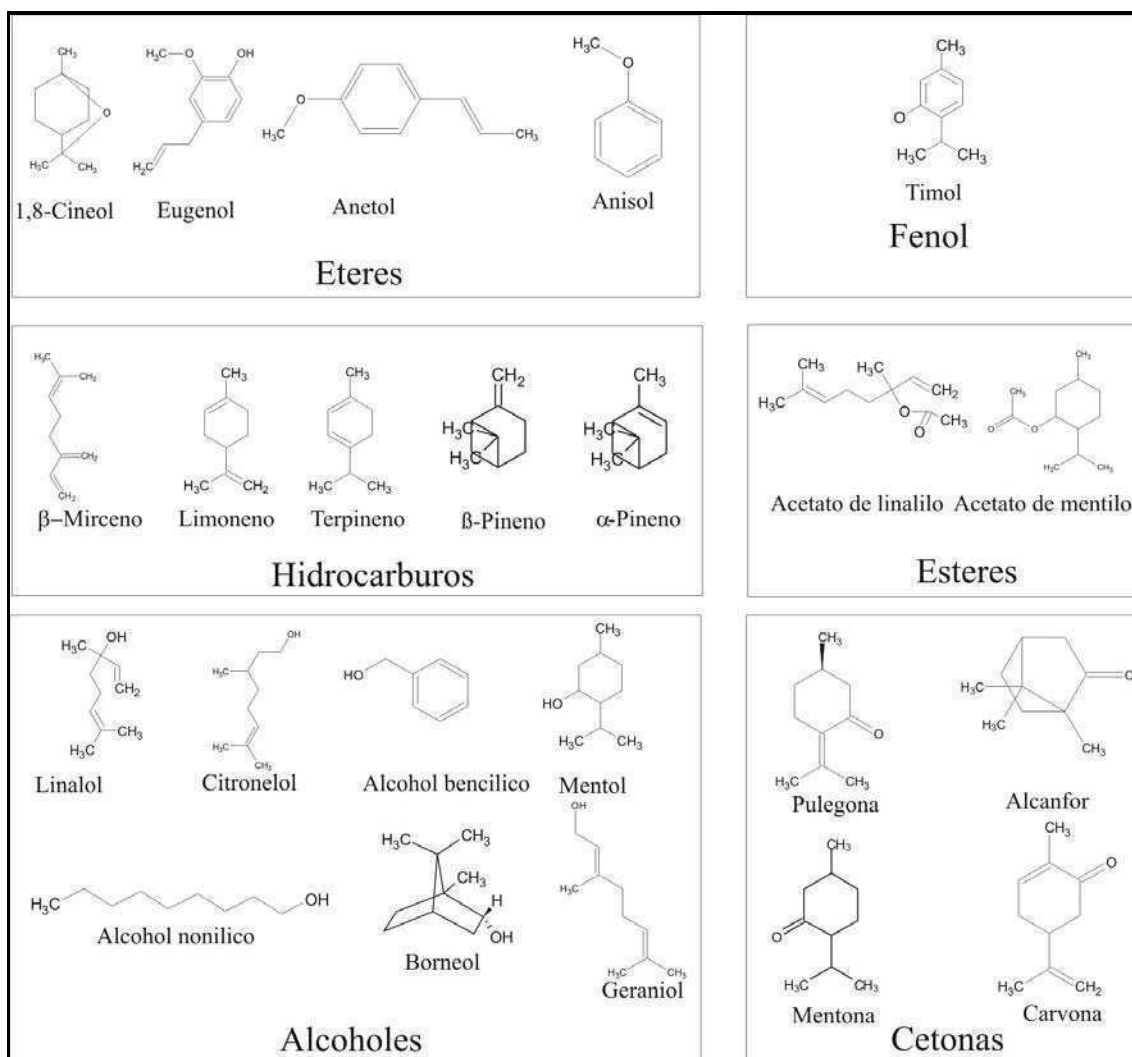
**Tabla 17.** Composición química de los componentes mayoritarios pertenecientes a los *Eucalyptus*.

Componentes	(%)				
	Myrtaceae				
	<i>E.tereticornis</i>	<i>E.grandis</i> X <i>E.tereticornis</i>	<i>E.grandis</i> <sup>a</sup>	<i>E.grandis</i> X <i>E.camaldulensis</i>	<i>E.camaldulensis</i>
γ-terpineno	-	-	5	-	-
α-pineno	-	22,8	52,71	30,65	-
Criptona	-	-	-	-	5,71
β-felandreno	22,64	-	-	-	16,34
Terpinen-4ol	5,83	-	-	-	6,73
α-felandreno	9,44	-	-	-	6,45
1,8-cineol	18,59	63,04	18,38	49,65	19,13
p-Cimeno	14,51	-	9,7	-	17,93
α-Terpineol	-	-	5,67	-	-
Espatunelol	6,83	-	-	-	7,32

<sup>a</sup> Datos provenientes de Lucía et al. (2007).

### 3.2.2. Monoterpenoides

Todos los 26 monoterpenoides empleados en esta tesis fueron de grado técnico (pureza >98%) y fueron provistos por Fluka (Munich, Alemania) y por Sigma Aldrich (St.Louis, USA) (**Figura 9**).



**Figura 9.** Estructura química de los monoterpenoides empleados en esta tesis.

### 3.2.3. Determinación de resistencia

Se usó permetrina de grado técnico (94,2% de pureza), provisto por Chemotécnica (Buenos Aires) y acetona certificada de grado técnico marca Merck (Buenos Aires).

### 3.2.4. Estudio fumígeno

El DDVP (2,2-diclorovinil dimetil fosfato) (97,8% de pureza) provisto por Chemotécnica (Buenos Aires).

### 3.2.5. Estudios de repelencia

Se empleó piperonal (1,3-benzodioxol-5-carboxaldehído) (99% de pureza) provisto por Aldrich (St. Louis, USA). La  $\delta$ -lactona (delta-hexalactona-5-metilpentanolido),  $\gamma$ -nonalactona (4-pentilbutanolido) and  $\delta$ -dodecalactona (5-heptilpentanolido) fueron provistos por Palma Chemicals (Argentina).

### 3.2.6. Medición enzimática de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)

#### 3.2.6.1. Soluciones Stock

El buffer fosfato ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ), 0,05M y pH=7,2. La acetilcolinesterasa (AChE) de anguila eléctrica tipo III-S en buffer fosfato (AChE, EC 3.1.1.7) 500Ue o 1,33UE/ml, 5.5' - Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) en buffer fosfato en una concentración de  $3,2 \times 10^{-4}$  M. El ioduro de acetilcolina (ATCI) estaba diluído en acetona/buffer de fosfato (1:9) en una concentración de  $1,56 \times 10^{-3}$  M. Los monoterpenoides empleados estaban diluídos en etanol absoluto (EtOH) 1M. Se realizaron diluciones seriales de eserina y de 1,8-cineol diluídas en etanol absoluto para realizar el cálculo de los parámetro de inhibición al 50% ( $IC_{50}$ ). Las concentraciones para la eserina variaron en un rango de  $1,07 \times 10^{-1}$ M a  $1,07 \times 10^{-7}$ M y desde 5M a  $10^{-4}$ M para el 1,8-cineol. Las concentraciones finales de EtOH para todos los ensayos estuvo mantenida al 5% (v/v), incluyendo los controles.

#### 3.2.6.2. Homogenato de piojos

Luego de remover el abdomen de las ninfas III y de los adultos de piojos de la cabeza, se homogenizaron en el buffer fosfato en una proporción de 10 piojos cada 150  $\mu$ l de buffer). El homogenato crudo fue filtrado usando un pedazo de fibra de vidrio dentro de una jeringa plástica de 1ml (0,50 x 15). El homogenato filtrado fue utilizado como la fuente de enzima en los ensayos de inhibición.

### 3.2.6.3. Medición de oxidasas de función mixta (OFM)

El butóxido de piperonilo (PBO) (pureza 93%) fue provisto por ICN Syntial, USA.

## 3.3. Bioensayos

### 3.3.1. Epidemiología

Para el estudio epidemiológico se analizaron un total de 1856 chicos de edades comprendidas entre 3-13 y provenientes de ocho escuelas primarias previamente seleccionadas para este estudio durante los meses de Marzo y Abril del año 2007. Las escuelas seleccionadas fueron aquellas en las que se detectaron altos niveles de resistencia a permetrina en estudios previos de nuestro laboratorio (Vassena et al. 2003), y en los estimados en la presente tesis. Para realizar este estudio en las escuelas antes mencionadas fue necesario obtener un permiso especial de las autoridades educativas del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Para examinar a todos los grupos de chicos de las escuelas fueron necesarias en promedio entre 4 y 5 visitas consecutivas. Todas las escuelas contempladas para este estudio fueron públicas y solamente aquellos chicos cuyos padres firmaron la autorización por escrito fueron incluidos en este estudio. Hubo amplia libertad de acción tanto para los chicos como para los padres en rehusarse a participar de este estudio.

La cabeza fue revisada en su totalidad durante 5 minutos y se hizo especial hincapié en los sitios de preferencia de los piojos como la nuca y la zona detrás de las orejas. Siempre que se revisó a un chico se hizo frente a las autoridades correspondientes de los establecimientos educativos.

Se definió pediculosis como la presencia de al menos un individuo adulto, ninfa o liendre que estuviera vivo o viable. Los piojos fueron removidos de la cabeza empleando un peine fino de metal marca ASSY. Además, se completó una planilla con los datos de la edad y las características del pelo para cada chico examinado. Una vez colectados los piojos fueron transportados a nuestro laboratorio para los demás estudios mencionados en esta tesis.

### 3.3.2. Determinación de los niveles de resistencia a permetrina

La aplicación tópica del insecticida permetrina fue realizada en base a la técnica previamente descrita de nuestro laboratorio por Vassena et al. (2003). Esta técnica consistió de diluciones seriales del insecticida permetrina en acetona aplicado sobre los piojos de la cabeza. Para ello se empleó una jeringa marca Hamilton de 5  $\mu$ l provista con un dispensador de repeticiones que permite aplicar sobre cada insecto en forma individual una gota de 0,1  $\mu$ l. Dicha gota fue aplicada sobre el abdomen dorsal de cada piojo de la cabeza o del cuerpo (cepa susceptible de referencia). Las dosis de insecticida variaron en un rango de 0,003 a 10 mg/ml. El control consistió de individuos topicados solamente con acetona. Los insectos tratados fueron colocados en cajas de Petri (90 mm de diámetro) en las que se colocó un papel de filtro Whatman N°1, y que luego fueron depositadas dentro de un recipiente cerrado de plástico conteniendo una atmósfera saturada de agua para evitar que los piojos se deshidraten. Este recipiente fue mantenido durante 18 h en una cámara ambiental sin luz (Lab-Line instruments) a  $18 \pm 0,5$  °C. Cada concentración fue replicada tres veces usando entre 10-15 insectos por réplica. Pasado este tiempo, se registró la mortalidad de los piojos. El criterio de mortalidad consistió en la imposibilidad de los piojos de poder caminar sobre un papel de filtro desde el centro hasta el borde de un filtro de papel de 70 mm de diámetro.

### 3.3.3. Actividad fumígena

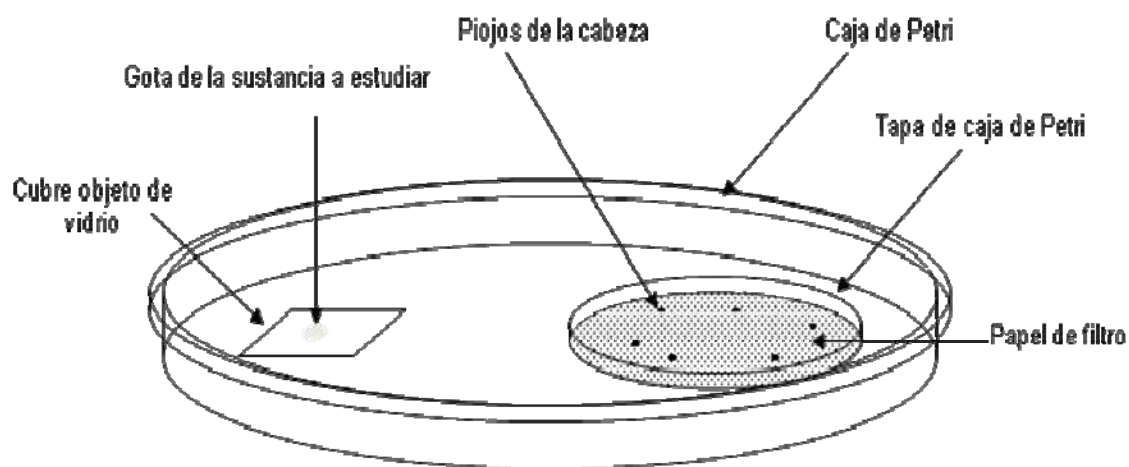
#### 3.3.3.1. Actividad fumígena de aceites esenciales y/o monoterpenoides sobre los estadios postembrionarios (ninfas III y adultos)

Para la exposición directa del aceite esencial o de los componentes se utilizó una cámara cerrada en donde los piojos se expusieron a los vapores, sin entrar en contacto con las sustancias en estudio (**Figura 10**). Cada unidad experimental consistió de una caja de petri de plástico (de 90mm de diámetro) que contenía 60  $\mu$ l de la sustancia pura a ser estudiada sobre un cubre objeto de vidrio (de 18 x 18mm de lado). La unidad control consistió de la misma cámara cerrada sin el agregado del aceite o compuesto a estudiar. El lado opuesto dentro de cada unidad contenía 15 piojos expuestos sobre un papel de filtro No. 1 (de 55 mm de diámetro, Whatman, Hillsboro, OR) colocado dentro de una tapa de caja de Petri plástica (de 55 mm de diámetro). Cada 5 min se registró el número de piojos volteados. El criterio de volteo utilizado fue cuando un piojo se



encontraba dado vuelta con las patas hacia arriba y presentando (o no) ligeros movimientos de las mismas. Para comparar el efecto se calculó el  $TV_{50}$ , expresado como los minutos necesarios para afectar el 50% de los piojos expuestos. Los insectos fueron usados una sola vez y luego descartados.

Durante cada estudio, las unidades estudiadas fueron mantenidas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y a  $60 \pm 5\%$  de humedad relativa en una cámara ambiental marca VELP Científica FOC225E.



**Figura 10** .Cámara para estudiar los vapores de los AEs y monoterpenoides en formas postembrionarias de piojos de la cabeza.

### 3.3.3.2. Actividad fumígena de monoterpenoides sobre huevos de *P.h.capitis*

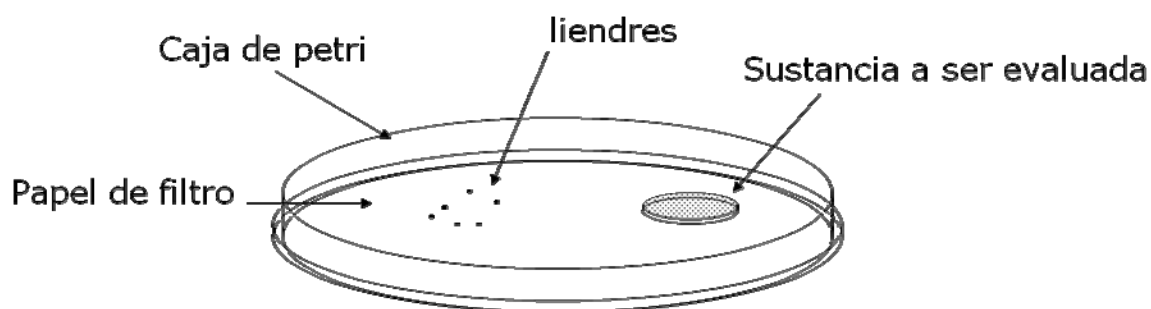
Cada unidad experimental consistió de una caja de Petri cerrada invertida (de 55 mm de diámetro), sobre la cual estaba colocado un papel de filtro No. 1 (de 55 mm de diámetro) que hace de piso o soporte a las liendres, y de una tapa plástica de 15mm de diámetro que contenía  $60\mu\text{l}$  del compuesto a ser estudiado (**Figura 11**). El control negativo consistió de la misma unidad experimental sin la adición de ninguna sustancia. Grupos de entre 10-20 huevos viables de desarrollo tardío fueron seleccionados de acuerdo a Mougabure Cueto et al. (2006b), y transferidos a la cámara cerrada. Los huevos de desarrollo tardío se caracterizan por poseer manchas oculares de color negro y apéndices fácilmente distinguibles del embrión. Cada grupo de huevos fue expuesto a los monoterpenoides en estudio durante 24 hs a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y a  $75 \pm 5\%$  de humedad relativa en contenedores de plásticos cerrados conteniendo una solución acuosa saturada de

NaCl. Se eligió este tiempo de exposición ya que se comprobó que este tiempo era el óptimo para la volatilización total del compuesto a estudiar:

Peso de la cámara total sin compuesto: 10,308g. Peso de 60 $\mu$ l del compuesto a ser estudiado a los diferentes tiempos de exposición (h):

$T_0=10,364g$ ;  $T_1= 10,360g$ ;  $T_2= 10,349g$ ;  $T_3= 10,345g$ ;  $T_4= 10,345g$ ....  $T_{24}= 10,310g$ .

Por lo mencionado arriba, podemos decir que el sistema de cámara cerrada permitió durante todo el período de exposición, la liberación progresiva de la sustancia en estudio. Los datos de mortalidad de los huevos tratados fueron registrados a los 5 días posteriores a la eclosión de los controles. El criterio de mortalidad considerado fue cuando los huevos permanecieron con el opérculo cerrado o cuando los huevos tenían el opérculo abierto y la ninfa estaba dentro de estos (Mougabure Cueto et al. 2006b).

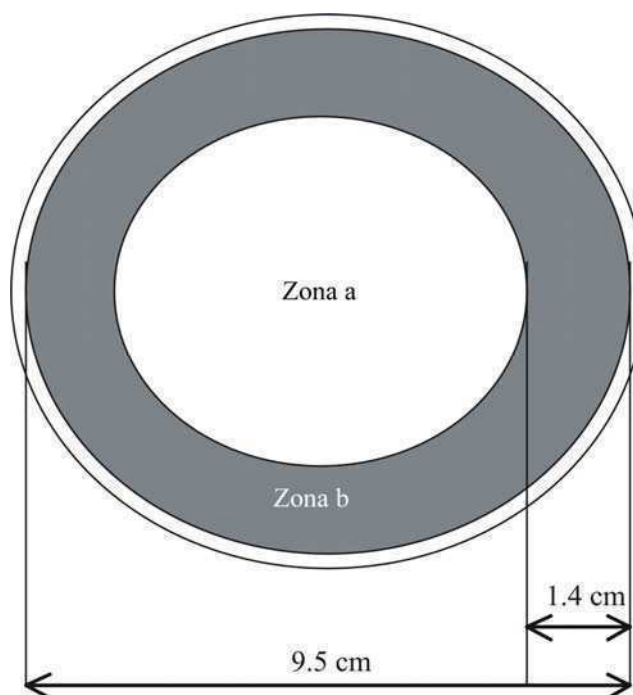


**Figura 11.** Cámara cerrada para estudiar la actividad fumígena de los monoterpenoides en huevos de piojos de la cabeza.

### 3.3.4. Actividad repelente

La actividad repelente fue estudiada en una arena experimental que consistió de un aro de vidrio (de 100 mm de diámetro y de 50mm de alto) colocado sobre un papel de filtro (Whatman No.1, 110 mm de diámetro), que ha sido dividido en una zona circular interna (zona a) y una externa (zona b), ambas con iguales áreas. Las arenas tratadas recibieron 0,5 ml de la solución a estudiar diluida en acetona (50 mg/ml) aplicada sobre la zona b, en una concentración final de 0,7 mg/cm<sup>2</sup> del papel (**Figura 12**). El control consistió en que ambas arenas estuvieran tratadas con acetona solamente. El compuesto químico piperonal fue usado como control positivo ya que se ha reportado que tiene un buen efecto repelente sobre piojos de la cabeza por Burgess (1993).

Para evaluar el efecto repelente de los compuestos se usó la orientación de los piojos. Un grupo de 15 piojos fue liberado dentro del centro de la zona a de cada arena experimental. En los controles negativos se observó que el  $86 \pm 6\%$  de los piojos liberados se dirigían de forma natural hacia la zona b y permanecían en contacto cercano con el aro de vidrio. Este fenómeno se conoce como tigmotaxis. La repelencia de la sustancia en estudio en la zona b fue estudiada como la reducción en la dispersión de los insectos desde la zona a la zona b. El índice de repelencia (IR) para cada aceite esencial o compuesto fue calculada como el porcentaje de repelencia producido en la zona b y fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:  $IR = [(N_c - N_t) / N_c] * 100$ , donde  $N_c$  es el número de piojos presentes en la zona b del control y  $N_t$  es el número de piojos presentes en la zona b del tratado. Los tratamientos y el control fueron replicados tres veces, y el número de piojos presentes en ambas zonas fue registrado mediante observación visual durante 5 minutos por el término de 1 hora.



**Figura 12.** Área usada para estudiar repelencia de los AEs y de los monoterpenoides.

### 3.3.5. Medición enzimática de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE)

#### 3.3.5.1. Síntomas de intoxicación

De manera de comparar los efectos tóxicos entre el monoterpenoide 1,8-cineol y un conocido insecticida anticolinesterásico como el DDVP (diclorvos) se

realizaron experimentos para estudiar y cuantificar la secuencia y el tiempo de aparición de los síntomas de intoxicación de los piojos de la cabeza con los vapores de los mencionados insecticidas. La exposición a los vapores en el estudio *In vivo* fue realizada debido a las características altamente volátiles de las sustancias estudiadas.

En primer lugar se identificaron los síntomas progresivos de cada piojo en forma individual durante la exposición continua a los vapores del DDVP y del 1,8-cineol. Luego, grupos de 10-15 piojos fueron expuestos a los vapores de los insecticidas mencionados y se registró el porcentaje de insectos con síntomas cada 5 minutos. Se observaron los siguientes síntomas: excitación (el insecto aumentó su actividad locomotora pasando desde el estado de excitación a hiperexcitación), incoordinación (se afectó la actividad locomotora), y volteo (todas las patas del insecto se vieron afectadas por movimientos convulsivos y el insecto permaneció sobre su dorso). Para ambos experimentos, se empleó la metodología de la cámara cerrada utilizada para estudiar el efecto de los vapores de los aceites esenciales y de sus componentes que es mencionada en esta tesis.

#### 3.3.5.2. Ensayos de inhibición y actividad de acetilcolinesterasa

La actividad de AChE fue determinada por una modificación del método de Ellman et al. (1961). Este método espectrofotométrico y cinético consiste en el empleo de un sustrato que es el acetato de tiofenol (PTA). Este compuesto producido por la hidrólisis enzimática del PTA reacciona con el 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoato de sodio (DTNB, reactivo color) generándose el anión 5-tio 2-nitrobenzoato que da color amarillo. Se trata de un método cinético ya que la actividad es determinada por el aumento del tiofenol a lo largo del tiempo de lectura.

La absorbancia fue medida a 415 nm en micro placas de 96 celdas de base cuadrada (Greiner- bio one, USA), usando un lector fotométrico de microplaca (modelo 680XR, Bio-Rad). La eserina fue empleada como control positivo en los ensayos *In vitro* debido a su conocida acción anticolinesterásica.

Se estudió el efecto producido por veinte de los monoterpenoides estudiados en esta tesis sobre la inhibición de la AChE (**Figura 13**).

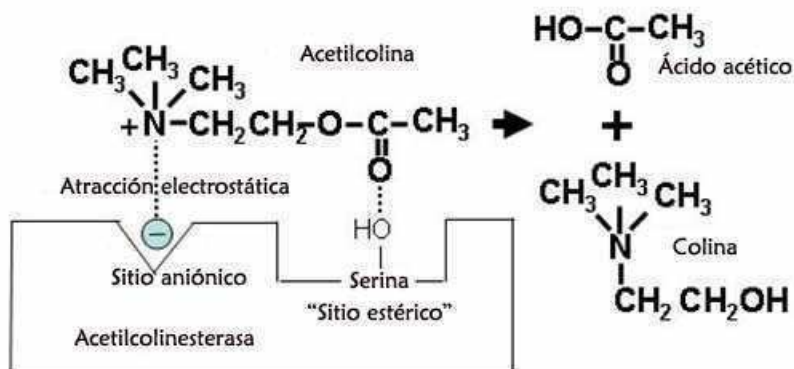


Figura 13. Reacción química producida por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

Para ello se empleó la enzima AChE de anguila eléctrica. Las concentraciones empleadas fueron de  $10^{-1}$  M para los monoterpénoides y de  $10^{-4}$  M para la eserina.

Dada la gran efectividad mostrada en los estudios de actividad fumígena y de inhibición de la AChE de anguila eléctrica del monoterpénoides 1,8-cineol, se procedió posteriormente a estudios complementarios acerca de la inhibición de AChE.

La concentración de inhibición al 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) fue establecida usando las enzimas AChEs de anguila eléctrica y la extraída a partir de los homogenatos de piojos de la cabeza para el 1,8-cineol solamente.

Con respecto a los ensayos de inhibición de AChE, se usó  $40 \mu\text{l}$  de la solución stock de la AChE proveniente de anguila eléctrica como del homogenato de piojos (o de buffer fosfato en el caso de los controles). La misma fue incubada junto con  $4 \mu\text{l}$  de la solución stock de eserina o del monoterpénoides (o de EtOH en el caso de los controles) por 10 minutos a temperatura ambiente. Las concentraciones de los reactivos en el mix ( $44 \mu\text{l}$ ) fue de: 1,21 UE/ml para la AChE,  $0,9 \times 10^{-1}$  M para los monoterpénoides, de  $0,9 \times 10^{-5}$  M a 0,45 M para el 1,8-cineol y de  $10^{-8}$  M a  $10^{-2}$  M para la eserina. Luego de la incubación se agregaron  $40 \mu\text{l}$  de la solución stock del cromógeno (DTNB) y la reacción comenzó con la incorporación de  $40 \mu\text{l}$  de la solución stock del sustrato (ATC). Las concentraciones de DTNB y de ATC en el mix final ( $124 \mu\text{l}$ ) fueron respectivamente de  $1,1 \times 10^{-4}$  M y de  $0,5 \times 10^{-3}$  M. Inmediatamente a esto, se procedió a la lectura de la absorbancia durante 3 minutos (10 mediciones cada 20 segundos) para la AChE de anguila eléctrica o por 10 minutos (10 mediciones por minuto) en el caso del homogenato de piojos. La absorbancia medida

durante este tiempo fue en todos los casos una función lineal. Los controles fueron realizados reemplazando la AChE por el buffer fosfato y los inhibidores (eserina o los monoterpénoides) por EtOH. Se realizó un mínimo de tres réplicas por dilución enzimática (monoterpénicoide o eserina) y los controles fueron incluidos para corregir las hidrolasas no enzimáticas del sustrato.

El ensayo de inhibición *in vivo* fue realizado para estudiar si la intoxicación de los piojos por el 1,8-cineol estaba asociada con la inhibición de la AChE. El DDVP fue empleado como control positivo debido a su alta presión de vapor y por su conocida actividad insecticida basada en la inhibición colinesterásica. Grupos de 10-15 piojos fueron expuestos a los vapores del 1,8-cineol o del DDVP. Los tiempos de exposición para el 1,8-cineol fueron de 5, 10, 20 y 30 minutos, y para el DVP fueron de 30, 50, 75 y 90 minutos (grupos independientes fueron empleados cada vez). Los períodos de exposición fueron previamente seleccionados en base a los síntomas de intoxicación observados para el DDVP y para el 1,8-cineol. Las unidades experimentales fueron similares a las utilizadas en los experimentos de sintomatología. Luego de la exposición, los piojos fueron homogeneizados (10 piojos cada 150  $\mu$ l de buffer fosfato) y 40  $\mu$ l de homogenato (buffer fosfato en el caso de los controles) se mezclaron con 40  $\mu$ l de la solución stock del cromógeno (DTNB) y con 40  $\mu$ l de de la solución stock del sustrato (ATC) en la celda de la microplaca de medición. La lectura de la absorbancia se hizo a 415 nm durante 10 minutos (10 mediciones cada minuto). Las concentraciones de DTNB y de ATC en el mix final (120  $\mu$ l) fueron respectivamente de  $1,14 \times 10^{-4}$  M y de  $0,52 \times 10^{-3}$  M. El control de la exposición de los vapores fue realizado sin la adición de 1,8-cineol o de DDVP. El control de la inhibición del AChE consistió del reemplazo de homogenato de piojos por buffer fosfato. Los ensayos con cada compuesto (1,8-cineol o DDVP) fueron realizados como mínimo por triplicado.

### **3.3.6. Rol de las oxidasas de función mixta (OFM) de los piojos *P.h.capitis* y *P.h.humanus* en la degradación de los compuestos 1,8-cineol y diclorvos (DDVP)**

Se topicaron ninfas III y adultos de piojos de la cabeza pertenecientes a las poblaciones arriba mencionadas con una jeringa Hamilton de 5 $\mu$ l, permitiendo de esta manera aplicar sobre el abdomen dorsal de cada insecto 0,1  $\mu$ l de concentraciones crecientes de PBO diluidas en acetona que variaban en un rango de 0,0014M-0,14M. El control consistió de la aplicación tópica de acetona solamente. Luego de esto, se dejaron a los piojos topicados durante 30 minutos

en una cámara ambiental a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y a  $75 \pm 5 \%$  de humedad relativa en contenedores de plásticos cerrados conteniendo una solución acuosa saturada de NaCl. Este tiempo fue determinado como el adecuado ya que permitió que los piojos pudieran metabolizar el PBO sin verse afectado su comportamiento y vitalidad (dosis subletales). Luego de pasado este tiempo, los piojos fueron expuestos a los vapores del monoterpenoide 1,8-cineol o del compuesto organofosforado DDVP siguiendo la misma metodología descrita previamente en esta tesis para el estudio de la fase vapor de compuestos.

### 3.4. Análisis estadístico

#### 3.4.1. Epidemiología

Los datos fueron comparados usando tabulación cruzada empleando el test de chi- cuadrado para estudiar las relaciones bivariadas entre la variable dependiente (prevalencia de piojos) y las variables independientes. La significancia estadística fue considerada para un  $P < 0,05$ . Para todos los cálculos de las ocho escuelas se consideró el porcentaje promedio.

#### 3.4.2. Resistencia

Los resultados obtenidos de las series de evaluación dosis/ respuesta (mortalidad) fueron utilizados para determinar la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) para cada población. Se realizó la corrección de mortalidad de controles mediante la fórmula de Abbott (1925). La  $DL_{50}$  es la dosis que mata el 50% de los individuos de una población. El cálculo de este valor fue realizado mediante el análisis de regresión Probit (Litchfield & Wilcoxon 1949). El software empleado para dicha medición fue el Polo PC Plus (LeOra 2002). Las dosis fueron expresadas como ng/insecto. Los grados de resistencia (GR) con 95% IC para el insecticida fueron obtenidos según el cálculo del cociente de dosis letal, de acuerdo a Robertson & Preisler (1992) para determinar diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 3.4.3. Actividad fumígena

##### 3.4.3.1. Estadios postembrionarios

Las frecuencias de volteo para cada aceite esencial y/o componente fueron sujetas a un análisis de regresión probit para estimar el tiempo de volteo (en minutos) necesarios para que se vean afectados el 50% de los individuos expuestos  $TV_{50}$  (Litchfield & Wilcoxon 1949). El software empleado para dicha medición fue el Polo PC Plus (LeOra 2002). Cuando los piojos se expusieron a un compuesto o aceite determinado y no mostraron síntomas de intoxicación dentro de 1 hora, el tiempo de volteo fue registrado como  $TV_{50} > 60$  minutos y fueron excluidos de los análisis estadísticos posteriores. Luego de que los datos de volteo fueron registrados, se realizó una regresión lineal múltiple para estudiar las relaciones entre las variables:  $TV_{50}$  de los compuestos efectivos, presión de vapor de los mismos ( $V$ ) ( $V$  es la temperatura en  $^{\circ}C$  en las que las presiones de vapor son de 1mm Hg), y el cociente de partición octanol-agua ( $\log P$ ) (Lide 1990).

#### 3.4.3.2. Huevos

Todos los datos de mortalidad fueron corregidos con la mortalidad de los controles empleando la fórmula de Abbott (1925). Se determinó el porcentaje de mortalidad y se realizó una transformación de raíz cuadrada del arcoseno para realizar un análisis de la varianza (ANOVA). Las medias de los tratamientos fueron comparadas y su separación fue realizada mediante el test de Duncan considerando a  $P < 0,05$ . Se realizó un análisis de regresión para estudiar la relación de la comparación entre los valores de volteo de los adultos  $TV_{50}$  (min) y los porcentajes de mortalidad de los huevos- % mortalidad-. Todos los test estadísticos realizados fueron realizados considerando una significancia de un  $\alpha = 0,05$ .

#### 3.4.4. Actividad repelente

Se consideró repelencia cuando los índices de repelencia (IRs) fueron significativamente mayores a cero  $IR > 0$ . Aquellos componentes o aceites cuyos errores estándares (ES) eran iguales o excedían a la media de sus propios índices de repelencia (IRs) fueron excluidos de los análisis estadísticos posteriores. Los IRs de los AEs o de los componentes fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), y las medias fueron separadas mediante el análisis LSD (Statistica 99, StatSoft, Tulsa, OK).



### 3.4.5. Medición de actividad de acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad enzimática fue calculada por la pendiente del análisis de regresión lineal entre los datos de absorbancia y las mediciones en el tiempo. La inhibición de las enzimas fue expresada como el porcentaje de actividad remanente en relación con el control sin los inhibidores menos 100. Los valores de inhibición de los diferentes monoterpenoides fueron analizados mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), y a los resultados que difirieron significativamente ( $P < 0,05$ ) se les realizó el test de Duncan (Statística 99, Statsoft, Tulsa, OK). Los valores de  $CI_{50}$  (concentración de inhibidores requeridos para producir el 50% de la actividad de AChE) fueron calculados gráficamente de la curva de concentración de inhibición-respuesta.

### 3.4.6. Rol de las OFM de *P.h.capitis* y *P.h.humanus* en la degradación de los insecticidas 1,8-cineol y diclorvos (DDVP)

El análisis estadístico empleado para calcular las diferencias entre las diferentes concentraciones topicadas de PBO y la posterior exposición a los vapores del monoterpenoide 1,8-cineol fue el mismo que se utilizó para calcular los valores del tiempo de volteo  $TV_{50}$  de la actividad fumígena de los aceites esenciales y/o componentes mencionado anteriormente.

# Resultados y Discusiones parciales

## 4. Resultados y discusiones parciales

### 4.1. Epidemiología

#### 4.1.1. Resultados

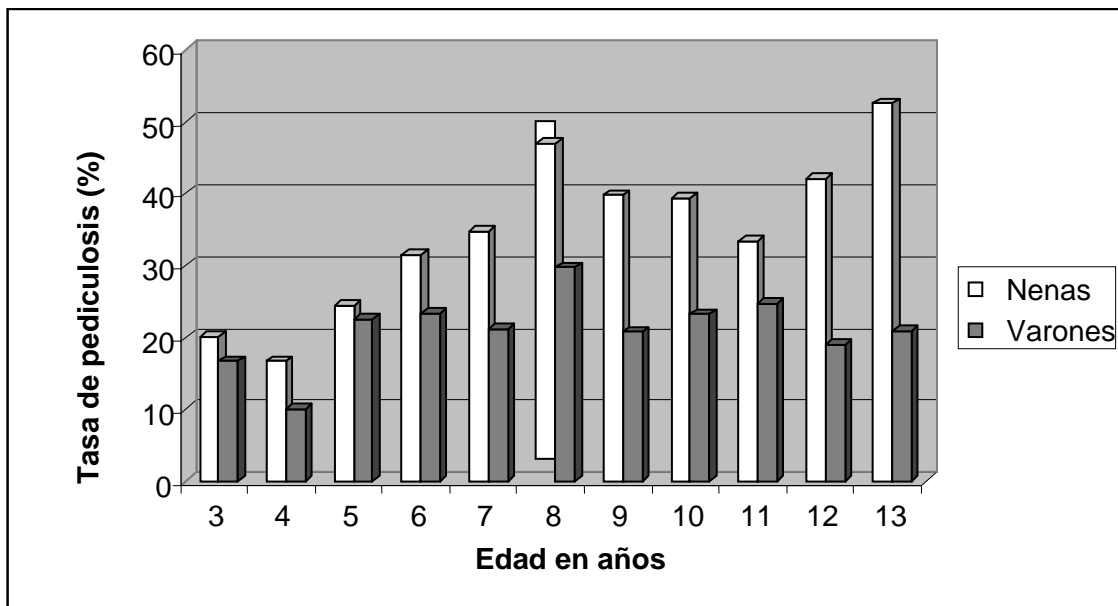
La presencia de piojos o pediculosis fue observada en todas las escuelas estudiadas, con una tasa promedio de infestación del 29,7%. Las niñas estuvieron significativamente más infestadas con piojos que los varones, con valores de infestación de 36,1% y 26,7% respectivamente ( $P < 0,0001$ ; **Tabla 18**).

Con respecto al permiso de los padres para realizar este estudio, podemos decir que más del 98% de los chicos tuvieron dicho permiso, pudiéndose tener una muestra representativa de cada escuela. Cuando se quiso incorporar la variable longitud de pelo a dicho análisis se registró que la mayoría de las niñas tenían pelo largo ( $n=960$ ) y que los varones tenían en su gran mayoría pelo corto ( $n=885$ ). Por lo tanto, no fue posible analizar la relación entre el grado de infestación y el largo del pelo (ya que si se hubiera realizado las conclusiones hubieran estado sesgadas hacia las características más numerosas). Solamente 42 de las niñas infestadas con piojos (12%) y 23 de los varones con piojos (11,4%) poseyeron más de 10 piojos en su cabeza. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre género ( $\chi^2=0,04$ ;  $P=0,85$ ). En relación al número total de chicos examinados, los chicos infestados con más de 10 piojos en su cabeza representaban el 4,3% y el 2,6% de los infestados respectivamente. En este caso se encontraron diferencias significativas ( $\chi^2=4,12$ ;  $P=0,04$ ).

**Tabla 18.** Prevalencia de la infestación de piojos entre diferentes sexos.

Género	No.	No.	% con piojos	$\chi^2$	Valor $P$
	Chicos examinados	Chicos con piojos			
Niñas	970	350	36,08	-	-
Varones	886	201	22,67	-	-
Total	1856	551	29,69	39,81	0,0001

La prevalencia de infestación por edad encontrada en niñas varió desde un 16,7% para las de 4 años hasta un 52,6% para las de 13 años. Con respecto a los varones, la infestación por edad varió de un 10% en los de 4 años hasta un 29,8% en los de 8 años (**Figura 14**). Sin embargo la proporción de chicos infestados- tanto niñas como varones- en cada grupo de edad no difirió significativamente uno de otro (**Tablas 19 y 20**).



**Figura 14.** Prevalencia de la infestación con piojos de la cabeza en diferentes grupos de edad (incluyendo nenas y varones juntos).

**Tabla 19.** Grado de pediculosis entre nenas.

Edad	No. Chicos examinados	No. Chicos con piojos	% con piojos
3	25	5	20,0
4	54	9	16,67
5	45	11	24,44
6	146	46	31,51
7	112	39	34,82
8	151	71	47,02
9	108	43	39,81
10	127	50	39,37
11	126	42	33,33
12	57	24	42,10
13	19	10	52,63
$\chi^2$			18,10
Valor <i>P</i>			0,053

**Tabla 20.** Grado de pediculosis entre varones.

Edad	No. Chicos examinados	No. Chicos con piojos	% con piojos
3	18	3	16,67
4	40	4	10
5	31	7	22,58
6	124	29	23,39
7	99	21	21,21
8	141	42	29,79
9	130	27	20,77
10	95	22	23,16
11	105	26	24,77
12	79	15	18,99
13	24	5	20,81
$\chi^2$			7,31
Valor <i>P</i>			0,695

La tasa de infestación con piojos de la cabeza entre las diferentes escuelas varió desde un 19,12% hasta un 42,74% (**Tabla 21**).

**Tabla 21.** Infestación de piojos de la cabeza entre escuelas.

Escuela	No. Chicos examinados	No. Chicos con piojos	% con piojos
1 (FM)	165	39	23,64
2 (LP)	387	74	19,12
3 (RT)	183	64	34,97
4 (GH)	578	178	30,79
5 (HL)	80	25	31,25
6 (HB)	94	31	32,98
7 (RG)	245	87	35,51
8 (E14)	124	53	42,74

#### 4.1.2. Discusión

La tasa de infestación promedio del 29,7% reportada en esta tesis nos revela la gran problemática que presentan los piojos de la cabeza en las escuelas de Buenos Aires. Este valor hallado está muy por encima del valor de infestación del

5%, que es cuando se considera que *P.h.capitis* adquiere importancia epidémica (Clóre 1988). Además, debemos mencionar que todas las escuelas estudiadas tenían en promedio valores por encima de éste. Esto indica que la pediculosis es muy común en las escuelas primarias y hogares de Buenos Aires. Este valor es similar a los reportados por diferentes autores en estudios previos a la detección de resistencia a piretroides en piojos de la cabeza en Buenos Aires. Por ejemplo, Castro et al. (1994) encontraron que los valores de pediculosis en la Provincia de Buenos Aires variaron desde el 12% hasta el 56,8% con una media anual del 38,04%. Además, Perotti et al. (2004) encontraron que el 29,8% de los chicos examinados en la Provincia de La Rioja tenían al menos un individuo vivo del piojo de la cabeza. Una tasa promedio de infestación superior fue encontrada por Doucet et al. (1997) en escuelas primarias de la Provincia de Córdoba.

Nuestro estudio muestra que las niñas están más infestadas con piojos que los varones. Estos valores son similares a los valores de infestación promedio de 37,82% y de 53,07% reportados para el año 1993 para Argentina por Doucet et al. (1997). Esta tendencia se halla presente en muchos países tales como el Reino Unido, Australia, Sudáfrica, Turquía y Brasil (Downs et al. 1999; Speare & Buettner 1999; Govere et al. 2003; Kocuturk et al. 2003; Heukelbach et al. 2005). Esto puede llegar a ser explicado por el hecho de que las niñas tienden a estar más tiempo jugando en contacto cercano entre ellas que los varones (quienes tienen a realizar actividades deportivas o juegos más violentos). Esta diferencia de comportamiento entre niñas y varones es de gran importancia ya que el contacto cabeza con cabeza es la vía principal de transmisión, aunque también hay que considerar la transferencia pasiva que involucra el compartir peines, gorros, toallas y vinchas que pudieran haber estado infestadas con algún estadio de piojo (Takano-Lee et al. 2005).

Por todo lo mencionado anteriormente podemos afirmar que la pediculosis es un serio problema sanitario que afecta a la mayoría de los chicos en edad escolar y genera malestar en los familiares de estos. Existen numerosos autores a lo largo del mundo que han estudiado los niveles de infestación de piojos de la cabeza. Por ejemplo, se han encontrado en países tales como Israel, Australia, Sudáfrica, Polonia, Brasil, el Reino Unido y Gaza valores de infestación que variaron desde un 0,48% hasta un 43,4% (Rosenfeld et al. 1993; Speare and Buettner 1999; Govere et al. 2003; Buczed et al. 2004; Heukelbach et al. 2005; Thomas et al. 2006; Al-Shawa 2006). Además, la incorporación de datos colectados de colegios o poblaciones enteras dentro de modelos matemáticos epidémicos tal como el realizado por Stone et al. (2008) permitirán predecir y comprender con mayor profundidad la dinámica de infestación de los piojos de la cabeza.

A pesar de que en las escuelas públicas de Argentina no está actualmente implementada la política de exclusión de piojos o liendres, en la mayoría de los casos las maestras y/o autoridades escolares notifican a los padres o tutores por medio de una nota escrita indicándoles que los chicos tienen piojos y que deben proceder con un tratamiento pertinente. Las diferencias de infestación encontradas en esta tesis en las diferentes escuelas pueden ser explicadas por las diferentes estrategias para combatir la pediculosis llevada a cabo por los padres o tutores para erradicar a los piojos.

## 4.2. Resistencia a permetrina

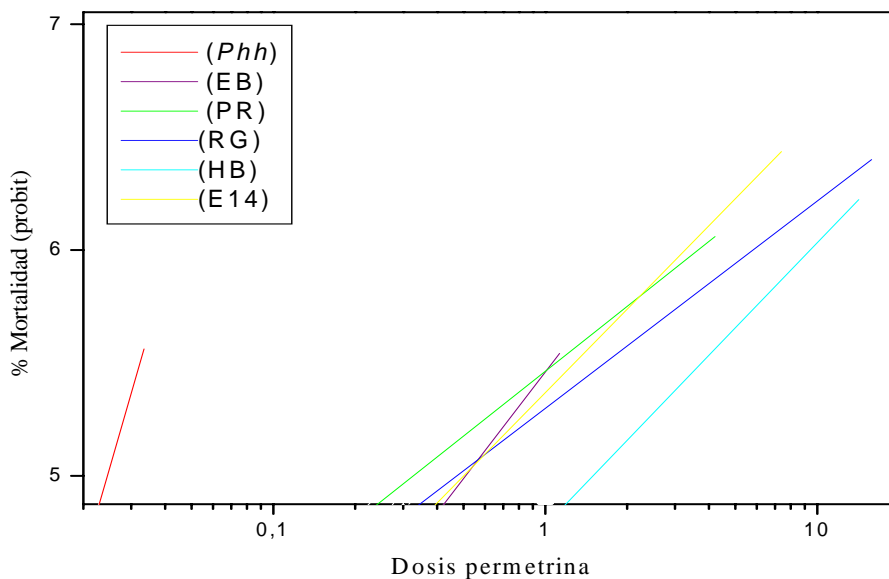
### 4.2.1. Resultados

Los resultados de las dosis letales 50 ( $DL_{50}$ ) y sus respectivos grados de resistencia (GRs) obtenidos del bioensayo de tóxico de permetrina sobre 5 poblaciones de *P.h.capitis* provenientes de escuelas de Buenos Aires se pueden ver en la **Tabla 22**. En todas las poblaciones estudiadas se encontró resistencia a la permetrina. Los valores de  $DL_{50}$  de las poblaciones estudiadas variaron desde 69,7 (ng/i) hasta 168,9 (ng/i). La población con el grado de resistencia más elevado fue HB con un valor de 71,42. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre todas las poblaciones estudiadas ( $P < 0,05$ ). Los valores de grado de resistencia obtenidos- en comparación con una población susceptible de laboratorio (de referencia) de *P.h.humanus*- estuvieron comprendidos entre 28,57 y 71,42 (**Figura 15**).

**Tabla 22.** Estados postembrionarios de *P.h.humanus* y *P.h.capitis*. Pendiente de curva dosis-respuesta,  $DL_{50}$  y niveles de resistencia a permetrina.

Población	n	Pendiente $\pm$ ES	$DL_{50}$ (ng/insecto) (95% IC)	Grado de resistencia (95% IC)
<i>P.h.humanus</i>	55	4,28 $\pm$ 1,09	2,4 (1,9-3,8)	-
<i>P.h.capitis</i>				
EB	133	2,72 $\pm$ 0,81	69,7 (31,5-105,2)	28,57 (16,39-50,0)
PR	148	1,41 $\pm$ 0,45	85,4 (24,4-178,1)	35,37 (15,87-76,92)
RG	278	0,91 $\pm$ 0,21	98 (19,2-268,2)	40 (19,23-83,33)
HB	186	1,66 $\pm$ 0,27	168,9 (34,4-504,8)	71,42 (40,0-125,0)
E14	302	1,38 $\pm$ 0,23	80,2 (13,4-223,5)	33,33 (18,86-58,82)





**Figura 15.** Curva dosis-respuesta para permetrina en piojos adultos.

#### 4.2.2. Discusión

El insecticida permetrina fue empleado en Argentina por primera vez en el año 1990 y su detección en las poblaciones de campo de Buenos Aires (en este caso las escuelas) fue realizada en el año 1997 (Picollo et al. 1998). Subsecuentes trabajos realizados en nuestro laboratorio, el CIPEIN, determinaron que la resistencia estaba ampliamente distribuida en las escuelas primarias y hogares de Buenos Aires (Picollo et al. 2000; Vassena et al. 2003). Además los estudios realizados utilizando sinergistas, junto con la fuerte correlación hallada entre la actividad enzimática del citocromo P450 y la dosis letal  $LD_{50}$  de permetrina indicaron que las monooxigenasas del citocromo P450 jugaban un rol importante (aunque no principal) en la resistencia a piretroides de las poblaciones estudiadas (González Audino et al. 2005).

Con respecto a las poblaciones analizadas en la presente tesis debemos mencionar que RG presentaba en el año 2002 un grado de resistencia a permetrina (en promedio) de 68,6 (González Audino et al. 2005). El valor promedio de resistencia reportado en esta tesis para la misma población fue de 40. Sin embargo, si comparamos los intervalos de confianza podemos ver que estos se superponen y no existen diferencias significativas en el grado de resistencia entre los años 2002 y 2009. Esto nos daría una idea de que la presión de selección en esta población se ha mantenido casi de la misma manera que en

años precedentes (a pesar de la disminución en el mercado de productos pediculicidas con permetrina) o bien que la dinámica de reversión de la resistencia es lenta. Por otro lado, cuando comparamos la población de HB podemos mencionar que en el año 2001 el grado de resistencia a permetrina era en promedio de 22,7 (Vassena et al. 2003), en el año 2003 de 47,2 (Mougabure Cueto et al. 2008) y en el año 2009 de 71,2. Los intervalos de confianza de esta tesis se superponen únicamente con los del año 2003. En esta población parecería que ha habido un aumento entre el año 2001 y el 2009. Ahora bien, algo interesante de saber sería el rol de las enzimas degradativas en la detoxificación de estas poblaciones a la permetrina. Desafortunadamente, no contamos con esa información pero seguramente la frecuencia de monooxigenasas dependientes del citocromo P450 haya aumentado a lo largo de todos estos años.

Con respecto a las demás poblaciones mencionadas en esta tesis- EB, PR y E14- tenemos que mencionar que fue la primera vez que se determinó el grado de resistencia a permetrina y que sus niveles estarían en un nivel medio de resistencia (en comparación con los datos determinados en años anteriores).

Como fue mencionado por Burgess (2004), los niveles de resistencia a los distintos insecticidas empleados para su control están aumentando (o manteniéndose de manera similar) en diferentes partes del mundo. Con respecto a la resistencia a permetrina debemos mencionar que la misma está dada por insensibilidad nerviosa, i.e., alteraciones en los canales de voltaje dependientes de sodio. Por ejemplo, en poblaciones de piojos de Estados Unidos, el Reino Unido y Japón se detectaron tres mutaciones puntuales (M815I, T929I y L932F) en la subunidad  $\alpha$  de los canales de sodio voltaje dependientes (Lee et al. 2000, 2003; Gao et al. 2003; Tomita et al. 2003). Además, se relacionaron los datos toxicológicos con la presencia y frecuencia de las mutaciones del tipo *kdr* en las poblaciones de Texas, Florida y California (Lee et al. 2003; Yoon et al. 2004). La conexión entre resistencia y mutaciones del tipo *kdr* también fue encontrada en poblaciones de piojos de Dinamarca (Kristensen et al. 2006).

Estudios preliminares realizados en el Departamento de ciencias veterinarias y animales, en la Universidad de Massachusetts, sobre la población argentina HB han demostrado individuos homocigotas recesivos *SS* y *RR* con tres mutaciones puntuales del tipo *kdr*: M815I, T917I y L920F. La primera de ellas (M815I) está ubicada en el loop extracelular del dominio IIS1-2, y las restantes en el segmento transmembrana del dominio IIS5 de la subunidad  $\alpha$  del canal de sodio voltaje dependiente. Como fue determinado por Lee et al. (2003), estas tres mutaciones

se encuentran en bloque como un haplotipo en ciertas poblaciones de piojos resistentes a permetrina.

Estás fueron medidas mediante la técnica SISAR (en inglés, Serial invasive signal amplification reaction) empleando fragmentos de ADN amplificados con PCR, tal cual fue descrita por Kim et al. (2004) (Hilliary Hodgdon 2007, comunicación personal-datos no publicados-).

### 4.3. Actividad fumígena

4.3.1. Efectividad biológica de los aceites esenciales sobre poblaciones de piojos con grados de resistencia diferencial.

#### 4.3.1.1. Resultados

Para este punto se eligieron poblaciones de piojos con grados de resistencia diferenciales (alto, medio y bajo) para poder discernir si existe alguna relación entre la actividad biológica de los AEs y el grado de resistencia.

La efectividad de los vapores de los aceites esenciales de *E. viminalis*, *E. saligna* y *E. tereticornis* sobre diferentes poblaciones de piojos se puede observar en la **Tabla 23**. Dentro de cada AE no se hallaron diferencias significativas entre los valores de  $TV_{50}$  de las poblaciones de piojos estudiadas. Los tiempos de volteo ( $TV_{50}$ ) para los aceites esenciales de *E. viminalis*, *E. saligna* y *E. tereticornis* de las distintas poblaciones variaron respectivamente desde 16,46 hasta 19,94 min; 17,09 hasta 19,06 min.; y desde 23,98 hasta 27,66 min. Con respecto a los piretroides permetrina y d-fenotrina tenemos que mencionar que ninguna de las poblaciones fue susceptible a los vapores de estos compuestos ( $TV_{50} > 60$  minutos). Esto es debido a que la presión de vapor de ambos compuestos es baja en comparación con la del aceite esencial (Ej: PV permetrina = 0,045mPa, PV d-fenotrina = 0,0187mPa).

**Tabla 23.** Actividad fumígena de AEs estudiados en piojos de la cabeza provenientes de escuelas con grados de resistencia diferentes.

Población	TV <sub>50</sub> (min) <sup>b</sup> (95% IC)				
	D-fenotrina	Permetrina	<i>E.viminalis</i>	<i>E.saligna</i>	<i>E.tereticornis</i>
GH <sup>a</sup>	>60	>60	16,56 (13,91-18,67)	19,06 (16,98-21,23)	23,98 (21,19-26,58)
RT <sup>a</sup>	>60	>60	19,94 (16,55-22,75)	17,09 (14,45-19,31)	- <sup>c</sup>
HB	>60	>60	18,24 (15,95-20,51)	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
E 25 DE 1 <sup>a</sup>	>60	>60	16,46 (14,36-18,95)	18,21 (16,87-20,06)	27,66 (24,03-30,92)

<sup>a</sup> Grados de resistencia a permetrina calculados por Vassena et al. (2003). Grado de resistencia: GH= 655,2; RT= 373; E25 DE 1= 5,4.

<sup>b</sup> Los tiempos de volteo (TV<sub>50</sub>) fueron calculados empleando un número superior a 45 piojos por población.

<sup>c</sup> Sin datos.

#### 4.3.1.2. Discusión

Este es uno de los primeros trabajos en donde se analizan varias poblaciones de piojos con niveles de resistencia diferenciales y su toxicidad a los vapores de aceites esenciales. No hubo una relación entre la toxicidad de los vapores y el grado de resistencia a permetrina. Aparentemente, las poblaciones resistentes serían todas susceptibles a los vapores de los aceites esenciales de eucalipto estudiados en esta parte de la tesis. Cuando consideramos la composición química de los AEs mencionados arriba, tenemos que decir que el monoterpeno 1,8-cineol es el componente principal de los mismos, en proporciones que van desde 38% (*E. tereticornis*) hasta un 94% (*E. saligna*). Los trabajos realizados sobre piojos por otros autores no han considerado sobre la posibilidad de hallar diferencias entre las distintas poblaciones. Esto puede deberse en parte, por la dificultad de encontrar poblaciones con grados de resistencia bien marcados y de fácil acceso.

Yang et al. (2009) estudiaron el efecto del aceite esencial *Origanum majorana* y de sus componentes en dos poblaciones de *P.h.capitis*, una susceptible a insecticidas proveniente de Corea y otra resistente a los insecticidas permetrina y malatión, -con grados de resistencia respectivos de 3,6 y 3,7- originaria del Reino Unido. Si bien la metodología difirió de la nuestra (ya que se impregnaron papeles de filtro con el AE o los monoterpenos), podemos destacar que la toxicidad del aceite esencial de *O.majorana* y de siete de los compuestos

principales no difirió entre las poblaciones de piojos mencionadas, indicando una ausencia de resistencia cruzada en la población resistente. Por mencionar alguno de los compuestos, tenemos que los más efectivos sobre adultos de piojos de la cabeza fueron el (-)-alcanfor, seguido del linalol, el (-)-terpinen-4-ol y el  $\alpha$ -terpineol.

Por otro lado, cuando otros autores estudiaron la toxicidad fumígena del AE de *Eucalyptus globulus* y del componente principal 1,8-cineol sobre una cepa resistente al organofosforado clorpirifos-metilo y otra susceptible del insecto plaga de granos almacenados *Oryzaephilus surinamensis*, se pudo observar que existieron diferencias significativas con respecto a la efectividad de los compuestos. Por ejemplo, la cepa resistente fue 1,9 y 2,1 más tolerante que la cepa susceptible para el AE y el 1,8-cineol (Lee et al. 2000). A pesar de no indicar ninguna cita que permita corroborarlo, los autores mencionan que la cepa resistente al organofosforado es producto de un incremento en las enzimas degradativas monooxigenasas, esterasas y glutatión-S-transferasas.

Esta diferencia entre *P.h.capitis* (los resultados mostrados aquí junto con los de Yang et al. 2004) y *O.surinamensis* podría deberse a una diferencia en los mecanismos degradativos de especies con hábitos alimenticios diferentes a los monoterpenoides, ya que se sabe que la toxicidad de los mismos es especie dependiente (Isman 2000).

Cuando se estudió el efecto de los vapores de permetrina y d-fenotrina sobre una población de piojos colectados en Corea, Yang et al. (2003) encontraron que estos insecticidas no tuvieron efecto alguno luego de 300 min. de exposición. Esto está en concordancia con lo presentado en esta tesis, ya que estos mismos insecticidas sintéticos no produjeron volteo alguno ( $TV_{50} > 60$  min.) sobre las poblaciones estudiadas en esta parte de la tesis.

#### **4.3.2. Efectividad de los vapores de aceites esenciales y componentes sobre estadios postembrionarios**

##### **4.3.2.1. Actividad biológica de los aceites esenciales colectados en los años 2003-2004 sobre *P.h.capitis***

###### **4.3.2.1.1. Resultados**

Se encontraron diferencias significativas en la actividad fumígena sobre piojos de la cabeza de los aceites esenciales colectados en los años 2003 y 2004 (**Tabla 24**). Once de los aceites tuvieron propiedades fumígenas (i.e.  $TV_{50} < 60$ ), es decir

que el 69% de los AEs estudiados produjeron efecto alguno. Los niveles de actividad variaron entre las familias de las plantas donde estos fueron colectados. Si consideramos los valores de  $TV_{50}$  tenemos que mencionar que el aceite de la planta autóctona *Myrcianthes cisplatensis* fue claramente más efectivo, seguido de los aceites de plantas exóticas como *Eucalyptus cinerea*, *Eucalyptus viminalis* y *Eucalyptus saligna*. Los aceites de los miembros autóctonos y exóticos de la familia botánica Myrtaceae fueron los que mayor actividad pediculicida presentaron, con la excepción de *Eucalyptus citriodora* (**Figura 16**).

**Tabla 24.** Actividad fumígena de los AEs provenientes de diferentes plantas 2003-2004 en piojos de la cabeza.

Aceite esencial <sup>a</sup>	Actividad Fumígena <sup>b</sup>			
	Pendiente ± ES	TV <sub>50</sub> , min (IC) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	GI <sup>d</sup>
<i>Myrcianthes cisplatensis</i>	4,37 ± 1,13	1,29 (0,81-1,69)	3,50	7
<i>Eucalyptus cinerea</i>	4,45 ± 1,47	12 (5,80-15,60)	1,25	4
<i>Eucalyptus viminalis</i>	17,70 ± 5,37	14,90 (8,60-19,30)	0,15	7
<i>Eucalyptus saligna</i>	6,96 ± 1,39	17,39 (10,05-22,72)	20,65	9
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	10,18 ± 20,39	23,52 (20,90-25,95)	1,56	8
<i>Eucalyptus citriodora</i>	-	> 60	-	-
<i>Laurus nobilis</i>	8,24 ± 1,63	24,35 (21,07-27,51)	4,69	10
<i>Aloysia polystachia</i>	13,63 ± 3,90	23,43 (20,49-26,31)	2,74	10
<i>Acantholippia riojana</i>	-	> 60	-	-
<i>Minthostachys verticillata</i>	6,96 ± 1,45	39,36 (34,51-44,92)	2,83	10
<i>Mentha pulegium</i>	3,95 ± 1,36	57,70 (46,40-122,3)	2,45	8
<i>Origanum vulgare</i>	-	> 60	-	-
<i>Schinus areira</i>	7,97 ± 1,54	40,40 (36-44,80)	4,10	10
<i>Artemisia verlotorum</i>	4,54 ± 1,50	44,70 (35,2-64,80)	2,02	4
<i>Psila spartioides</i>	-	> 60	-	-
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	-	> 60	-	-

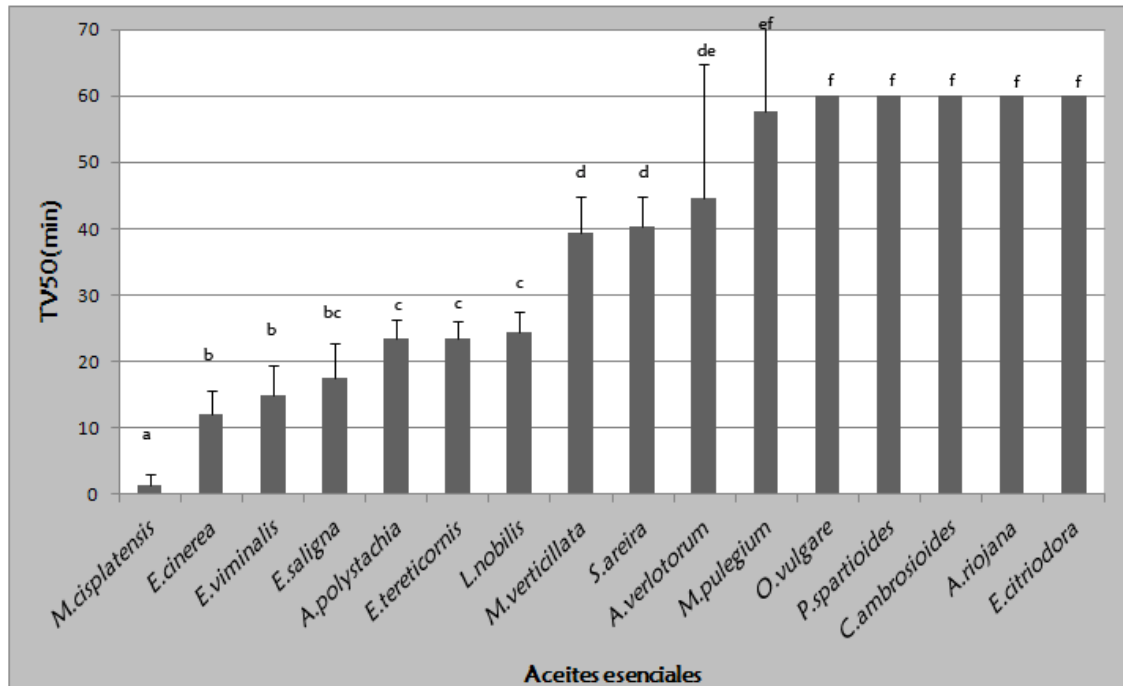
<sup>a</sup> AEs ordenados por familia botánica y dentro de ésta por efectividad decreciente.



<sup>b</sup> Dato estadístico del análisis probit obtenido de los estudios de volteo. Tres réplicas de 15 piojos cada uno (total 45) para cada AE, observado cada 5 min durante un período de 1h.

<sup>c</sup> tiempo de volteo del 50% de los individuos, LC= 95% del intervalo de confianza.

<sup>d</sup> gl= Grado de libertad.



**Figura 16.** Efecto fumígeno de los aceites esenciales colectados en los años 2003-2004. Letras distintas indican diferencias significativas a un  $P < 0,05$ .

#### 4.3.2.1.II. Discusión

Es interesante remarcar que fue la primera vez que los aceites esenciales autóctonos mostrados arriba se estudiaron como pediculidas en piojos de la cabeza resistentes a permetrina.

En este estudio resalta la rápida efectividad en el tiempo de volteo ( $TV_{50} = 1,29$  min.) del aceite esencial autóctono de *Myrcianthes cisplatensis*, el cual fue 9,3, 11,5, 13,5 y 18,2 veces más efectivo que los aceites esenciales exóticos respectivos de *E.cinerea*, *E.viminalis*, *E.saligna* y *E.tereticornis*. Un segundo patrón interesante hallado en este estudio fue la similitud que hubo en efectividad entre especies de plantas emparentadas taxonómicamente. Por ejemplo, todas las seis especies, excepto una (*E.citriodora*) de las plantas pertenecientes al género

Myrtaceae tuvieron aceites con vapores efectivos. Esto también fue cierto para dos de las tres especies de la familia Lamiaceae.

Reportes previos han mencionado el potencial de los vapores de los aceites esenciales como pediculicidas sobre *P.h.capitis* (Oladimeji et al. 2000; Lahlou et al. 2000; Yang et al. 2003, 2004). Para comparar tenemos que considerar lo hallado por Yang et al. (2004), quienes emplearon un método de exposición similar al mostrado en esta tesis, y hallaron un  $TV_{50}$  de 6,2 min para el aceite esencial de *E.cinerea*, con valor similar al reportado en esta tesis.

Además, el trabajo realizado por Lahlou et al. (2000) reveló una alta actividad pediculicida (90 % de los individuos estaban muertos dentro de los 60 minutos de exposición) de los aceites esenciales *Mentha pulegium*, *Chenopodium ambrosioides* y *Eucalyptus citriodora* cuando piojos de la cabeza fueron expuestos a los vapores de los mismos en una cámara cerrada de forma similar a la empleada en esta tesis y con una cantidad similar de aceite esencial. En esta tesis, no hubo volteo de los piojos cuando fueron expuestos a los vapores de *Chenopodium ambrosioides* y *Eucalyptus citriodora* ( $TV_{50} > 60$  min.). Esta diferencia con el trabajo anterior puede ser debida a diferencias en la composición química de los AEs. Por ejemplo, el p-cimeno (27,2%) y el  $\alpha$ -terpineol (68,2%) son los componentes mayoritarios del AE de *Chenopodium ambrosioides* estudiado acá (Tabla 3), mientras que el estudiado por Lahlou et al. (2000) posee  $\alpha$ -pineno (10,3%),  $\alpha$ -felandreno (18,6%) y p-cimeno (17,70) y Limoneno (6%) entre otros. Algo similar ocurre con *Eucalyptus citriodora*, ya que en la Tabla 7 se puede ver que los componentes mayoritarios son el citronelal (76%), acetato de citronelilo (7,3) y el isopulegol (9%); mientras que el de los autores mencionados arriba posee citronelal (57,8%) y citronelol (7,6%). Esto nos permitiría decir que variaciones en la composición química de los componentes mayoritarios, como así también de las proporciones de los mismos y las interacciones con los compuestos minoritarios son los que determinan la efectividad del aceite esencial en su totalidad.

Por otro lado, Lucía et al. (2009) demostraron que los AEs de eucaliptos *E.cinerea*, *E.viminalis*, *E.saligna* y *E.tereticornis* tuvieron una gran efectividad de volteo sobre adultos del mosquito transmisor del dengue *Aedes aegypti*.

Aunque el AE *M. verticillata* produjo un moderado efecto pediculicida ( $TV_{50} = 39,36$  min), Palacios et al. (2009) encontraron que este aceite fue el más efectivo sobre moscas domésticas ( $CL_{50} = 0,5$  mg/dm<sup>3</sup>), aunque el aceite difirió un poco en la composición el estudiado en esta tesis.

Por lo mencionado anteriormente y antes de pasar a presentar los resultados de los demás aceites esenciales, es importante mostrar en primer lugar los resultados de la actividad biológica de los monoterpenoides, ya que son componentes principales de la mayoría de los AEs estudiados en esta tesis.

#### 4.3.2.2. Actividad biológica de los monoterpenoides sobre *P.h.capitis*

##### 4.3.2.2.1. Resultados

La actividad fumígena de los 26 monoterpenoides estudiados en esta tesis se observa en la **Tabla 25**. Como se puede observar, los componentes que resultaron ser los más efectivos fueron el 1,8-cineol y el anisol, con valores de  $TV_{50}$  de 11,1 y 12,7 respectivamente. Luego estuvieron los compuestos limoneno, 1S-(-)- $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, (+)- $\alpha$ -pineno, linalol, mentona,  $\alpha$ -pineno, pulegona,  $\beta$ -mirceno y alcohol bencílico. El  $TV_{50}$  del control positivo DDVP (un conocido fumigante) fue de 40,15 min y fue menos efectivo significativamente que los tres compuestos más efectivos, tales como el 1,8-cineol, el anisol y el limoneno (**Figura 17**).

Tabla 25. Efectividad de los monoterpenoides sobre adultos de *P.h.capitis*.

Clase química	Compuesto <sup>a</sup>	Actividad fumígena <sup>b</sup>			
		Pendiente ± ES	TV <sub>50</sub> (min) (95% IC) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	gl <sup>d</sup>
Éter	1,8-cineol	9,96 ± 3,47	11,10 (8,32-13,11)	0,07	2
	Anisol	9,067 ± 2,11	12,70 (10,80-14,40)	1,5	2
	Anetol	-	>60	-	-
	Eugenol	-	>60	-	-
Hidrocarburo	Limoneno	5,69 ± 1,35	27,20 (22-32,41)	3,7	7
	1S-(-)-α-pineno	3,20 ± 0,53	28,54 (19,89-43,35)	19,6	8
	β-pineno	5,87 ± 1,26	33,86 (28-39,61)	2,97	7
	(+)-α-pineno	2,35 ± 0,46	34,48 (25,39-53,93)	12,49	9
	α-pineno	2,09 ± 0,49	42,70 (31,50-62,20)	13,3	12
	β-mirceno	8,27 ± 1,52	48,90 (43,70-53,90)	4,23	12
	Terpineno	-	>60	-	-
Alcohol	Linalol	14,26 ± 2,84	37,73 (34,79-40,49)	3,52	10
	Alcohol bencílico	8,83 ± 2,43	59,72 (55-68,90)	2,21	10
	Borneol	-	>60	-	-
	Citronelol	-	>60	-	-
	(-)-mentol	-	>60	-	-
	Isomentol	-	>60	-	-
	(+)-mentol	-	>60	-	-

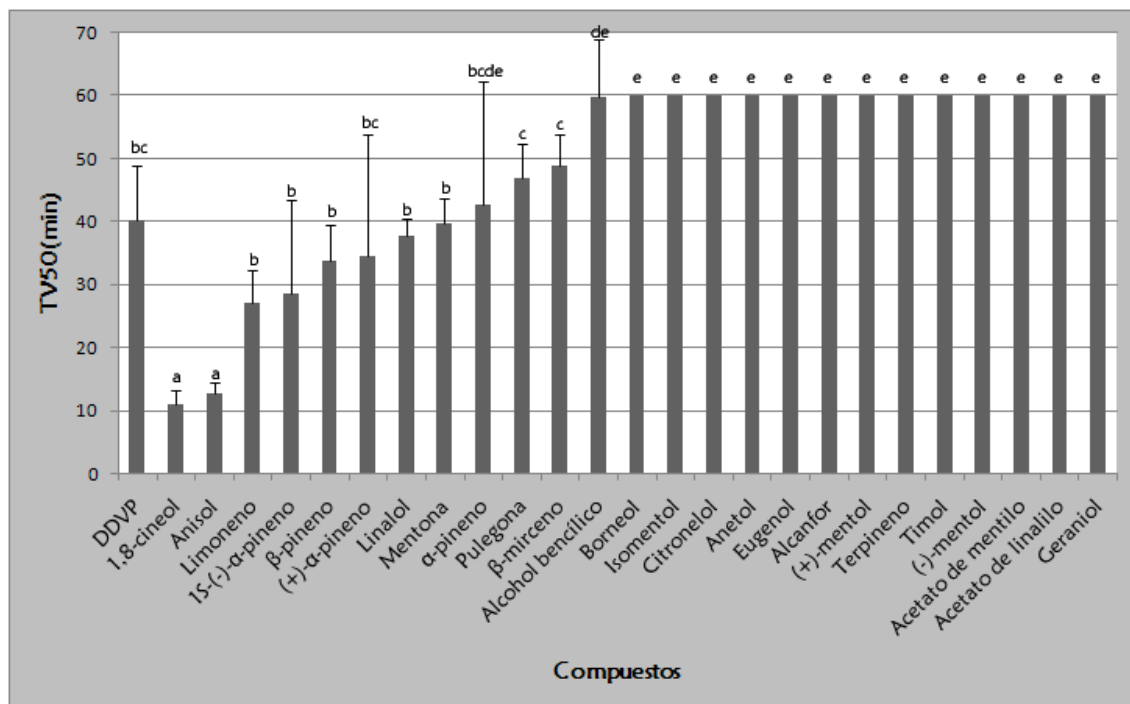
	Geraniol	-	>60	-	-
Cetona	Mentona	7,50 ± 1,27	39,70 (35,60-43,60)	6,38	10
	Pulegona	6,92 ± 1,36	46,93 (41,78-52,50)	3,05	11
	Alcanfor	-	>60	-	-
	Carvona	-	>60	-	-
Ester	Acetato de mentilo	-	>60	-	-
	Acetato de linalilo	-	>60	-	-
Fenol	Timol	-	>60	-	-
Control positivo	DDVP	3,93 ± 0,68	40,15 (34,63-48,86)	7,27	11

<sup>a</sup> Monoterpenos ordenados por clase química y dentro de esta por efectividad decreciente.

<sup>b</sup> Dato estadístico del análisis probit obtenido de los estudios de volteo. Tres réplicas de 15 piojos cada uno (total 45) para cada AE, observado cada 5 min durante un período de 1h.

<sup>c</sup> tiempo de volteo del 50% de los individuos, LC= 95% del intervalo de confianza.

<sup>d</sup> gl= Grado de libertad.



**Figura 17.** Actividad fumígena de los monoterpenos estudiados sobre adultos y ninfas III de *P.h.capitis*. Letras distintas indican diferencias significativas para un  $P < 0,05$ .

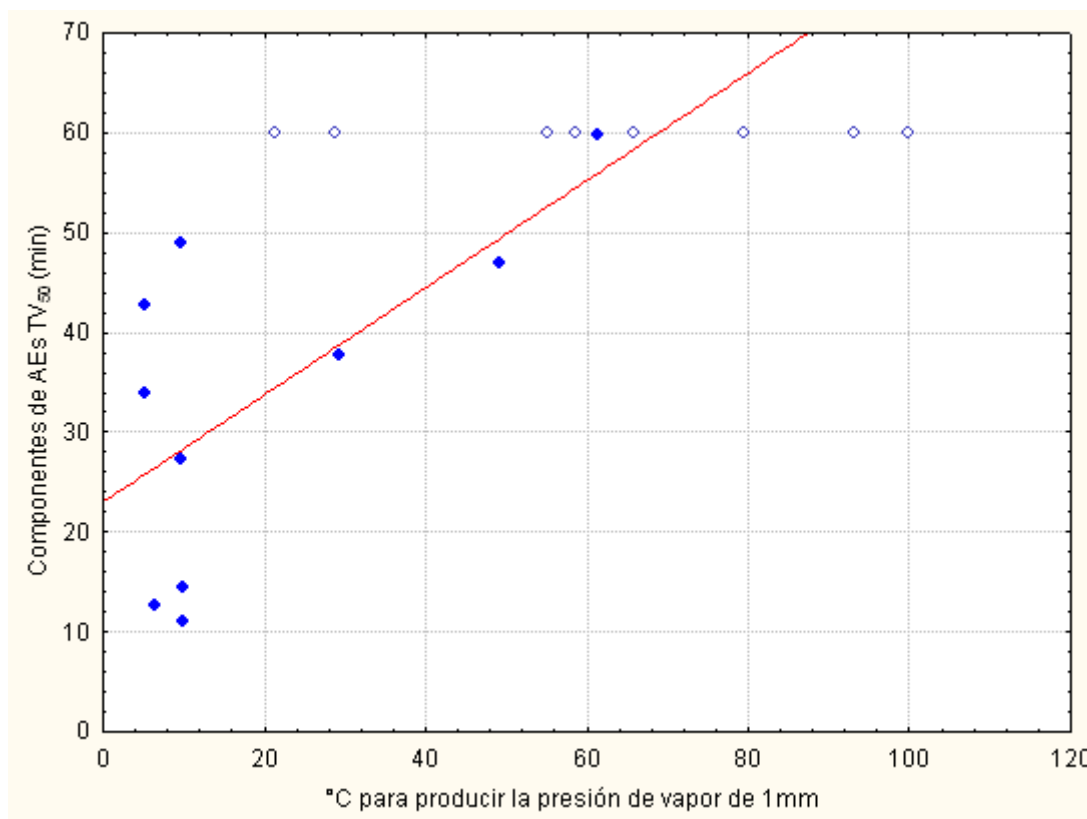
Una vez calculados los valores de la actividad biológica de los monoterpenoides, se procedió a realizar un análisis de regresión para ver si la efectividad de los mismos estaba en relación alguna con los parámetros físico-químicos presión de vapor y  $\log P$  ( $K_{ow}$ ), ya que ambas propiedades influyen en la actividad pediculicida.

El análisis de regresión lineal mostró una correlación significativa entre los valores calculados de  $TV_{50}$  y las correspondientes presiones de vapor de los componentes efectivos ( $TV_{50} < 60$  min.) considerados como una sola variable.

La ecuación resultante del análisis es:

$$TV_{50} = 22,998 \pm 6,15 + 0,538 \pm 0,22 PV.$$

El valor de  $r$ -cuadrado indica que el ajuste del modelo explica el 42% de la variabilidad del  $TV_{50}$  ( $r^2 = 0,42$ ;  $F = 5,74$ ;  $df = 1, 8$ ). Ya que el valor de  $P$  en la tabla del ANOVA es  $P < 0,05$ ; hay una relación estadística significativa entre las variables al nivel de confianza del 95%. Por lo tanto, los componentes más volátiles fueron los más efectivos como fumígenos (**Figura 18**).



**Figura 18.** Relación de la toxicidad fumígena ( $TV_{50}$ ) y la volatilidad de los componentes de aceites esenciales. Los círculos llenos fueron incluidos en los análisis de regresión mientras que los círculos vacíos fueron descartados del análisis ( $TV_{50s} > 60$  min).

En contraste, los valores de  $TV_{50}$  fueron independientes de los valores de  $\log P$  para los mismos compuestos. La ecuación resultante de ello es:

$$TV_{50} = 34,854 \pm 17,11 - 0,409 \pm 4,98 \log P.$$

Los demás valores fueron:  $r^2 = 0,001$ ,  $F = 0,01$ ;  $df = 1,8$ ;  $P < 0,937$ . Como  $P$  fue mayor a  $0,05$ , no existe una relación estadística significativa entre las variables de estudio considerando una confianza del 95%.

Para finalizar, cuando ambas variables en estudio fueron incorporadas a un modelo de regresión múltiple, la ecuación resultante fue:

$$TV_{50} = -19,7 \pm 17,16 + 0,967 \pm 0,24 (PV) + 10,5 \pm 4,18 (\log P).$$

En este caso el valor de  $r$ -cuadrado indica que el ajuste del modelo explica el 73% de la variabilidad del  $TV_{50}$  ( $r^2 = 0,73$ ;  $F = 8,14$ ;  $df = 2, 6$ ). Ya que el valor de

P en la tabla del ANOVA es  $P < 0,05$ ; hay una relación estadística significativa entre las variables para un valor de significancia de  $\alpha = 0,05$ . En este caso, la incorporación de la variable log P mejora el ajuste individual obtenido para la presión de vapor.

#### 4.3.2.2.II. Discusión

La actividad fumigante de los componentes de aceites esenciales indicó que los más efectivos contra piojos resistentes a permetrina fueron el 1,8-cineol (o eucaliptol cuando procede de eucaliptos) y el anisol. Cuando se compara la efectividad de los enantiómeros del mentol y de los pinenos, se puede observar que no hubo diferencias significativas relacionadas con su toxicidad entre ellos (Tabla 26). Los grupos químicos más efectivos fueron los éteres y los hidrocarburos, seguidos de las cetonas, y alcoholes. Los grupos que no tuvieron efectividad alguna sobre los adultos de *P.h.capitis* fueron los ésteres y los fenoles. Estos resultados indican que el modo de liberación de los compuestos estuvo dado en la fase vapor, y que el ingreso fue a través del sistema respiratorio. En nuestro estudio, el 11% (3/26) de los compuestos estudiados fueron más efectivos que el control positivo DDVP (un conocido organofosforado con una alta presión de vapor). Si comparamos con otros trabajos podemos mencionar entre otros al estudio realizado en cucarachas *Blatella germanica* por Jang et al. (2005). Éstos encontraron que la toxicidad fumígena del DDVP fue superior a los 41 monoterpenos estudiados por ellos. Además, este compuesto fue 1640 veces más tóxico que la verbenona-el monoterpeno más efectivo-. De manera similar, pero con moscas comunes *M.domestica*, Rice & Coats (1994) obtuvieron que los 22 monoterpenos analizados fueron al menos 20 veces (dos órdenes de magnitud) menos tóxicos que el DDVP. Dentro de ese mismo trabajo, estos autores hallaron que solamente la pulegona tuvo un efecto comparable al diclorvos cuando fueron evaluados en gorgojos *Tribolium castaneum*. Dentro de este mismo orden de ideas pero en insectos hematófagos se puede mencionar el trabajo de Sfara et al. (2009) y de Lucía et al. (2009). El primero de ellos fue realizado sobre los triatominos *Rodnius prolixus*, y los autores encontraron que ninguno de los 7 monoterpenos analizados fue superior en efectividad al DDVP. Es más, el más efectivo de ellos, el eucaliptol, fue 3,5 veces menos efectivo. El segundo trabajo fue realizado sobre *Aedes aegypti* y los autores encontraron que ninguno de los vapores de los seis monoterpenos analizados fue más efectivo que el DDVP.



Es interesante destacar que la asociación encontrada entre los valores de  $TV_{50}$ , las presiones de vapor (PV) y los coeficientes de partición octanol-agua ( $\log P$ ) de los componentes de aceites esenciales concuerda con estudios previos que indican que la acción narcótica de los compuestos orgánicos y la actividad fumígena en insectos correlacionan con sus volatilidades y solvencias en agua (Hansch 1971).

La lipofilicidad y la volatilidad han sido consideradas de gran importancia en la actividad pediculicida por varios autores (Regnault-Roger & Hamraoui 1995; Mougabure Cueto et al. 2002; Yang et al. 2003). Por ejemplo, es esperable que los compuestos con una alta efectividad en los bioensayos de contacto- los cuales necesitan penetrar a través de la cutícula lipofílica- sean aquellos que tengan altos valores de  $K_{ow}$ ; mientras que para los compuestos efectivos en los bioensayos con vapores, es esperable que sean aquellos que tengan altas presiones de vapor ya que deben ingresar al insecto a través de las tráqueas en fase vapor.

El estudio de las características estructurales de los compuestos de aceites esenciales (monoterpenos) junto con la actividad biológica de los mismos es de importancia práctica ya que puede brindar información útil (aunque sea una cierta tendencia) acerca de las propiedades insecticidas de los mismos, permitiendo mejorar las formulaciones, las maneras en que se liberan y las estrategias a ser implementadas en casos de resistencia.

Para ello hay que mencionar el trabajo realizado por Rice & Coats (1994) en el que incrementaron la potencia de los monoterpenos empleados a través de una derivatización del grupo hidroxilo. Ellos hallaron que la bioactividad de los compuestos derivados estudiados en *M. domestica* se incrementaba a medida que aumentaba la presión de vapor, llevando por consiguiente a una mayor acción fumígena. De manera similar, en bioensayos con ácaros, Kim et al. (2003) encontraron que la actividad fumígena variaba en relación con la presión de vapor, aumentando cuando el eugenol era metilado a metileugenol y disminuyendo cuando se transformaba en acetileugenol. Sin embargo, este patrón del eugenol y sus compuestos derivados no pudo ser observado en piojos de la cabeza (Yang et al. 2003). En el estudio de efectividad de monoterpenoides sobre cucarachas, Jang et al. (2005) no encontraron una relación significativa entre los parámetros físico-químicos de hidrofobicidad y presión de vapor con la toxicidad producida por los compuestos analizados y concluyeron que puede deberse a características estructurales tales como el grado de saturación y el tipo de grupo funcional más que por los tipos diferentes de esqueletos de carbono (i.e. clases químicas).

Además, Lucía et al. (2009) estudiaron el efecto de los vapores de aceites esenciales de eucaliptos y sus componentes mayoritarios sobre adultos de mosquitos *Aedes aegypti*; y encontraron una correlación lineal significativa entre la inversa de las presiones de vapor de los componentes y sus correspondientes  $TV_{50}$ s.

Con todo lo mencionado anteriormente, es importante resaltar que si bien en los resultados presentados en esta parte de la tesis existe una tendencia entre la presión de vapor y la efectividad de los compuestos (no así con el coeficiente de lipofilicidad), una generalización de este patrón puede en algunos casos ser precipitado y llevar a conclusiones erróneas ya que no se deben descuidar las metodologías de estudio a realizar, la selección de los monoterpenos, los estados fisiológicos de los insectos antes de su empleo, los rangos de temperatura y humedad relativa, los estadios ha utilizarse, entre otros.

Como fue mencionado por Rice & Coats (1994), las características estructurales de los monoterpenos pueden influenciar sus propiedades insecticidas y además la forma, el grado de saturación y el tipo o clase de grupos funcionales; ya que todas estas condiciones pueden afectar la penetración dentro de la cutícula del insecto, afectar su movilidad y disponibilidad, modificar la interacción con otras moléculas o con el/los sitios activos, e influenciar la degradación del mismo.

#### 4.3.2.3. Actividad biológica de los aceites esenciales colectados en los años 2006-2007 sobre *P.h.capitis*

##### 4.3.2.3.1. Resultados

Se encontraron diferencias significativas en la actividad fumígena de los 26 aceites esenciales colectados en los años 2006-2007 (autóctonos y exóticos) sobre piojos de la cabeza (**Tabla 26**). Es interesante remarcar que 22 de estos AEs son autóctonos de Argentina (84,6%). Con respecto a su efectividad biológica, hay que resaltar el hecho de que solamente 8 de ellos (31%) fueron efectivos ( $TV_{50} < 60$  min) contra *P.h.capitis*.

**Tabla 26.** Actividad fumígena de los AEs provenientes de diferentes plantas 2006-2007 en piojos de la cabeza.

Aceite esencial <sup>a</sup>	Actividad Fumígena <sup>b</sup>			
	Pendiente ± ES	TV <sub>50</sub> , min (IC) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	gl <sup>d</sup>
<i>Cinnamomun porphyrium</i>	4,94 ± 0,89	1,12 (0,92- 1,31)	2,38	6
<i>Aloysia citriodora</i> (2)	7,05 ± 1,37	3,02 (2,58- 3,41)	4,01	6
<i>Aloysia citriodora</i> (1)	-	>60	-	-
<i>Aloysia catamarcensis</i>	-	>60	-	-
<i>Myrcianthes pseudomato</i>	4,83 ± 0,72	4,09 (3,46- 4,65)	2,32	12
<i>Syzygium aromaticum</i>	-	> 60	-	-
<i>Buddleja mendozensis</i>	2,25 ± 0,43	28,81 (18,97- 45,05)	16,34	10
<i>Satureja parvifolia</i> (2)	6,75 ± 1,04	32,06 (28,72- 35,37)	3,74	12
<i>Satureja parvifolia</i> (1)	-	> 60	-	-
<i>Thymus vulgaris</i>	-	>60	-	-
<i>Artemisia annua</i>	6,30 ± 1,11	41,39 (35,59- 49,36)	14,03	10
<i>Tagetes filifolia</i>	-	> 60	-	-
<i>Tagetes mendocina</i>	-	>60	-	-
<i>Baccharis salicifolia</i> (1)	-	>60	-	-
<i>Baccharis salicifolia</i> (2)	-	>60	-	-
<i>Baccharis vernicosa</i>	-	>60	-	-
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (1)	2,22 ± 0,44	42,03 (33,01- 57,37)	7,50	11
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (2)	-	>60	-	-

<i>Peumus boldus</i>	5,90 ± 1,23	52,67 (46,72- 61,75)	1,78	11
<i>Azorella</i> sp.	-	>60	-	-
<i>Pimpinella anisum</i>	-	>60	-	-
<i>Juniperus scopularum</i>	-	>60	-	-
<i>Croton piluliferum</i>	-	>60	-	-
<i>Zuccagnia punctata</i>	-	>60	-	-
<i>Adesmia boronioides</i>	-	>60	-	-
<i>Anemia tomentosa</i>	-	>60	-	-

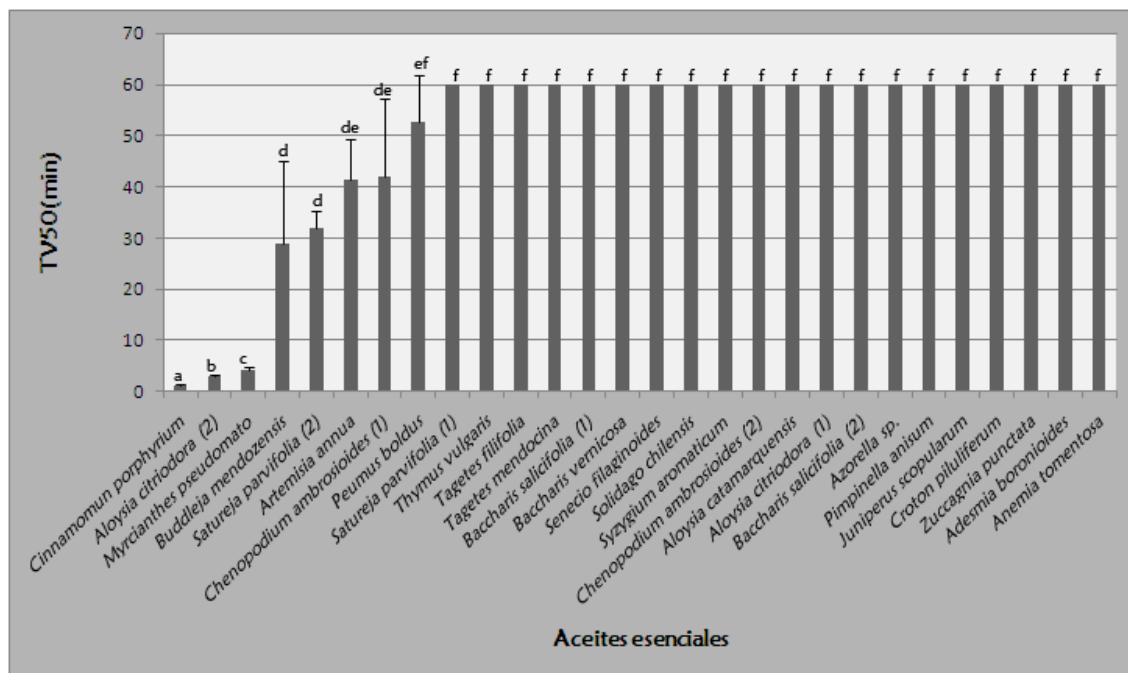
<sup>a</sup> AEs ordenados por familia botánica y dentro de ésta por efectividad decreciente. Los números entre paréntesis que se observan en tres de las especies en estudio indican variedades químicas o quimiotipos.

<sup>b</sup> Dato estadístico del análisis probit obtenido de los estudios de volteo. Tres réplicas de 15 piojos cada uno (total 45) para cada AE, observado cada 5 min durante un período de 1h.

<sup>c</sup> tiempo de volteo del 50% de los individuos, LC= 95% del intervalo de confianza.

<sup>d</sup> gl= Grado de libertad.

El aceite esencial significativamente más efectivo en su acción pediculicida fue el *Cinnamomun porphyrium* con un TV<sub>50</sub> de 1,12 min, seguido del quimiotipo (2) de *Aloysia citriodora* y de *Myrcianthes pseudomato* con valores de volteo de TV<sub>50</sub> de 3,02 min y 4,09 min; respectivamente. A estos le siguieron los AEs de *Buddleja mendozensis*, *Satureja parvifolia* quimiotipo (2), *Artemisia annua*, *Tagetes riojana*, *Chenopodium ambrosiodes* quimiotipo (1) y *Peumus boldus* (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto fumígeno de los aceites esenciales colectados en los años 2006-2007. Letras distintas indican diferencias significativas a un  $P < 0,05$ .

Cuando comparamos la efectividad de los distintos quimiotipos estudiados en esta parte de la tesis tenemos que decir que existieron diferencias significativas de efectividad entre todos ellos. Esto significa que los tres aceites esenciales que poseían quimiotipos se diferenciaron entre sí. Por ejemplo *Aloysia citriodora* (2), *Satureja parvifolia* (2) y *Chenopodium ambrosioides* (1) tuvieron acción fumígena a diferencia de sus variedades químicas que no produjeron ningún efecto sobre los piojos ( $TV_{50} > 60$  min).

#### 4.3.2.3.II. Discusión

A pesar de los varios trabajos realizados con los vapores de los aceites esenciales sobre piojos (Lahlou et al. 2000; Yang et al. 2003, 2005, 2009; Jadhav et al. 2007), ninguno lo ha hecho con los aceites esenciales autóctonos mencionados en esta parte de la tesis.

Un resultado que resulta por demás interesante es la actividad fumígena presentada por los tres aceites esenciales con los tiempo de volteo más rápido, *Cinnamomun porphyrium*, *Aloysia citriodora* (2) y *Myrcianthes pseudomato* ( $TV_{50}$ s de 1,12, 3,02 y 4,09 min, respectivamente). Además estos aceites fueron respectivamente 25,7; 9,5 y 7 veces más efectivos que el siguiente aceite (*Buddleja mendozensis*). Esto da una idea de la marcada diferencia en el efecto

de los vapores de los mencionados aceites. Otra especie pero del mismo género (aunque de composición distinta), *Cinnamomun zeylanicum* demostró poseer acción pediculicida (Yang et al. 2005), aunque la efectividad fue mucho menor a la encontrada en este trabajo para *C.porphyrinum*.

A pesar de que las pequeñas diferencias en composición de *M.pseudomato*, Demo et al. (2002) encontraron que este aceite produjo un gran efecto de inhibición sobre bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Micrococcus luteus*. Con respecto a los componentes mayoritarios, tenemos que mencionar que solamente el 1,8-cineol (34,1%) y el  $\alpha$ -pineno (6%) fueron estudiados en la presente tesis. El aceite esencial fue más efectivo que ambos componentes estudiados en forma individual sobre los piojos.

En relación a las diferencias en el efecto biológico de los diferentes quimiotipos, tenemos que mencionar que estas se deben a las variaciones de composición química de los mencionados aceites (Tablas 10, 11, 13 y 16). Por ejemplo, los dos quimiotipos de *C.ambrosioides* difieren rotundamente entre sí y no comparten compuestos alguno entre sí. El quimiotipo 1 posee como componentes mayoritarios al trans-pinocarveol (42,4%), acetato de trans-pinocarvilo (22,4%) y cis-carveol (10,6%), entre otros. Mientras que el quimiotipo 2 está compuesto exclusivamente de ascaridol (99,4%). En el caso de *A.citriodora*, el panorama es similar al anterior pero en este caso hay un componente mayoritario común a ambos quimiotipos (1 y 2)- la pulegona-, aunque en proporciones algo diferente (85,7% y 82,3, respectivamente). Además, el quimiotipo 1 posee geranial (12%), mientras que el quimiotipo 2 posee neral (6%). A pesar de no especificar la composición química de los aceites *A.citriodora* y *C.ambrosioides*, Palacios et al. (2009) encontraron que estos AEs estuvieron ubicados en el cuarto y séptimo lugar de efectividad de entre 9 aceites estudiados, con valores de  $CL_{50}$ s de 12,8 y 26,7 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente; produciendo un moderado efecto de volteo sobre moscas comunes. Por otro lado, el trabajo realizado por Lahlou et al. (2000) mostró que el AE de *C.ambrosioides* fue efectivo sobre piojos, pero la composición química difirió bastante en relación a los quimiotipos estudiados en esta tesis. Por ejemplo, el AE mencionado presentó como componentes mayoritarios al  $\alpha$ -pineno (10,3%),  $\alpha$ -felandreno (18,6%), p-cimeno (17,7%) y limoneno (6%), de los cuales ninguno estuvo presente en los estudiados acá.

En el caso de *S.parvifolia*, ambos quimiotipos poseen componentes en común (piperitona y óxido de piperitona), y las diferencias en composición entre ambos es baja. Por ejemplo, el quimiotipo 1 posee un 41,9% de piperitona y un 50,1 de óxido de piperitona; mientras que el quimiotipo 2 posee un 46% y un 49,3%

respectivamente. Esto podría ser explicado por el hecho de que pequeñas variaciones en la composición de un aceite esencial serían de gran importancia en la actividad fumígena observada en piojos de la cabeza.

La composición química de *Aloysia catamarquensis* demostró estar formada casi exclusivamente por el componente carvona (98,7%) (Tabla 16). Si comparamos la efectividad de los vapores de este componente en forma individual (Tabla 25), tenemos que mencionar que tanto la carvona como el aceite en su totalidad no produjeron efecto alguno sobre los piojos ( $TV_{50} > 60$  min).

A pesar de que *Tagetes mendocina* no produjo efecto pediculida, el estudio de Lima et al. (2009) demostró que este aceite tiene acción antimicrobiana, antibacteriana y antifúngica sobre distintos microorganismos. Aunque está ampliamente demostrado que el efecto de los aceites esenciales es especie-dependiente (Isman 2000, Papachristos et al. 2004), aunque pareciera existir una tendencia similar de componentes como el 1,8-cineol y el  $\alpha$ -pineno, en especies diferentes tales como el mosquito *Aedes aegypti*, la mosca hematófaga *Haematobia irritans* y la cucaracha *Blattella germanica* (Lucía 2009, comunicación personal).

Los quimiotipos del aceite esencial *Baccharis salicifolia* (1 y 2) presentaron compuestos en común, tales como el  $\alpha$ -pineno, óxido de cariofileno, espatulenol y  $\alpha$ -muurolol en proporciones diferentes; y otros que fueron exclusivos del quimiotipo 2 (Tabla 10). Indistintamente de su composición, ninguno de los quimiotipos fue efectivo sobre piojos de la cabeza ( $TV_{50} > 60$  min).

El aceite de *Artemisia annua* produjo un moderado efecto de volteo sobre los piojos ( $TV_{50} = 41,4$  min). Cuando analizamos la efectividad de algunos de los componentes mayoritarios estudiados en esta tesis, tales como el 1,8-cineol (16,7%), alcanfor (7%) y  $\alpha$ -pineno (7%) hay que mencionar que el primer compuesto mencionado produjo una mayor mortalidad que el aceite puro, mientras que el  $\alpha$ -pineno tuvo un efecto similar y el alcanfor no produjo efecto alguno. Esto da idea de la heterogeneidad de cada compuesto mayoritario en comparación con el aceite en su totalidad. A pesar de una composición levemente diferente del aceite (aunque comparten dos de sus compuestos principales -1,8-cineol y artemisia cetona-), el trabajo de Palacios et al. (2009) mostró que los vapores de este aceite esencial fueron altamente efectivos sobre *Musca domestica*, con valores de  $CL_{50}$  de 6,5 mg/dm<sup>3</sup>.

De las tres especies pertenecientes al género *Tagetes* estudiadas en la presente tesis, solamente *T. riojana* produjo volteo sobre piojos con un  $TV_{50}$  de 53,39

min. Con respecto a la composición química de estos aceites hay que mencionar que *T. filifolia* posee un 74,5% de anetol, compuesto que al igual que el aceite puro no produjo efecto alguno.

Con respecto a la muestra comercial del AE *Puermus boldus*, hay que aclarar que hasta el momento no se encontró evidencias en bibliografía de su efectividad como pediculicida. Si bien el TV<sub>50</sub> es de 52,7min, lo que indica un efecto de volteo bajo (en comparación con los AEs más efectivos); cabe destacar su potencial acción sobre piojos.

Para finalizar hay que mencionar que si bien el AE de *S. aromaticum* (o *Eugenia caryophyllata*) no produjo volteo de piojos dentro de la hora de análisis, el trabajo de Yang et al. (2003) mostró que este AE puede ser efectivo sobre piojos cuando el mismo es impregnado sobre papeles de filtro. Esto indicaría que el modo de aplicación y/o exposición son de vital importancia en el momento de estudiar el efecto biológico de los aceites esenciales y sus componentes.



#### 4.3.2.4. Actividad biológica de los aceites esenciales de *Eucalyptus* sobre *P.h.capitis*.

##### 4.3.2.3.1. Resultados y discusión

En esta etapa de la tesis debemos mencionar que hubo diferencias significativas considerables ( $P < 0,05$ ) en la actividad de los vapores sobre piojos de la cabeza entre los híbridos de eucaliptos y las especies puras (**Tabla 27**).

**Tabla 27.** Actividad fumígena de los AEs provenientes de *Eucalyptus* en piojos de la cabeza.

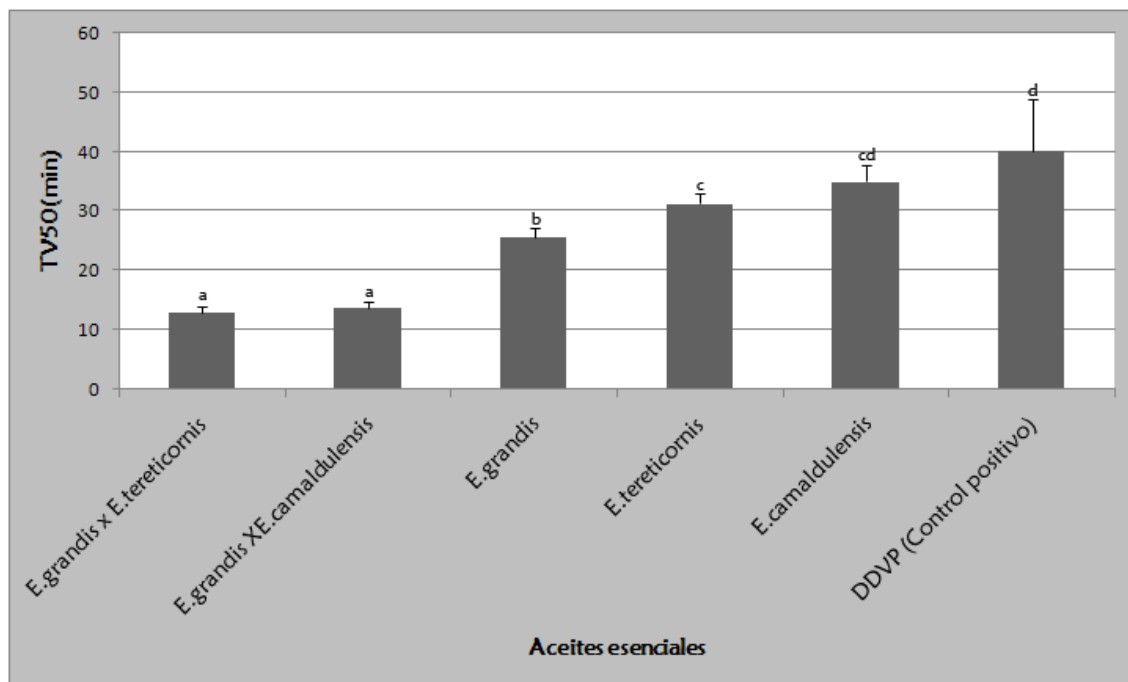
Compuestos	Actividad Fumígena <sup>a</sup>			
	Pendiente ± ES	TV <sub>50</sub> , min (IC) <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup>	Gl <sup>c</sup>
<i>E. camaldulensis</i>	7,98 ± 0,99	35,01 (32,15-37,76)	13,51	12
<i>E. grandis</i>	11,17 ± 1,57	25,57 (23,97-27,24)	2,52	13
<i>E. tereticornis</i>	14,63 ± 2,25	31,31 (29,47-33,09)	5,72	15
<i>E. grandis</i> X <i>E. camaldulensis</i>	11,04 ± 1,80	13,63 (12,50-14,68)	1,73	7
<i>E. grandis</i> X <i>E. tereticornis</i>	15,62 ± 3,46	12,99 (11,98-14,05)	2,18	7
DDVP	3,93 ± 0,68	40,15 (34,63-48,86)	7,27	11

<sup>a</sup> Dato estadístico del análisis probit obtenido de los estudios de volteo. Tres réplicas de 15 piojos cada uno (total 45) para cada AE, observado cada 5 min durante un período de 1h.

<sup>b</sup> tiempo de volteo del 50% de los individuos, LC= 95% del intervalo de confianza.

<sup>c</sup> gl= Grado de libertad.

La actividad fumígena de ambos híbridos fue superior en relación a las especies puras y al compuesto DDVP empleado como control positivo (**Figura 20**). Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los TV<sub>50</sub>s de ambos híbridos. Si comparamos la efectividad de los mismos con las especies puras tenemos que mencionar que fueron en promedio 1,8; 2,29 y 2,56 veces más efectivos que los respectivos aceites esenciales de *E. grandis*, *E. tereticornis* y *E. camaldulensis*. Ahora, cuando comparamos con el DDVP, tenemos que mencionar que fueron 3 veces mejores que el compuesto usado como control positivo.



**Figura 20.** Actividad fumígena de los AEs de eucaliptos. Letras distintas indican diferencias significativas a un  $P < 0,05$ .

La gran efectividad de los híbridos puede deberse a la gran concentración del 1,8-cineol y del  $\alpha$ -pineno determinada por el análisis de GC-MS (**Tabla 17**). Para poner a prueba esta hipótesis se realizó un análisis de regresión lineal. Este análisis mostró la existencia de una correlación significativa entre los valores de  $TV_{50}$  y el % de 1,8-cineol de los aceites esenciales que puede verse:

La ecuación del modelo de ajuste es:  $TV_{50} = 33,515 \pm 4,87 - 0,2645 \pm 0,09\%$  1,8-cineol.

El valor de r-cuadrado indica que el ajuste del modelo explica el 68% de la variabilidad del  $TV_{50}$  ( $r^2 = 0,68$ ;  $F = 8,56$ ;  $df = 1$ ). Ya que el valor de P en la tabla del ANOVA es  $P < 0,05$ ; hay una relación estadística significativa entre las variables al nivel de confianza del 95% (**Figura 21a**). Por lo tanto, los aceites esenciales con la concentración más elevada de 1,8-cineol tuvieron la mayor efectividad sobre los piojos de la cabeza.

Cuando se realizó el análisis para la correlación entre el tiempo de volteo ( $TV_{50}$ ) y la composición de  $\alpha$ -pineno, la ecuación resultante fue:  $TV_{50} = 23,258 \pm 7,54 + 0,10 \pm 0,15\%$   $\alpha$ -pineno;  $r^2 = 0,09$ ;  $F = 0,43$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,548$ ). De manera opuesta a lo ocurrido con el 1,8-cineol, los valores de  $TV_{50}$  fueron independientes de la concentración de  $\alpha$ -pineno. Esto nos indica que la

concentración de  $\alpha$ -pineno no estaría relacionada con la efectividad de los aceites esenciales.

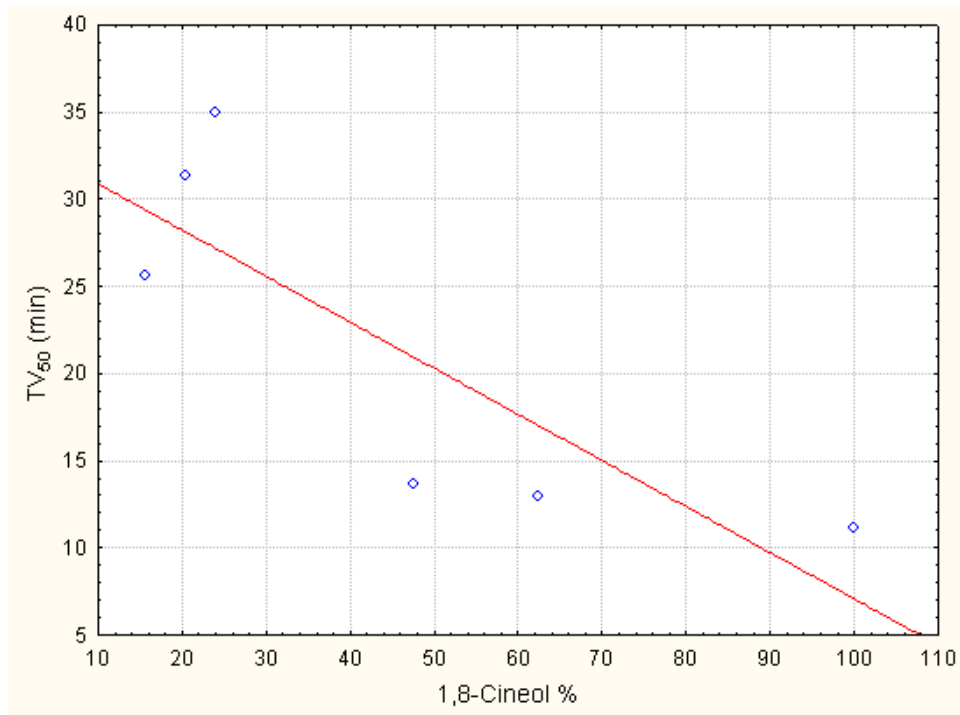
El paso de análisis siguiente fue la inclusión de los valores de volteo de los AEs con los valores de proporción de los dos compuestos mencionados arriba dentro de la composición química de los AEs.

La ecuación resultante del modelo de análisis de regresión múltiple lineal fue:

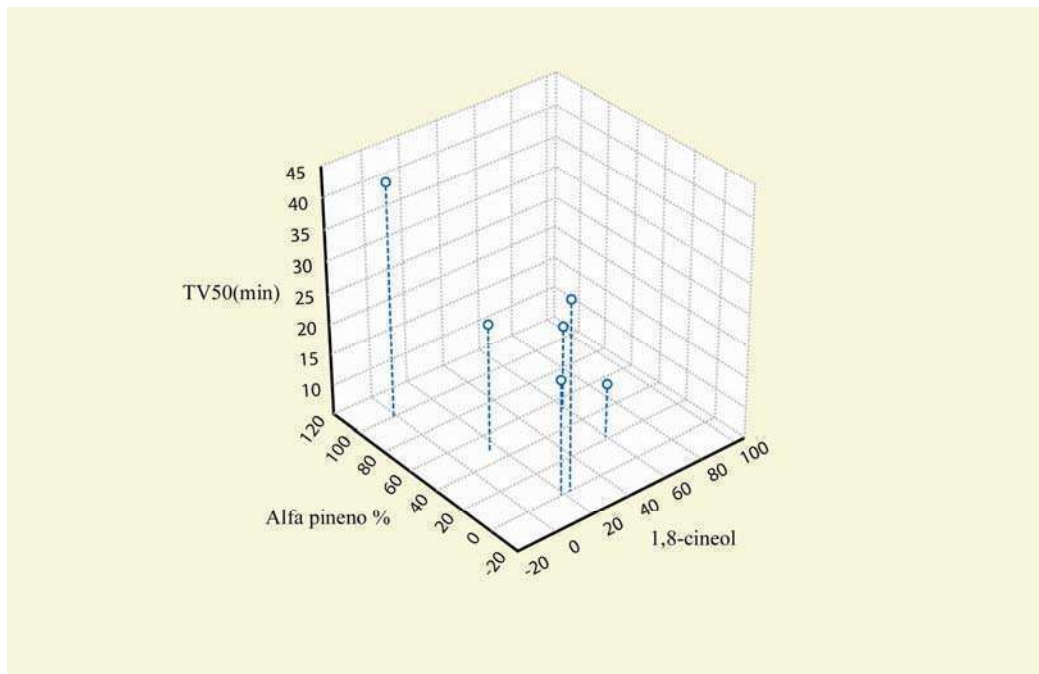
$TV_{50} = 42,2 \pm 2,8 - 0,226 \pm 0,06 (\% \alpha\text{-pineno}) - 0,389 \pm 0,07 (\% 1,8\text{-cineol})$ .

El valor de r-cuadrado indica que el ajuste del modelo explica el 96% de la variabilidad del  $TV_{50}$  ( $r^2=0,96$ ;  $F= 26,01$ ;  $df= 2$ ). Ya que el valor de P del ANOVA es  $P<0,05$ , existe una relación estadística significativa entre las variables a un nivel de confianza del 95%. La incorporación de la variable independiente  $\alpha$ -pineno mejora significativamente el ajuste el modelo de regresión, en comparación con el obtenido para el 1,8-cineol solo (**Figura 21b**).

a



b



**Figura 21.** Relación entre la actividad fumígena (TV<sub>50</sub>) de cada aceite esencial y su correspondiente concentración de los constituyentes mayoritarios (1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno). (a) Regresión simple de la toxicidad fumigante (TV 50) y % de 1,8-cineol

presente en los aceites esenciales estudiados. (b) Regresión múltiple lineal entre el % de 1,8-cineol, % de  $\alpha$ -pineno y TV50 (min).

Estos resultados demuestran la importancia del compuesto 1,8-cineol en la actividad fumígena de los aceites esenciales de *Eucalyptus*. Como fue mencionado en el punto anterior, el valor de TV<sub>50</sub> del compuesto 1,8-cineol fue 3,84 veces menor (i.e. más potente) que el  $\alpha$ -pineno. De manera similar, Lahlou et al. (2000) estudiando la actividad de 15 monoterpenos aislados de plantas de Marruecos sobre piojos de la cabeza encuentran que el compuesto 1,8-cineol fue entre dos y tres veces más efectivo que el  $\alpha$ -pineno. Ahora bien, siguiendo con este mismo orden de ideas pero en insecto diferentes, tenemos que mencionar los trabajos de actividad fumígena de Papachristos et al. (2004) y de Lucía et al. (2009). El primero de ellos sobre *Acanthoscelides obtectus*, un gorgojo plaga de granos almacenados, y el segundo sobre *Aedes aegypti*, el mosquito transmisor del dengue. En ambos trabajos se encontró que el 1,8-cineol fue más efectivo que el  $\alpha$ -pineno. Esto estaría concordando con lo hallado en esta tesis.

El trabajo de Alzogaray et al. (comunicación personal) estudiaron la actividad fumígena de 13 aceites esenciales de eucaliptos (entre los que se encuentran los estudiados acá) sobre ninfas de cucaracha *Blattella germanica*. Los autores encontraron que ambas especies de híbridos *E. grandis* X *E. tereticornis* y *E. grandis* X *E. camaldulensis* tuvieron la mayor efectividad (TV<sub>50</sub>=56 y 63,5min) en relación a las especies puras *E. tereticornis*, *E. grandis* y *E. camaldulensis*, cuyos valores respectivos de TV<sub>50</sub> fueron de 160,8; 69,1 y 140,6 min. Los autores explican que esta diferencia en el efecto biológico está dada por las variaciones en la composición química de los diferentes aceites, ya que hallaron correlaciones significativas entre la actividad fumígena y el porcentaje de 1,8-cineol y de  $\alpha$ -pineno. Esto significa que los aceites cuya composición química se enriquece con estos dos componentes, también se verá favorecida su actividad fumígena sobre cucarachas.

Siguiendo con este orden de comparación, en el trabajo de Lucía et al. (2009) se estudiaron la actividad fumígena de los mismos aceites esenciales de eucaliptos mencionados en esta parte de la tesis (entre otros) sobre el mosquito transmisor del dengue, *Aedes aegypti*. En primer lugar hay que destacar que los híbridos *E. grandis* X *E. tereticornis* y *E. grandis* X *E. camaldulensis* (TV<sub>50</sub> de 5,21 y 5,07 min; respectivamente) tuvieron un efecto fumígeno sobre los adultos de *A. aegypti* más potente significativamente que las especies puras *E. tereticornis*, *E. grandis* y *E. camaldulensis*, cuyos valores respectivos de TV<sub>50</sub> fueron de 10,55; 10,31 y 10,35 min. Este patrón de efectividad superior de los híbridos por sobre las

especies puras concidiría con lo hallado en esta tesis. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias significativas entre la efectividad de las especies puras. Esto podría deberse principalmente a la respuesta diferencial entre los piojos y los mosquitos.

Además, estos autores encontraron una correlación positiva entre el porcentaje de 1,8-cineol y la efectividad biológica de los vapores de los aceites esenciales, coincidiendo nuevamente con el patrón hallado en esta tesis, lo cual estaría indicando un comportamiento físico-químico similar propio de los monoterpenoides.

### 4.3.3. Efectividad de los vapores de los monoterpenoides sobre la eclosión de los huevos de *P.h.capitis*.

#### 4.3.3.1. Resultados

La actividad ovicida de 23 monoterpenoides se pueden observar en la **Tabla 28**. Se encontraron diferencias significativas en la acción ovicida de los diferentes compuestos estudiados ( $F=14,88$ ,  $gl=23, 58$ ,  $P<0,0001$ ). Los monoterpenoides más efectivos pertenecieron a las familias químicas de los hidrocarburos y éteres, seguidos de las cetonas, alcoholes, fenoles y ésteres.

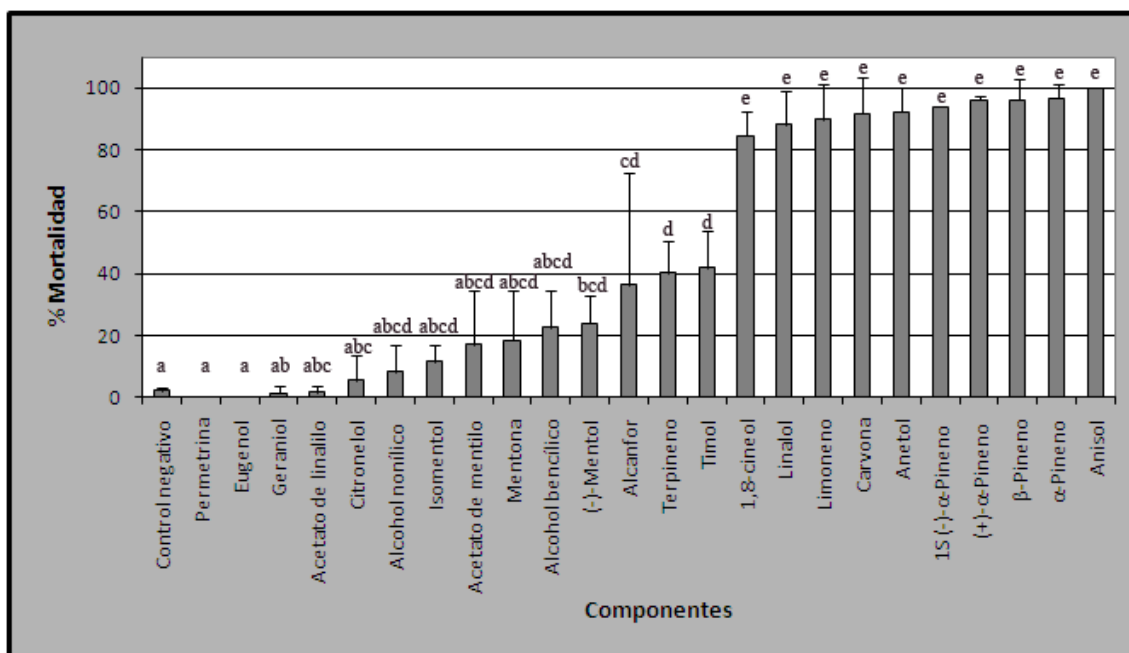
**Tabla 28.** Actividad ovicida de los monoterpenoides estudiados.

Clase química	Monoterpenoides	% Mortalidad $\pm$ ES <sup>a</sup>
Alcohol	Linalol	88.17 $\pm$ 10.9e
	(-)-Mentol	23.78 $\pm$ 9.1bcd
	Alcohol bencílico	22.4 $\pm$ 12abcd
	Isomentol	11.57 $\pm$ 5.5abcd
	Alcohol nonílico	8.33 $\pm$ 8.4abcd
	Citronelol	5.55 $\pm$ 7.9abc
	Geraniol	1.25 $\pm$ 2.5ab
Cetona	Carvona	91.64 $\pm$ 11.7e
	Alcanfor	36.26 $\pm$ 36.5cd
	Mentona	18.44 $\pm$ 16.1abcd
Ester	Acetato de mentilo	17.12 $\pm$ 17.1abcd
	Acetato de linalilo	1.51 $\pm$ 2.1abc
Eter	Anisol	100e
	Anetol	92.5 $\pm$ 7.5e
	1,8-cineol	84.47 $\pm$ 8e
	Eugenol	0a
Fenol	Timol	41.77 $\pm$ 11.8d
Hidrocarburo	$\alpha$ -pineno	96.67 $\pm$ 4.7e
	$\beta$ -pineno	96.42 $\pm$ 6.2e
	(+)- $\alpha$ -pineno	96.13 $\pm$ 1.4e
	1S(-)- $\alpha$ -pineno	94.21 $\pm$ 0.3e
	Limoneno	89.88 $\pm$ 11.3e
	Terpineno	40.22 $\pm$ 10.5d

<sup>a</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

Los componentes que resultaron ser los más efectivos en la mortalidad producida sobre la eclosión de los embriones de *P.h.capitis* a un nivel de confianza del 95% fueron: el anisol, el  $\alpha$ -pineno, el  $\beta$ -pineno, el (+)- $\alpha$ -pineno, el 1S(-)- $\alpha$ -pineno, el anetol, la carvona, el limoneno, el linalol y el 1,8-cineol. Esto es similar a lo observado para formas eclosionadas. Tampoco se vio efecto alguno sobre los embriones cuando estos estuvieron expuestos a la permetrina (0% de mortalidad).

Diez de los componentes estudiados produjeron una mortalidad en los huevos superior al 80% (en comparación con los controles negativos) (Figura 22).



**Figura 22.** Actividad ovicida de los componentes provenientes de diferentes plantas en huevos de *P.h.capitis*. Letras diferentes indican diferencias significativas por medio del test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

Para enriquecer este estudio se procedió a realizar una comparación de efectividad de los monoterpenoides estudiados entre los  $TV_{50}$  obtenidos para adultos y ninfas III (Tabla 26) y las mortalidades sobre huevos obtenidos en esta parte de la tesis. Se encontró una relación muy significativa entre la actividad pediculicida de los monoterpenos entre huevos y adultos.

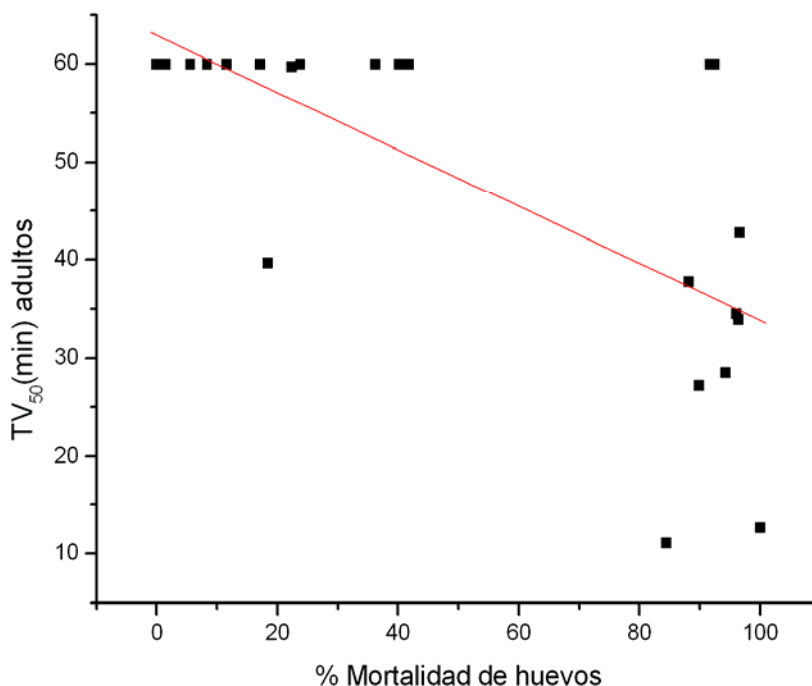
La fórmula resultante de dicho análisis fue:

$$TV_{50} (\text{adultos}) = 62,9234 - 0,290902 \% \text{mortalidad (huevos)}.$$

El valor de r-cuadrado indica que el ajuste del modelo explica el 47% de la variabilidad del  $TV_{50}$  ( $r^2 = 0,47$ ;  $F = 17,61$ ;  $df = 1, 20$ ). Ya que el valor de P del



ANOVA fue  $P < 0,001$ , existe una relación estadística significativa entre las variables a un nivel de confianza del 99,9% (Figura 23).



**Figura 23.** Regresión lineal entre la toxicidad de los monoterpenoides en adultos ( $TV_{50}$ ) y en huevos (% mortalidad).

#### 4.3.3.2. Discusión

En esta parte de la tesis es interesante destacar que una gran cantidad de monoterpenoides son potentes inhibidores del desarrollo embrionario de los piojos de la cabeza. Los resultados aquí mencionados sugieren que los procesos involucrados en la toxicidad de los huevos de desarrollo tardío y de los adultos serían similares. Estudios previos han estudiado la actividad ovicida de los componentes de aceites esenciales sobre los huevos de *P.h.capitis* (Lahlou & Berrada 2003, Yang et al. 2004, Priestley et al. 2006), sin embargo, estos autores emplearon diferentes metodologías de estudio. Por ejemplo, Yang et al. (2004b) emplearon como bioensayo papeles de filtros impregnados con los compuestos a estudiar, y vieron que el 1,8-cineol no produjo más del 20% de mortalidad en huevos. Este compuesto, en nuestro estudio resultó producir una mortalidad alta.

En un estudio posterior de estos mismos autores y con la misma metodología a la anterior, Yang et al. (2009) encontraron que el compuesto linalol fue el más efectivo contra huevos de *P.h.capitis* de Corea resistentes a permetrina (100% de mortalidad), y que los compuestos  $\beta$ -pineno y alcanfor produjeron respectivamente mortalidades de 24% y de 1%. Si comparamos con lo mostrado en esta tesis podemos decir que el linalol también fue efectivo sobre huevos de piojos, como así también el  $\beta$ -pineno. No así el alcanfor, quien produjo una mortalidad baja, coincidiendo con lo encontrado por los autores arriba mencionados. Otro caso de eficacia diferencial fue el trabajo de Priestley et al. (2006). Utilizando un método de inmersión sobre los piojos de la ropa o del cuerpo *P.h.humanus*, estos autores estudiaron una gran variedad de monoterpenoides y vieron que los componentes que fueron efectivos, fueron inefectivos o produjeron mortalidades moderadas en nuestro estudio. Esto podría estar debido, en parte, por el modo de aplicación de los compuestos sobre los piojos. La acción fumígena de los monoterpenoides que poseen alta presión de vapor indica que la toxicidad de los mismos es debida a la penetración efectiva a través del sistema respiratorio (Smith & Salked 1966). Los monoterpenoides son compuestos lipofílicos y Veal (1996) mencionó que la penetración a través de la hemolinfa del piojo es generalmente lenta y limitada, por lo que la entrada de los mismos ocurriría a través del sistema de traqueas del insecto. En el caso de los huevos, el intercambio de gases entre la atmósfera y el embrión depende de la difusión a través de los micrópilos del opérculo, y los monoterpenoides podrían alcanzar el embrión a través de estas estructuras. Además, los cambios en las membranas que rodean al embrión afectan la permeabilidad de la cápsula del huevo y conllevan a un aumento de la toxicidad del insecticida (Smith & Salked 1966).

Con todo lo enunciado arriba acerca de la toxicidad de los monoterpenoides sobre huevos resistentes a permetrina de *P.h.capitis*, tenemos que mencionar que los compuestos derivados de plantas podrían ser incorporados a formulaciones pediculicidas. Además, se debería tener presente la adición de excipientes que incrementen la estabilidad y/o efectividad de los mismos (Burgess 2004). La alta volatilidad de los monoterpenoides podría ser remediada mediante la adición de los mismos a formulaciones de liberación lenta y progresiva, o con la incorporación de otros compuestos como vehículos base.

#### 4.4. Actividad repelente

##### 4.4.1. Actividad repelente de los AEs colectados en los años 2003-04 y de sus componentes

###### 4.4.1.1. Resultados

La media de los valores de índice de repelencia (IRs) de los aceites esenciales obtenidos de plantas nativas y exóticas difirió significativamente ( $F=3,86$ ;  $df=15, 46$ ;  $P < 0,001$ ) (Tabla 29).

**Tabla 29.** Actividad repelente de los AEs colectados en el año 2003-2004 sobre piojos de la cabeza.

Compuesto <sup>a</sup>	Actividad Repelente <sup>b</sup>
	IR $\pm$ ES
<i>Mentha pulegium</i>	75,50 $\pm$ 11,60 c
<i>Origanum vulgare</i>	34,50 $\pm$ 17,40 ab
<i>Minthostachys verticillata</i>	22,50 $\pm$ 5,10 a
<i>Eucalyptus saligna</i>	62,80 $\pm$ 40 bc
<i>Eucalyptus citriodora</i>	59,30 $\pm$ 14,90 bc
<i>Myrcianthes cisplatensis</i>	51,20 $\pm$ 23,90 abc
<i>Eucalyptus cinerea</i>	50,20 $\pm$ 18,50 abc
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	34,50 $\pm$ 31,90 ab
<i>Eucalyptus viminalis</i>	33,30 $\pm$ 10,40 a
<i>Laurus nobilis</i>	49,50 $\pm$ 16,3 abc
<i>Acantholippia riojana</i>	48,10 $\pm$ 1,20 abc
<i>Aloysia polystachia</i>	30,70 $\pm$ 26,80 a
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	46,70 $\pm$ 36,90 abc
<i>Schinus areira</i>	40,40 $\pm$ 13,50ab

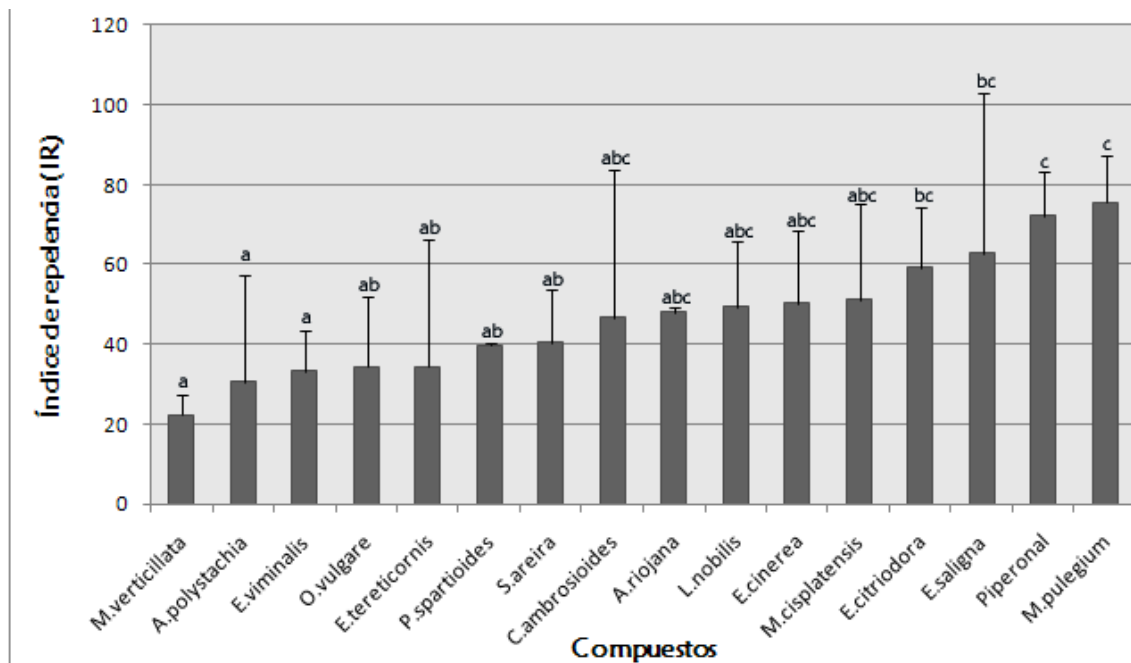
<i>Psila spartioides</i>	39,90 ± 0,5 ab
<i>Artemisia verlotorum</i>	- <sup>c</sup>
Piperonal	72,26 ± 11,16 c

<sup>a</sup> Los aceites esenciales están ordenados por su efectividad decreciente y por familia botánica.

<sup>b</sup> La separación entre las medias está indicada por las letras diferentes obtenida por un test de LSD ( $P < 0,05$ ).

<sup>c</sup> Dato no registrado.

El aceite esencial que produjo mayor repencia sobre piojos de la cabeza fue el obtenido de la planta exótica *Mentha pulegium* y no difirió significativamente del control positivo piperonal. También se encontraron diferencias significativas entre la *Mentha pulegium* y el grupo formado por los aceites esenciales *Minthostachys verticillata*, *Aloysia polystachia*, *Eucayptus viminalis*, *Eucalyptus tereticornis*, *Origanum vulgare*, *Psila spartioides* y *Schinus areira* (Figura 24).



**Figura 24.** Repelencia de los AEs colectados en los años 2003-04. Letras distintas indican diferencias significativas para un  $\alpha = 0,05$  de significancia.

#### 4.4.1.2. Discusión

Ya que los piojos infestan a sus huéspedes mediante el traslado de una cabeza a otra (forma activa) o en forma indirecta por intercambio de elementos personales (gorros, bufandas, vinchas, etc.), es bastante común que exista contagio y reinfestación. Por lo tanto, el empleo de productos repelentes para disminuir el contagio adquiere considerable importancia en la prevención de la pediculosis. Con respecto al estudio de repelentes en piojos hay que mencionar que existen pocos trabajos al respecto. Por ejemplo, Mumcuoglu et al. (1996) estudiaron la efectividad como repelentes in-vitro- de cuatro aceites esenciales extraídos de las plantas de eucalipto, lavanda, romero y citronela sobre piojos de la ropa. La metodología de este estudio consistió en la impregnación de telas de corderoy con los mencionados aceites -en un extremo de la arena-, y en el otro lado impregnaron telas con sales de amonio que sirvieron como atrayentes. De dicho estudio surgió que el más efectivo fue el aceite de citronela con un índice de repelencia superior al 50% sobre *P.h.humanus*. Si comparamos este resultado con lo obtenido en esta tesis tenemos que destacar que cinco de los 16 aceites esenciales poseyeron IRs > 50%. Posteriormente, Mumcuoglu et al. (2004) realizaron un ensayo clínico doble-ciego placebo-controlado de una formulado microencapsulado de citronela (3,7% i.a.) en piojos de la cabeza de casi 200 niños de escuelas de Israel. Luego de 2 meses de la aplicación de los productos, estos autores encontraron diferencias significativas entre el formulado repelente (12% de chicos infestados) y el placebo (50,5%). Estos autores además encontraron que dos meses después (4 meses de iniciado el estudio), siguieron hallándose diferencias significativas entre el repelente (12,4%) y el placebo (33,7%); indicando que el formulado repelente fue entre 3 y 4 veces más efectivo que el placebo. Esto nos da una idea en primer lugar, de que los estudios in vitro son de gran utilidad ya que permiten seleccionar o clasificar los compuestos más efectivos; y en segundo lugar, nos dice que estos compuestos pueden llegar a ser también efectivos in vivo y ser utilizados como repelentes de venta comercial.

Otro ejemplo para destacar es el del piperonal. Una solución del 2% de este compuesto demostró ser in vitro casi el doble de repelente sobre piojos de la ropa *P.h.humanus* que una solución del 50% de DEET (Peock & Maunder 1993). Cuando este compuesto fue estudiado sobre piojos de la cabeza, los resultados fueron positivos y siguió demostrando tener in vitro un buen efecto repelente (Burgess 1993). Sin embargo, cuando este compuesto fue evaluado in vivo en un estudio clínico, los resultados no fueron los esperados y no tuvo la efectividad mostrada in vitro (Burgess 2004). Esto fue debido en parte a una falla en el diseño experimental y a una mala aplicación del producto por parte del personal

que formó parte en el experimento, más que a un error del principio activo (Burgess I, Comunicación personal).

Ahora bien, si comparamos el efecto repelente en otro grupo de insectos hematófagos tales como los mosquitos, tenemos que mencionar el trabajo de Gillij et al. (2008). Este trabajo consistió en el estudio de catorce aceites esenciales colectados en Argentina sobre mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Los autores hallaron (entre otros) que *E. saligna* y *M. verticillata* (de igual composición química que los de esta tesis) produjeron un efecto repelente sobre los mosquitos con valores de IR de 90%. Cuando comparamos estos valores con los obtenidos en la presente tesis, tenemos que decir que estos aceites esenciales produjeron (en promedio) menor repelencia en los piojos de la cabeza que en los mosquitos. Esto nos estaría indicando en cierta manera que el potencial de estas plantas como repelentes varía de acuerdo al grupo de insectos hematófagos al que nos refiramos, es decir que dicha actividad es especie dependiente.

Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis nos permiten indicar que los aceites esenciales más efectivos en el estudio in vitro pueden (debidamente formulados) ser empleados como productos repelentes sobre piojos de la cabeza.

#### 4.4.2. Actividad repelente de los aceites esenciales de eucaliptos

##### 4.4.2.1. Resultados

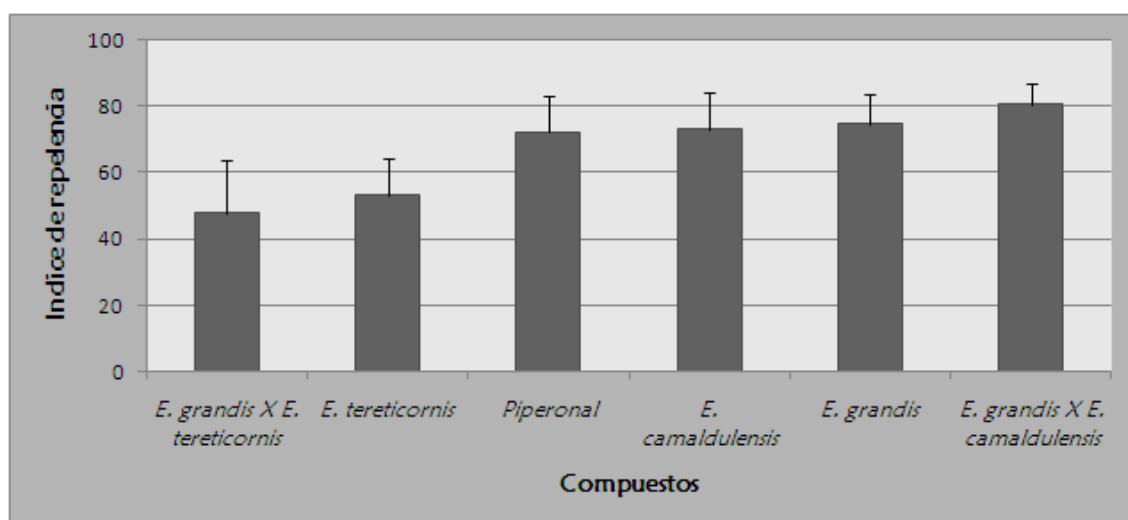
De los cinco aceites esenciales de *Eucaliptus* estudiados en esta sección tenemos que decir que los índices de repelencia variaron en promedio desde  $47,8 \pm 16\%$  hasta un  $80,69 \pm 6\%$  (Tabla 30).

Tabla 30. Actividad repelente de los AEs de *Eucalyptus* sobre piojos de la cabeza.

Compuesto	Actividad Repelente
	IR $\pm$ ES
<i>E. camaldulensis</i>	73,16 $\pm$ 11
<i>E. grandis</i>	74,73 $\pm$ 9
<i>E. tereticornis</i>	53,13 $\pm$ 11
<i>E. grandis</i> X <i>E. camaldulensis</i>	80,69 $\pm$ 6
<i>E. grandis</i> X <i>E. tereticornis</i>	47,80 $\pm$ 16
Piperonal	72,26 $\pm$ 11,16

A pesar de que el aceite del híbrido *E. grandis* X *E. camaldulensis* demostró ser el más repelente, no se diferenció estadísticamente del resto de los aceites ( $F= 1,71$ ;  $df= 4$ ;  $P<0,283$ ). A diferencia de lo obtenido en la actividad fumígena, no se halló ninguna correlación entre la actividad repelente y la composición química de los componentes mayoritarios como el  $\alpha$ -pineno y el 1,8-cineol.

Si comparamos la actividad repelente del control positivo piperonal (1,3-benzodioxol-5-carboxialdehído) y de los aceites esenciales estudiados en esta sección de la tesis, hay que mencionar que no hubo diferencias significativas entre ellos para un  $\alpha=0,05$  (Figura 25).

Figura 25. Actividad repelente de los eucaliptos estudiados sobre *P.h.capitis*.

#### 4.4.2.2. Discusión

A pesar de la gran cantidad de trabajos de repelencia que involucran aceites esenciales de eucaliptos sobre una enorme variedad de insectos de importancia médica, veterinaria y sanitaria (Moore et al. 2007), hay que resaltar el hecho de que ninguno de los aceites esenciales analizados en esta sección de la tesis fue estudiado con anterioridad sobre piojos de la cabeza.

Con respecto a la composición química de los aceites esenciales, es interesante destacar que pequeñas diferencias en la composición del aceite esencial pueden generar grandes diferencias en la actividad repelente. Por ejemplo, los AEs *E. grandis* y *E. camaldulensis* poseen composiciones químicas de monoterpenoides muy diferentes y similares valores de índices de repelencia. El trabajo de Gillij et al. (2008) en mosquitos reveló que se pueden obtener valores similares (o iguales de repelencia) y presentar una composición del aceite esencial muy distinta. Por ejemplo, el aceite *Tagetes minuta* posee como componentes mayoritarios al limoneno (66,3%),  $\alpha$ -pineno (11,8%) y (E)-ocimeno (19,1%); mientras que el aceite *Rosmarinus officinalis* posee alcanfor (33,6%), linalol (4,1%), terpinen-4-ol (8,4%),  $\alpha$ -terpineol (8,2%), verbenona (24,9%) y (E)-cariofileno (14,8%). Ambos aceites produjeron una repelencia del 90% para una concentración elevada (90%), e incluso esta tendencia se mantuvo cuando las concentraciones variaron desde un 12,5% hasta un 50%.

El estudio de repelencia de Watanabe et al. (1993) consistió en el empleo del aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* y de sus componentes sobre el mosquito *Aedes albopictus*. Estos autores encontraron que este aceite produjo una buena repelencia en comparación con el DEET.

Los productos derivados de aceites de eucaliptos empleados como repelentes de insectos pueden proteger de las picaduras de los mismos hasta por 8 horas (dependiendo de la concentración usada) (Batish et al. 2008). Además, Mumcuoglu et al. (1996) demostraron en telas impregnadas que el efecto repelente de eucalipto sobre *P.h.humanus* varió dentro de un período de 8 días desde 100% (día 1) hasta aprox. 60% (día 8).

Esto nos indicaría en forma indirecta de que los aceites de *Eucalyptus* pueden ser empleados en un futuro cercano como repelente de piojos de la cabeza. Por ejemplo, el producto derivado de *Eucalyptus* llamado “Quwenling” es un repelente de insectos de venta comercial en China con gran aceptación dentro del mercado reemplazando a los repelentes tradicionales (Peterson & Coats 2001).



### 4.4.3. El efecto repelente de los monoterpenoides sobre *P.h.capitis*

#### 4.4.3.1. Resultados

Cuando comparamos la actividad repelente de los compuestos de aceites esenciales tenemos que decir que se han encontrado diferencias significativas entre los mismos ( $F= 10,7$ ;  $df= 12, 40$ ;  $P < 0,001$ ) (Tabla 31).

**Tabla 31.** Actividad repelente de los monoterpenoides empleados sobre *P.h.capitis*.

Clase química	Compuesto	Actividad Repelente <sup>a</sup>
		IR $\pm$ ES
Eter	1,8-cineol	23,4 $\pm$ 8 ab
	Anisol	17,1 $\pm$ 21 <sup>b</sup>
	Anetol	31,4 $\pm$ 11 abc
	Eugenol	31,7 $\pm$ 25 abc
Hidrocarburo	Limoneno	5,0 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
	$\beta$ -pineno	8,3 $\pm$ 0,5 a
	$\alpha$ -pineno	-2,7 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
	$\beta$ -mirceno	- <sup>c</sup>
	Terpineno	46,1 $\pm$ 1 cd
Alcohol	Linalol	- <sup>c</sup>
	Alcohol bencílico	57,7 $\pm$ 20de
	Borneol	18,9 $\pm$ 19 <sup>b</sup>
	Citronelol	31,0 $\pm$ 2abc
	(-)-mentol	53,5 $\pm$ 13 cd
	Isomentol	22,4 $\pm$ 22 <sup>b</sup>
	(+)-mentol	36,4 $\pm$ 1 bcd

Cetona	Mentona	39,2 ± 16 bcd
	Pulegona	- <sup>c</sup>
	Alcanfor	33,9 ± 21 abc
	Carvona	- <sup>c</sup>
Fenol	Timol	52,7 ± 10 cd
Control positivo	Piperonal	72,2 ± 11,16 e

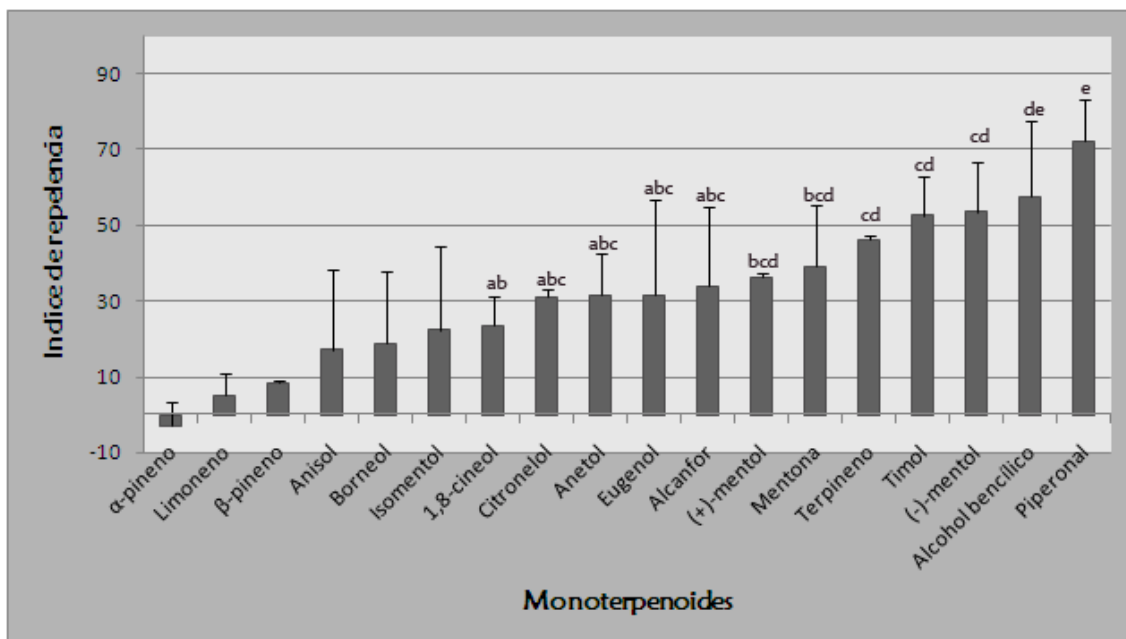
<sup>a</sup> La separación entre las medias está indicada por las letras diferentes obtenida por un test de LSD ( $P < 0,05$ ).

<sup>b</sup> No incluido en el análisis estadístico debido a que el ES fue mayor que la media del índice de repelencia.

<sup>c</sup> No estudiado.

El compuesto con mayor efectividad repelente fue el alcohol bencílico con un índice de repelencia promedio de 57,74%, seguido de (-)-mentol, mentona y (+)-mentol con valores de IR respectivos de 53,56; 39,23 y 36,45%.

Con respecto al control positivo piperonal, tenemos que decir que el único compuesto que no difirió estadísticamente de este fue el alcohol bencílico. A pesar de ser en promedio menor. Además, existieron diferencias significativas entre el alcohol bencílico y el grupo formado por el  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, citronelol, anetol, eugenol y alcanfor (**Figura 26**).



**Figura 26.** Actividad repelente de los monoterpenoides empleados en los piojos de la cabeza. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se realizó un análisis de regresión lineal para saber si la efectividad repelente está relacionada de alguna manera con las propiedades fisicoquímicas antes estudiadas, tales como el log P y la presión de vapor (PV).

No se encontró correlación significativa entre el índice de repelencia y el log P para un nivel de confianza del 90%.

La ecuación resultante fue:  $IR = 49,976 \pm 13,69 - 5,079 \pm 4,40 \log P$  ( $r^2 = 9,96$ ;  $df = 1,12$ ;  $F = 1,32$ ;  $P = 0,271$ ).

Los valores del índice de repelencia fueron independientes de la presión de vapor a un nivel de confianza del 95%.

La ecuación resultante de dicho análisis fue:  $IR = 35,7533 \pm 9,19 + 0,0429 \pm 0,14 PV$ . ( $r^2 = 0,976$ ;  $df = 1,9$ ;  $F = 0,08$ ;  $P = 0,772$ ).

#### 4.4.3.2. Discusión

Hay que resaltar que este estudio es el primer trabajo en los que se estudia el efecto repelente de compuestos monoterpenoides de forma individual sobre *P.h.capitis* resistentes a permetrina.

Es de suma importancia emplear compuestos que ejerzan un efecto repelente sobre piojos para evitar que estos pasen o colonizen nuevos huéspedes. Sin embargo, ellos pueden ser únicamente efectivos si la prevalencia es baja y solo si la persona a la cual se le aplica el producto no posee piojos en ese momento (Burgess 2004). El trabajo de Burgess (1993 b) fue el primero en demostrar la eficacia *in vitro* como repelente del piperonal o heliotropina aplicado sobre papeles de filtro o pedazos de pelo impregnados con este insecticida. Este producto produjo una repelencia del 90% en una concentración del 2% en comparación con el 50% de una solución de DEET.

En el pasado, el aceite de lavanda fue utilizado para proteger a los chicos de la infestación de piojos (Spencer 1941). En bibliografía, el único trabajo que estudió el efecto repelente sobre piojos de la ropa o del cuerpo (*P.h.humanus*) fue realizado hace más de trece años atrás por Mumcuoglu et al. (1996). Este estudio consistió en la impregnación de pelos con cuatro aceites esenciales y con diez monoterpenoides. A modo de comparar los resultados presentados en esta tesis, tenemos que aclarar que la metodología de estos autores difiere considerablemente de la realizada aquí. Solamente los compuestos citronelal y geraniol produjeron repelencias considerables que incluso nunca superaron el 50%. En nuestro estudio, 3 de los 21 componentes produjeron repelencias superiores al 50% y además este método permitió diferenciar el efecto repelente entre enantiómeros del mentol, con el (-)-mentol > (+)-mentol > isomentol.

Como fue expresado por Mumcuoglu et al. (1996), algunas técnicas para estudiar repelencia son realizadas sobre superficies neutras y no consideran la atracción del parásito hacia su hospedador. Por lo tanto, cuando se les presenta la opción a los animales entre una superficie tratada y una no tratada, es probable que estos elijan el área no tratada; ya que en ausencia de cualquier molécula atractante, pequeñas cantidades de un repelente pueden ejercer su efecto. En nuestro caso tuvimos en cuenta la capacidad de los piojos de caminar sobre los bordes (i.e. tigmotaxia) y se pudo medir que en la arena experimental en ausencia de tratamiento alguno, los piojos permanecían más del 85% de su tiempo en el área concéntrica externa. Con esto en mente, se diseñaron los experimentos de manera tal que se trataran las superficies externas con el “probable repelente”, forzando a los insectos a caminar hacia el centro. Este método permitió además impedir la interacción entre sustancias atractantes y repelentes que pudiesen confundir o “contaminar” los resultados.

Existen una gran variedad de compuestos a los que generalmente se les denomina como repelentes de insectos. Tal vez el ejemplo más común sea el de los piretroides y el del DDT, quienes producen en dosis adecuadas un efecto

insecticida y a menor dosis efectos tóxicos subletales causando que el insecto sea incapaz de escapar de la región del insecticida. Sin embargo, la repelencia debe estar relacionada con un efecto comportamental causado por la percepción sensorial del sistema nervioso periférico, logrando que el insecto no pique (o muerda) y que se aleje del huésped. Este comportamiento es considerado como el producido por un verdadero repelente (Pickett et al. 2008).

Con respecto al modo de acción de un compuesto repelente tenemos que decir que existen dos teorías: 1) el compuesto *per se* interfiere con la detección del compuesto atrayente impidiendo que estas moléculas estén disponibles para que puedan ser reconocidas por el insecto y 2) el insecto posee receptores sensoriales específicos que ante la presencia de un compuesto repelente, se ve alterada e inhibida la respuesta del sistema olfativo del insecto impidiendo reconocer a una señal química atractiva normal (Syed & Leal 2008). En el primer caso el repelente engloba al atrayente de acuerdo a propiedades más bien físico-químicas del compuesto que a lo relacionado con el insecto, mientras que en el segundo caso la inhibición ocurriría a nivel del sistema sensorial del insecto.

Syed & Leal (2008) demostraron la existencia en algunos insectos de neuronas receptoras olfativas específicas que responden al DEET y que se encuentran localizadas en los palpos de las antenas y de las maxilas del mosquito *Culex quinquefasciatus*. Estas neuronas se encontraban localizadas cerca de los órganos sensoriales en forma de cuerno llamados sensilias tricoides. Cuando el DEET fue expuesto a los animales, los autores registraron un comportamiento de evitación dosis-dependiente.

El trabajo de Sfara (2008) consistió de la exposición de dosis crecientes de DEET en dos intervalos consecutivos sobre ninfas de la especie *Rhodnius prolixus*. Cuando los insectos fueron expuestos a 70  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  se produjo una respuesta repelente normal para ambos períodos. Sin embargo, cuando se expusieron a 700 y 1750  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  la repelencia en el segundo período fue menor que la observada en el primero sugiriendo que la exposición a altas concentraciones de DEET produjo en las vinchucas una saturación en los receptores sensoriales provocando adaptación sensorial evidenciada por la disminución de la respuesta a lo largo del tiempo.

Se ha demostrado que las garrapatas pueden detectar los compuestos repelentes con los tarsos del primer par de patas (el órgano de Haller), mientras que los insectos detectan las mismas sustancias con las antenas; y que estas estructuras son homólogas entre estas dos clases de animales. Además se sabe que puede existir una respuesta diferencial por parte de distintos insectos a los

mismos repelentes y que esto no parecería estar relacionado con la distancia taxonómica de los diferentes grupos. Por ejemplo, existe una variación de 2 grados de diferencia en el efecto producido por el DEET sobre diferentes cepas de *A. aegypti* (Peterson & Coats 2001).

En nuestro trabajo no se encontró relación alguna entre los parámetros presión de vapor, log P y actividad repelente. Esto también fue observado y discutido por Peterson & Coats (2001), ya que parecería que no existen muchos trabajos en los que la actividad repelente pueda ser correlacionada con algún parámetro físico-químico. El único parámetro que podría llegar a ser tenido en cuenta es la presión de vapor, ya que los repelentes tópicos más efectivos sobre mosquitos tuvieron pesos moleculares comprendidos entre 150 y 250 (Taylor et al. 1996).

Con respecto al modo de acción de los compuestos repelentes sobre piojos humanos, hay que mencionar el trabajo realizado por Peock & Maunder (1993). Estos autores usaron piojos a los que le sacaron el segmento apical de ambas antenas y luego los expusieron en arenas tratadas con piperonal y observaron que no hubo ninguna diferencia comportamental o estadística de lo esperado para una distribución al azar. Ellos sugirieron que los órganos de los sentidos en la punta de la antena serían necesarios para la detección del compuesto repelente. Busvine (1971) dijo que los piojos de la cabeza se encuentran adheridos al pelo y que están en estrecho contacto con su fuente de alimento, por lo que los órganos de los sentidos no jugarían un rol tan importante como lo hacen en otros hematófagos. En vez de ser atraídos hacia un estímulo favorable, los piojos reaccionarían por un reconocimiento del tipo klino-táctico o klino-cinético de zonas desfavorables. Por lo tanto, esto sugeriría que el fenómeno de repelencia en este grupo de hematófagos podría estar dado por un efecto anti-gustatorio o de irritación química que impide que los piojos entren en contacto con el material repelente.

Canyon & Speare (2006) estudiaron el efecto repelente de más de diez mezclas de aceites esenciales sobre pelos impregnados en *P.h. capitis* colectados en Australia. A pesar que todas los compuestos redujeron la transmisión de los piojos a los pelos tratados entre un 33 y 65%, este efecto fue debido a la naturaleza deslizante de los pelos impregnados y no a un efecto repelente *per se*. Esto explicaría en parte el porque los piojos de la cabeza son mayormente encontrados en cabezas con pelos limpios que en cabezas con pelos sucios y grasosos.

La aplicación de un repelente sobre individuos infestados con piojos podría aumentar la dispersión de los mismos hacia otras personas cercanas del grupo social o familiar. Por ejemplo, si un chico con piojos es tratado con un repelente, es probable que los insectos tiendan a migrar de esa cabeza hacia otra no tratada; por lo que lo más adecuado en ese caso sería el de aplicar un repelente a todo el grupo social y familiar (Heukelbach et al. 2006).

#### 4.4.4. Repelencia de Lactonas

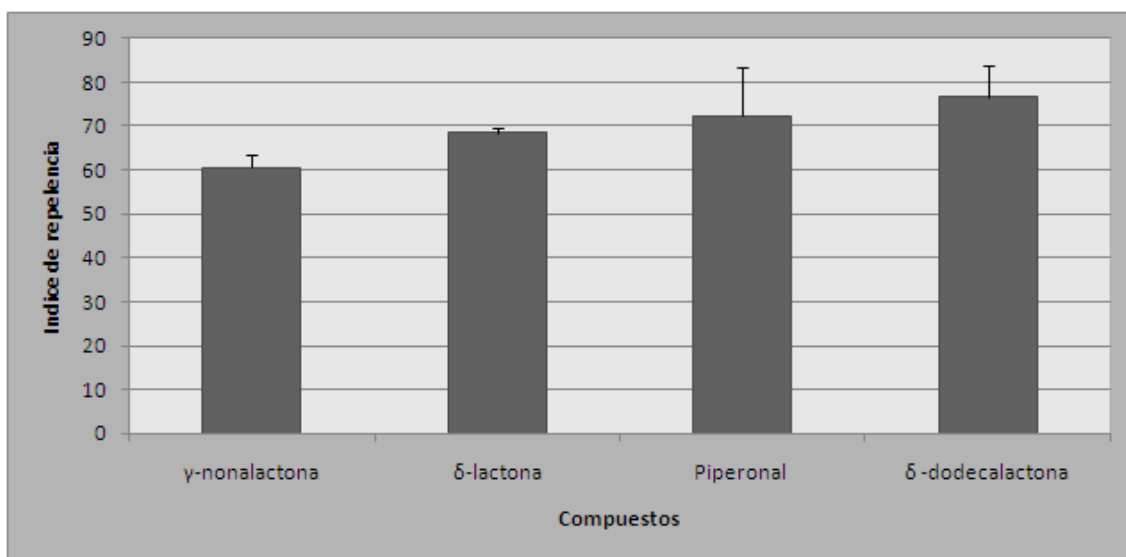
##### 4.4.4.1. Resultados

La actividad repelente de las lactonas acíclicas estudiadas en esta tesis se muestra en la **Tabla 32**.

**Tabla 32.** Actividad repelente de lactonas acíclicas sobre piojos de la cabeza.

Compuesto	Actividad Repelente IR $\pm$ ES
$\delta$ -lactona	68,48 $\pm$ 1
$\gamma$ -nonalactona	60,50 $\pm$ 3
$\delta$ -dodecalactona	76,68 $\pm$ 7
Piperonal	72,26 $\pm$ 11,16

De todos los compuestos estudiados la  $\delta$ -dodecalactona produjo el efecto repelente mayor con un índice de repelencia de 76,68%, aunque no difirió significativamente de las otras lactonas ni del control positivo ( $F=0,96$ ;  $df=3,23$ ;  $P=0,428$ ) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Actividad repelente de lactonas acíclicas sobre *P.h.capitis*.



#### 4.4.4.2. Discusión

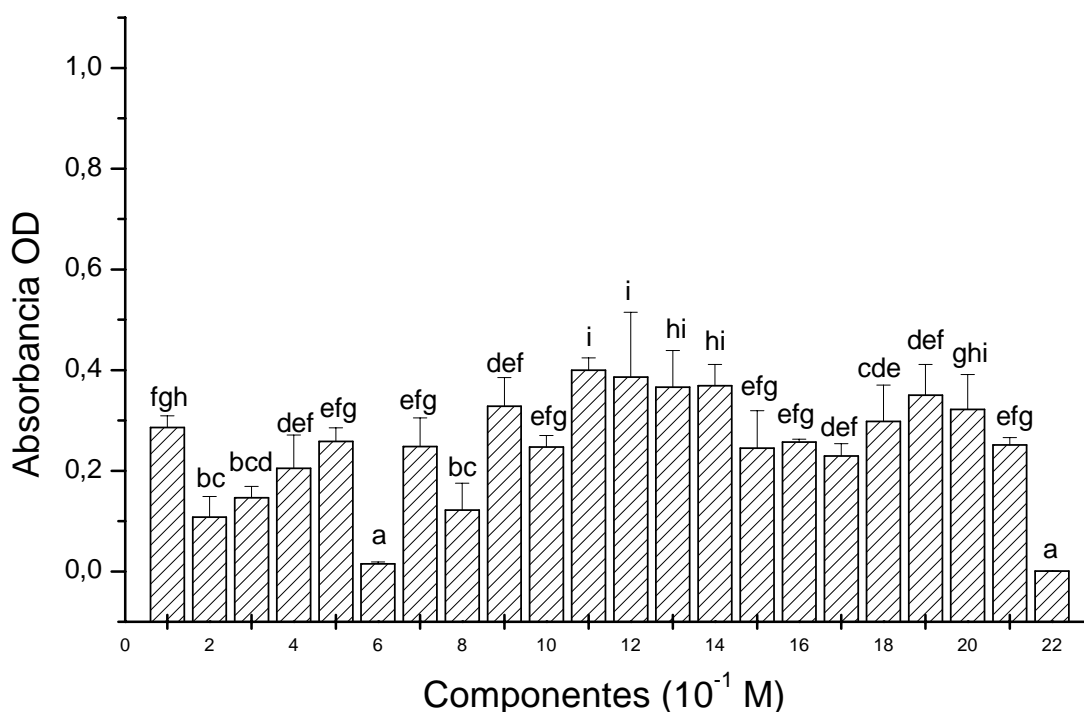
Este es el primer reporte de los resultados de la potencialidad de las lactonas acíclicas como repelentes de piojos de la cabeza. Además, su efectividad repelente varió entre 60,5 y 76,68%, y en el mismo orden de magnitud que el reconocido repelente piperonal. Cuando comparamos con los valores obtenidos de los monoterpenoides estudiados en la sección anterior, tenemos que destacar que las lactonas produjeron mayor repelencia que los 17 compuestos terpénicos estudiados y que todos los aceites esenciales y compuestos estudiados por Mumcuoglu et al. (1996). Esto nos daría una pauta del potencial de las lactonas como repelentes. Además, si consideramos su toxicidad hay que mencionar que todas ellas presentan un valor de toxicidad oral y dérmica  $> 5000$  mg/kg, lo cual las hace totalmente seguras para ser aplicadas en un formulado repelente de liberación lenta para permitir la protección ideal por más tiempo. Esto es totalmente coherente ya que este tipo de lactonas son empleados como saborizantes en alimentos, bebidas y cremas. Dado que estos compuestos no produjeron volteo alguno sobre los piojos (datos no mostrados en esta tesis), habría que estudiar la posibilidad de ser mezcladas con aceites esenciales o con monoterpenoides para tener un compuesto repelente y que produzca volteo sobre los piojos.

## 4.5. Medición de la actividad de acetilcolinesterasa de los monoterpenoides

### 4.5.1. Resultados y discusión

#### 4.5.1.1 Inhibición de la actividad AChE de anguila eléctrica

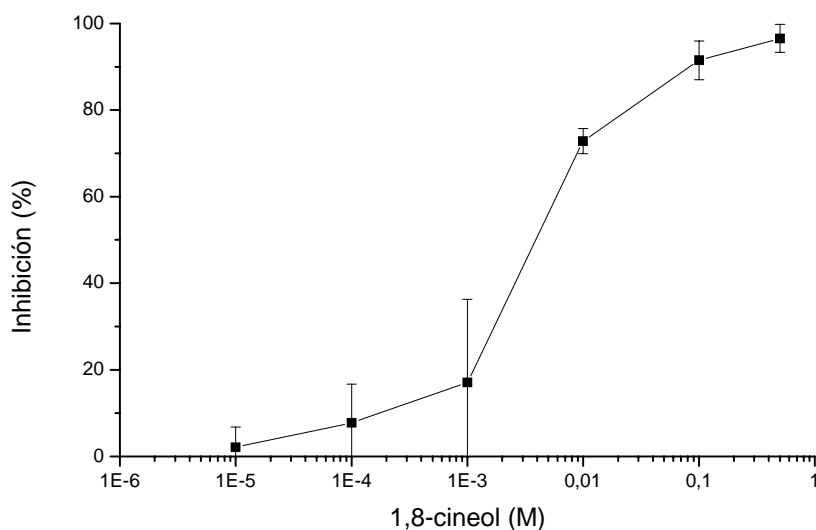
La inhibición de la actividad anticolinesterásica AChE de 20 monoterpenoides se muestra en la **Figura 28**. Existieron diferencias significativas en la inhibición de la AChE de anguila eléctrica entre los distintos monoterpenoides ( $F=12,86$ ;  $df=21, 44$ ;  $P<0,0001$ ).



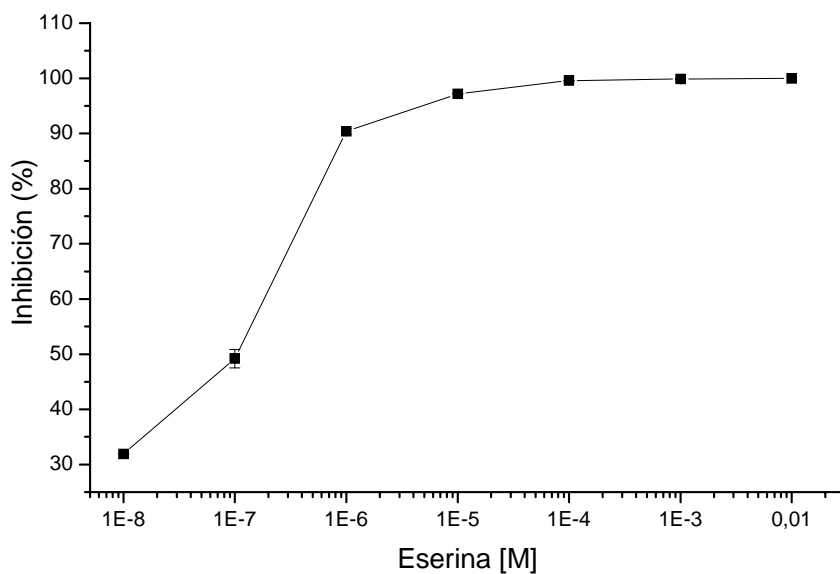
**Figura 28.** Inhibición de la actividad de AChE de anguila eléctrica por monoterpenoides (medias  $\pm$  error estándar). Monoterpenoides: 1:acetato de linalilo, 2:mentona, 3:carvona, 4:alcanfor, 5:anetol, 6:1,8 cineol, 7:anisol, 8:eugenol, 9:linalol, 10:borneol, 11:alcohol nonílico, 12:isomentol, 13:(-)-mentol, 14:(+)-mentol, 15:citronelol, 16: $\alpha$ -pineno, 17: $\beta$ -pineno, 18:limoneno, 19:  $\beta$ -mirceno, 20:terpineno, 21:control negativo (sin monoterpenoides) y 22:eserina (control positivo)( $10^{-4}$ M). Letras distintas indican diferencias significativas por medio del test de Duncan ( $p<0,05$ ).

El compuesto que mayor inhibición de AChE de anguila eléctrica produjo fue el 1,8-cineol. A pesar de que este compuesto y la eserina (control positivo) presentaron valores de inhibición similares, la eserina fue más potente que el 1,8-cineol, con valores respectivos de concentración de  $10^{-4}$  M y  $10^{-1}$  M.

Luego de este análisis se procedió a realizar la inhibición de AChE de anguila eléctrica dependiente de la concentración del compuesto más potente (1,8-cineol) y de su comparación con el control positivo (eserina) **Figuras 29-30**.



**Figura 29.** Inhibición de la actividad de AChE de anguila eléctrica por el 1,8-cineol.

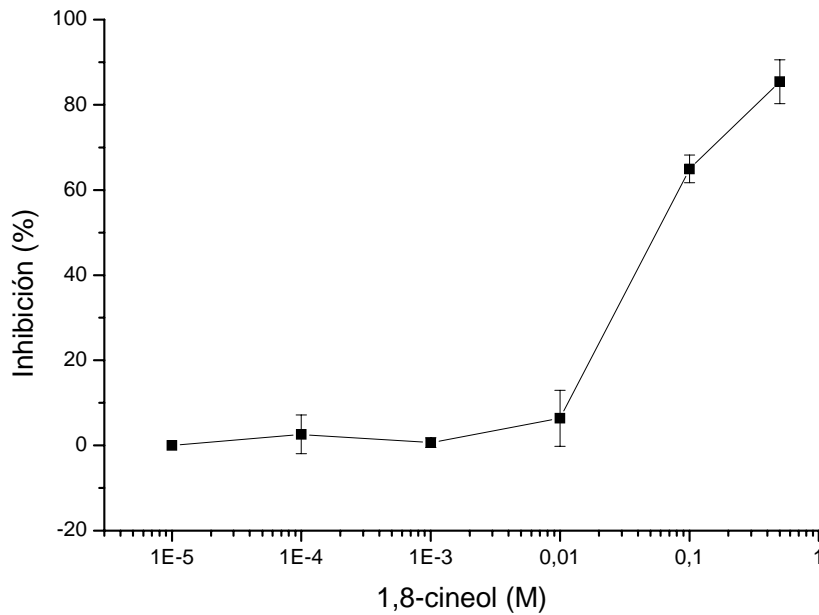


**Figura 30.** Inhibición de la actividad de AChE de anguila eléctrica por la eserina.

Los valores de la concentración de inhibición  $CI_{50}$  para el 1,8-cineol y la eserina fueron respectivamente de  $6 \times 10^{-3}$  M y  $1 \times 10^{-7}$  M. Esto muestra que la eserina fue mejor inhibidor de la AChE que el monoterpenoide 1,8-cineol.

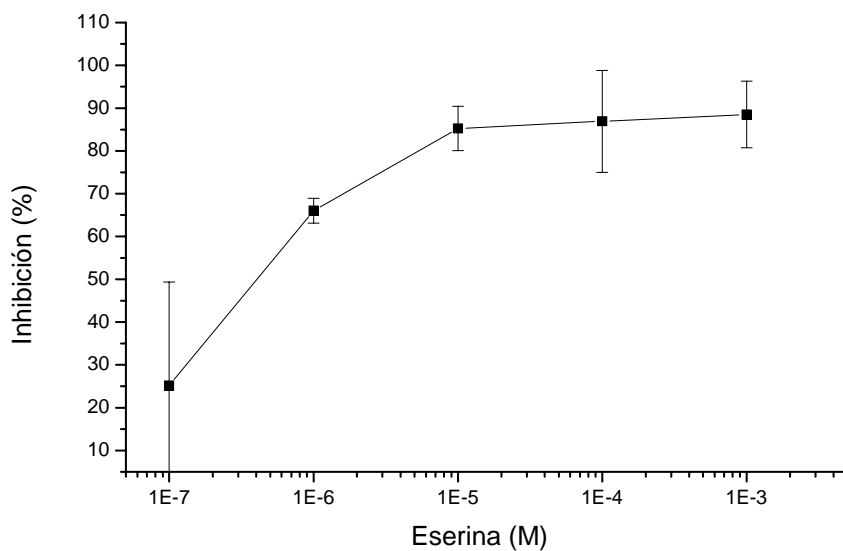
#### 4.5.1.2. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa obtenida de homogenato de *P.h.capitis*

La inhibición de la actividad AChE de homogenato de piojos de la cabeza por el terpeno 1,8-cineol se puede observar en la **Figura 31**.



**Figura 31.** Inhibición de la actividad de AChE de homogenato de piojos por el 1,8-cineol.

En comparación con la inhibición de AChE producida por la eserina (**Figura 32**), los valores de  $CI_{50}$  para el 1,8-cineol y la eserina fueron respectivamente de  $7,7 \times 10^{-2}$  M y de  $1 \times 10^{-6}$  M. De nuevo, la eserina produjo mayor inhibición de la AChE obtenida de homogenato de piojo de la cabeza.



**Figura 32.** Inhibición de la actividad de AChE de homogenato de piojos por la eserina.

Existen varios trabajos que han reportado la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de anguila eléctrica y de eritrocitos bovinos por parte de monoterpenos pertenecientes a diferentes grupos químicos (Grundy & Still 1985, Ryan & Byrne 1988, Miyazawa et al. 1997, 1998, Mills et al. 2004, Miyazawa & Yamafuji 2005, Dohi et al. 2009). Entre los compuestos estudiados por Mills et al. (2004) y por Dohi et al. (2009), tenemos que mencionar que al igual que lo obtenido en esta tesis, el compuesto 1,8-cineol demostró tener una gran inhibición sobre la enzima AChE de anguila eléctrica. Esto también fue observado por Miyazawa et al. (1998) sobre AChE de eritrocitos bovinos. En todos estos trabajos la inhibición del 1,8-cineol fue menor que el obtenido para la eserina.

Como fue mencionado por Keane & Ryan (1999), la validación de los resultados de inhibición de la actividad AChE in vitro (i.e. AChE de anguila eléctrica o de eritrocito bovino) debe ser realizada in vivo para demostrar una relación causa-efecto entre la lesión bioquímica y el efecto fisiológico. Con esto en mente, se realizó la medición de la inhibición de AChE obtenida a partir de homogenato de piojos. Es interesante remarcar que este es el primer trabajo que demuestra que el 1,8-cineol fue un fuerte inhibidor de la acetilcolinesterasa obtenida de piojos de la cabeza. El trabajo de Keane & Ryan (1999) estudió el efecto inhibitorio de varios terpenoides sobre la AChE obtenida de la polilla *Galleria mellonella* (L.) y obtuvo una moderada inhibición del compuesto 1,8-cineol.

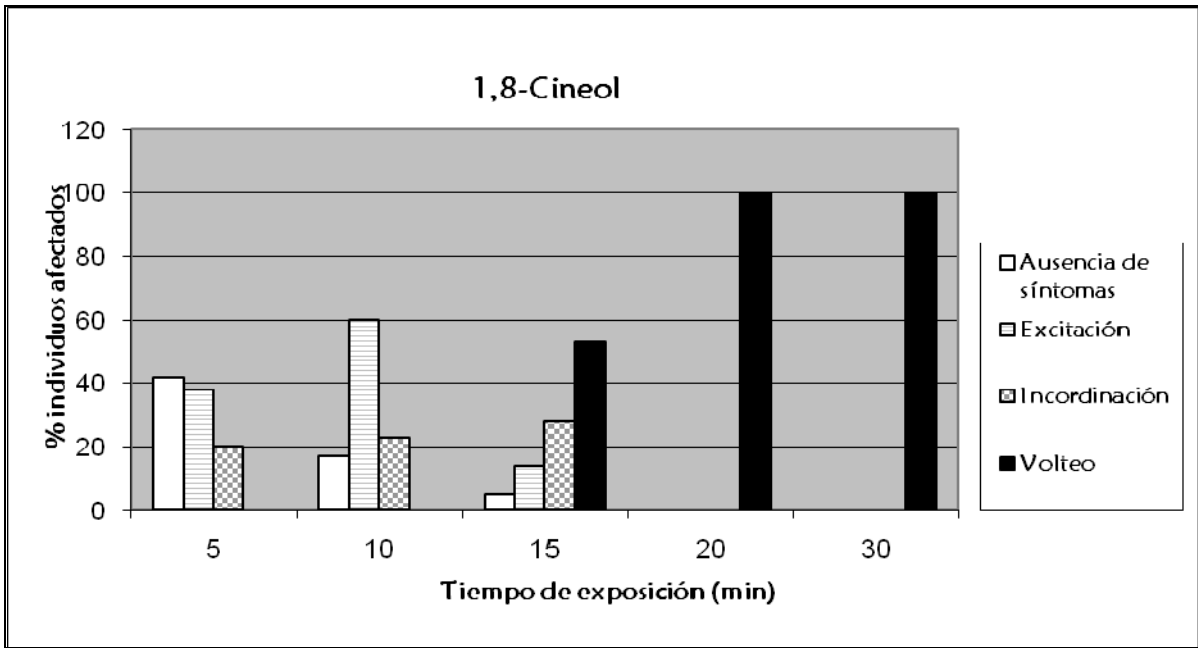
#### 4.5.1.3. Secuencia de intoxicación de los piojos afectados a los vapores de 1,8-cineol y DDVP

En el estudio in vivo, la actividad AChE de los piojos expuestos a los vapores del 1,8-cineol y del organofosforado DDVP fue medida a lo largo de diferentes intervalos de tiempo. La secuencia de síntomas medidos durante 1 hora se observa en la **Tabla 33**.

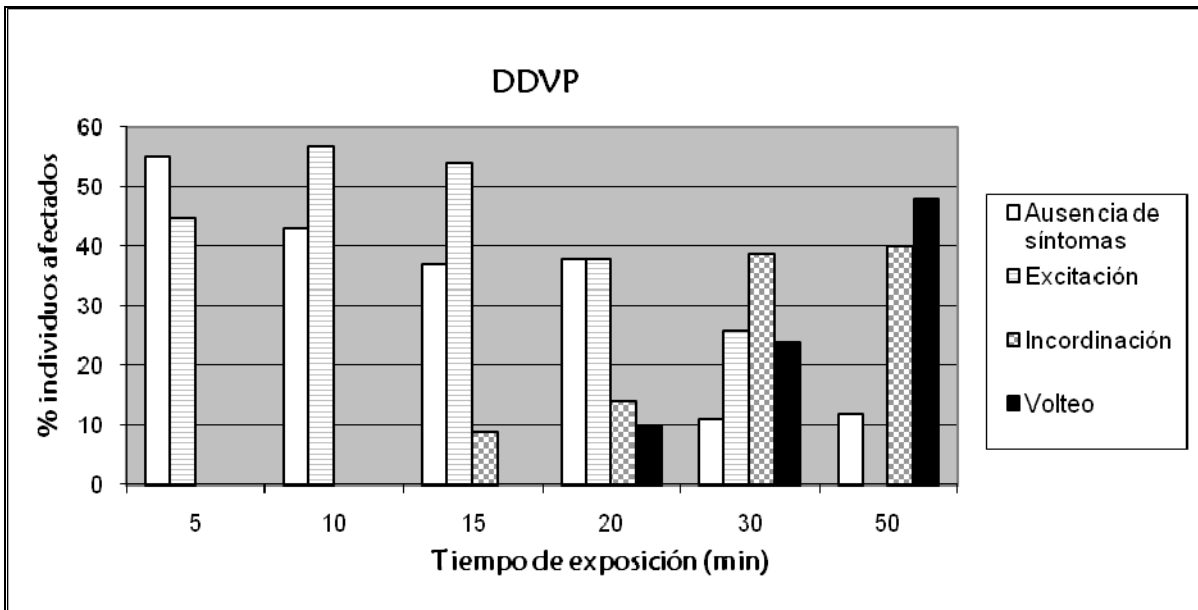
**Tabla 33.** Porcentaje de individuos afectados durante la exposición a los vapores de los compuestos 1,8-cineol y DDVP. Síntomas: A= incremento actividad locomotora, B=incoordinación de la caminata, C= volteo y AS= ausencia de síntomas.

Tiempo de exposición (min)	Síntomas							
	DDVP				1,8-cineol			
	A	B	C	AS	A	B	C	AS
5	45	-	-	55	38	20	-	42
10	57	-	-	43	60	23	-	17
15	54	9	-	37	14	28	53	5
20	38	14	10	38	-	-	100	-
30	26	39	24	11				
40	10	54	32	4				
50	-	40	48	12				
60	-	30	50	20				

Los piojos de la cabeza que estuvieron expuestos a los vapores del 1,8-cineol se vieron afectados más rápidamente que el DDVP. Luego de 20 minutos de exposición al monoterpenoide el 100 % de los piojos estaban en la última etapa de intoxicación (i.e. volteo). Por otro lado, luego de 60 minutos de exposición a los vapores del DDVP, el 50% de los piojos estaban volteados (**Figura 33**).



a



b

**Figura 33.** Secuencia de síntomas de intoxicación de los piojos expuestos a los vapores de: (a) 1,8-cineol and (b) DDVP.



#### 4.5.1.4. Inhibición de la actividad AChE obtenida de homogenato de piojos previamente expuestos a los vapores de 1,8-cineol y DDVP

##### 4.5.1.4.1. Resultados y discusión

La inhibición de la actividad de AChE de piojos de la cabeza previamente expuestos a los vapores de 1,8-cineol y DDVP se muestra en la **Tabla 34**.

**Tabla 34.** Inhibición de la actividad de AChE de piojos previamente expuestos a los vapores de 1,8-cineol y DDVP.

Tiempo de exposición (min)	Inhibición de la actividad de AChE (% ± ES)	
	1,8-cineol	DDVP
5	1,41 ± 2,4	-
10	16,67 ± 14,8	0
20	4,89 ± 8,5	-
30	13,3 ± 18,8	61,83 ± 3,3
50	-	75,50 ± 2,8
75	-	80,3 ± 20
90	-	76,5 ± 20

A pesar de que todos los piojos expuestos al 1,8-cineol se encontraban volteados, solamente se encontró que en promedio un 13% de la AChE estaba inhibida. Esto parecería reflejar que no existe correlación entre los síntomas neurotóxicos y la actividad de inhibición de la AChE. Por otro lado, los piojos que estuvieron expuestos al DDVP mostraron una gran inhibición de la AChE que se correlacionaba con los síntomas neurotóxicos.

El análisis in vivo mostró que tanto el 1,8-cineol como el DDVP presentaron síntomas de intoxicación similares sugiriendo un sitio de acción neurotóxico (Isman 1999). Sin embargo, no se encontró correlación entre la inhibición in vivo de la AChE y los síntomas de intoxicación observados en los piojos expuestos a los vapores del 1,8-cineol. Esto parecería indicar que la AChE puede no ser el primer sitio de acción de este monoterpenoide, o al menos no el blanco primario responsable de la intoxicación de los insectos. Resultados similares (i.e. ausencia de correlación) fueron encontrados por Grundy & Still (1985). Estos autores encontraron que el 1,2-epóxido pulegona inhibió in vitro la AChE de cucarachas de Madagascar *Gromphadorhina portentosa*, aunque no hallaron correlación de tipo alguno entre la inhibición in vivo de la AChE y el desarrollo progresivo de los síntomas de intoxicación observados. Basado en la relación

entre las toxicidades relativas de seis monoterpenos y de su afinidad absoluta o estricta, los autores concluyen que el modo de acción debe estar dado a través de la inhibición de la AChE, a pesar de no poder ser demostrado en sus experimentos de correlación.

Más recientemente, Abdelgaleil et al. (2009) estudiaron la actividad fumígena, de contacto y la inhibición de AChE de 11 monoterpenos sobre los gorgojos *Sitophilus arYZae* y *Tribolium castaneum*. Estos autores encontraron que el 1,8-cineol fue el compuesto que mayor efecto fumígeno produjo sobre ambas especies y que además produjo una fuerte inhibición in vitro de la AChE aislada de estos insectos.

En nuestro estudio, la baja inhibición de AChE del 1,8-cineol medida en los ensayos in vivo debería ser analizada considerando las dos isoformas de AChE reportadas para insectos (Bourguet et al. 1997), y particularmente en piojos del género *Pediculus* (Kono & Tomita 2006). Estos últimos autores identificaron las secuencias cADN que codifican los precursores AChE-AO y AP-, midieron in vitro la inhibición de la AChE producida por el fenitroxon (organofosforado) y carbarilo (carbamato), y luego determinaron la abundancia relativa de los genes transcriptos AP-AChE en proporción a los genes AO-AChE. Basados en estos hallazgos, los autores sugieron el potencial significativo de la isoforma AP-AChE en el piojo del cuerpo en relación con la eficacia de los pediculicidas cuyo blanco es la AChE. La actividad insecticida in vivo de la mayoría de los insecticidas metil carbamatos y organofosforados es mediante la unión al sitio hidrofóbico de la AChE (Hansch & Deutsch 1966).

El estudio de Miyazawa & Yamafuji (2005) mostró la existencia de monoterpenos que inhibieron la AChE en forma no competitiva ya que la inhibición disminuyó a medida que disminuía la concentración del sustrato (acetilcolina-ACh-). Estos compuestos no se unirían a la enzima sino al complejo enzima-sustrato, evitando que se forme el producto. Estos autores encontraron además compuestos que se unían directamente a la enzima, inhibiendo la AChE en forma competitiva. Esto fue propuesto cuando se observó que la inhibición aumentaba a medida que disminuía la concentración del sustrato, indicando que los compuestos competían con el sustrato por el sitio activo de la enzima. La interacción del sustrato con el centro activo de la AChE involucra tres subsitios, el aniónico, esterásico y el hidrofóbico. De acuerdo a Ryan & Byrne (1988), los monoterpenos que compiten de forma directa actuarían sobre el sitio hidrofóbico de la AChE.

Sin embargo, no habría que descartar las otras vías propuestas como el sitio de acción de los monoterpenos tales como los receptores GABA (Priestley et al. 2003) y los receptores octopaminérgicos (Enan 2001, Kostyukovsky et al. 2002).

#### 4.6. Rol de las OFM de *Pediculus humanus capitis* en la degradación del monoterpeno 1,8-cineol y del organofosforado DDVP *in vivo*

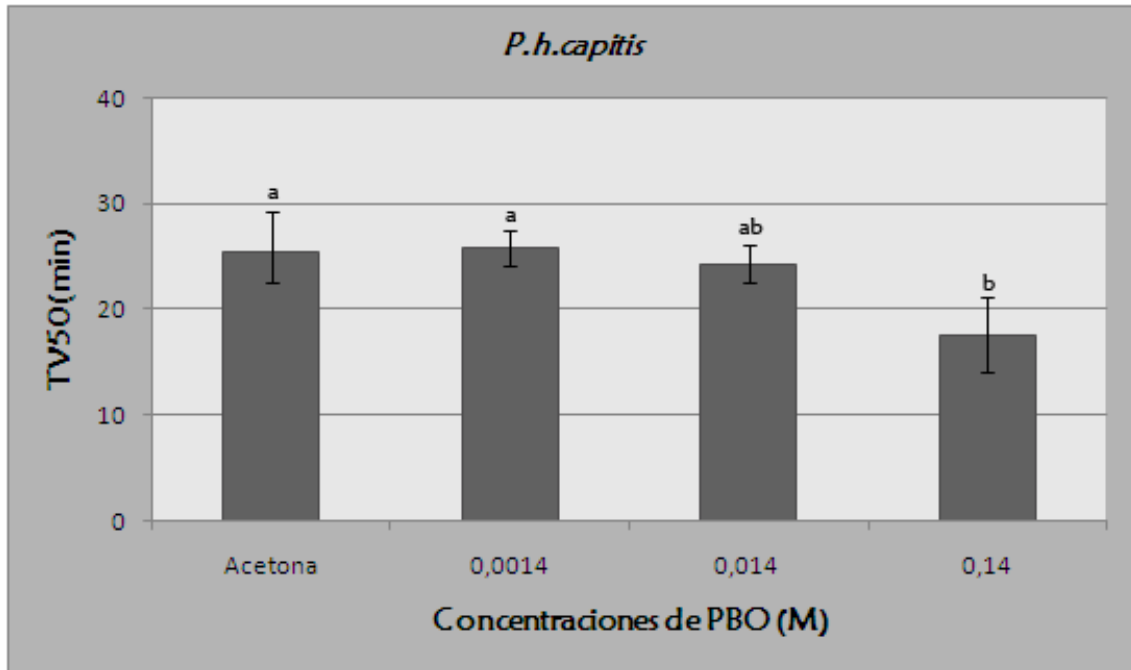
##### 4.6.1. Resultados y discusión

El volteo producido por el tópico de concentraciones crecientes subletales del inhibidor de oxidasas de función mixta butóxido de piperonilo (PBO) y la posterior exposición a los vapores del monoterpeno 1,8-cineol se aprecia en la **Tabla 35**.

**Tabla 35.** Dosis letales 50 (DL<sub>50</sub>) de las distintas concentraciones de butóxido de piperonilo (PBO) y posterior exposición de *P.h.capitis* a los vapores de 1,8-cineol. Letras distintas señalan las diferencias significativas a un  $P < 0,05$ .

Concentraciones de PBO (M)	TV <sub>50</sub> (min) (95% IC)
Control (acetona)	25,431 (23,782-27,10) a
0,0014	25,882 (24,074-27,72) a
0,014	24,32 (20,853-27,984) ab
0,14	17,515 (14,515-20,282) b

Existieron diferencias significativas entre los tiempos de volteo (TV<sub>50</sub>) de algunas de las concentraciones estudiadas. Por ejemplo, la concentración de 0,14 M fue la que produjo la mayor intoxicación con un TV<sub>50</sub> de 17,5 min y difirió de la concentración de 0,0014 M (**Figura 34**).



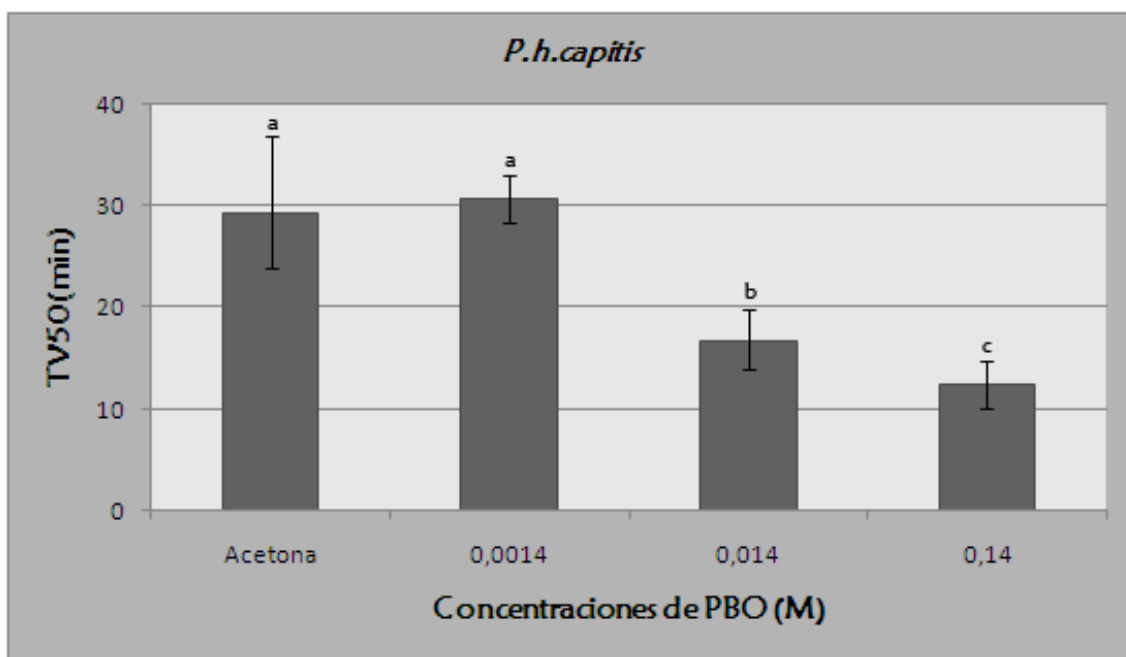
**Figura 34.** Tópico con PBO y posterior exposición a 1,8-cineol sobre *Pediculus humanus capitis*. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para poder analizar y comparar con este método el efecto producido por el PBO sobre las oxidasas de función mixta y de su posible rol en la degradación del 1,8-cineol, se procedió a ver el efecto en piojos expuestos a un conocido insecticida volátil (DDVP) del cual se sabe que las OFM juegan un importante papel en la degradación del mismo (**Tabla 36**).

**Tabla 36.** Dosis letales 50 ( $DL_{50}$ ) de las distintas concentraciones de butóxido de piperonilo (PBO) y posterior exposición de *P.h.capitis* a los vapores de DDVP. Letras distintas señalan las diferencias significativas a un ( $P < 0,05$ ).

Concentraciones de PBO (M)	TV <sub>50</sub> (min) (95% IC)
Control (acetona)	29,145 (26,923-31,473) a
0,0014	30,671 (27,964-33,838) a
0,014	16,726 (14,355-18,96) b
0,14	12,438 (10,44-14,341) c

De dicho estudio se pudo ver la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones empleadas de PBO y el volteo producido en los piojos. De ello se puede ver que la concentración de 0,14 M fue la que produjo un mayor efecto de volteo con un  $TV_{50}$  de 12,44 min (Figura 35).



**Figura 35.** Tópico con PBO y posterior exposición a DDVP sobre *Pediculus humanus capitis*. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Si bien el compuesto butóxido de piperonilo (PBO) es un conocido inhibidor de las monooxigenasas microsomales (inhibidoras del citocromo P450), las cuales están involucradas en el metabolismo y en la detoxificación de una gran variedad de insecticidas sintéticos. La gran capacidad de las monooxigenasas para metabolizar sustratos diversos se debe a la diversidad de isoformas del P450 (Scott & Wen 2001). La detoxificación mediada por el citocromo P450 de insecticidas sintéticos es uno de los mecanismos de resistencia a insecticidas más importantes, ya que este mecanismo puede afectar potencialmente a varias clases de insecticidas y conferir resistencia cruzada entre compuestos no relacionados estructuralmente.

Recientemente, Waliwitiya et al. (2009) estudiaron la toxicidad de larvas I-IV de *A. aegypti* expuestas a 15 monoterpenoides y a concentraciones subletales de PBO. Los mismos encontraron que la adición de PBO a todas las soluciones en estudio aumentó significativamente la actividad larvicida de todos los compuestos y que los grados de sinergismo (GS) variaron desde 3 hasta 250.

Dentro de ese estudio los autores hallaron que los grados de sinergismo para el compuesto 1,8-cineol decrecieron en relación el estadio larval en estudio. Por ejemplo, los GS variaron desde 238 en larvas I hasta 5 en larvas IV. Esta evidencia se vuelca nuevamente a favor de la importancia que presentan las monooxigenasas del citocromo P450 de insectos en la degradación de compuestos monoterpenoides. Los autores concluyen que se podrían obtener altos valores de mortalidad de larvas, incluso a bajas concentraciones de monoterpenoides, mediante la incorporación de sinergistas del tipo del PBO.

Con respecto a la presente tesis, esto indicaría que la metodología empleada en en esta sección permite diferenciar claramente *in vivo* el rol inhibitorio producido por las oxidasas de función mixta en piojos expuestos tanto a un insecticida organofosforado como a un monoterpenoide. Además, es importante mencionar que todas las poblaciones estudiadas en esta tesis presentaron oxidasas incrementadas debido a la fuerte presión de selección ejercida por los insecticidas piretroides que han llevado a diversos grados de resistencia, lo cual nos inclina a pensar en la gran importancia que pueden llegar a presentar las formulaciones de monoterpenoides y PBO en el manejo de poblaciones de piojos resistentes a piretroides.

# Discusión y Conclusiones generales



## 5. Discusión general

Actualmente el control químico de *Pediculus humanus capitis* mediante insecticidas está limitado por el desarrollo de poblaciones de piojos resistentes. Una alternativa a los insecticidas convencionales son los compuestos botánicos tales como los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas y sus componentes, los cuales han despertado alto interés por su actividad adulticida, ovicida y repelente en varios insectos plaga. Sin embargo, son pocos los estudios publicados sobre la actividad biológica de los aceites esenciales sobre *P. humanus capitis*, probablemente debido a las dificultades en el manejo del material biológico en los estudios de laboratorio.

De acuerdo a estos antecedentes, el objetivo de esta tesis fue el estudio de los efectos biológicos, el modo de acción y el metabolismo degradante, de componentes de aceites esenciales de plantas aromáticas, en piojos y embriones resistentes a insecticidas piretroides.

El relevamiento de niños infestados en escuelas primarias y hogares de menores ubicados en Buenos Aires, demostró que en promedio el 29,7% de los niños sufrían pediculosis. Este valor es mayor al 5% establecido como umbral sobre el cual la infestación con piojos de la cabeza es considerada de importancia endémica. Este valor es además similar al establecido previamente por nuestro laboratorio en el año 1997, indicando la permanencia de esta enfermedad endémica en Buenos Aires.

El estudio de susceptibilidad al insecticida permetrina en estas poblaciones demostró niveles altos de resistencia que variaron entre 28,6 y 71,4. Estos valores son similares a los previamente establecidos por el CIPEIN en el año 1998, a pesar que comercialmente aumentó el uso de productos basados en componentes naturales. Esto indica que se continuó la presión de selección o bien que la dinámica de reversión de resistencia es lenta.

Estos piojos resistentes fueron expuestos a vapores de aceites esenciales de plantas aromáticas provenientes de diferentes zonas de Argentina. Este estudio demostró toxicidad diferencial de 49 aceites estudiados, siendo 24 de ellos los que mostraron efecto piojicida (49%). Los más efectivos fueron aquellos obtenidos de plantas aromáticas autóctonas tales como *Cinnamomun porphyrium*, *Myrcianthes cisplatensis*, *Aloysia citriodora* (quimiotipo 2),

*Myrcianthes pseudomato*, con valores respectivos de TV<sub>50</sub> entre 1,12 y 4,09 min.

Un análisis de los componentes comunes presentes en los aceites más efectivos, llevó a determinar la actividad fumígena de 26 monoterpenos, demostrándose la alta actividad fumígena del 1,8-cineol, anisol, limoneno y  $\alpha$ -pineno, con valores de TV<sub>50</sub> entre 11,10 a 33,86 min. Estos valores representan una muy rápida acción insecticida de los compuestos evaluados. A modo comparativo, el TV<sub>50</sub> del insecticida DDVP (un conocido fumigante) fue de 40,15 min.

La actividad insecticida de los componentes evaluados pudo ser correlacionada con algunos parámetros físico-químicos de dichos compuestos. Se estableció la correlación entre efectividad biológica y los parámetros presión de vapor y coeficiente de partición octanol-agua. Esto indica que de manera aislada, los componentes más efectivos son los más volátiles, posiblemente debido a que producen mayor concentración en la unidad experimental en menor tiempo.

Para verificar si los componentes más efectivos mantienen su actividad en las mezclas (aceites esenciales), se utilizaron plantas híbridas de distintas especies de eucáptos con mayor concentración de componentes mayoritarios y ausencia de algunos minoritarios presentes en los individuos progenitores. La actividad fumígena de los híbridos fue significativamente mayor que la obtenida en las especies parentales. Los TV<sub>50</sub> del híbrido *E. grandis* X *E. tereticornis* fue 12,99 min, y para *E. grandis* X *E. camaldulensis* fue 13,63 min, mientras que las parentales mostraron valores entre de 25,57 y 31,31 min. La actividad de estos híbridos mostró correlación significativa con el porcentaje de 1,8-cineol presente en el aceite. Estos resultados demuestran que, para el caso de los aceites de eucáptos, la actividad biológica está determinada por la concentración del componente mayoritario 1,8-cineol, el más volátil.

Considerando que los huevos de piojos juegan un rol importante en el posible fenómeno de re-infestación, se determinó la actividad de vapores de estos compuestos sobre huevos de desarrollo tardío. Se estableció actividad ovicida de 23 monoterpenos pertenecientes a diversas clases químicas, los más efectivos mostraron similar efectividad: 1,8-cineol, limoneno, acetol, anisol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, (+)- $\alpha$ -pineno, 1S-(-)-  $\alpha$ -pineno, linalol y carvona. La comparación entre mortalidad observada en huevos y el poder de volteo de adultos mostró una correlación lineal, sugiriendo un modo de acción similar de los monoterpenos en embriones y formas post-embrionarias.

Otro de los efectos biológicos estudiados fue el efecto repelente de los AEs y/o sus componentes. Este estudio demostró poder repelente de 5 de los 16 AEs estudiados, siendo el de mayor efectividad el de la planta exótica *Mentha pulegium* (que no difirió significativamente del control positivo piperonal). Respecto a los componentes, sólo 3 de los 21 estudiados mostró efecto repelente; la mayor actividad correspondió al alcohol bencílico con un índice de repelencia promedio de 57,74%, seguido de (-)-mentol, mentona y (+)-mentol con valores de IR entre 53,56 y 36,45%. La comparación entre los componentes que produjeron volteo y aquellos que produjeron repelencia indica que no hay correlación entre ambos efectos y sugiere distintos sitios de acción. El efecto de volteo estaría dado principalmente por la penetración a través de tráqueas y unión al sitio nervioso. El efector repelente podría estar asociado a la irritación química producida por el contacto con el compuesto.

Considerando que un probable sitio de acción de los monoterpenos es la enzima acetil-colinesterasa (AChE), se analizó la capacidad de inhibir esta actividad in vitro e in vivo. Se determinó la capacidad diferencial para inhibir AChE de anguila eléctrica de 20 monoterpenoides y la capacidad del más efectivo (1,8-cineol) para inhibir AChE de piojos. No se encontró correlación entre la sintomatología de intoxicación y la inhibición de actividad acetilcolinesterasa. Esto sugiere que la enzima no es el primer sitio de acción de los terpenos, o bien que la inhibición de la isoforma de AChE crítica para la vida estuvo enmascarada por la medición de actividad del total de la AChE.

El análisis del rol de las monooxidasas mostró una relación creciente entre el pre-tratamiento con butóxido de piperonilo (inhibidor de oxidasas) y la actividad fumígena del 1,8-cineol. Esto indica la importancia de este complejo enzimático en la degradación del monoterpeno.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Los vapores de aceites esenciales de plantas aromáticas de distintas áreas geográficas de Argentina, poseen la propiedad de producir volteo y/o repelencia de piojos resistentes a insecticidas piretroides.
- El efecto biológico está determinado por los componentes mayoritarios del aceite, y existe una correlación entre concentración del componente mayoritario y la efectividad del aceite que lo contiene.
- La actividad fumígena de los componentes depende fundamentalmente de dos propiedades físico-químicas de la estructura química: presión de vapor y coeficiente de partición octanol-agua.
- La actividad de los volátiles de plantas está relacionada con la inhibición de la enzima acetil-colinesterasa, y existe una relación entre efectividad e inhibición enzimática.
- Las enzimas mono-oxigenasas están involucradas en el metabolismo degradante de los monoterpenos, y por consiguiente la inhibición de dicho complejo enzimático aumenta la toxicidad de los componentes de aceites esenciales.

# Bibliografía

## 6. Bibliografía

- Abbot W 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Abdelgaleil S, Mohamed M, Badawy M, El-arami S 2009. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium confusum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. J. Chem. Ecol. 35: 518-525.
- Adams R 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed. Illinois, Allured Publishing Corporation. 804 pp.
- Al-Shawa R 2006. Head louse infestations in Gaza governorates. J. Med. Entomol. 43: 505-507.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. essential oils from stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem. 54: 4364-4370.
- Araújo A, Ferreira L, Guidon N, Maudes Da Serra Freires N, Reinhard K and Dittmar K. 2000. Ten thousand years of head lice infestation. Parasitol Today. 16: 269.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbek D, Idaomar M 2008. Biological effect of essential oils- a review. Food and chem. Toxicol. 46: 446-475.
- Bandoni A 2002. Los aceites esenciales, Capítulo 2, pp. 27-38, En: Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, Bandoni A (Ed.), CYTED, Subprograma IV, proyecto IV.6.
- Barker S, Whiting M, Johnson K, Murrell A 2003. Phylogeny of the lice (Insecta: Phthiraptera) inferred from small subunit rRNA. Zoologica scripta 32: 407-414.
- Batish D, Singh H, Kohli R, Kaur S 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. Forest ecol. Management 256: 2166-2174.
- Becerra J 2007. The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. PNAS 104: 7483-7488.

- Bourguet D, Roig A, Tautant J, Arpagaus M 1997. Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. *Neurochem. Int.* 31: 65-72.
- Brattsten L, Wilkinson C 1977. Herbivore-plant interactions: mixed-function oxidases and secondary plant substances. *Science* 196: 1349-1352.
- Bresciani J, Haarlov P and Moller G. 1989. Head lice in mummified Greenlanders from AD 1475. *Meddelelser om Gronland, Man & Society* 12: 89-92.
- Browne L 1977. Host-related responses and their suppression: some behavioral considerations, pp. 117-127. In: Shorey, H. H. & J.J. McKelvey, Jr. (Eds.), *Chemical control of insect behavior*. John Wiley & Sons, NY.
- Bruneton J 1999. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants: essential oils*, 2<sup>nd</sup>. Edition, Lavoisier Publishing, NY, pp. 461-780.
- Buczek A, Markowska-Gosik D, Widomska D, Kawa I 2004. Pediculosis capitis among schoolchildren in urban and rural areas of astern Poland. *Eur J Epidemiol* 19: 491-495.
- Burgess I 1993a. New head louse repellent. *British J. Dermatol.* 28: 357-358.
- Burgess IF 1993b. The function of a repellent in head louse control. *Pharm. J.* 250: 692-693.
- Burgess I 2001. Head lice. *Pesticide Outlook* 6: 109-113.
- Burgess IF 2004. Human lice and their control. *Annu Rev Entomol* 49: 457-481.
- Burgess I, Brown C, Lee PN 2005. Treatment of head louse infestation with 4% dimeticone lotion: randomised controlled equivalence trial. *BMC* 330: 1423.
- Burgess I 2009. The mode of action of dimeticone 4% lotion against head lice, *Pediculus capitis*. *BMC pharmacology* 9: 3.
- Buxton PA. 1941. Studies on populations of head lice. (*Pediculus humanus capitis*: Anoplura). IV. The composition of populations. *Parasitol*, 33: 224-242.

- Buxton P 1946. The Louse. An account of the lice which infest man, their medical importance and control. Edward Arnold & CO, UK.
- Canyon D & Speare R 2007. Do head lice spread in swimming pools?. *International J. Dermatol.* 46: 1211-1213.
- Carlson D, Tribble P, Weart C 1988. Pyrethrin with piperonyl butoxide (RID) vs. 1% permethrin (NIX) in the treatment of head lice. *Am J Dis. Child.* 142: 768-769.
- Castro DC, Abrahamovich A, Cicchino A, Rigoni A, Rafaelli C, Barrio A 1994. Prevalencia y estacionalidad de la *Pediculosis capitis* en la población infanto-juvenil de la región sanitaria, Buenos Aires, Argentina. *Rev Saude Pública* 28: 295-299.
- Chouela E, Abeldaño A, Cirigliano M, Ducard M, Neglia V, Forgia M, Colombo A 1997. Head louse infestations: epidemiologic survey and treatment evaluation in Argentinian schoolchildren. *International J. Dermatol.* 36: 819-825.
- Clore ER 1988. Nursing management of pediculosis. *Pediatr Nur* 3: 4.
- Cosmides L & Tooby J. 1981. Cytoplasmatic inheritance and intragenomic conflict. *J Theor Biol*, 89: 83-129.
- Cruikshank R, Johnson K, Smith V, Adams R, Clayton D, Page R 2001. Phylogenetic analysis of partial sequences of elongation factor one-alpha identifies major groups of lice (Insecta: Phthiraptera). *Mol. Phylo. Evol.* 19: 202-215.
- Dambolena J, Zunino M, Rotman A, Ahumada O, Lucini E, Biurrun F, Zygadlo J 2009a. Essential oils of plants used in home medicine in North of Argentina. *J E O R* 21: 405-409.
- Dambolena J, Zunino M, Lucini E, Banchio E, Biurrun F, Rotman A, Ahumada O, Zygadlo J 2009b. Aromatic plants of Northwest of Argentina. Constituents of the essential oils of aerial parts of seven *Verbenaceae*: *Lantana* and *Aloysia*. *J E O R* (En Prensa).
- Demo M, Oliva M, Zunino M, Lopez M, Zygadlo J 2002. Aromatic plants from Yungas. Part IV: Composition and antimicrobial activity of *Myrcianthes pseudomato* essential oil. *Pharm. Biol.* 40: 481-484.
- Dethier V 1956. Repellents. *Ann. Rev. Entomol.* 1: 181-202.



- Dobzhansky T 1951. Genetics and the origin of species. 3rd. Ed. Columbia University Press, New York.
- Dohi S, Terasaki M, Makino M 2009. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. J. Agric. Food Chem. 57: 4313-4318.
- Doucet M, Miranda M, Arce MA 1997. Prevalences of *Pediculus humanus capitis* and *Sarcoptes scabiei* in primary schools of Córdoba, Argentina. Analysis in relation to sex, age and socio-economic conditions. Res Rev Parasitol. 57: 67-69.
- Downs A, Stafford K, Harvey I, Coles G 1999a. Evidence for double resistance to permethrin and malathion in head lice. British J. Dermatol. 141: 501- 511.
- Downs MR, Harvey I, Kennedy CT 1999b. The epidemiology of head lice and scabies in the UK. Epidemiol Infect 122: 471-477.
- Eddy G 1952. Effectiveness of certain insecticides against DDT-resistant body lice in Korea. J. Econ. Entomol. 45: 1043-1051.
- Ellman G, Courtney K, Andres V, Featherstone R 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharma. 7: 88-95.
- Enan 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comp. Biochem. Phys. Part C. 130: 325-337.
- Evans P 1980. Biogenic amines in the insect nervous system. Adv. Insect Physiol. 15: 317-473.
- Ewing H. 1924. Lice from human mummies. Science 60: 389-390.
- Falagas M, Matthaiou D, Rafailidis P, Panos G, Pappas G 2008. Worldwide prevalence of head lice. Emer. Infect. Dis. 14: 1493-1494.
- Fernandez S, Fernandez A, Armentia A, Pineda F 2006. Allergy due to head lice *Pediculus humanus capitis*. Allergy 61: 1372.
- Ffrench-Constant R & Roush R 1990. Resistance detection and Documentation: The relative roles of pesticidal and biochemical assays. pp. 4-38. En: Pesticide resistance in Arthropods (R. Roush and B. Tabashnik eds.). Chapter 2. Chapman and Hall, New York and London.

- Frances S 2007. Efficacy and safety of repellents containing DEET, chapter 16, pp. 311-326. En: Insect repellents, principles, methods and uses (Eds. Debboun, Frances, strickman), CRC press, Boca Raton, FL.
- Friedman S 1987. Lindane neurotoxic reaction in nonbullous congenital ichthyosiform erithroderma. Arch. Dermatol. 123: 1056-1058.
- Gao J, Yoon K, Lee S, Takano-Lee M, Edman J, Meinking T, Taplin D, Clark J 2003. Increased frequency of the T929I and L932F mutations associated with knockdown resistance in permethrin-resistant populations of the human head louse, *Pediculus capitis*, from California, Florida and Texas. Pestic. Biochem. Physiol. 77: 115-124.
- Gillij Y, Gleiser R, Zygadlo J 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresource Technol. 99: 2507-2515.
- Goddard J 2003. Physician's guide to arthropods of medical importance, 4<sup>th</sup> edition. The lice, CRC press, USA, pp.216-221.
- González Audino P, Barrios S, Vassena C, Mougabure Cueto G, Zerba E, Picollo M 2005. Increased monooxygenase activity associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. J. Med. Entomol.42: 342-345.
- González S, Bandoni A, van Baren C, Lira P, Cerda-García-Rojas C, Joseph-Nathan P 2004. The essential oil of the aerial parts of *Adesmia boronioides* Hook.f. J E O R 16: 513-516.
- Govere JM, Speare R, Durrheim DN 2003. The prevalence of pediculosis in rural South African schoolchildren. S Afr J Sci 99: 21-23.
- Gratz NG 1997. Human lice. Their prevalence, control and resistance to insecticides—a review 1985-1997. WHO/CTD/WHOPES/ 97.8.
- Grimaldi D, Engel M 2005. The Paraneopteran Orders. pp. 261-280. In Grimaldi D, Engel M (eds.), Evolution of the insects. Chapter 8, Cambridge University Press, UK.
- Grundy D & Still C 1985. Inhibition of acetylcholinesterase by pulegone-1,2-epoxide. Pest. Biochem. Phy. 23: 383-388.

- Guenther E 1948. The chemistry, origin and function of essential oils in plant life, Chapter 2, pp. 15-77. En: The essential oils. Ed. Krieger Publication Co, Florida.
- Hansch C & Deutsch EQ 1966. The use of substituent constants in the study of structure- activity relationships in cholinesterase inhibitors. *Biochim. Biophys Acta* 126: 117-128.
- Hansch C 1971. Quantitative Structure-Activity Relationship, Chapter 2, pp. 271-284. In E. Ariens (ed.), *Drug Design*, vol. 1. Academic Press, New York, USA.
- Hansen RC & O´Haver J 2004. Economic considerations associated with *Pediculus humanus capitis* infestation. *Clin. Pediatr.* 43: 523-527.
- Heukelbach J, Wilcke T, Winter B, Feldmeier H 2005. Epidemiology and morbidity of scabies and pediculosis capitis in resource-poor communities in Brazil. *Brit J Dermatol* 153: 150-156.
- Heukelbach J, speare R, Canyon D 2006. Natural products and their application to the control of head lice: an evidence-based review. *Chemistry of natural products: recent trends & development* 1-26.
- Houghton P, Ren Y, Howes M 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Pro. Reports* 23: 181-199.
- Houhamdi L, Fournier P, Fang R, Lepidi H, Raoult D 2002. An experimental model of human body louse infection with *Rickettsia prowazekii*. *J. infect. Dis.* 186: 1639-1646.
- Huang Y, Hee S, Ho S 1998. Antifeedant and growth inhibitory effects of  $\alpha$ -pinene on the stored-product insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Int Pest Control* 40: 18-20.
- Ibarra J 1993. Lice (Anoplura). Pp. 516-527. In Lane R & Crosskey RW (Eds.), *Medical Insects and arachnids*, Chapman & Hall, USA.
- Isman M 1999. Pesticides based on plant essential oils. *Pesticide Outlook* 10: 68-72.
- Isman M 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection* 19: 603-608.

- Isman M 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and increasingly regulated world. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Jadhav V, Kore A, Kadam V 2007. In-vitro pediculicidal activity of *Hedychium spicatum* essential oil. *Fitoterapia* 78: 470-473.
- Jan Y, Yang Y, Choi D, Ahn Y 2005. Vapor phase toxicity of Marjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *J. Agric. Food Chem.* 53: 7892-7898.
- Johnson K, Whiting 2002. Multiple genes and the monophyly of Ischnocera (Insecta: Phthiraptera). *Mol. Phy. Evol.* 22: 101-110.
- Jones K & English J 2003. Review of common therapeutic options in the United States for the treatment of Pediculosis capitis. *Clin. Infec. Dis.* 36: 1355-1361.
- Kamal H. 1967. A dictionary of pharaonic medicine. The National Publication House, Cairo, Egypt.
- Keane S & Ryan MF 1999. Purification, characterization, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem. Molec.* 29: 1097-1104.
- Kim E, Kim H, Choi D 2003. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *App. Entomol. Zool* 38: 261-266.
- Kim H, Symington S, Lee S, Clark M 2004. Serial invasive signal amplification reaction for genotyping permethrin-resistant (kdr-like) human head lice, *Pediculus humanus*, *Pest. Biochem. Phy.* 80: 173-182.
- Kim K, Ludwig H 1978. The family classification of the Anoplura. *Syst. Entomol.* 3: 249-284.
- Kim K 1985. Evolutionary relationships of parasitic arthropods and mammals. Pp. 3-82. In Kim, K. (ed.), *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*. John Wiley and sons; New York.
- Kim S, Nab Y, Yia J, Kimb B, Ahn Y 2007. Contact and fumigant toxicity of oriental medicinal plant extracts against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Parasitol.* 145: 377-382.

- Kokturk A, Baz K, Bugdayci R, Sasmaz T, Tursen U, Kaya T, Ikizoglu G 2003. The prevalence of pediculosis capitis in schoolchildren in Mersin, Turkey. *Int. J. Dermatology* 42: 694-698.
- Kono Y & Tomita T 2006. Amino acid substitutions conferring insecticide insensitivity in *Ace*-paralogous acetylcholinesterase. *Pest. Biochem. Phy.* 85: 123-132.
- Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.* 58: 1101-1106.
- Kristensen M, Knorr M, Rasmussen A, Jespersen J 2006. Survey of permethrin and malathion resistance in human head lice populations from Denmark. *J. Med. Entomol.* 43: 533-538.
- La Scola B, Fournier P, Brouqui P, Raoult D 2001. Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marescens*, and *Acinetobacter* spp. From decontaminated human body lice. *J. Clinical Microbiology* 39: 1707-1709.
- Lafeber A 1984. An allergic reaction from contact with *Pediculus humanus capitis* (head lice). *Ned Tijdschr geneeskde* 128: 1860- 1861.
- Lahlou M, Berrada R, Agoumi A, Hmamouchi M 2000. The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in morocco. *Int. J. Aromather.* 10: 108-123.
- Lahlou M & Berrada R 2003. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. *Flavour Frag. J.* 18: 124-127.
- Lahlou M 2004. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Frag. J.* 19: 159-165.
- Lang J. 1976. Sex ratio of adult head lice under crowded conditions. *J New York Entomol Soc*, 84: 243-245.
- Laurent D, Vilaseca L, Chantraine J 1997. Insecticidal activity of essential oils on *Triatoma infestans*. *Phytoter. Res.* 11: 285-290.
- Lee S, Choi W, Lee H, Park B 2000. Cross-resistance of a chlorpyrifos-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Cucujidae) to fumigant activity of essential oil extracted from Eucalyptus

- globules and its major monoterpene, 1,8-cineole. *J. Stored Products Research* 36: 383-389.
- Lee S, Yoon K, Williamson M, Goodson S, Takano L, Edman J, Devonshire A, Clark J 2000. Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 66: 130-143.
  - Lee S, Gao J, Yoon K, Mumcuoglu K, Taplin D, Edman J, Takano L, Clark J 2003. Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). *Pestic. Biochem. Physiol.* 75: 79-91.
  - Lee T, Edman J, Mullens B, Clark J 2005. Transmission potential of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Int. J. Dermatol.* 44: 811-816.
  - LeOra Software 2002. POLO-PC Plus: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra software, Berkeley, CA.
  - Licht H, Coscia C 1978. Cytochrome P-450LM<sub>2</sub> mediated hydroxylation of monoterpene alcohols. *Biochem.* 17: 5638-5646.
  - Lide D 1990. CRC handbook of chemistry and physics, 71st ed. CRC, Ann Arbor, MI, USA.
  - Lima B, Agüero M, Zygadlo J, Tapia A, Solis C, Rojas de Arias A, Yaluff G, Zacchino S, Feresin G, Schmeda-Hirschmann G 2009. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *J. Chil. Chem. Soc.* 54: 68-72.
  - Litchfield J, Wilcoxon F 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Exp. Ther.* 96: 99-103.
  - Lucía A, Gonzalez Audino P, Seccacini E, Licastro S, Zerba E 2007. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpinene and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23: 299-303.
  - Lucía A, Licastro S, Zerba E, González Audino P, Masuh H 2009. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. *Bioresource Tech.* (en prensa). Doi: 10.1016/j.biortech.2009.02.075.

- Lyal C 1985. Phylogeny and classification of the Psocodea, with particular reference to the lice (Psocodea: Phthiraptera). *Sys. Entomol.* 10: 145-165.
- Malcolm C & Bergman J 2007. Trying to keep ahead of lice: A therapeutic challenge 11 (10): 1-6.
- Mey H 2003. On the development of animal louse systematic (Insecta, Phthiraptera) up to the present day. *Rudolstädter nat. hist. Schr.* 11: 115-134.
- Mills C, Cleary B, Gilmer J, Walsh J 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. *J. Pharm. Pharmacol.* 56: 375-379.
- Misra G, Pavlostathis S 1997. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 572-577.
- Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H 1997. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 45: 677-679.
- Miyazawa M, Watanabe H, Umemoto K, Kameoka H 1998. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils *Mentha* species. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3431-3434.
- Miyazawa M, Miyamoto Y 2004. Biotransformation of (1R)-(+)- and (1S)-(-)-camphor by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 27: 83-89.
- Miyazawa M & Yamafuji C 2005. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1765-1768.
- Moore S & Debboun M 2007. History of insect repellents, chapter 1, pp. 3-30. En: *Insect repellents, principles, methods and uses* (Eds. Debboun, Frances, Strickman), CRC press, Boca Raton, FL.
- Mougabure Cueto G, González Audino P, Vassena C, Picollo MI, Zerba E 2002. Toxic effect of aliphatic alcohols against susceptible and permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 39: 457-460.
- Mougabure Cueto G, Zerba E, Picollo MI 2006a. Permethrin-resistant head lice (Anoplura: Pediculidae) in Argentina are susceptible to spinosad. *J. Med. Entomol.* 43: 634-635.

- Mougabure Cueto G, Zerba E, Picollo MI 2006b. Embryonic development of human lice: rearing conditions and susceptibility to spinosad. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101: 257-261.
- Mougabure Cueto G, Zerba E, Picollo MI 2008. Evidence of pyrethroid resistance in eggs of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) from Argentina. J. Med. Entomol.45: 693-697.
- Muller N 1972. First report of resistance of human body lice to malathion. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66: 372-374.
- Mumcuoglu K, Galun R, Ikan R 1986. The aggregation response of human body louse (*Pediculus humanus*) (Insecta: Anoplura) to its excretory products. Insect Sci Applic 7: 629-632.
- Mumcuoglu K, Magdassi S, Miller J, Ben-Ishai F, Zentner G, Helbin V, Friger M, Kahana F, Ingber A 2004. Repellency of citronella for head lice: double-blind randomized trial of efficacy and safety. IMAJ 6: 756-759.
- Mumcuoglu K 2008. Human lice: *Pediculus* and *Pthirus*. In: Paleomicrobiology-Past human infections. Raoult D & Drancourt M (Eds.). Springer, Berlin, pp: 215-222.
- Mumcuoglu K, Gilead L, Ingber A 2009. New insights in pediculosis and scabies. Expert Review of Dermatology 4: 285-302.
- Oladimeji FA, Orafidiya O, Ogunniyi B, Adewunmi T 2000. Pediculicidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. J. Ethnopharmacol. 72: 305-311.
- Oliveira F, Speare R, Heukelbach J 2007. High in vitro efficacy of Nyda® L, a pediculicide containing dimeticone. J. Eur. Acad. Dermatol. 21: 1325-1329.
- Orchard L 1982. Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone and neuromodulator. Can. J. Zool. 60: 659-669.
- Palacios S, Bertoni A, Rossi Y, Santander R, Urzúa A 2009. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). Parasitol Res. (In Press, DOI: 10.1007/s00436-009-1651-2).
- Papachristos D, Karmanoli K, Stamopoulos D, Menkissoglu-Spiroudi U 2004. The relationship between the chemical composition of three



- essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Manag. Sci.* 60: 514-520.
- Peock S & Maunder J 1993. Arena tests with piperonal, a new louse repellent. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health* 113: 292-294.
  - Perotti A, Catalá S, Ormeño A, Zelazowska M, Bilinski S, Braig H 2004. The sex ratio distortion in the human head louse is conserved over time. *BMC genetics* 5: 1-13.
  - Perotti A, Allen J, Reed D, Braig H 2007. Host-symbiont interactions of the primary endosymbiont of human head and body lice. *The FASEB Journal*. 21:1058-1066.
  - Peterson C & Coats J 2001. Insect repellents-past, present and future!. *Pest. Outlook* 12: 154-158.
  - Phipps M 1991. Permethrin: treatment of head lice infestation. *Am. Pharm. NS31*: 53-56.
  - Pichersky E, Noel J, Dudareva N 2006. Biosynthesis of plant volátiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.
  - Pickett J, Birkett M, Logan J 2008. DEET repels ORNery mosquitoes. *PNAS* 105: 13195-13196.
  - Picollo M, Vassena C, Casadio A, Massimo J, Zerba E 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura; Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 35: 814-817.
  - Picollo M 1999. Riesgos y beneficios en el uso de pediculicidas. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 58: 238-242.
  - Picollo MI, Vassena C, Mougabure Cueto G, Verneti M, Zerba E 2000. Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. *J. Med. Entomol.* 37: 721-725.
  - Priestley C, Williamson E, Wafford K, Satelle D 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA<sub>A</sub> receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Brit. J. Pharmacol.* 140: 1363-1372.

- Priestley CM, Burgess I, Williamson EM 2006. Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia*. 77: 303-306.
- Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Fournier P, Ardagna Y, Drancourt M, Signoli M, La D, Macia Y, Aboudharam G 2005. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon`s grand army in Vilnius. *J. infect. Dis.* 193: 112-120.
- Raoult D, Reed D, Dittmar K, Kirchman j, Rolain J, Guillen S and Light J. 2008. Molecular identification of lice from pre-Columbian mummies. *J. Infect. Dis.* 197: 536-543.
- Reed D, Smith V, Hammonf S, Rogers A and Clayton D. 2004. Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans. *PLoS Biol.* 2 (11): 1972-1983.
- Reed D, Light J, Allen J, Kirchman J 2007. Pair of lice lost or parasites regained: the evolutionary history of anthropoid primate lice. *BMC Biology* 5:7.
- Regnault-Roger C & Hamraoui A 1995. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Stored Prod.* 31: 291-299.
- Rice P & Coats R 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172-1179.
- Robertson J, Preisler H 1992. *Pesticide Bioassays with arthropods*. CRC, Boca Ratón, FL.
- Robinson D, Leo N, Prociw P, Barker S 2003. Potential role of head lice, *Pediculus humanus capitis*, as vectors of *Rickettsia prowazekii*. *Parasitol. Research* 90: 209-211.
- Rogoff W 1952. The Repellency of Chlordane, DDT, and Other Residual Insecticides to Greenhouse Thrips. *J Econ Entomol*45: 1065-1071.
- Rosenfeld J, Manor O, Mumcuoglu K 1993. Relationship of sociodemographic variables and head lice infestation among elementary school children in Bet Shemesh. *Isr J Zool* 39: 177-183.

- Rossini C, Castillo L, González A 2008. Plant extrats and their components as potential control agents against human head lice. *Phytochemistry Rev.* 7: 51-63.
- Roy D & Ghosh S. 1944. Studies on the populations of the head lice *Pediculus humanus var. capitis*. *De G. Parasitol.*, 36: 69-71.
- Rupes V, Moravec J, Chmela J, Ledvinka J, Zelenkova J 1995. A resistance of head lice *Pediculus capitis* to permethrin in Czech Republic. *Eur. J. Public health* 1: 30-32.
- Ryan M, Byrne O 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 14: 1965-1975.
- Sasaki T, Kanta S, Poudel S, Isawa H, Hayashi T, Seki N, Tomita T, Sawabe K, Kobayashi M 2006. First molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), colected from Nepalese children. *J. Med. Entomol.*43: 110-112.
- Sawicki R 1962. Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. III. Knockdown and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. *J. Sci. Food. Agric.* 13: 283-292.
- Scott J, Liu N, Wen Z 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Phy. Part C* 121: 147-155.
- Scott J and Wen Z 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip f the iceberg. *Pest. Manag, Sci.* 57: 958-967.
- Sfara V 2008. Función del óxido nítrico en el comportamiento de *Rhodnius prolixus* en respuesta a estímulos químicos. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, pp. 98.
- Sfara V, Zerba E, Alzogaray R 2009. Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rodnius prolixus*. *J. Med Entomology* 46: 511-515.
- Shaaya E, Ravid U, Paster N, Juven B, Zisman U, Pissarev V 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. *J. Chem. Ecol.* 17: 499-504.

- Silva L, Alencar R, Madeira N 2008. Survey assessment of parental perceptions regarding head lice. *Int. J. Dermatol.* 47: 249-255.
- Slifer E & Sekhon E 1980. Sense organs on the antennal flagellum of the human louse, (Anoplura). *J. Morphol.* 164: 161-166.
- Smith E & Salked E 1966. The use and action of ovicides. *Ann. Rev. Entomol.* 11: 331-368.
- Smith V 2004. Phthiraptera, Vol 3, Grzimek's Animal Life Encyclopedia.
- Southwell I, Maddox C, Zaluchi M 1995. Metabolism of 1,8-cineole in tea tree (*Melaleuca alternifolia* and *M. linarifolia*) by pyrgo beetle (*Paropsisterna tigrina*). *J. Chem. Ecol.* 21: 439-453.
- Speare R & Buettner P 1999. Head lice in pupils of a primary school in Australia and implications for control. *Int J Dermatol* 38: 285-290.
- Speare R, Canyon D, Melrose W 2006. Quantification of blood intake of the head louse: *Pediculus humanus capitis*. *Int. J. Dermatol.* 45: 543-546.
- Speare R, Canyon D, Cahill C, Thomas G 2007. Comparative effectiveness of two nit combs in removing head lice (*Pediculus humanus var. capitis*) and their eggs. *Int.l J. Dermatol.* 46: 1275- 1278.
- Spencer G 1941. The control of human lice under war conditions. *Can. Entomol.* 73: 20.
- Stone P, Wilkinson-Herbots H, Isham V 2008. A stochastic model for head lice infections. *J Math Biol* 56: 743-763.
- Stroh J, Wan M, Isman M, Moul D 1998. Evaluation of the acute toxicity to juvenile pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bull. Entomol. Contam. Toxicol.* 60: 923-930.
- Strycharz J, Yoon K, Clark J 2008. A new ivermectin formulation topically kills permethrin-resistant human head lice (Anoplura; Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 45: 75-81.
- Syed Z & Leal W 2008. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *PNAS* 105: 13598-13603.

- Takano-Lee M, Edman J, Mullens B, Clark M 2005. Transmission potential of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Int J Dermatol* 44: 811-816.
- Taylor W, Hall T, Schreck C 1996. Synthesis and mosquito repellent properties of 2,2-dialkyl- and 2-alkyl-4,4-dimethyl-N-acetyloxazolidines. *Pest Sci* 46: 307-314.
- Thacker J 2004. Resistance to insecticides. En: An introduction to arthropod pest control. (J Thacker ed.). Chapter 4. Formulation, application and the direct and indirect side-effects of insecticides. pp. 94-95.
- Thomas D, McCarroll L, Roberts R, Karunaratne P, Roberts C, Casey D, Morgan S, Touhig K, Morgan J, Collins F, Hemingway J 2006. Surveillance of insecticide resistance in head lice using biochemical and molecular methods. *Arch Dis Child* 91: 777-778.
- Tisserand R, Balacs T 1995. Essential oils safety: a guide for health care professionals. Churchill Livingstone. London, UK.
- Toloza A, Bressa MJ, Picollo MI, Papeschi A 2007. Aportes de la citogenética a la caracterización de los piojos humanos del género *Pediculus* (Phthiraptera: Pediculidae). Resumen del congreso de la SAG, Vol. XVIII Pp. 122.
- Toloza A, Lucía A, Zerba E, Masuh, H, Picollo MI 2008. Interspecific hybridization of *Eucalyptus* as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina. *Bioresource Tech.* 99: 7341-7347.
- Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Kasai S 2003. Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 40: 468-474.
- Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phyto. Res.* 19: 303-309.
- Valderrama X, Robinson G, Attygalle B, Eisner T 2000. Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects?. *J. Chem. Ecol.* 26: 2781-2790.

- Vassena C, Mougabure Cueto G, González Audino P, Alzogaray R, Zerba E, Picollo MI 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J. Med. Entomol.* 40: 447-450.
- Waliwitiya R, Kennedy C, Lowenberger C 2009. Larvicidal and vipoosition-altering activity of monoterpenoids, *trans*-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest. Manag. Sci.* 65: 241-248.
- Wappler T, Smith V, Dalglish R 2004. Scratching an ancient itch: an Eocene bird louse fossil. *Proceedings of the Royal Society of London B (Suppl.)*. 271: 255-258.
- Watanabe K, Shono Y, Kakimizu A, Okada A, Matsuo N, Satoh A, Nishimura H 1993. New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldulensis*. *J. Agric. Food Chem* 41: 2164-2166.
- Willems S, Lapeere H, Haedens N, Pasteels I, Naeyaert J, De Maeseneer 2005. The importance of socio-economic status and individual characteristics on the relevance of head lice in schoolchildren. *Eur. J. Dermatol.* 15: 387-392.
- Woodring J, Mcbride L, Fields P 1989. The role of octopamine in handling and exercise-induced hyperglycemia and hyperlipaemia in *Acheta domesticus*. *J. Insect. Physiol.* 35: 613-617.
- Wright J & Pal R 1965. Second review of insecticide-resistance in body lice (1958-1963). *Bull. WHO.* 33: 485-501.
- Yang Y, Lee S, Lee W, Choi D, Ahn Y 2003. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 4884-4888.
- Yang Y, Lee H, Clark J, Ahn Y 2004a. Insecticidal activity of plant essential oils against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 41: 699-704.
- Yang Y, Choi H, Choi W, Clark J. Ahn Y 2004b. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52: 2507-2511.

- Yang Y, Lee H, Lee S, Clark J, Ahn Y 2005. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *International Journal for Parasitology* 35: 1595-1600.
- Yang Y, Lee S, Clark M, Ahn Y 2009. Ovicidal and adulticidal activities of *Origanum majorana* essential oil constituents against insecticide-susceptible and pyrethroid/malathion-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Agric. Food. Chem.* 57: 2282-2287.
- Yoon K, Gao J, Lee S, Coles G, Meinking T, Taplin D, Edman J, Takano-Lee M, Clark J 2004. Resistance and cross-resistance to insecticides in human head lice from Florida and California. *Pest. Biochem. Physiol.* 80: 192-201.
- Zias J y Mumcuoglu K 1991. Pre-pottery Neolithic B head lice from Nahal Hemar cave. *Atiqot* 20: 167-168.

# Apéndice



## 7. Apéndice

### 7.1 Trabajos publicados en revistas internacionales relacionados con esta tesis

# Fumigant and Repellent Properties of Essential Oils and Component Compounds Against Permethrin-Resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina

ARIEL CEFERINO TOLOZA,<sup>1</sup> JULIO ZYGADLO,<sup>2</sup> GASTÓN MOUGABURE CUETO,<sup>1</sup>  
FERNANDO BIURRUN,<sup>3</sup> EDUARDO ZERBA,<sup>1, 4</sup> AND MARÍA INÉS PICOLLO<sup>1</sup>

J. Med. Entomol. 43(5): 889–895 (2006)

**ABSTRACT** The repeated use of permethrin and other insecticides for the control of head lice, *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae), during past decades has resulted in the development of marked levels of resistance. Thus, new alternative insecticides are needed for the control of head lice. We studied the fumigant and repellent properties of essential oils from 16 native and exotic plants in Argentina, and 21 chemical components against permethrin-resistant head lice from Argentina. With a direct vapor-exposure bioassay, the most effective oil was from the native *Myrcianthes cisplatensis* Cambess (Myrtaceae) with a time to 50% knockdown (KT<sub>50</sub>) of 1.3 min, followed by exotic species, *Eucalyptus cinerea* F.V. Muell., *Eucalyptus viminalis* Labill., and *Eucalyptus saligna* Smith. with KT<sub>50</sub> values of 12.0, 14.9, and 17.4 min, respectively. The most effective components were 1,8-cineole and anisole, with KT<sub>50</sub> values of 11.1 and 12.7 min, respectively. Regression analysis of KT<sub>50</sub> values and vapor pressures and water-partition coefficients for the essential oil components revealed that the most effective fumigants were among the more volatile components. Repellency assays indicated that the essential oil from *Mentha pulegium* L. and its benzyl alcohol component were the most effective repellents, having repellency indices of 75.5 and 57.8%, respectively. Thus, some Argentinean plants contain essential oils and components that function as fumigants or as repellents and thereby show potential for development of new control products for head lice.

**KEY WORDS** head lice, Argentinean plants, essential oils, repellents, fumigants

The human head louse, *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae), is a worldwide problem affecting school-aged children in most developed and developing countries. Although head lice generally pose no significant health threat, their primary negative effects are as causes of embarrassment and social sanctioning (Gratz 1997). Recently, laboratory experiments (Robinson et al. 2003) have suggested that head lice can transmit *Rickettsia prowazekii* da Rocha-Lima 1916 (Rickettsiales: Rickettsiaceae).

Chemical control of head lice has been based on a variety of conventional insecticides, such as DDT and lindane in the 1940–1950s, carbaryl and malathion in the 1960–1970s, and pyrethroids in the 1980s to present. Repeated use of compounds in all these classes has led to resistance in several countries (Eddy 1952; Wright and Pal 1965; Muller 1972; Gratz 1997;

Picollo et al. 1998, 2000; Vassena et al. 2003; Burgess 2004). Alternatives to conventional insecticides might be found in botanical compounds known as essential oils (EOs). Some of these natural products are repellents, ovicides, adulticides, feeding inhibitors, or attractants for various insect species (Rice and Coats 1994, Isman 1999, Tapondjou et al. 2005), including head lice (Burgess 2004). EOs isolated from aromatic plants from Morocco were shown to be insecticidal against head lice and nits, as demonstrated with a microatmosphere technique (Lahlou et al. 2000). In a similar bioassay, the fumigant action of EOs against female head lice was compared with those of *d*-phenothrin and pyrethrum (Yang et al. 2004). Addition of the terpenoids *d*-limonene and  $\alpha$ -terpineol to alcoholic lotions containing malathion increased pediculicidal efficacy (Taplin et al. 1982). Tests using malathion and carbaryl formulations had limited effectiveness, whereas formulations containing high levels of monoterpenes (13–20%) were completely pediculicidal and ovicidal (Burgess 2004).

EOs are the steam-distillable fraction of plant tissues and are often responsible for a plant's distinctive scent or taste. These oils are of rather complex composition, with component compounds generally consisting of low-molecular-weight monoterpenes (10-carbon)

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Juan Bautista De La Salle 4397 (B1603ALO) Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV-CONICET, Córdoba, Argentina.

<sup>3</sup> Universidad Nacional de La Rioja, Subsección Química, La Rioja, Argentina.

<sup>4</sup> Universidad Nacional de General San Martín, Escuela de Postgrado, Buenos Aires, Argentina.

and related phenols. Monoterpenoids include an array of structures that can be acyclic, monocyclic, or bicyclic, and aliphatic or aromatic. Interesting compounds include hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, esters, ethers, oxides, peroxides, and acids (Tisserand and Balacs 1995).

Although previous reports focused on the potential effectiveness of selected EOs and their components as pediculicides against head lice, few native or exotic plants have been evaluated as sources of pediculicidal products. Moreover, little work has been done to assess either the fumigant or repellent activity of EO components and their structure-activity relationships.

The purposes of the current study were 1) to assess the repellent and fumigant activity of essential oils and their main chemical components from native and exotic Argentinean plants against permethrin-resistant head lice, and 2) to determine structure-pediculicidal activity relationships among effective essential oils components.

### Materials and Methods

**Lice.** Head lice were collected from heads of 2,450 infested children 6–12 yr old, using a fine toothed antilouse comb. Lice were obtained from three elementary schools (GH, LP and RT) located in different parts of Buenos Aires, where a filter paper exposure method had previously documented high levels of resistance to permethrin (Vassena et al. 2003). Head lice were collected and transported to our laboratory as previously reported by Picollo et al. (1998, 2000). The protocol for lice collection was approved by the ad hoc committee of the Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas (Research Center of Pests and Insecticides, Buenos Aires, Argentina), and archived in our laboratory.

**Chemicals and EOs.** Sixteen species of native and exotic plants in seven different families were collected in the spring season of 2003 and 2004 from Argentina. They were identified taxonomically at the INDELLAR herbarium by F.B. A representative specimen of each species was deposited in the herbariums of the Botanic Museum of Córdoba (University of Córdoba, Córdoba, Argentina) and of the INDELLAR-Chemical (University of La Rioja, La Rioja, Argentina). The species are listed by family in Tables 1 and 2.

Dried leaves of each individual species were hydrodistilled in a Clevenger-like apparatus for 1 h. The oils obtained were dried over anhydrous sulfate (Merck, Buenos Aires, Argentina) and stored in a refrigerator until analysis.

Component chemicals of EOs (Table 3) were purchased from Fluka (Munich, Germany) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Certified acetone, used as a negative control, and piperonal (1,3-benzodioxol-5-carboxaldehyde), used as a positive control, in assays of repellency were purchased from Merck (Buenos Aires, Argentina) and Aldrich Chemical (Milwaukee, WI), respectively.

**Gas Chromatography (GC).** Analyses of essential oils were performed in a Shimadzu GC-RIA (flame

ionization detector) gas chromatograph, fitted with a 30 m by 0.25 mm (0.25- $\mu$ m film thickness) fused silica capillary column coated with a phase 5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane, nonpolar DB-5 column. The GC operating conditions were as follows: oven temperature programmed from 40 to 230°C at 2°C/min; injector and detector temperature, 240°C. The carrier gas was nitrogen at a constant flow of 0.9 ml/min, and 0.3  $\mu$ l of each material was injected into the chromatograph. The constituents of the essential oils were identified by 1) their GC retention index with reference to an homologous series of *n*-alkanes ( $C_{12}$ – $C_{25}$ ); 2) comparison of their retention times with those of pure authentic samples from Sigma-Aldrich and Fluka; 3) peak enrichment on coinjection with authentic standards, if possible; 4) GC-mass spectrometry (MS) library search (Adams and Nist); and 5) visual inspection of the mass spectra from literature, for confirmation. Analyses were performed with a PerkinElmer Q-700 equipped with a SE-30 capillary column (30 m by 0.25 mm; coating thickness 0.25- $\mu$ m film). The analytical conditions were: oven temperature from 40 to 230°C at 2°C/min, the carrier gas was helium at a constant flow of 0.9 ml/min, and the source was at 70 eV.

**Bioassays for Fumigant Activity.** Direct exposure of insects to vapors from essential oils and their chemical components was done with a small, enclosed chamber (Fig. 1A). Each experimental unit consisted of a covered plastic petri dish (90 mm in diameter) containing 60  $\mu$ l of a test substance on a micro coverglass (18 by 18 mm) on one side. Control units were the same but without addition of any substance. The other side of each unit contained 15 lice exposed on a Whatman No. 1 filter paper (55 mm in diameter, Whatman, Hillsboro, OR) inside an upturned lid of a plastic petri dish (55 mm in diameter). Exposed lice were observed for evidence of knockdown every 5 min, when the number of immobile insects was recorded. Criterion for knockdown was if a louse remained on its back with no or only occasional low leg movement. Specimens were used once in a given assay and then discarded. During each study, the assembled units were kept at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $60 \pm 5\%$  RH.

**Bioassay for Repellents.** Repellency was evaluated in a second test arena (Fig. 1B), consisting of a transparent glass ring (100 mm in diameter, 50 mm in height) placed on a filter paper (Whatman No. 1, 110 mm in diameter) that had been divided into an inner circular zone (zone a) and an outer ring (zone b), both with equal areas. Treated arenas received 0.5 ml of a test solution (50 mg/ml) applied to zone b, at a final concentration of 0.7 mg/cm<sup>2</sup> of paper. Control arenas had both zones treated with acetone only. Piperonal was used as a positive control, as was reported previously by Burgess (1993).

Orientation of lice was used to evaluate repellency of test substances. A set of  $n = 15$  lice was released into the center of each arena's zone a. In negative controls,  $\approx 86 \pm 6\%$  of released lice naturally moved to zone b and stayed in close contact with the glass ring. Repellency of a test substance applied in zone b was then

Table 1. Chemical components of essential oils, as percentage of total from each of 16 native and exotic plants from Argentina

Chemical class	Compound <sup>b</sup>	Plant species as source of essential oil <sup>a</sup>															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Monoterpene hydrocarbon	Camphene	0.7			0.4		1.0	0.3	0.5	1.3		<0.1					0.4
	<i>p</i> -Cymene	0.5	27.2	0.1		<0.1	<0.1	3.1	1.0	11.2	1.0	22.0	17.4		0.2	<0.1	
	Limonene	7.8		0.1	9.3	0.2	10.1	<0.1	1.2	6.1	3.3	5.2	4.1	27.1	0.1	6.0	
	Myrcene				0.6	0.1	0.5	0.1	0.8			<0.1		0.1		1.4	
	$\alpha$ -Pinene	23.0			0.5	0.4	1.0	0.7	5.2	5.2		<0.1		4.3		0.8	
	$\beta$ -Pinene	36.7		0.1	1.1	0.1	1.5	<0.1	0.2	0.8		<0.1				0.2	
	Sabinene			0.1	0.6	<0.1	0.6	<0.1	8.1	<0.1		0.1	<0.1		0.2	<0.1	3.1
	$\alpha$ -Terpinene		3.6						0.2	<0.1		0.1	0.2				
	$\gamma$ -Terpinene			0.1	0.4		0.1	1.3	1.0	<0.1		1.0	10.8	23.2	0.2	0.1	
	Borneol			0.2					0.3				7.6				
Alcohol	Citronellol										4.2						
	Iso-isopulegol										3.5						
	Isopulegol										9.0						
	Linalool						<0.1		2.2					4.8			
	Menthol					0.5											
	Neomenthol					1.6											
	Terpinen-4ol			0.1					4.1	4.2		5.2	3.1	0.4	0.1		
	$\alpha$ -Terpineol		68.2	0.1	6.3	0.1			1.2	3.3		3.6	4.2	7.7		0.3	
	Camphor			0.2	55.5												6.1
	Ketone	Carvone															
Isomenthone						4.6											
Menthone						34.8	30.7										
Pulegone					0.8	51.1	51.2										
$\alpha$ -Thujone				7.3												93.4	71.9
$\beta$ -Thujone				2.1												0.8	4.5
1,8-Cineole				84.6		0.2	0.1	0.3	50.8	62.1		93.2	37.5	46.9	45.7		
Ether	Eugenol							15.0									
	Carvacrol							80.5									
Phenol	Thymol		0.2					9.0								0.8	
	Citronellal										76.0						
Aldehyde	Citronellyl acetate										7.3						
	Sesquiterpene hydrocarbon																
Ester	$\delta$ -Cadinene	1.4		0.1	0.8	0.2		<0.1		0.5				2.3	0.3	0.8	
	$\gamma$ -Cadinene	5.0			0.9							0.2		0.4	0.3	0.5	
	$\beta$ -Caryo phyllene	2.4	0.2	1.5	3.5	0.8	0.1	0.2		<0.1	0.2		0.1	1.0	0.2	0.1	
	$\gamma$ -Gurjunene		<0.1		4.0	0.2	<0.1			0.5			0.1		0.2		
Oxygenated sesquiterpene	$\tau$ -Cadinol	14.4													0.1	0.1	
	spathulenol	2.0		0.9		0.2	1.1	<0.1		0.2		5.0			0.3	0.5	
Other		6.1	0.5	2.4	15.3	4.9	2	4.3	8.4	4.6		0.9	2.9	0.9	5.8	2.7	3.3

<sup>a</sup> 1, *Schinus areira* L. (native) (Anacardiaceae); 2, *Chenopodium ambrosioides* L. (native) (Chenopodiaceae); 3, *Artemisia verlotorum* Lamotte (native) (Compositae); 4, *Psila spartioides* (Hooker et Arnott) J. Remy. (native) (Compositae); 5, *Menta pulegium* L. (exotic) (Lamiaceae); 6, *Minthostachys verticillata* (H. B. K) Griseb. (native) (Lamiaceae); 7, *Origanum vulgare* L. (exotic) (Lamiaceae); 8, *Laurus nobilis* L. (exotic) (Lauraceae); 9, *Eucalyptus cinerea* F.V. Muell. (exotic) (Myrtaceae); 10, *Eucalyptus citriodora* Hook. (exotic) (Myrtaceae); 11, *Eucalyptus saligna* Smith. (exotic) (Myrtaceae); 12, *Eucalyptus tereticornis* Smith. (exotic) (Myrtaceae); 13, *Eucalyptus viminalis* Labill. (exotic) (Myrtaceae); 14, *Myrcianthes cisplatensis* Cambess. (native) (Myrtaceae); 15, *Acantholippia riojana* Hieron. Ex Moldenke (native) (Verbenaceae); and 16, *Aloysia polystachia* (Griseb.) Moldenke. (native) (Verbenaceae).

<sup>b</sup> Determined with GC-MS (see text).

Table 2. Fumigant and repellent activities of essential oils from different plants and piperonal against head lice

Botanical family	Substance <sup>a</sup>	Fumigant activity <sup>b</sup>				Repellency (RI ± SE) <sup>d</sup>
		Slope ± SE	KT <sub>50</sub> , min (CL) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	df	
Myrtaceae	<i>Myrcianthes cisplatensis</i>	4.37 ± 1.13	1.29 (0.81–1.69)	3.50	7	51.20 ± 23.9abc
	<i>Eucalyptus cinerea</i>	4.45 ± 1.47	12 (5.80–15.60)	1.25	4	50.20 ± 18.50abc
	<i>Eucalyptus viminalis</i>	17.70 ± 5.37	14.90 (8.60–19.30)	0.15	7	33.30 ± 10.40a
	<i>Eucalyptus saligna</i>	6.96 ± 1.39	17.39 (10.05–22.72)	20.65	9	62.80 ± 40bc
	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	10.18 ± 20.39	23.52 (20.90–25.95)	1.56	8	34.50 ± 31.90ab
	<i>Eucalyptus citriodora</i>		>60			59.30 ± 14.90bc
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i>	8.24 ± 1.63	24.35 (21.07–27.51)	4.69	10	49.50 ± 16.3abc
Verbenaceae	<i>Aloysia polystachia</i>	13.63 ± 3.90	23.43 (20.49–26.31)	2.74	10	30.70 ± 26.80a
	<i>Acantholippia riojana</i>		>60			48.10 ± 1.20abc
Lamiaceae	<i>Mintostachys verticillata</i>	6.96 ± 1.45	39.36 (34.51–44.92)	2.83	10	22.50 ± 5.10a
	<i>Mentha pulegium</i>	3.95 ± 1.36	57.70 (46.40–122.3)	2.45	8	75.50 ± 11.60c
	<i>Origanum vulgare</i>		>60			34.50 ± 17.40ab
Anacardiaceae	<i>Schinus areira</i>	7.97 ± 1.54	40.40 (36–44.80)	4.10	10	40.40 ± 13.50ab
Compositae	<i>Artemisia verlotorum</i>	4.54 ± 1.50	44.70 (35.2–64.80)	2.02	4	— <sup>e</sup>
	<i>Psila spartioides</i>		>60			39.90 ± 0.5ab
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium ambrosioides</i>		>60			46.70 ± 36.90abc
	Piperonal					72.26 ± 11.16c

<sup>a</sup> Plant species or chemical. Three replicates of 15 lice each (total 45) for each substance, observed at 5-min intervals for 1 h.

<sup>b</sup> Statistics from probit analysis of knockdown times.

<sup>c</sup> Time to 50% knockdown; CL = 95% confidence limit.

<sup>d</sup> Means in same column followed by different letters are significantly different by LSD test ( $P < 0.05$ ).

<sup>e</sup> No data recorded.

evaluated as the amount of reduction in dispersal from zone a to b. A repellency index (RI) for each compound was calculated as a percentage repelled from zone b,  $RI = [(Nc - Nt)/Nc] \times 100$ , where Nc was the number of lice found in the zone b of the control arena, and Nt was the number of lice found in zone b of the treated arena. Treatments and controls were replicated three times, and the number of lice found on both zones was recorded every 5 min for 1 h.

**Statistical Analysis.** Frequencies of knockdown with each essential oil or component were subjected to probit regression analysis (Litchfield and Wilcoxon 1949) to estimate time in minutes to knockdown of 50% of each unit's subjects (KT<sub>50</sub>), by using POLO PC (LeOra Software 1987). When lice exposed to a test solution showed no evidence of efficacy in 1 h, the knockdown time was recorded as KT<sub>50</sub> > 60 min and that treatment was not included in further statistical

Table 3. Fumigant and repellent activities of essential oil components against head lice

Chemical class	Chemical <sup>a</sup>	Fumigant activity <sup>b</sup>				Repellent activity (RI ± SE) <sup>d</sup>
		Slope ± SE	KT <sub>50</sub> (min) (95% CL) <sup>c</sup>	χ <sup>2</sup>	df	
Ether	1,8-Cineole	9.96 ± 3.47	11.10 (8.32–13.11)	0.07	2	23.40 ± 8ab
	Anisole	9.067 ± 2.11	12.70 (10.80–14.40)	1.5	2	17.16 ± 21 <sup>e</sup>
	Anethole		>60			31.46 ± 11abc
	Eugenol		>60			31.75 ± 25abc
Hydrocarbon	Limonene	5.69 ± 1.35	27.20 (22–32.41)	3.7	7	5.07 ± 6 <sup>f</sup>
	β-Pinene	5.87 ± 1.26	33.86 (28–39.61)	2.97	7	8.30 ± 0.5a
	α-Pinene	2.09 ± 0.49	42.70 (31.50–62.20)	13.3	12	–2.78 ± 6 <sup>f</sup>
	β-Myrcene	8.27 ± 1.52	48.90 (43.70–53.90)	4.23	12	— <sup>f</sup>
	Terpinene		>60			46.10 ± 1cd
Alcohol	Linalool	14.26 ± 2.84	37.73 (34.79–40.49)	3.52	10	— <sup>f</sup>
	Benzyl alcohol	8.83 ± 2.43	59.72 (55–68.90)	2.21	10	57.74 ± 20de
	Borneol		>60			18.98 ± 19 <sup>f</sup>
	Citronellol		>60			31.06 ± 2abc
	(–)-Menthol		>60			53.56 ± 13cd
	Isomenthol		>60			22.41 ± 22 <sup>f</sup>
	(+)-Menthol		>60			36.45 ± 1bcd
Ketone	Menthone	7.50 ± 1.27	39.70 (35.60–43.60)	6.38	10	39.23 ± 16bcd
	Pulegone	6.92 ± 1.36	46.93 (41.78–52.50)	3.05	11	— <sup>f</sup>
	Camphor (ketone)		>60			33.95 ± 21abc
Phenol	Carvone (ketone)		>60			— <sup>f</sup>
	Thymol		>60			52.70 ± 10cd
	Piperonal					72.26 ± 11.16e

<sup>a</sup> Statistics from probit analysis of knockdown times.

<sup>b</sup> Three replicates of 15 lice each (total 45) for each substance, observed at 5-min intervals for 1 h.

<sup>c</sup> Time to 50% knockdown; CL = 95% confidence limit.

<sup>d</sup> Means in same column followed by different letters are significantly different by LSD test ( $P < 0.05$ ).

<sup>e</sup> Not included in the statistical analysis because SE was larger than mean RI.

<sup>f</sup> Not tested.

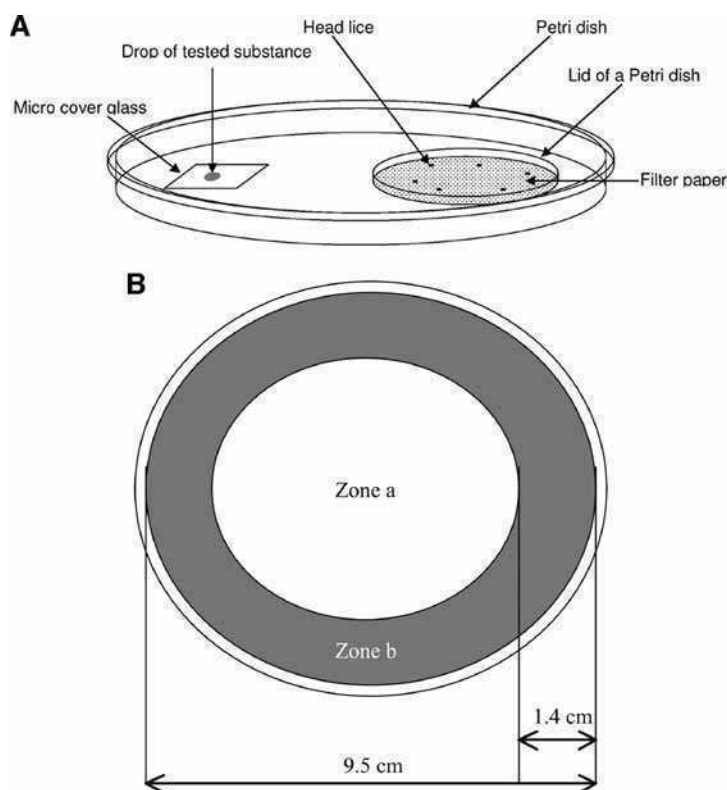


Fig. 1. (A) Diagram of arena used to evaluate fumigant properties of vapors from essential oils or their chemical components. (B) Arena used to evaluate repellency.

analysis. Once the fumigant data were collected, a multiple linear regression analysis was performed to examine relations among  $KT_{50}$  values of the effective components and their respective vapor pressures ( $V$ ) ( $V$  is the temperature [ $^{\circ}C$ ] at which vapor pressures were 1 mmHg) and their octanol-water partition coefficient values ( $\log P$ ) (Lide 1990).

Repellency was indicated when RI values were significantly  $>0$ . Those compounds whose SEs equaled or exceeded their respective mean RIs were excluded from statistical analysis. Repellency indices of the essential oils and their components were analyzed by analysis of variance (ANOVA), and means were separated using least significant difference (LSD) test (Statistica 99, StafSoft, Tulsa, OK).

## Results

**Fumigant Activity.** Significant differences in fumigant activity against head lice were observed among the essential oils from the native and exotic plant species (Table 2). Eleven of the oils had fumigant properties (i.e.,  $KT_{50} < 60$ ), and levels of activity varied among plant families. On the basis of  $KT_{50}$  values, the essential oil from the native *Myrcianthes cisplatensis* Cambess was by far the most effective, followed by the exotics *Eucalyptus cinerea* F.V. Muell., *Eucalyptus viminalis* Labill., and *Eucalyptus saligna*

Smith. Oils from both native and exotic members of the Myrtaceae family were the most effective, with the exception of *Eucalyptus citriodora* Hook. (Table 2). Oils from species in Lamiaceae and the remaining families were less effective. Assays of individual oil components indicated the vapors of 1,8-cineole and anisole were the most active, followed by limonene,  $\beta$ -pinene, linalool, menthone,  $\alpha$ -pinene, pulegone,  $\beta$ -myrcene, and benzyl alcohol (Table 3).

Regression analysis revealed a significant correlation between estimated  $KT_{50}$  values and corresponding vapor pressures of the effective compounds when considered as a single predictor. The resulting model was  $KT_{50} = 22.998 \pm 6.15 + 0.538 \pm 0.22 V$ ;  $r^2 = 0.42$ ;  $F = 5.74$ ;  $df = 1, 8$ ;  $P < 0.05$ . Thus, the more volatile the compound, the more effective it was as a fumigant (Fig. 2). In contrast,  $KT_{50}$  values were independent of  $\log P$  values for the same compounds ( $KT_{50} = 34.854 \pm 17.11 - 0.409 \pm 4.98 \log P$ ;  $r^2 = 0.001$ ;  $F = 0.01$ ;  $df = 1, 8$ ;  $P < 0.937$ ). Finally, when both predictors were included, the resulting model was  $KT_{50} = -19.7 \pm 17.16 + 0.967 \pm 0.24 * (V) + 10.5 \pm 4.18 * (\log P)$  ( $r^2 = 0.73$ ;  $F = 8.14$ ;  $df = 2, 6$ ;  $P < 0.05$ ).

**Repellency.** Mean RI of the essential oils from the native and exotic plants differed significantly (Table 2) ( $F = 3.86$ ;  $df = 15, 46$ ;  $P < 0.001$ ). The most repellent essential oil was from the exotic *Mentha pulegium* L., and it was not significantly more repellent than the

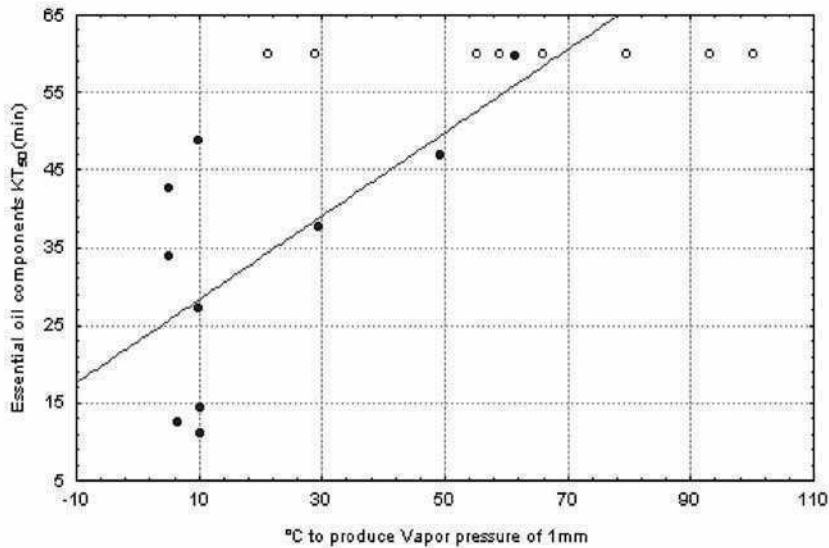


Fig. 2. Relationship of fumigant toxicity ( $KT_{50}$ ) and volatility of essential oil components. Filled points were included in regression analysis, and open points were not used ( $KT_{50}$  values > 60).

positive control piperonal (Table 2). Significant differences also occurred among *Mentha pulegium* and the group of *Minthostachys verticillata* (H.B.K.) Griseb., *Aloysia polystachia* (Griseb.), *E. viminalis*, *Eucalyptus tereticornis* Smith., *Origanum vulgare* L., *Psila spartioides* (Hooker et Arnott) J. Remy., and *Schinus areira* L. (Table 2). Highly significant differences were found among the oil components (Table 3) ( $F = 10.7$ ;  $df = 12, 40$ ;  $P < 0.001$ ). The most repellent compound, benzyl alcohol, was as repellent as piperonal (Table 3). There were significant differences among repellencies of benzyl alcohol and the group of  $\beta$ -pinene, 1,8-cineole, citronellol, anethole, eugenol, and camphor (Table 3).

### Discussion

The present results are the first to show that essential oils from some Argentinean plants can function as fumigants or repellents against head lice. An interesting result was the quick knockdown time ( $KT_{50} = 1.29$ ) of the extract from the native species, *Myrcianthes cisplatensis*, which was 9.3-, 11.5-, 13.5-, and 18.2-fold more effective than oils from the exotics *E. cinerea*, *E. viminalis*, *E. saligna*, and *E. tereticornis*, respectively. A second interesting pattern was the similarities in activities of essential oils from taxonomically related plant species. For example, all but one (*E. citriodora*) of the six species in Myrtaceae yielded active oils, as did two of the three species in Lamiaceae. The fumigant activities of their oil components showed that the ethers 1,8-cineole and anisole were the most effective. However, neither the enantiomers of the menthol constituent nor  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene had significantly different levels of fumigant activity (Table 3).

The association between  $KT_{50}$  values and vapor pressures (V) and octanol-water partition coefficients (log P) of the essential oil components was in accordance with former studies showing that both narcotic action of organic compounds in mammals and fumigant activity in insects both correlate with their volatilities and solencies in water (Hansch 1971).

Previous reports have also noted the potential of essential oil vapors as pediculicides against head lice (Oladimeji et al. 2000; Lahlou et al. 2000; Yang et al. 2003, 2004). Lahlou et al. (2000) also found high pediculicidal activity of *Mentha pulegium* and *Eucalyptus* sp. when head lice from Morocco were exposed to vapors in an enclosed chamber whose size and oil quantity were similar to ones employed in this work. In addition, Yang et al. (2004), using similar methods, found  $KT_{50}$  values of 6.2 min for *E. cinerea* oil, and  $KT_{50}$ s of 13 min and 27 min for 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene, respectively. Those levels of fumigant activity are also similar to ones estimated in the present work. Mumcuoglu et al. (1996) analyzed four essential oils and ten of their main components, and found that citronella oil and citronellal were the only ones with RIs >50% against body lice *Pediculus humanus humanus* L. Our results showed that five of the 16 tested essential oils (Table 2) and three of their 21 components (Table 3) had RIs >50% against head lice, but that citronellol was not effective.

The present results suggest that subtle differences in oil components may substantially alter apparent repellency. For example, oils from *M. pulegium* and *M. verticillata* have the same main components with only slight differences in concentration, yet the oil from *M. pulegium* was 3.4-fold more repellent than the one from *M. verticillata*. Furthermore, enantiomers of the

menthol constituent differed in repellency, with (-)-menthol > (+)-menthol > isomenthol.

The fumigant and repellent properties of the essential oils and components studied here suggest they may have potential for development as products for head lice control. A limiting factor that will need to be addressed is that they all are relatively volatile materials, and are likely to evaporate quickly when applied on or near the human head. High volatility might be remedied by formulating candidate compounds for sustained release, or by formulating them with other compounds in a vehicle base, such as potentially synergistic aliphatic alcohols (Mougabure Cueto et al. 2002), or terpenoids, which themselves may afford additional efficacy (Taplin et al. 1982). A battery of tests for acute and chronic toxicity will need to be completed before any of these compounds can be used as commercial formulations for control of head lice.

### Acknowledgments

We thank Mercedes Mantesi, Isabel Cuñete, Rosa Ester Flores, Elena Schwartzter, Paula García Canto, and all the authorities of the elementary schools where head lice were collected. We thank two anonymous reviewers for extremely helpful comments, and R. Moon for editorial assistance. This investigation received financial support from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina) and Laboratio Elea S.A.C.I.F. y A. (Buenos Aires, Argentina).

### References Cited

- Burgess, I. F. 1993. The function of a repellent in head louse control. *Pharm. J.* 250: 692–693.
- Burgess, I. F. 2004. Human lice and their control. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 457–481.
- Eddy, G. W. 1952. Effectiveness of certain insecticides against DDT-resistant body lice in Korea. *J. Econ. Entomol.* 45: 1043–1051.
- Gratz, N. G. 1997. Human lice. Their prevalence, control and resistance to insecticides—a review 1985–1997. WHO/CTD/WHOPES/ 97.8, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Hansch, C. 1971. Quantitative structure-activity relationship, chapter 2, pp. 271–284. In E. Ariens [ed.], *Drug design*, vol. 1. Academic, New York.
- Isman, M. 1999. Pesticides based on plant essential oils. *Pestic. Outlook* 10: 68–72.
- Lahlou, M., R. Berrada, A. Agoumi, and M. Hmamouchi. 2000. The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in morocco. *Int. J. Aromather.* 10: 108–123.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Lide, D. R. 1990. CRC handbook of chemistry and physics, 71st ed. CRC, Ann Arbor, MI.
- Litchfield, J. T., and F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Exp. Ther.* 96: 99–110.
- Mougabure Cueto, G. A., P. Gonzalez Audino, C. V. Vassena, M. I. Picollo, and E. N. Zerba. 2002. Toxic effect of aliphatic alcohols against susceptible and permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 39: 457–460.
- Muller, R. N. 1972. First report of resistance of human body lice to malathion. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 372–374.
- Mumcuoglu, K., R. Galun, U. Bach, J. Miller, and S. Magdassi. 1996. Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Entomol. Exp. Appl.* 78: 309–314.
- Oladimeji, F. A., O. Orafidiya, T. A. B. Ogunniyi, and T. A. Adewunmi. 2000. Pediculocidal and scabicial properties of *Lippia multiflora* essential oil. *J. Ethnopharmacol.* 72: 305–311.
- Piccolo, M. I., C. V. Vassena, A. A. Casadio, J. Massimo, and E. N. Zerba. 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura; Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 35: 814–817.
- Piccolo, M. I., C. V. Vassena, G. A. Mougabure Cueto, M. Verneti, and E. N. Zerba. 2000. Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. *J. Med. Entomol.* 37: 721–725.
- Rice, P. J., and J. R. Coats. 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 1172–1179.
- Robinson, D., N. Leo, P. Procvic, and S. C. Barker. 2003. Potential role of *Pediculus humanus capitis*, as vectors of *Rickettsia prowazekii*. *Parasitol. Res.* 90: 209–211.
- Taplin, D., P. M. Castillero, J. Spiegel, S. Mercer, A. Rivera, and L. Schachner. 1982. Malathion for treatment of *Pediculus humanus var capitis* infestation. *J. Am. Med. Assoc.* 247: 3103–3105.
- Tapondjou, A. L., C. Adler, D. A. Fontem, H. Bouda, and C. Recihmuth. 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J. Stored Prod. Res.* 41: 91–102.
- Tisserand, R., and T. Balacs. 1995. Essential oils safety: a guide for health care professionals. Churchill Livingstone. London, United Kingdom.
- Vassena, C. V., G. Mougabure Cueto, P. González Audino, R. A. Alzogaray, E. N. Zerba, and M. I. Picollo. 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J. Med. Entomol.* 40: 447–450.
- Wright, J. W., and R. Pal. 1965. Second review of insecticide-resistance in body lice (1958–1963). *Bull. World Health Organ* 33: 485–501.
- Yang, Y., S. Lee, W. Lee, D. Choi, and Y. Ahn. 2003. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 4884–4888.
- Yang, Y., H. Lee, J. M. Clark, and Y. Ahn. 2004. Insecticidal activity of plant essential oils against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 41: 699–704.

Received 11 May 2005; accepted 1 March 2006.



# The fumigant and repellent activity of aliphatic lactones against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae)

Ariel Ceferino Toloza, Julio Zygadlo\*, Gastón Mougabure-Cueto, Eduardo Zerba/\*\*, Silvina Faillaci\*, María Inés Picollo/†

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas, J. B. de La Salle 4397 (B1603ALO), Provincia de Buenos Aires, Argentina

\*Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina \*\*Universidad Nacional General San Martín, Buenos Aires, Argentina

*New alternative insecticides are necessary for the chemical control of head lice. In this study the fumigant knockdown time 50% (KT<sub>50</sub>) and repellency index (RI) of three aliphatic lactones was compared with two essential oils and DDVP, against permethrin-resistance *Pediculus humanus capitis* from Argentina. In the fumigant assay, none of the lactones were effective compared to the highest activity of eucalyptus (KT<sub>50</sub> 15.53 m). In the repellency test, the three lactones were equally or more effective (RI ranging from 60.50 to 76.68) than the positive control (piperonal). These lactones are promising as head lice repellents.*

Key words: aliphatic lactones - permethrin-resistance - head lice

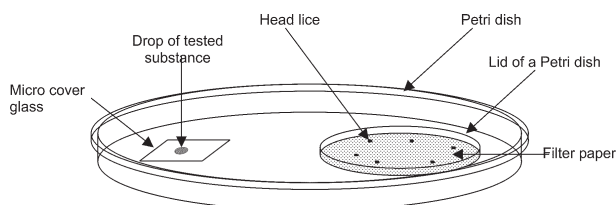
Head lice infestation with *Pediculus humanus capitis* De Geer, is a worldwide health problem affecting most of the primary school-aged children in developed and developing countries (Burgess 2004). The repeated application of insecticides has resulted in the development of resistance to these products (Picollo et al. 1998, Vassena et al. 2003, Burgess 2004). Recent concerns with human health and environmental safety have prompted a revival of interest in plant-derived insecticides. Aliphatic lactones are widely found in many different fruits playing important roles in flavors (Zarbin et al. 2004). In addition, essential oils (EO) of plant tissues have been widely reported as insecticides (Isman 1999). The purpose of the present work was to evaluate the fumigant and repellent activity of three aliphatic lactones against permethrin-resistant head lice from Argentina. Two EO (eucalyptus and lavender) and two insecticides (DDVP and piperonal) were used as positive controls.

## MATERIALS AND METHODS

Head lice were collected using an anti-lice comb from 60 infested children of two elementary schools from Buenos Aires. Permethrin-resistance had previously been reported from the same schools as the lice were collected (Vassena et al. 2003). The  $\delta$ -lactone (delta-hexalactone-5-methylpentanolide),  $\gamma$ -nonalactone (4-pentylbutanolide) and  $\delta$ -dodecalactone (5-heptylpentanolide), were from Palma Chemicals (Argentina), the eucalyptus and lavender from Fritzsche Saica (Argentina). The purity of each compound was more than 99% as measured by HPLC analysis. The piperonal (1,3-benzodioxol-5-carboxaldehyde) (99%) was from Aldrich (US) and the DDVP (2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate) (97.8%) from

Chemotecnica (Argentina). Certified acetone was used as control treatment in the repellent experiments.

The direct vapor contact was evaluated in an enclosed chamber consisting of a 9 cm Petri dish where 60  $\mu$ l of the tested substance was placed within. A 5.5 cm Petri dish with a Whatman No.1 filter paper and 15 adult head lice were placed within the chamber (Figure). The control test was performed using the chamber without any test substance included. Knockdown was recorded every 5 min for 1 h.



Schematic view of vapour exposure enclosed test chamber

Repellency was evaluated in a test arena consisting of a filter paper (Whatman No.1, 11 cm diameter) divided into an inner zone (a) and outer zone (b), both with equal areas. Treatment consisted of 0.5 ml of the tested solutions in acetone (50 mg/ml) applied on zone b resulting in a final concentration of 0.7 mg/cm<sup>2</sup> on the paper. Control consisted of both zones treated with acetone. All treated filter papers were allowed to dry for 10 min before use. Batches of 15 adults were placed in the zone a, the number of lice found on both zones was recorded every 5 min for 1 h. The DDVP and piperonal were employed as positive controls for fumigant and repellency activity (Burgess 2004). The EO of eucalyptus and lavender were used to compare either fumigant or repellent activity of the lactones. All the insects were kept at 28  $\pm$  1°C; 60  $\pm$  5 %RH.

All knockdown data were subject to probit analysis to estimate knockdown time 50% (KT<sub>50</sub>) by the POLO PC

†Corresponding author: mpicollo@citefa.gov.ar

Received 10 August 2005

Accepted 4 January 2006

TABLE  
Fumigant and repellent activity of aliphatic lactones, essential oils, DDVP, and piperonal against *Pediculus humanus capitis*

Components <sup>a</sup>	Fumigant activity			Repellent activity
	KT <sub>50</sub> (min, 95% CL)	Slope ± SE	χ <sup>2</sup>	RI ± SE
δ-lactone	> 60			68.46 ± 1ef
γ-nonalactone	> 60			60.50 ± 3ef
δ-dodecalactone	> 60			76.68 ± 7f
Piperonal	-			72.26 ± 11f
Eucalyptus	15.53 (11.74-18.53)	5.34 ± 1.22	1.88	50.22 ± 15de
Lavender	44.6 (39.67-50.82)	8.13 ± 1.93	2.85	31.72 ± 9d
DDVP	40.15 (34.63-48.86)	3.93 ± 0.68	7.27	-

a: for each essential oil and for each treatment, the number of head lice was 45; CL: confidence limit; RI ± SE: repellency index ± standard error. Means in the repellent activity column followed by different letters are significantly different after performing the Duncan test (P < 0.05).

program. The repellency index (RI) was calculated according to  $RI = [(Nc - Nt) / Nc] * 100$ , where Nc is the percentage in zone b for the control, and Nt is the percentage in the zone b of the treatment. The RI means were analyzed by ANOVA. The means were separated using the Duncan test.

### RESULTS

The fumigant and repellency activity of the tested substances against permethrin-resistance head lice are shown in the Table. The aliphatic lactones showed no fumigant activity (KT<sub>50</sub> > 60 m), compared to eucalyptus (KT<sub>50</sub> 15.53 m) that was 2.58 and 2.87-fold more effective than Lavender and DDVP. The repellency results showed the highest activity for the δ-dodecalactone (RI 76.68), which was significantly different from the more limited repellent effect of the essential oils. Lavender was significantly different from the aliphatic lactones (ANOVA p < 0.001) but showed no difference from eucalyptus.

### DISCUSSION

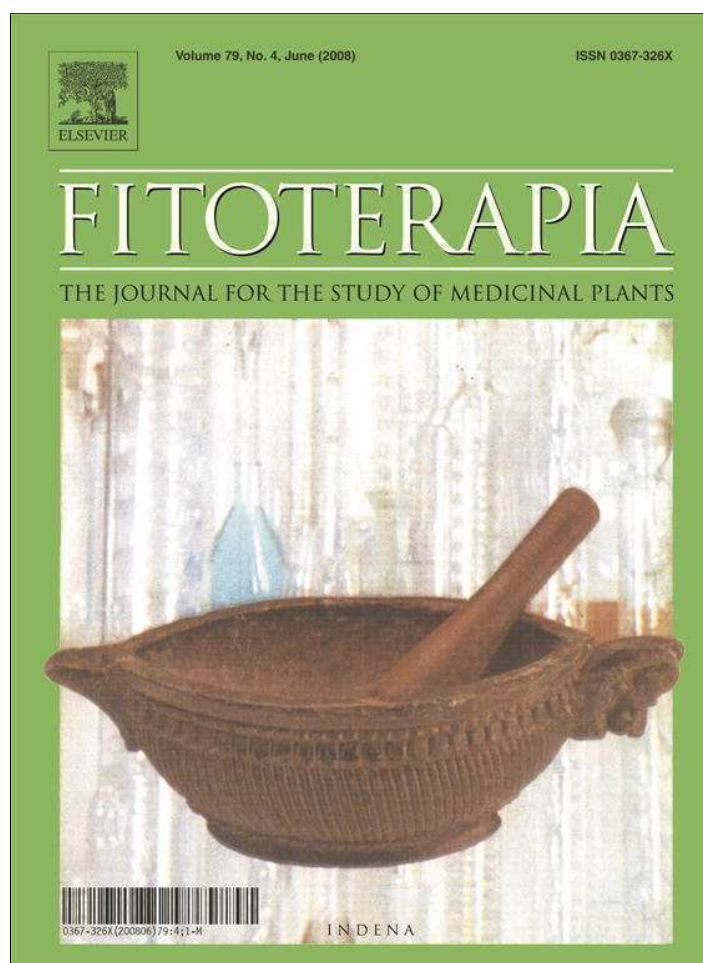
Previous authors have mentioned the fumigant and repellent activity of EO against human lice (Burgess 2004), but no reports concerning to the pediculicida activity of aliphatic lactones were done. Our results demonstrated that these lactones were as effective as the well known repellent piperonal, and showed higher repellent indexes (RI 68.46, 60.50, and 76.68) than those previously reported for EO components (less than 50%) against *P. h. humanus* (Mumcuoglu et al 1996).

These results also suggest that aliphatic lactones could be incorporated in formulations suitable for application to hair capable to produce an adequate slow release, and act as a repellent formulation applied directly to the hair of the persons protecting them from head lice infestation.

### REFERENCES

- Burgess IF 2004. Human lice and their control. *Annu Rev Entomol* 49: 457- 481.
- Isman M 1999. Pesticides based on plant essential oils. *Pestic Outlook* 10: 68-72.
- Mumcuoglu K, Galun R, Bach U, Miller J, Magdassi S 1996. Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Entomol Exp Appl* 78: 309-314.
- Piccolo MI, Vassena C, Casadio A, Massimo J, Zerba E 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura; Pediculidae). *J Med Entomol* 35: 814-817.
- Vassena C, Mougabure Cueto G, González Audino P, Alzogaray R, Zerba E, Piccolo MI 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J Med Entomol* 40: 447-450.
- Zarbin P, Oliveira A, Simonelli F, Villar J, Delay O 2004. An easy and versatile approach to the synthesis of chiral pheromone lactones via 4, 4-dimethyl-2-oxazoline derivatives. *Tetrahedron Lett* 45: 7399-7400.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids

M.I. Picollo<sup>a,\*</sup>, A.C. Toloza<sup>a</sup>, G. Mougabure Cueto<sup>a</sup>, J. Zygodlo<sup>b</sup>, E. Zerba<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397, (B1603ALO), Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, IMBIV-CONICET, Córdoba, Argentina

Received 26 September 2007; accepted 16 January 2008

Available online 9 February 2008

### Abstract

The repetitive and inadequate application of pediculicidal products frequently results in the development of resistance to these compounds. Essential oils are a promising alternative to synthetic insecticides, although their mode of action remains to be explored. It has been proposed that one possible target of the essential oils is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE). The role of monoterpenoids as possible AChE inhibitors and their relationship with the toxicity was investigated both *in vitro* and *in vivo*. Inhibition of electric eel AChE activity showed that the most effective inhibitor was 1,8-cineole with  $IC_{50} 6 \times 10^{-3}$  M. The inhibition of AChE activity of head louse homogenate by 1,8-cineole showed  $IC_{50} 7.7 \times 10^{-2}$  M. The intoxication symptoms of head lice exposed to vapors of 1,8-cineole was recorded before the *in vivo* head louse AChE inhibition assay. No correlation was found between neurotoxic symptoms and inhibition of AChE activity.

Published by Elsevier B.V.

**Keywords:** Head lice; Acetylcholinesterase; Inhibition; Monoterpenoids

### 1. Introduction

The ectoparasite, *Pediculus humanus capitis*, De Geer has been associated with humans throughout ages, probably since our pre-hominid African ancestors [1]. Head louse is confined to the scalp and every year infests millions of school-age children in both developed and developing countries [2]. The main negative effects of pediculosis are embarrassment, dermal irritation and social sanctioning, and some schools have an exclusion policy for infested children [3]. Transmission occurs person to person between infested individuals and through the interchanging of personal things like hats and clothes [4]. The chemical control has been mainly based in the treatment with topical insecticides such as DDT, lindane, carbaryl, malathion, permethrin and d-phenothrin [5].

Unfortunately, the repetitive and inadequate application of pediculicidal products has resulted in the development of resistance to one or more of these products in several countries, including Argentina [2,5–8]. Thus, there is a need to find alternatives to these synthetic pesticides. Plant essential oils are promising in that they are easily biodegradable,

\* Corresponding author. Tel.: +54 11 4709 8224; fax: +54 11 4709 5334.

E-mail address: mpicollo@citefa.gov.ar (M.I. Picollo).

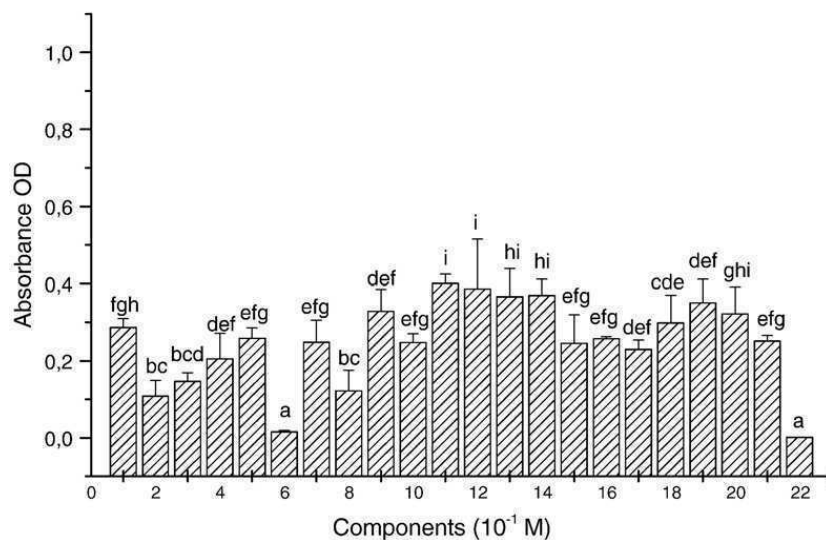


Fig. 1. Inhibition of electric eel AChE activity by monoterpenoids (mean±s.e.m.). (1) linalyl acetate, (2) menthone, (3) carvone, (4) camphor, (5) anetole, (6) 1,8-cineole, (7) anisole, (8) eugenol, (9) linalool, (10) borneol, (11) nonyl alcohol, (12) isomenthol, (13) (-)-menthol, (14) (+)-menthol, (15) citronellol, (16) α-pinene, (17) β-pinene, (18) limonene, (19) β-myrcene, (20) terpinene, (21) control (without monoterpenoids), (22) eserine ( $10^{-4}$  M). Different letters are significantly different by Duncan test ( $P<0.05$ ).

environmental friendly and effective against a wide variety of insect pests [9,10]. Previous reports have mentioned the pediculicidal action of essential oils against head lice [5,11]. A previous study of our laboratory reported the fumigant and repellent activity of essential oils and monoterpenoids against permethrin-resistant head lice from Buenos Aires [12]. Essential oils are obtained by hydro-distillation of plant tissues and composed of many different types of constituents like hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, esters, phenols, ethers, oxides and acids [13]. The symptoms of poisoned insects by certain essential oils or their main components point to a neurotoxic mode of action, similar to those produced by synthetic insecticides such as the organophosphates and carbamates [10]. Certain works have reported that the possible mode of action of the essential oils are due to a reversible competitive inhibition of acetylcholinesterase (AChE) enzymes isolated from electric eels, and from heads of housefly, cockroach, horse serum and bovine erythrocytes [14–18]. Another possible target suggested for essential oils is the interference with the octopaminergic system of insects [19,20], and with GABA-gated chloride channels [21].

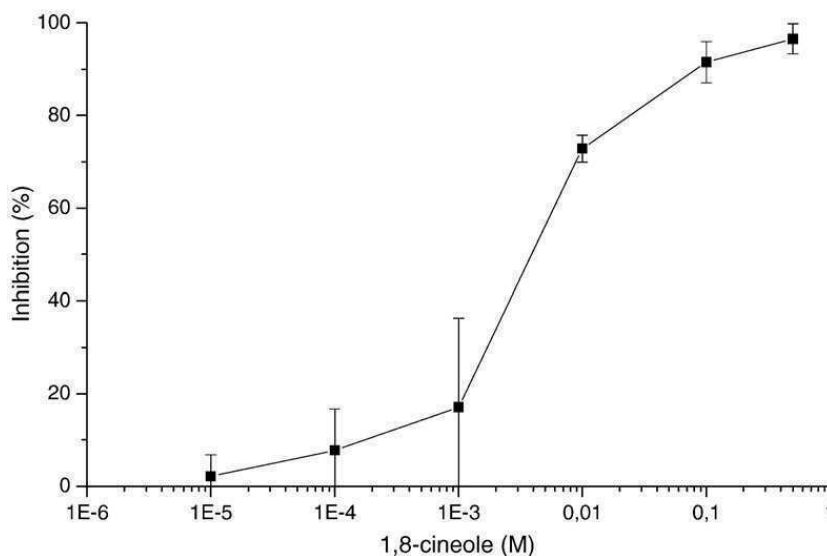


Fig. 2. Inhibition of electric eel AChE activity by 1,8-cineole.

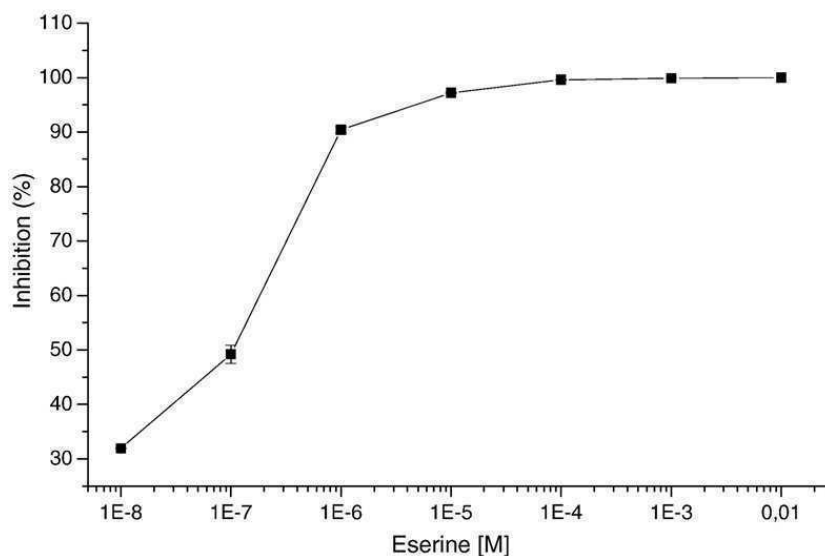


Fig. 3. Inhibition of electric eel AChE activity by eserine.

The aim of this work was to analyze the potential inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by monoterpenoids and their relationship with the toxic effect in both *in vitro* and *in vivo*.

## 2. Experimental

### 2.1. General

Head lice were obtained from heads of infested children (6–12 yr old) from two elementary schools of Buenos Aires (LP, GH), which were susceptible to carbaryl but resistant to pyrethroids [7]. Lice were collected using a fine toothed antilouse comb and transported to our laboratory as previously described [6]. Only third instars and adults were employed. The protocol for the lice collection was approved by the ad hoc committee of the Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (Research Center of Pest and Insecticides, Buenos Aires, Argentina), and archived in our laboratory.

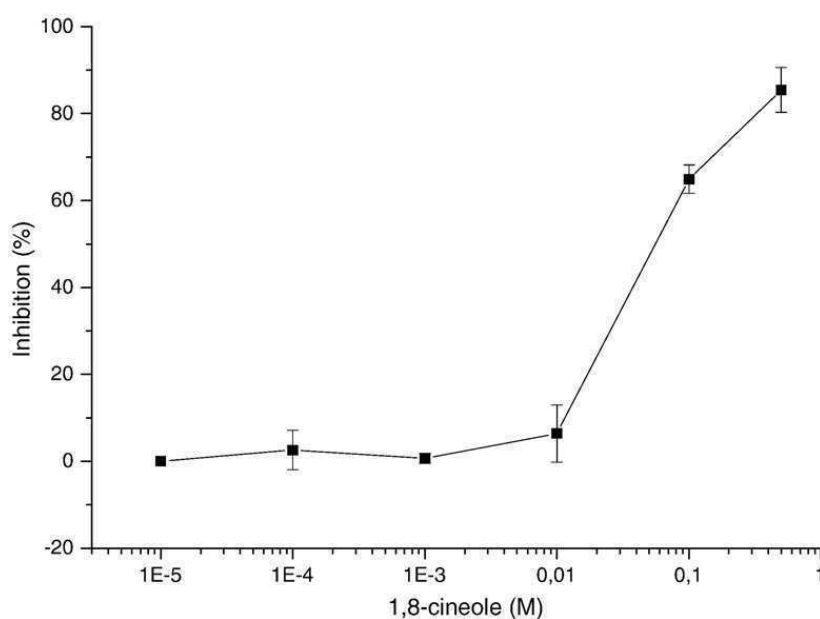


Fig. 4. Inhibition of head louse AChE activity by 1,8-cineole.

Tested monoterpenoids (technical grade, >98% purity): linalyl acetate, menthone, carvone, camphor, anetole, 1,8-cineole, anisole, eugenol, linalool, borneol, nonyl alcohol, isomenthol, (–)-menthol, (+)-menthol, citronellol,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene,  $\beta$ -myrcene and terpinene were supplied by Fluka, Munich, Germany; and by Sigma, St. Louis, MO, USA. DDVP (also known as dichlorvos) was purchased from Chemotécnica S.A. (Buenos Aires, Argentina). Eserine (commonly called physostigmine), acetylcholinesterase (AChE) from electric eel (type III-S, EC 3.1.1.7), 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB); and Acetylthiocholine iodide (ATC) were supplied by Sigma, St. Louis, MO, USA. Absolute ethanol and acetone were supplied by Merck, Darmstadt, FR, Germany.

## 2.2. Stock solutions

Buffer phosphate ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ), 0.05 M and pH=7.2. AChE from electric eel in phosphate buffer, 1.33 UE/ml. DTNB in phosphate buffer,  $3.2 \times 10^{-4}$  M. ATC in acetone/phosphate buffer (1:9),  $1.56 \times 10^{-3}$  M. Monoterpenoids in absolute EtOH, 1 M. Serial dilutions of eserine and 1,8-cineole in absolute EtOH were prepared for the estimation of the parameters of inhibition 50% ( $IC_{50}$ ). Concentrations ranged from  $1.07 \times 10^{-1}$  M to  $1.07 \times 10^{-7}$  M for eserine and from 5 M to  $10^{-4}$  M for 1,8-cineole. The final EtOH concentrations in all assays were maintained at 5% (v/v), including controls.

## 2.3. Head lice homogenate

After removal of the abdomen, third instars and adults were homogenized in phosphate buffer (10 lice by 150  $\mu$ l of buffer). Crude homogenate was filtered using a piece of glass fiber into a plastic syringe. The filtered homogenate was utilized as the enzyme source in the inhibition assays.

## 2.4. Symptoms of intoxication

In order to compare the toxic effects between the monoterpenoid 1,8-cineole and a well known anticholinesterase insecticide [Dichlorvos (DDVP)], the experiments were performed to quantify the sequence and time of appearance of symptoms of head lice intoxicated with vapors of DDVP and 1,8-cineole. The vapour exposure for the in vivo evaluation was performed due to the high volatile characteristics of the studied substances.

Firstly, the progressive symptoms were identified in each individual louse during a continued exposure to vapors of DDVP and 1,8-cineole. Then, batches of 10–15 lice were exposed to vapors of DDVP or 1,8-cineole, and the percentage of insects showing each symptom was recorded every 5 min. The following symptoms were observed: excitation (the insect increased their locomotor activity passing from excitation to hyperexcitation), incoordination (the insect was

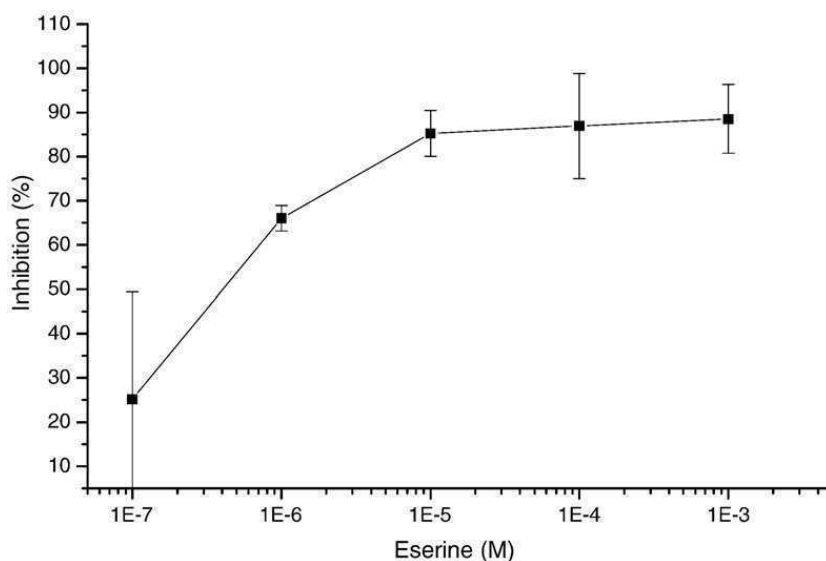


Fig. 5. Inhibition of head louse AChE activity by eserine.

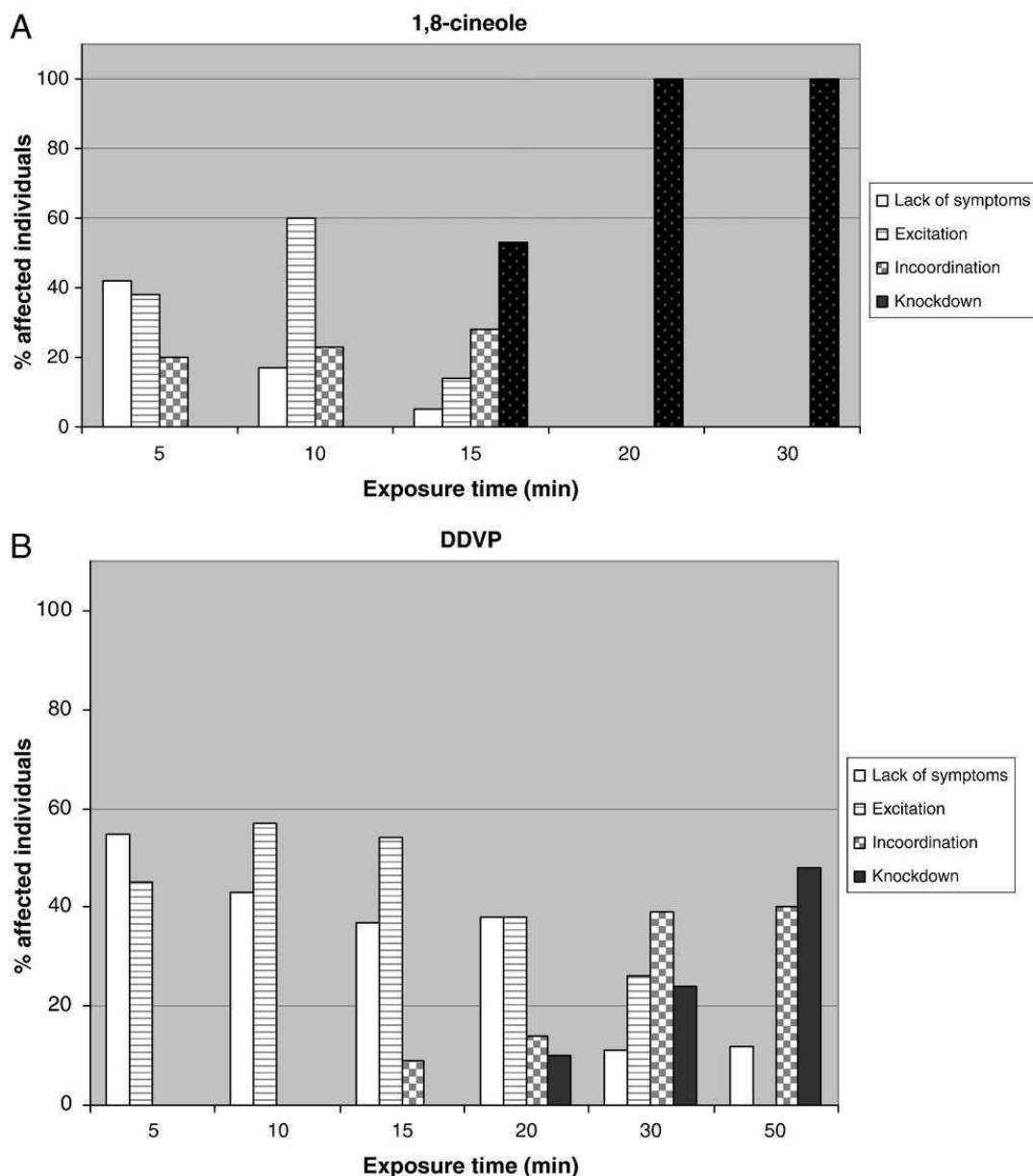


Fig. 6. Sequence of symptoms of intoxication of head lice exposed to vapors of: (A) 1,8-cineole and (B) DDVP.

altered in its locomotor activity), and knockdown (all the legs were affected by convulsive movements and the insect lay on its back). In both experiments, the enclosed chamber methodology previously described [12] was employed.

### 2.5. Inhibition assays and acetylcholinesterase activity

In vitro inhibition of AChE was assessed with minor modifications to microtiter plate assay by a colorimetric method [22]. Absorbance at 415 nm was measured in a 96-well microtiter plate (Greiner, bio-one, USA) using a microplate reader photometer (model 680XR, Bio-Rad). Eserine was employed as a positive control in the in vitro assays due to its known anticholinesterase activity. The inhibition of AChE by twenty monoterpenoids was assessed using electric eel enzyme. The concentrations were  $10^{-1}$  M for monoterpenoids and  $10^{-4}$  M for eserine.

The inhibitor concentration 50% ( $IC_{50}$ ) was established on electric eel and head louse AChEs for 1,8-cineole. This was based on the high inhibition value of eel AChE and the high fumigant activity previously reported for head lice [12].

For inhibition assays, 40  $\mu$ l of stock solution of either electric eel or head louse AChE (or phosphate buffer in controls) was incubated with 4  $\mu$ l of stock solution of monoterpenoid or eserine (or EtOH in controls) for 10 min at room temperature. Concentration of the reactants in the mix (44  $\mu$ l) was: 1.21 UE/ml for AChE,  $0.9 \times 10^{-1}$  M for



Table 1  
Inhibition of AChE activity of head lice previously exposed to vapors of 1,8-cineole and DDVP

Exposure time (min)	Inhibition of AChE activity (%±s.e.m.)	
	1,8-cineole	DDVP
5	1.41±2.4	–
10	16.67±14.8	0
20	4.89±8.5	–
30	13.3±18.8	61.83±3.3
50	–	75.50±2.8
75	–	80.35±20
90	–	76.49±20

monoterpenoid, from 0.45 M to  $0.9 \times 10^{-5}$  M for 1,8-cineole, and from  $10^{-2}$  M to  $10^{-8}$  M for eserine. After incubation, 40  $\mu$ l of stock solution of chromogen (DTNB) was added and reaction was initiated by addition of 40  $\mu$ l of stock solution of substrate (ATC). The concentrations of DTNB and ATC in the final mix (124  $\mu$ l) were  $1.1 \times 10^{-4}$  M and  $0.5 \times 10^{-3}$  M, respectively. Immediately, absorbance was read for 3 min (10 measures every 20 s) for electric eel AChE, or for 10 min (10 measures every min) for head louse homogenate. The recorded absorbance during time was in all the cases a linear function. Controls were performed replacing AChE by phosphate buffer and inhibitors (monoterpenoid or eserine) by EtOH. There were at minimum three replicates per enzyme dilution (monoterpenoid or eserine) and controls were included to correct non-enzymatic hydrolyses of the substrate.

The *in vivo* inhibition assay was performed to test whether intoxication by 1,8-cineole was associated with the inhibition of AChE. DDVP was used as a positive control due to their high vapor pressure and their known insecticide activity based on anticholinesterase inhibition. Batches of 10–15 lice were exposed to vapors of 1,8-cineole or DDVP. Time expositions were 5, 10, 20, 30 min for 1,8-cineole; and 30, 50, 75 or 90 min for DDVP (independent batches were used for each time). The periods of time were chosen from appearance of symptoms for DDVP and 1,8-cineole. The experimental units were similar to those used in the symptomatology experiments. After exposition, the lice were homogenized (10 lice per 150  $\mu$ l of phosphate buffer) and 40  $\mu$ l of homogenate (phosphate buffer in controls) were mixed with 40  $\mu$ l of the stock solution of chromogen (DTNB) and 40  $\mu$ l of stock solution of substrate (ATC) in the measure well. Absorbance at 415 nm was read for 10 min (10 measures every min). The concentrations of DTNB and ATC in the final mix (120  $\mu$ l) were  $1.14 \times 10^{-4}$  M and  $0.52 \times 10^{-3}$  M, respectively. Control of vapor exposition was performed without addition of 1,8-cineole or DDVP. Control of AChE inhibition was performed replacing homogenate by phosphate buffer. The assays with each component (1,8-cineole or DDVP) were run in triplicate, at a minimum.

## 2.6. Statistics

Enzymatic activity value was estimated by the slope of the linear regression analysis among absorbance data and measure time. Enzyme inhibition was expressed as percentage of remainder activity with respect to control without inhibitors minus 100. Inhibition values of different monoterpenoids were analyzed by means of one-way ANOVA, and significant results ( $P < 0.05$ ) were followed by Duncan test (Statistica 99, Staf, Tulsa, OK).  $IC_{50}$  values (concentration of inhibitors required to produce 50% inhibition of AChE activity) were calculated graphically from the inhibition concentration–response curve.

## 3. Results and discussion

Inhibition of electric eel AChE activity following twenty monoterpenoid treatments is shown in Fig. 1. There were significant differences in the inhibition of electric eel AChE by the monoterpenoids evaluated in the present study ( $F = 12.86$ ;  $df = 21, 44$ ;  $P < 0.0001$ ). The most potent electric eel AChE inhibitor was 1,8-cineole. Although 1,8-cineole and eserine showed similar AChE inhibition values, eserine had a potency much greater than 1,8-cineole ( $10^{-4}$  M and  $10^{-1}$  M, respectively).

A concentration dependent inhibition of electric eel AChE was calculated for 1,8-cineole and eserine (Figs. 2, 3). The  $IC_{50}$  values for 1,8-cineole and eserine were  $6 \times 10^{-3}$  M and  $1 \times 10^{-7}$  M, respectively. Thus, eserine was more potent inhibitor of AChE than 1,8-cineole. The inhibition of head louse AChE activity by the monoterpenoid 1,8-

cineole is shown in Fig. 4. Compared with the inhibition of AChE by eserine (Fig. 5), the inhibition concentration  $IC_{50}$  values for 1,8-cineole and eserine were  $7.7 \times 10^{-2}$  M and  $1 \times 10^{-6}$  M; respectively. Again, eserine showed stronger inhibitory effect than 1,8-cineole.

Previous works also reported that this monoterpenoid inhibited eel AChE [14–18]. However, to the best of our knowledge, this is the first report showing that this monoterpenoid was in vitro inhibitor of human louse AChE.

As was mentioned by Keane and Ryan [17], the validation of an in vitro inhibition of AChE should additionally be demonstrated by an appropriate in vivo effect for the evaluated monoterpenoid.

In the in vivo test, AChE activity of head lice exposed to vapors of 1,8-cineole and DDVP were measured at several different intervals of time. The sequence of symptoms recorded during 1 h is shown in Fig. 6. Head lice exposed to vapors of 1,8-cineole were affected faster than those of DDVP. After 20 min of exposure to the monoterpenoid, 100% of head lice were in the final stage of intoxication (i.e. knockdown). On the other hand, after 60 min of exposure to DDVP, only 50% of the lice were in the mentioned stage.

The inhibition of head louse AChE activity previously exposed to vapors of 1,8-cineole and DDVP is shown in Table 1. Even though all head lice exposed to 1,8-cineole were knockdown, only 13% of AChE inhibition was measured. Thus, no correlation was found between neurotoxic symptoms and inhibition of AChE activity. On the other hand, lice exposed to DDVP showed high AChE inhibition that was associated to neurotoxic symptoms.

The in vivo analysis showed that both 1,8-cineole and DDVP possessed similar symptoms of intoxication suggesting a neurotoxic site of action [10]. However, no correlation was found between the in vivo inhibition of AChE and the observed intoxication symptoms in head lice exposed to vapors of 1,8-cineole. This indicated that AChE could not be the first site of action of this monoterpenoid, or at least not the major responsible of insect intoxication. Similar lack of correlation was reported [14]. Even though pulegone-1,2-epoxide inhibited Madagascar roach AChE in vitro, no correlation between inhibition of AChE in vivo and the progressive development of symptoms was reported. Based on the relationship between the relative toxicities of six monoterpenoids and their absolute affinities for AChE, they concluded that their mode of action may be via the inhibition of AChE in spite of the failure to demonstrate that correlation.

In our study, the low AChE inhibition by 1,8-cineole measured in the in vivo assay could be analyze considering the two AChE isoforms demonstrated in insects [23], and particularly in *Pediculus* lice [24]. These latter authors identified the cDNA sequences encoding AO- and AP-AChE precursors, measured the in vitro AChE inhibition by fenitroxon (organophosphorous) and carbaryl (carbamates), and determined the relative abundance of AP-AChE gene transcripts over AO-AChE. Based on their findings, they suggested the potential significance of the AP-AChE isoform in body lice in association with the efficacy of AChE-targeting pediculicides.

However, the toxic action of monoterpenoids could be mediated through other pathways such as GABA receptors [21] and octopaminergic receptors [19,20]. Future detailed investigations of the in vivo toxicity of various biologically active essential oils are necessary to improve our knowledge of the target specificity of these compounds, which could represent a new alternative in the control of insect pests.

## Acknowledgements

The authors wish to thank all the authorities of the elementary schools where head lice were collected. This investigation received financial support from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina) and Laboratorio Elea S.A.C.I.F. y A. (Buenos Aires, Argentina).

## References

- [1] Araújo A, Ferreira LF, Guidon N, Maues da Serra Freire N, Reinhard KJ, Dittmar K. Parasitol Today 2000;16:269.
- [2] Gratz NG. Human lice. Their prevalence, control and resistance to insecticides—a review 1985–1997, vol. 97.8. Geneva: World Health Organization; 1997. p. 61.
- [3] Dolianitis C, Sinclair R. Clin Dermatol 2002;20:94.
- [4] Heukelback J, Feldmeier H. Lancet 2004;363:889.
- [5] Burgess IF. Annu Rev Entomol 2004;49:457.
- [6] Picollo MI, Vassena CV, Casadio AA, Massimo J, Zerba EN. J Med Entomol 1998;35:814.
- [7] Picollo MI, Vassena CV, Mougabure Cueto GA, Verneti M, Zerba EN. J Med Entomol 2000;37:721.
- [8] Vassena CV, Mougabure Cueto G, González Audino P, Alzogaray RA, Zerba EN, Picollo MI. J Med Entomol 2003;40:447.

- [9] Regnault-Roger C. *Int Pest Manag Rev* 1997;2:25.
- [10] Isman M. *Pest Outlook* 1999;10:68.
- [11] Priestley CM, Burgess IF, Williamson EM. *Fitoterapia* 2006;77:303.
- [12] Toloza AC, Zygadlo J, Mougabure Cueto G, Biurrun F, Zerba E, Picollo MI. *J Med Entomol* 2006;43:889.
- [13] Tisserand R, Balacs T. *Essential oils safety: a guide for health care professionals*. London: Churchill Livingstone; 1995.
- [14] Grundy DL, Still CC. *Pest Biochem Physiol* 1985;23:383.
- [15] Ryan ME, Byrne O. *J Chem Ecol* 1988;14:1965.
- [16] Miyazawa M, Watanabe H, Kameoka H. *J Agric Food Chem* 1997;45:677.
- [17] Keane S, Ryan MF. *Insect Biochem Mol Biol* 1999;29:1097.
- [18] Mills C, Cleary BJ, Gilmer JF, Walsh JJ. *J Pharm Pharmacol* 2004;56:375.
- [19] Enan E. *Comp Biochem Physiol C* 2001;130:325.
- [20] Kostyukovsky M, Rafaeli A, Gileadi C, Demchenko N, Shaaya E. *Pest Manag Sci* 2002;58:1101.
- [21] Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Satelle DB. *Br J Pharmacol* 2003;140:1363.
- [22] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88.
- [23] Bourguet D, Roig A, Toutant JP, Arpagaus M. *Neurochem Int* 1997;31:65.
- [24] Lee S, Kasai S, Komagata O, Kobayashi M, Agui N, Kono Y, et al. *J Med Entomol* 2007;44:72.

# Ovicidal and adulticidal effects of monoterpenoids against permethrin-resistant human head lice, *Pediculus humanus capitis*

A. C. TOLOZA, C. VASSENA and M. I. PICOLLO

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina

**Abstract.** The improper use of pediculicides containing permethrin has led to the development of resistance. Thus, new alternatives for control are needed. Plant-derived insecticides are attractive alternatives to common chemical insecticides because most of them are environmentally friendly and non-toxic to mammals. The toxic activity of 23 monoterpenoids belonging to several chemical classes was tested against the eggs of permethrin-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* De Geer (Phthiraptera: Pediculidae). Significant differences in ovicidal action were observed among the tested substances. The most effective chemicals were hydrocarbons and ethers, followed by ketones, alcohols, phenols and esters. A linear relationship between egg mortality and knockdown time (KT<sub>50</sub>) on adults by the tested components revealed that most of the components were effective on both egg and adult stages. The monoterpenoids described herein are good candidates as effective pediculicides.

**Key words.** *Pediculus humanus capitis*, adult head lice, fumigant activity, head lice eggs, monoterpenes, toxicity.

## Introduction

The human head louse, *Pediculus humanus capitis* De Geer, is an important cosmopolitan pest mainly affecting school-aged children. Louse infestation is annoying and may cause itching, loss of sleep and social sanctioning (Gratz, 1997). The spread of lice occurs mainly through direct host-to-host contact (Roberts, 2002). Although head lice have not been incriminated in the transmission of deleterious pathogens, it has been suggested that they can be potential transmitters of *Rickettsia prowazekii* Da Rocha-Lima, a causative agent of epidemic typhus, and *Bartonella quintana* Brenner, a causative agent of trench fever (Robinson *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2006).

There are several treatment options for the control of head lice, which include over-the-counter products, prescription pediculicides, manual removal (wet combing), homeopathic remedies and oral therapy (West, 2004). Infestation with head lice is increasing every year in both developed and developing countries, as reflected in pediculicide failure through resistance, improper application and formulation changes (Burgess, 2004). Since the mid-1990s, levels of resistance to the synthetic pyrethroids permethrin and phenothrin have been widely reported in several

countries, such as France (Coz *et al.*, 1993), the Czech Republic (Rupes *et al.*, 1995), the U.K. (Burgess *et al.*, 1995), Israel (Mumcuoglu *et al.*, 1995), the U.S.A. (Pollack *et al.*, 1999), Denmark (Kristensen *et al.*, 2006), Japan (Tomita *et al.*, 2003), Australia (Hunter & Barker, 2003) and Argentina (Picollo *et al.*, 1998, 2000; Vassena *et al.*, 2003). Therefore, the use of alternative plant-derived products has increased worldwide due to the tendency of consumers to prefer 'natural' products. Plant essential oils, the steam distillate of aromatic plants, constitute a rich source of bioactive chemicals with compounds generally consisting of low-molecular-weight monoterpenes and phenols (Guenther, 1972). Some of these components are effective against a wide variety of insect pests (Rice & Coats, 1994; Isman, 1999), including human lice (Burgess, 2004; Priestley *et al.*, 2006; Toloza *et al.*, 2006). Plant-derived products such as shampoos, sprays and lotions have previously been reported to be effective as pediculicides (Mumcuoglu *et al.*, 2002; Heukelbach *et al.*, 2006; Abdel-Ghaffar & Semmler, 2007; Gonzalez-Audino *et al.*, 2007). In general terms, adult lice are easier to kill than eggs. Effective control is to ensure that the dosage, exposure and formulation of the products are sufficient to kill them (Buxton, 1947; Veal, 1996). Concerning eggs, there are two

Correspondence: Ariel C. Toloza, Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397 (B1603ALO), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina. Tel.: + 5411 4709-8224; Fax: + 5411 4709-5334; E-mail: atoloza@citefa.gov.ar

types of mortality: the embryo in the egg is killed or the developing nymph dies when it comes into contact with the surface insecticide as it chews its way out of the chorion during eclosion (Leonard *et al.*, 1991). Differences among the biological systems of eggs and hatched forms include the absence of a differentiated nervous system in early embryonic stages and certain processes for utilization of stored energy that are not common to hatched forms. On the other hand, mature embryos have some of the same vital systems found in newly emerged nymphs, such as the nervous, respiratory and circulatory systems. Thus, it may be possible to develop an ovicidal product that is effective against all stages, if it could target vital processes common to mature embryos and hatched forms, as well as those that are unique to embryos (Smith & Wagenknecht, 1959). The aim of this work was to study the pediculicidal activity of several monoterpenoids against eggs and adults of *P. h. capitis* populations reported to have permethrin resistance.

## Materials and methods

### Chemicals

The monoterpenoids tested were those previously evaluated against adult head lice (Toloza *et al.*, 2006). All compounds were of more than 98% purity (Fig. 1), and were supplied by Fluka, Munich, Germany and by Sigma, St. Louis, MO.

### Head lice

Adults and eggs were collected in 2007 from infested children 6–12 years old, using a fine-toothed antilouse comb. Head lice were obtained from three elementary schools located in different parts of Buenos Aires city. Previously, a topical application method (Vassena *et al.*, 2003) had demonstrated high levels of

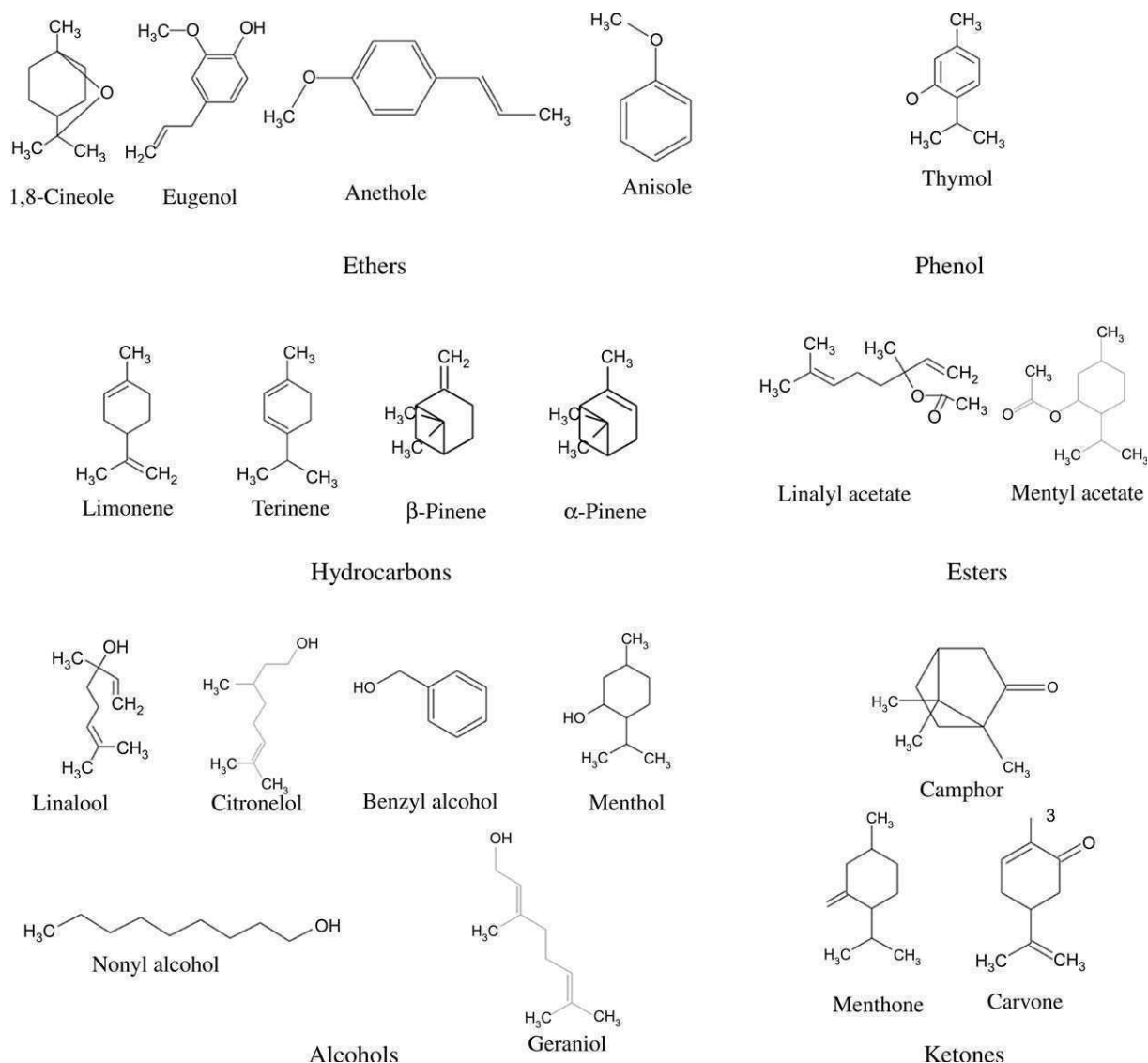


Fig. 1. Structures of the monoterpenoids selected for investigation.

resistance to permethrin in these schools (resistance ratios >150), which were confirmed to be at a similar level during the present study. The material was collected and transported to our laboratory as previously reported (Picollo *et al.*, 1998, 2000). The protocol for adult and egg collection was approved by the *ad hoc* committee at the Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (Research Centre of Pests and Insecticides, Buenos Aires, Argentina) and archived in our laboratory.

#### Ovicidal effects of monoterpenoids on *Pediculus humanus capitis* eggs

Each experimental unit consisted of a covered plastic Petri dish (55 mm diameter), a filter paper and 60  $\mu$ L of a test substance on a small plastic container. The negative control consisted of the same experimental unit without the addition of any substance. Groups of 10–20 late development viable eggs were selected, as described previously by Mougabure Cueto *et al.* (2006), and transferred to the enclosed chamber. Late eggs showed black eye spots and clearly visible appendages of the embryo. Each set of eggs was exposed to the test monoterpenoid for 24 h at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $75 \pm 5\%$  RH. After this time, the small container with the test substance was removed and the treated batches of eggs were incubated at  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $75 \pm 5\%$  RH (closed containers with saturated aqueous solutions of NaCl). Mortality data of treated eggs were recorded 5 days after the eclosion of controls. Treatments and controls were replicated three times. The criterion for mortality was eggs with a closed operculum or eggs with an opened operculum and the nymph inside (Mougabure Cueto *et al.*, 2006).

#### Fumigant activity against adult head lice

The method of Toloza *et al.* (2006) was employed to evaluate the fumigant activity of those monoterpenoids whose efficacy has not been previously reported. The compounds were evaluated in an enclosed chamber (9 cm diameter Petri dish) containing 60  $\mu$ L of the test substance. A 5.5 cm diameter Petri dish with a filter paper and 15 adult head lice was placed within the chamber. The control test consisted of the same unit without the

addition of any substance. Knockdown of exposed lice, defined here as the inability of the insects to walk on a filter paper, was recorded every 5 min for 1 h.

With the fumigant data reported here and those previously reported by us (Toloza *et al.*, 2006), a linear regression analysis was performed between knockdown time ( $KT_{50}$ ) values on adults and the percentage mortality of the eggs.

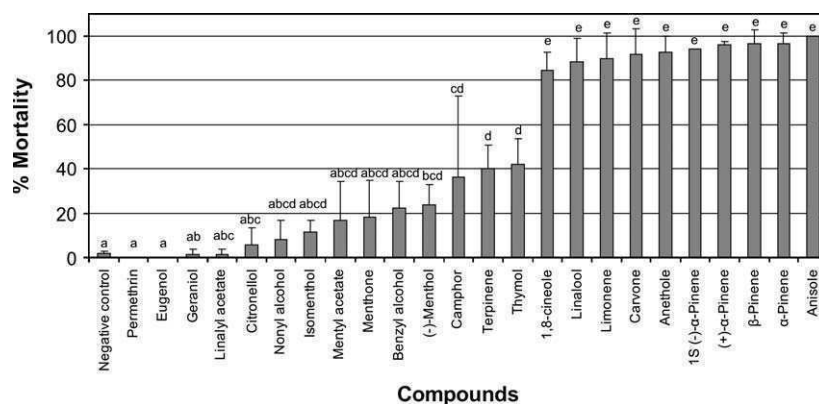
#### Statistical analysis

All mortality data were corrected for control mortality by using Abbott's equation (Abbott, 1925). The percentage mortality was determined and transformed to arcsine square-root values for ANOVA. Treatment means were compared and separated by the Duncan test at  $P < 0.05$  (StatSoft Inc., 2001). The relationship between  $KT_{50}$ s on adults and egg mortality was estimated by regression analysis. All statistical tests were performed with  $\alpha = 0.05$  for significance of statistical tests.

## Results

The ovicidal activity of monoterpenoids, the negative control and permethrin are summarized in Fig. 2. Significant differences in ovicidal action were observed among the tested substances ( $F = 14.88$ , d.f. = 23, 58,  $P < 0.0001$ ). Ten of the compounds gave louse egg mortality above 80% (as compared with the negative control). The most effective chemicals were hydrocarbons and ethers, followed by ketones, alcohols, phenols and esters. Assays of individual monoterpenoids indicated that the most effective were anisole (100%),  $\alpha$ -pinene ( $96.7 \pm 4.7\%$ ),  $\beta$ -pinene ( $96.4 \pm 6.2\%$ ), (+)- $\alpha$ -pinene ( $96.1 \pm 1.4\%$ ), 1S(-)- $\alpha$ -pinene ( $94.21 \pm 0.3\%$ ), anethole ( $92.5 \pm 7.5\%$ ), carvone ( $91.6 \pm 11.7\%$ ), limonene ( $89.88 \pm 11.3\%$ ), linalool ( $88.17 \pm 10.9\%$ ) and 1,8-cineole ( $84.47 \pm 8.0\%$ ) at the 95% confidence level.

The toxicity of six monoterpenoids against adult *P. h. capitis* are shown in Table 1. Of the tested compounds, only (+)- $\alpha$ -pinene and S(-)- $\alpha$ -pinene were effective on head lice. Additionally, the fumigant activity of monoterpenoids previously reported by Toloza *et al.* (2006) is shown in comparison (Table 1).



**Fig. 2.** Ovicidal effects of compounds against *Pediculus humanus capitis*. Different letters are significantly different by Duncan's test ( $P < 0.05$ ).

**Table 1.** Fumigant activity of monoterpenoids against adult head lice.

Chemical class	Monoterpenoid	KT <sub>50</sub> (95% confidence level)
Ether	1,8-cineole	11.10 (8.32–13.11)*
	Eugenol	>60*
	Anethole	>60*
Hydrocarbon	Anisole	12.7 (10.80–14.40)*
	Limonene	27.20 (22–32.41)*
	Terpinene	>60*
	β-Pinene	33.86 (28–39.61)*
	α-Pinene	42.70 (31.50–62.20)*
	(+)-α-Pinene	34.48 (25.31–53.97)
	1S-(-)-α-Pinene	28.54 (19.89–43.35)
Alcohol	Linalool	37.73 (34.79–40.49)*
	Citronellol	>60*
	Benzyl alcohol	59.72 (55–68.90)*
	Nonyl alcohol	>60
	Isomenthol	>60*
Ketone	(-)-Menthol	>60*
	Geraniol	>60
	Menthone	39.70 (35.60–43.60)*
	Carvone	>60*
Phenol	Camphor	>60*
	Thymol	>60*
Ester	Mentyl acetate	>60
	Linalyl acetate	>60
Negative control		>60
Permethrin		>60

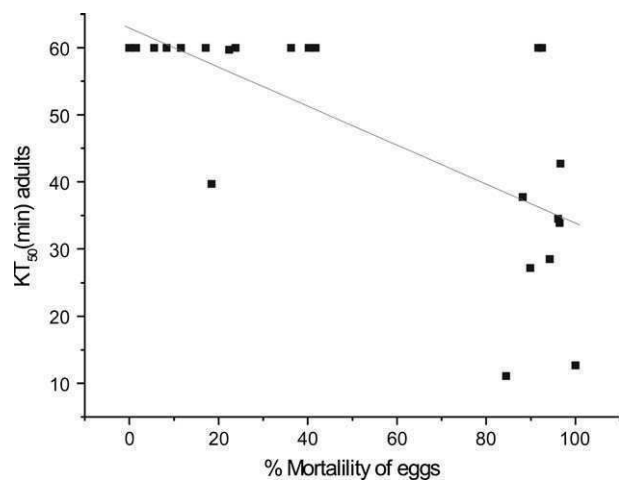
\*Data from Toloza *et al.* (2006).

KT<sub>50</sub>, knockdown time (min).

When adult *P. h. capitis* fumigant KT<sub>50</sub>s were compared with ovidal mortality percentages, we detected a strong relationship between the pediculicidal activity of the monoterpenoids in both adult and egg stages (KT<sub>50</sub> = 62.9234–0.290902 egg mortality,  $r^2 = 0.47$ ,  $F = 17.61$ , d.f. = 1, 20,  $P < 0.001$ ) (Fig. 3).

## Discussion

The present work reports that some monoterpenoids are potentially useful for head louse control because many of them were effective against both adults and eggs. These results suggest that the process involved in killing both later development eggs and adults may be similar. Previous studies have also reported the efficacy of some essential oil components on *P. humanus* eggs (Lahlou & Berrada, 2003; Yang *et al.*, 2004; Priestley *et al.*, 2006), however, different bioassay methodologies were employed. In comparison with the results of Yang *et al.* (2004), who used a filter paper contact bioassay and observed that 1,8-cineole was ineffective, our results indicate that it was highly effective. In addition, the most effective components reported by Priestley *et al.* (2006), who employed an immersion methodology on clothing lice, ranged from ineffective to moderately effective in our study. This difference may be related, at least in part, to the mode of application. The fumigant action of monoterpenoids, which have a high vapour pressure, indicates that the toxicity of the compounds offers an effective means of penetration via the



**Fig. 3.** The linear regression between the toxicity of monoterpenoids on adults (knockdown time: KT<sub>50</sub>) and eggs (% mortality).

respiratory system (Smith & Salkeld, 1966). Monoterpenoids are lipophilic compounds, and Veal (1996) mentioned that penetration through the louse haemolymph may be slow and limited, and instead entry may occur via the tracheal system. In eggs, the exchange of gases between the atmosphere and the embryo depends upon diffusion through the micropyles of the operculum, and monoterpenoids may reach the embryo through these structures. Moreover, changes in the membranes surrounding the embryo affect the permeability of the shell, increasing the toxicity of the insecticide (Smith & Salkeld, 1966).

Differences in the evaluation of pediculicide efficacy could also be due to differences in the mortality criteria applied. According to Heukelbach *et al.* (2008), head lice can recover within 180 min of sham death after exposure to a pediculicide. Thus, a short post-treatment recording time could overestimate the mortality of lice and the efficacy of a tested substance or product.

Our study indicates that monoterpenoids could be incorporated into formulations as potential pediculicides against both eggs and adults. Moreover, the addition of excipients to increase the efficacy and stability of the products should also be taken into account (Burgess, 2004). High volatility might be remedied by formulating candidate monoterpenoids for sustained release, or by formulating them with other compounds in a vehicle base. Further complementary studies including human health, such as burning sensations and skin irritation, should also be considered before any of these compounds can be employed as commercial products.

## Acknowledgements

The authors thank all the authorities of the elementary schools where head lice material was collected. This investigation received financial support from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina) and the Laboratorio Elea S.A.C.I.F y A. (Argentina). We thank anonymous reviewers for extremely helpful comments.

## References

- Abbott, W. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**, 265–267.
- Abdel-Ghaffar, F. & Semmler, M. (2007) Efficacy of neem seed extract shampoo on head lice of naturally infected humans in Egypt. *Parasitology Research*, **100**, 329–332.
- Burgess, I.F. (2004) Human lice and their control. *Annual Review of Entomology*, **49**, 457–481.
- Burgess, I., Brown, C., Peock, S. & Kaufman, J. (1995) Head lice resistant pyrethroid insecticides in Britain. *British Medical Journal*, **311**, 752.
- Buxton, P. (1947) *The Louse*. Edward Arnold, London, U.K.
- Coz, J., Combescot-Lang, C. & Verdier, V. (1993) Resistance of head louse *Pediculus capitis* L. 1758 to pyrethroids: d-phenothrine and permethrin in France. *Bulletin of the Society of France Parasitology*, **11**, 245–252.
- Gonzalez-Audino, P., Vassena, C., Zerba, E. & Picollo, M.I. (2007) Effectiveness of lotions based on essential oils from aromatic plants against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis*. *Archives of Dermatology Research*, **299**, 389–392.
- Gratz, N.G. (1997) *Human Lice. Their Prevalence, Control and Resistance to Insecticides—A Review 1985–1997*. World Health Organisation, Division of Control of Tropical Diseases, WHO Pesticide Evaluation Scheme Report, WHO/CTD/WHOPES/97.8, Geneva.
- Guenther, E. (1972) *The Essential Oils*. Krieger Publishing Company, FL.
- Heukelbach, J., Oliveira, F. & Speare, R. (2006) A new shampoo based on neem (*Azadirachta indica*) is highly effective against head lice in vitro. *Parasitology Research*, **99**, 353–356.
- Heukelbach, J., Canyon, D.V., Oliveira, F.A., Muller, R. & Speare, R. (2008) *In vitro* efficacy of over-the-counter botanical pediculicides against the head louse *Pediculus humanus var capitis* based on a stringent standard for mortality assessment. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 264–272.
- Hunter, J. & Barker, S. (2003) Susceptibility of head lice (*Pediculus humanus capitis*) to pediculicides in Australia. *Parasitology Research*, **90**, 476–478.
- Isman, M. (1999) Pesticides based on plant essential oils. *Pesticide Outlook*, **10**, 68–72.
- Kristensen, M., Knorr, M., Rasmussen, A. & Jespersen, J. (2006). Survey of permethrin and malathion resistance in human head lice populations from Denmark. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 533–538.
- Lahlou, M. & Berrada, R. (2003) Composition and nictidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. *Flavour and Fragrance Journal*, **18**, 124–127.
- Leonard, B., Graves, J. & Sparks, T. (1991) Ovicidal effects of selected insecticides against pyrethroid-susceptible and -resistant tobacco budworm. *Southwestern Entomologist*, **15**, 163–172.
- Mougabure Cueto, G., Zerba, E. & Picollo, M.I. (2006) Embryonic development of human lice: rearing conditions and susceptibility to spinosad. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 257–261.
- Mumcuoglu, K., Hemingway, J., Miller, J., Ioffe-Uspensky, I., Klaus, S., Ben-Ishai, F. & Galun, R. (1995) Permethrin resistance in the head louse *Pediculus capitis* from Israel. *Medical and Veterinary Entomology*, **9**, 427–432.
- Mumcuoglu, K., Miller, J., Zamir, C., Zentner, G., Helbin, V. & Ingber, A. (2002) The *in vivo* pediculicidal efficacy of a natural remedy. *The Israel Medical Association Journal*, **4**, 790–793.
- Picollo, M.I., Vassena, C., Casadio, A., Massimo, J. & Zerba, E. (1998) Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, **35**, 814–817.
- Picollo, M.I., Vassena, C., Mougabure Cueto, G., Verneti, M. & Zerba, E. (2000) Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. *Journal of Medical Entomology*, **37**, 721–725.
- Pollack, R., Kiszewski, A., Armstrong, P. *et al.* (1999) Differential permethrin susceptibility of head lice sampled in the United States and Borneo. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, **153**, 969–973.
- Priestley, C.M., Burgess, I. & Williamson, E.M. (2006) Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia*, **77**, 303–306.
- Rice, P.J. & Coats, J. (1994) Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and Southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, **87**, 1172–1179.
- Roberts, R. (2002) Head lice. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1645–1650.
- Robinson, D., Leo, N., Prociw, P. & Barker, S.C. (2003) Potential role of *Pediculus humanus capitis*, as vectors of *Rickettsia prowazekii*. *Parasitology Research*, **90**, 209–211.
- Rupes, V., Moravec, J., Chmela, J., Ledvinka, J. & Zelenkova, J. (1995) A resistance of head lice (*Pediculus capitis*) to permethrin in Czech Republic. *Central European Journal of Public Health*, **3**, 30–32.
- Sasaki, T., Poudel, S., Isawa, H. *et al.* (2006) First molecular evidence of *Bartonella Quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 110–112.
- Smith, E. & Salkeld, E. (1966) The use and action of ovicides. *Annual Review of Entomology*, **11**, 331–368.
- Smith, E. & Wagenknecht, A. (1959) The ovicidal action of organophosphate insecticides. *Canadian Journal of Applied Physiology-Revue Canadienne de Physiologie Appliquée*, **37**, 1135–1144.
- StatSoft Inc. (2001) *Statistica*. Edition. StatSoft Inc., Tulsa, OK.
- Toloz, A.C., Zygadlo, J., Mougabure Cueto, G., Biurrun, F., Zerba, E. & Picollo, M.I. (2006) Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *Journal of Medical Entomology*, **43**, 889–895.
- Tomita, T., Yaguchi, N., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. & Kasai, S. (2003). Molecular analysis of a para sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, **40**, 468–474.
- Vassena, C.V., Mougabure Cueto, G., González Audino, P., Alzogaray, R., Zerba, E. & Picollo, M.I. (2003). Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 447–450.
- Veal, L. (1996) The potential effectiveness of essential oils as a treatment for head lice, *Pediculus humanus capitis*. *Complementary Therapies in Nursing and Midwifery*, **2**, 97–101.
- West, D. (2004) Head lice treatment costs and the impact on managed care. *American Journal of Managed Care*, **10**, S277–S282.
- Yang, Y., Choi, H., Choi, W., Clark, J. & Ahn, Y. (2004) Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 2507–2511.

Accepted 30 August 2008



Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Interspecific hybridization of *Eucalyptus* as a potential tool to improve the bioactivity of essential oils against permethrin-resistant head lice from Argentina

Ariel Ceferino Toloza<sup>a,\*</sup>, Alejandro Lucia<sup>a</sup>, Eduardo Zerba<sup>a,b</sup>, Hector Masuh<sup>a,b</sup>,  
 Maria Inés Picollo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397 (B1603ALO), Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Universidad Nacional de General San Martín, Escuela de Postgrado, Buenos Aires, Argentina

Received 30 March 2007; received in revised form 3 December 2007; accepted 3 December 2007

Available online 7 February 2008

---

### Abstract

The essential oils extracted from *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*, and the hybrids *E. grandis* × *E. camaldulensis*, and *E. grandis* × *E. tereticornis* were analyzed by GC–MS, and evaluated for their fumigant and repellent effects on permethrin-resistant head lice. Fumigant activity of both hybrids was higher than that for pure species. *E. grandis* × *E. tereticornis* and *E. grandis* × *E. camaldulensis* showed  $KT_{50}$  values of 12.99 and 13.63 min, respectively. *E. grandis*, *E. camaldulensis*, and *E. tereticornis* showed  $KT_{50}$  values of 25.57, 35.01, and 31.31, respectively. A simple regression analysis revealed a significant correlation between  $KT_{50}$  data and % of 1,8-cineole in these essential oils. Repellency varied from  $47.80 \pm 16\%$  to  $80.69 \pm 6\%$  for the five *Eucalyptus* essential oils tested. Interspecific hybridization improves the pediculicidal activity of *Eucalyptus* essential oils.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Head lice; *Eucalyptus*; Interspecific hybridization; Repellents; Fumigants

---

### 1. Introduction

*Pediculus humanus capitis* De Geer, commonly known as the human head louse, is a cosmopolitan parasite found worldwide, both in developed and developing countries. Each year, an estimated 5 million people are newly infested with head lice and these parasites mostly affect children 6–12 years old (Gratz, 1997). Their presence is unpleasant and may cause itching, loss of sleep, and secondary skin infections due to scratching of irritated scalp (Gratz, 1997; Durden, 2005). For decades, control has been mainly based on the continued or repeated chemical application of insecticides such as DDT, lindane, malathion, carbaryl, permethrin and *d*-phenothrin. Repeated use of this insecti-

cide has led to development of resistance to one or more of these products in several countries, including Argentina (Picollo et al., 1998; Burgess, 2004). During the last two decades, pediculosis has increased worldwide as a result of product failures through resistance, improper application, formulation changes and misdiagnosis (Burgess, 2004; Kim et al., 2004).

Recently, there has been a great interest in the use of plant extracts as new control alternatives to synthetic insecticides. Essential oils (EOs) seem to be good candidates because many have lesser mammalian toxicity and lesser persistence in the environment than synthetic insecticides (Isman, 1999). Some of these natural products are effective against a wide variety of insects pest (Isman, 1999; Lee et al., 2003), including head lice (Mumcuoglu et al., 1996; Burgess, 2004; Priestley et al., 2006; Toloza et al., 2006a,b).

---

\* Corresponding author. Tel./fax: +54 11 4709 5334.  
 E-mail address: atoloza@citefa.gov.ar (A.C. Toloza).

The majority of essential oils are obtained by steam-distillation of plant tissues from either wild or cultivated plants, and consist of mixtures of hydrocarbons (terpenes, and sesquiterpenes) and oxygenated compounds (alcohols, esters, ethers, aldehydes, ketones, lactones, phenols and phenol ethers) (Guenther, 1972). These oils are often responsible for a plant's distinctive scent. An estimated 3000 essential oils are known, of which 300 are of commercial importance (FAO, 1995).

Among plants containing essential oils, are *Eucalyptus* species belonging to the Myrtaceae family. Several hundreds species of *Eucalyptus* contain volatile oils, though probably fewer than 20 of these have ever been exploited commercially for essential oil production. The oils are classified in the trade into three broad types according to their composition and main end-use: medicinal, perfumery and industrial (FAO, 1995).

Interspecific hybrids of *Eucalyptus* have been used in forestry for decades (Griffin et al., 1988). The main hybrid areas are planted on a large scale are in Brazil, Congo, China, Indonesia and South Africa. However, there are also small plantations in other countries in Asia (e.g. Philippines, Vietnam, Thailand and Malaysia) and South America (e.g. Argentina, Chile, Paraguay and Uruguay) (Dungey and Nikles, 2000). Apart from growth, the main traits which have been identified for improvement by hybridization include propagation, coppicing, frost, drought and salt resistance, wood density, resistance to pests and pulp yield (Potts and Dungey, 2004). On the other hand, *Eucalyptus* hybridization has been used as a technique to improve the quality and quantity of essential oils (Farah et al., 2002).

In Argentina, the importance of *Eucalyptus* species for reforestation and as a source of timber or pulp was recognized in the middle of the 1950s (Marcó and Harrand, 1999). In the last decade, the used of hybridization methods to intercross some species of *Eucalyptus* has received some attention. Only 2% of the *Eucalyptus* products obtained in Argentina were employed for medicinal purposes (FAO, 1995). This paper describes a laboratory study aimed at assessing the fumigant and repellent activity of essential oils of *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus tereticornis*, and the hybrids *E. grandis* × *E. camaldulensis* and *E. grandis* × *E. tereticornis* against permethrin-resistant head lice. In addition, yield and chemical composition analyses of the evaluated essential oils are reported.

## 2. Methodology

### 2.1. Plant materials

The species were purchased from a forest tree nursery, Paul Forestal SRL (INASE Register Number J/5 188), Argentina, with quality and origin certificates. They were planted in an experimental plot site in the Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA-CONICET)

(34°33'42"S, 58°30'39"W), located in Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina. After 18 months of growth (March 2006), fresh leaves of *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, and the hybrids *E. grandis* × *E. camaldulensis* and *E. grandis* × *E. tereticornis* were collected.

### 2.2. Extraction and essential oil yields

Fresh leaves of each *Eucalyptus* species were extracted for 70 min using the hydrodistillation method in a modified Clevenger-type apparatus, at a laboratory scale. Moisture in the oil was removed by anhydrous sodium sulfate (Merck, Buenos Aires, Argentina). The oils obtained were stored at 4 °C prior to bioassays. Essential oil yields were expressed as oil weight/100 g fresh plant material (% w/w).

### 2.3. Essential oil analysis

The chemical compositions of *Eucalyptus* essential oils were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry using a GCMS-QM 5050 A (Shimadzu, Japan) instrument. Gas chromatography conditions were as follows: injection of a 0.4 µl sample of an hexane solution of *Eucalyptus* essential oil (1 mg/ml); capillary column HP-1 (Crosslinked Methyl Silicone Gum) (50 m × 0.32 mm × 0.52 µm); helium as carrier gas (1.3 ml/min). Analytical conditions: injector and interface temperatures of 250 and 280 °C, respectively, split ratio of 13:1, initial isothermic temperature of 50 °C during 10 min, programmed temperature of 50 °C to 68 °C (1 °C/min), programmed temperature of 68 °C to 75 °C (0.5 °C/min), programmed temperature of 75 °C to 250 °C (20 °C/min), final isothermic temperature of 280 °C during 10 min, electron impact 70 eV.

Compounds identified in the samples were confirmed by comparing the GC retention times with standard compounds where possible, with comparison of mass spectra with available NIST or Wiley mass spectral libraries. Quantification of essential oil components (expressed in relative % on total area of chromatogram) was carried out by peak area normalization measurements.

### 2.4. Head lice

Head lice were collected from 530 infested children 6–12 years old, using a fine toothed antilouse comb. Lice were obtained from two elementary schools (Guardia de Honor and República de Turquía) located in different parts of Buenos Aires city. In a previous study, a topical application method had demonstrated high levels of resistance to permethrin in these two schools, with resistance ratios of 665.2 and 373.0, respectively (Vassena et al., 2003). Head lice were collected and transported to our laboratory as previously reported (Picollo et al., 1998; 2000). The protocol for louse collection was approved by the ad hoc committee of the Centro de Investigaciones de Plagas e

Table 1  
Yield of essential oil (w/w), expressed as means of four replicates and standard deviation

<i>Eucalyptus</i>	Yield (% w/w)	Standard deviation
<i>E. grandis</i> × <i>E. tereticornis</i>	0.89	0.02
<i>E. grandis</i>	0.36	0.02
<i>E. tereticornis</i>	0.60	0.03
<i>E. grandis</i> × <i>E. camaldulensis</i>	0.54	0.04
<i>E. camaldulensis</i>	0.39	0.01

Insecticidas (Research Center of Pests and Insecticides, Buenos Aires, Argentina), and archived in our laboratory.

### 2.5. Test for fumigant and repellent activity

The method of Toloza et al. (2006a,b) was employed to evaluate the fumigant and repellent activity of five *Eucalyptus* essential oils against head lice. Fumigant tests were conducted in an enclosed chamber that allowed a build up of vapor. A drop of 60 µl of pure essential oil was introduced to the chamber. Controls consisted of the same experimental

unit without addition of any substance. Batches of 15 adult lice were exposed to a test substance and knockdown was recorded every 5 min for 1 h. Knockdown consisted of the inability of the insects to walk on a filter paper. Three replicates were made for each tested oil. During each study, the assembled units were kept at  $28 \pm 1$  °C and  $60 \pm 5\%$  RH.

Repellency testing was conducted on a filter paper divided into an inner circular zone and an outer ring. The outer zone was impregnated with 0.5 ml of a test solution (50 mg/ml) dissolve in acetone, while the inner zone was impregnated with acetone only (control). In a preliminary test, both zones were treated with acetone only and it was found that  $86.6 \pm 6\%$  of released insects moved to the outer zone. Groups of 15–20 adult head lice were placed on the inner zone and repellency was evaluated as the % of lice that avoided the treated zone. The number of lice found in each zone was recorded every 5 min and each experiment was completed within 1 h. There were three replicates for each tested essential oil. A repellency index (RI) for each essential oil was calculated as the percentage of insects repelled from the treated zone,  $RI = [(N_c - N_t)/N_c] \times 100$ , where  $N_c$  was the average

Table 2  
Chemical composition of essential oils from five species of genus *Eucalyptus*, expressed as relative percentage on total area in the chromatogram

Plant species as source of essential oils	<i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> × <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> <sup>b</sup>	<i>E. grandis</i> × <i>E. camaldulensis</i>	<i>E. camaldulensis</i>
<i>Oil constituents</i> <sup>a</sup>					
α-Thujene	1.99	–	–	–	1.7
α-Pinene	1.35	22.8	52.71	30.65	<1
Camphene	–	–	–	<1	–
β-Pinene	–	3.29	–	1.1	–
Sabinene	1.26	–	–	–	1.05
Myrcene	1.54	–	–	–	1.21
α-Phellandrene	9.44	–	–	–	6.45
Linalool acetate	–	–	–	1.43	–
α-Terpinene	<1	–	–	–	<1
p-Cymene	14.51	1.92	9.7	2.77	17.93
β-Phellandrene	22.64	–	–	–	16.34
1,8-Cineole	18.59	63.04	18.38	49.65	19.13
γ-Terpinene	2.25	–	5	–	1.87
α-Terpinolene	–	–	–	–	<1
Linalool	<1	–	–	–	3.08
p-Menth-2-en-1-ol	<1	–	–	–	<1
Fenchol	–	<1	–	<1	–
Cryptone	4.14	–	–	–	5.71
α-Campholene aldehyde	–	<1	1.19	<1	–
Trans-pinocarveol	–	1.22	1.93	2.75	–
Borneol	–	1	2.95	1.42	–
Terpinen-4-ol	5.83	<1	1.04	<1	6.73
α-Terpineol	1.59	2.55	5.67	4.05	–
4-Isopropilbenzaldehyde	1.32	–	–	–	2.6
Phellandral	<1	–	–	–	1.45
γ-Elemene	<1	–	–	–	–
Spathulenol	6.83	<1	–	<1	7.32
Caryophyllene oxide	1.69	–	–	–	–
Globulol	–	<1	–	–	–
Unidentified compounds	2.01	1.56	1.43	2.66	2.96

<sup>a</sup> Main constituents of essential oils, determined by CG–MS. Unidentified compounds: less than 90% similarity index.

<sup>b</sup> Data from Lucia et al., 2007.

number of lice in the control zone, and  $N_t$  was the number of lice found in the treated zone.

## 2.6. Statistical analysis

Probit analysis was conducted on fumigant data to estimate knockdown of 50% of exposed individuals ( $KT_{50}$ ), using statistical software POLO-PC (LeOra Software, 1987). Values were considered to be significantly different if the 95% confidence limits (CL) did not overlap. The relationships between 50% knockdown time of the essential oils and their main components  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole were estimated by either simple or multiple linear regression analysis (Statistica 99, StatSoft, Tulsa, OK). Analysis of variance (ANOVA) was performed on repellency data, and means were separated using the least significant difference (LSD) test (Statistica 99, StatSoft, Tulsa, OK).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical constituents

The average essential oil yields based on fresh weight for each plant extracted are shown in Table 1. The hybrid *E. grandis*  $\times$  *E. tereticornis* showed the greatest yield (0.89%, w/w). The qualitative and quantitative chemical compositions of the essential oils are presented in Table 2. These results revealed that the principal constituents of *E. grandis* were  $\alpha$ -pinene (49.52%) and 1,8-cineole (15.72%). In contrast, the main constituents of *E. tereticornis* and *E. camaldulensis* were *p*-cymene (19.7%) and 1,8-cineole (20.49%); and *p*-cymene (25.77%), 1,8-cineole (23.95%), respectively. Oils of the hybrids mainly constituted of 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene (63.04% and 22.8% for *E. grandis*  $\times$  *E. tereticornis*, and 49.65% and 30.65% for *E. grandis*  $\times$  *E. camaldulensis*, respectively). Farah et al. (2002) reported a similar content of 1,8-cineole (47.69%), but a lower percentage of  $\alpha$ -pinene (14.11%) in an interspecific hybrid of *E. grandis*  $\times$  *E. camaldulensis*. Additionally, these authors showed that the interspecific hybridization of eucalyptus grown in Morocco produced essential oils with high content of 1,8-

cineole. However, in that study, the objective was not to improve the insecticidal activity of eucalyptus essential oils but rather its pharmaceutical quality.

### 3.2. Fumigant activity

In the present work, there were significant differences in vapor effects against head lice among the hybrids and species (Table 3). Fumigant activity of both hybrids was higher than that for pure species. The higher fumigant activity of hybrids could be based on higher 1,8-cineole concentrations as determined by GC–MS analysis. To test this hypothesis, a regression analysis was made. A simple regression analysis revealed a significant correlation between  $KT_{50}$  data and % of 1,8-cineole in the essential oils ( $KT_{50} = 33.515 \pm 4.87 - 0.2645 \pm 0.09\%$  1,8-cineole;  $r^2 = 0.68$ ;  $F = 8.56$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.05$ ) (Fig. 1a). Thus, the higher the concentration of 1,8-cineole, the more effective it was as a fumigant. In contrast,  $KT_{50}$  values were independent of  $\alpha$ -pinene concentration ( $KT_{50} = 23.258 \pm 7.54 + 0.10 \pm 0.15\%$   $\alpha$ -pinene;  $r^2 = 0.09$ ;  $F = 0.43$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.548$ ). When a multiple linear regression analysis was made, the resulting model was  $KT_{50} = 42.2 \pm 2.8 - 0.226 \pm 0.06$  (%  $\alpha$ -pinene)  $- 0.389 \pm 0.07$  (% 1,8-cineole);  $r^2 = 0.96$ ;  $F = 26.01$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0.05$ ), showing a significant and better relationship when both predictors were included (Fig. 1b).

Our results demonstrate the importance of 1,8-cineole to the fumigant activity of Eucalyptus essential oils. In a previous study, Toloza et al. (2006a,b) analyzed the fumigant activity of 21 monoterpenoids against head lice, and reported that the  $KT_{50}$  value of 1,8-cineole was 3.84-fold shorter than that of  $\alpha$ -pinene. Additionally, Lahlou et al. (2000) studied the activity of 15 terpenoids isolated from plants of Morocco against head lice, and found that 1,8-cineole was also two to three times more effective than  $\alpha$ -pinene. These results are also in accord with those of Papachristos et al. (2004) in the fumigant analysis of monoterpenoids against stored product insects.

Repellent activity of essential oils and synthetic components against body and head lice has previously been

Table 3  
Fumigant and repellent activity of *Eucalyptus* essential oils against head lice

Substance	Fumigant activity				Repellent action (RI $\pm$ SE)
	Slope $\pm$ SE	$KT_{50}$ min (CL)	$\chi^2$	df	
<i>E. camaldulensis</i>	7.98 $\pm$ 0.99	35.01 (32.15 – 37.76)	13.51	12	73.16 $\pm$ 11
<i>E. grandis</i>	11.17 $\pm$ 1.57	25.57 (23.97 – 27.24)	2.52	13	74.73 $\pm$ 9
<i>E. tereticornis</i>	14.63 $\pm$ 2.25	31.31 (29.47 – 33.09)	5.72	15	53.13 $\pm$ 11
<i>E. grandis</i> $\times$ <i>E. camaldulensis</i>	11.04 $\pm$ 1.80	13.63 (12.50 – 14.68)	1.73	7	80.69 $\pm$ 6
<i>E. grandis</i> $\times$ <i>E. tereticornis</i>	15.62 $\pm$ 3.46	12.99 (11.98 – 14.05)	2.18	7	47.80 $\pm$ 16
Piperonal <sup>a</sup>	N/S	N/S	N/S	N/S	72.26 $\pm$ 11.16
DDVP <sup>b</sup>	3.93 $\pm$ 0.68	40.15 (34.63 – 48.86)	7.27	N/S	N/S

N/S, not studied. Piperonal was only employed as the repellency positive control, while DDVP was only employed as the knockdown positive control.

<sup>a</sup> Positive control for repellent activity. Data from Toloza et al., 2006a,b.

<sup>b</sup> Positive control for fumigant activity. Data from Toloza et al., 2006a,b.

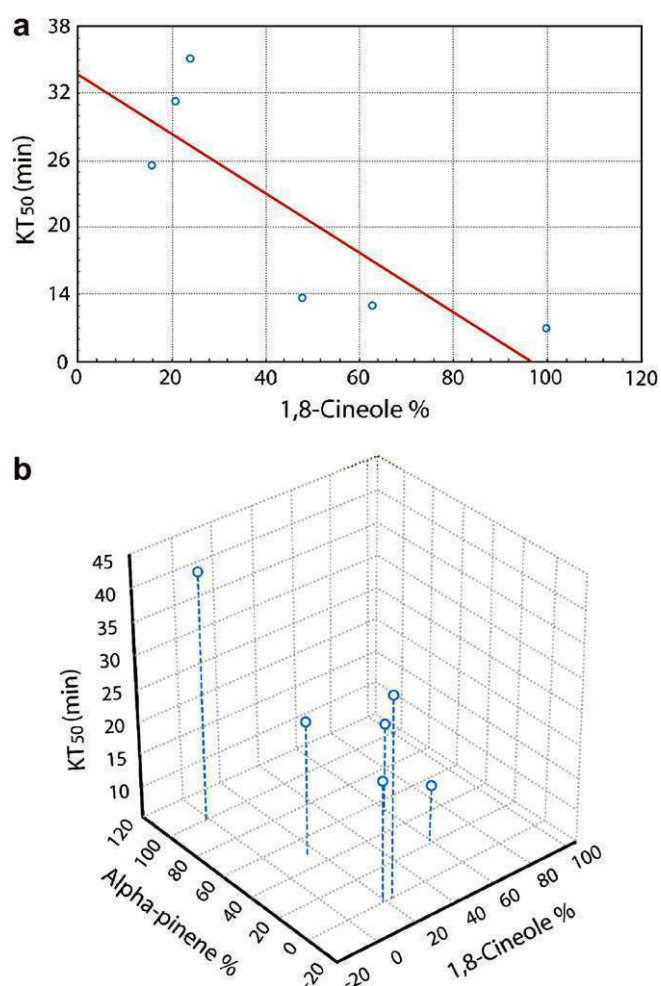


Fig. 1. Relationship between fumigant activity ( $KT_{50}$ ) from each essential oil and their corresponding concentration of the main constituents (1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene). (a) Simple regression of fumigant toxicity ( $KT_{50}$ ) and % of 1,8-cineole in tested oils. (b) Multiple linear regression among % of 1,8-cineole, % of  $\alpha$ -pinene and  $KT_{50}$  (min).

reported (Burgess, 1993; Mumcuoglu et al., 1996; Toloza et al., 2006a,b). The impetus for studying repellent alternatives is to deter lice from climbing onto a new host (Burgess, 2004). The problem of lice resistance to existing pediculicides makes the development of effective lice repellents more attractive (Mumcuoglu et al., 1996).

### 3.3. Repellent activity

For the five *Eucalyptus* essential oils tested, repellency varied from  $47.80 \pm 16\%$  to  $80.69 \pm 6\%$  of (Table 3). Although the oil from the hybrid *E. grandis*  $\times$  *E. camaldulensis* was the most repellent, it was not significantly different from the other tested oils ( $F = 1.71$ ;  $df = 4$ ;  $P < 0.283$ ). These results suggested that 1,8-cineole or  $\alpha$ -pinene concentration are not related to the repellent activity of *Eucalyptus* essential oils. The RI values of the *Eucalyptus* EOs obtained herein are in accord with the RI value obtained previously in our laboratory with different populations of head lice using a well known repellent commercial product

known as piperonal (1,3-benzodioxol-5-carboxaldehyde) (Toloza et al., 2006a,b).

It is appropriate to point out that subtle differences in oil composition can result in major differences in repellency. For instance, *E. grandis* and *E. camaldulensis* presented very different terpenoid compositions but comparable RI values. A similar pattern was previously found in a study on several insects, like the house fly, red flour beetle and Southern corn rootworm (Rice and Coats, 1994). In that report, when very subtle differences of monoterpene composition were found, similar RI values were obtained.

It is important to note that essential oil insecticidal activity is species dependent and that the chemical composition of the EO (i.e. monoterpenoids) can influence their insecticidal properties (Rice and Coats, 1994; Isman, 1999; Enan, 2001). Moreover, factors such as shape, degree of saturation and type of functional groups can influence the insecticidal activity of the whole oil. These can affect penetration into the insect cuticle, movement and interactions of the constituents inside the insect and their biodegradation. Thus, differences in effect at the site of action may account for the differential response found in the repellent and fumigant bioassays reported here. It has been suggested that contact repellents act upon specialized chemoreceptors which are not normally sensitive to vapors (Dethier, 1956). On one hand, vapors might enter through tracheae to haemolymph and then bind to some putative target site. These oils possess a neurotoxic mode of action and some mechanisms for this have been proposed. For example, some authors have proposed that these oils are competitive inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) as well as cholinesterase (Grundy and Still, 1985; Ryan and Byrne, 1988), while others suggest interference with the neuromodulator octopamine (Enan, 2001; Kostyukovsky et al., 2002) or with GABA-gated chloride channels (Priestley et al., 2003). On the other hand, human lice are so closely attached to their host that they do not require much in the way of host seeking senses. It seems that rather than attraction to favorable stimuli, the human louse reacts by kline-tactic or kline-kinetic avoidance of unfavorable zones. Thus, it is suggested that repellency in this ectoparasite could be due to anti-gustatory effects or chemical irritancy that deters insects from crawling into close contact with the repellent material (Busvine, 1971).

As discussed by Isman (2006), there are three main barriers to commercialization for botanical insecticides: sustainability of the botanical resource, standardization of chemically complex extracts, and regulatory approval. One, to produce a botanical insecticide on a commercial scale, the source plant biomass should be obtained on a commercial scale and preferably not on a seasonal basis. The *Eucalyptus* EOs obtained in the present study showed relative high yield values (i.e. allowing commercial scale) and were not affected by seasonal bias due to standardized cultivation and harvesting methods. Moreover, the seedlings of origin certificate guarantees a regular harvesting and chemically homogenous system. Two, for a botanical

insecticide to provide a reliable level of efficacy to the user, there must be some degree of chemical standardization, based on the putative active ingredient(s). The hybrids of this study showed less number of ingredients than pure species, allowing a better chemical identification and manipulation of the individual compounds. Three, regulatory approval remains the most formidable barrier to the commercialization of new botanical insecticides. Certain botanical insecticides could be exempt from regulatory scrutiny in some countries based on their presumed safety.

#### 4. Conclusions

Our study shows that *Eucalyptus* essential oils have pediculicidal and repellent potential for development as products for head lice control. Production of *Eucalyptus* essential oils is feasible owing to their low cost, availability and accessibility. Interspecific hybridization appears to be an interesting biotechnological tool to improve essential oils with more favorable properties for pest control. As some oil constituents applied to the human head may have a high rate of evaporation, essential oils or their components should be formulated to produce slow release of these. However, acute and chronic toxicological testing for safety should be conducted before a product is released into the market.

#### Acknowledgements

We thank the authorities of the elementary schools where head lice were collected. We are especially grateful to Mr. Bunse and Paul Forestal S.R.L. (Buenos Aires, Argentina). We thank two anonymous reviewers for their constructive criticisms that have help to improve the work. This investigation received financial support from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), Laboratorio Elea S.A.C.I.F. y. A. (Buenos Aires, Argentina), and Chemotécnica S.A. (Argentina).

#### References

- Burgess, I.F., 1993. The function of a repellent in head louse control. *Pharm. J.* 250, 692–693.
- Burgess, I.F., 2004. Human lice and their control. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 457–481.
- Busvine, J.R., 1971. A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. CAB, London, UK.
- Dethier, V.G., 1956. Repellents. *Annu. Rev. Entomol.* 1, 181–202.
- Dungey, H.S., Nikles, D.G., 2000. An international survey of interspecific hybrids in forestry. In: Dungey, H.S., Dieters, M.J., Nikles, D.G. (Eds.), *Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium, 9–14th April 2000 Noosa, Queensland, Australia, Department of Primary Industries, Brisbane*, pp. 419–425.
- Durden, L.A., 2005. Lice, the Phthiraptera. In: Marquardt, W. (Ed.), *Biology of Disease Vectors*, second ed. Elsevier, Oxford, UK.
- Enan, E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 325–337.
- FAO, 1995. *Flavours and Fragrances of Plant Origin*, Rome, Italy.
- Farah, A., Fechtal, M., Chaouch, A., 2002. Effet de l'hybridation interspécifique sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles d'eucalyptus cultivés au Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6, 163–169.
- Griffin, A.R., Burgess, I.P., Wolf, L., 1988. Patterns of natural and manipulated hybridization in the genus *Eucalyptus* L'Herit – a review. *Aust. J. Bot.* 36, 41–66.
- Gratz, N.G., 1997. Human lice. Their Prevalence, Control and Resistance to Insecticides – A Review 1985–1997, World Health Organization, Geneva, Switzerland, WHO/CTD/WHOPES/97.8.
- Grundy, D.L., Still, C.C., 1985. Inhibition of acetyl-cholinesterase by pulegone-1,2-epoxide. *Pest. Biochem. Physiol.* 23, 383–388.
- Guenther, E., 1972. *The Essential Oils*. Krieger Publishing Company, Florida, USA.
- Isman, M., 1999. Pesticides based on plant essential oils. *Pestic. Outlook* 10, 68–72.
- Isman, M., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45–66.
- Kim, H., Symington, S., Lee, S., Clark, J.M., 2004. Serial invasive signal amplification reaction for genotyping permethrin-resistant (*kdr*-like) human head lice, *Pediculus capitis*. *Pest. Biochem. Physiol.* 80, 173–182.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., Shaaya, E., 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manage. Sci.* 58, 1101–1106.
- Lahlou, M., Berrada, R., Agoumi, A., Hmamouchi, M., 2000. The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in Morocco. *Int. J. Aromather.* 10, 108–123.
- Lee, S., Peterson, C.J., Coats, J.R., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 39, 77–85.
- LeOra Software, 1987. *POLO-PC: A User's Guide to Probit or Logit Analysis*, LeOra software, Berkeley, CA.
- Lucia, A., Gonzalez Audino, P., Seccacini, E., Licastro, S., Zerba, E., Masuh, H., 2007. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 299–303.
- Marcó, M., Harrand, L., 1999. El mejoramiento genético forestal y su aporte al desarrollo del Sector Forestal Regional. *EEA, INTA Concordia. Información Forestal* 13, 55–61.
- Mumcuoglu, K., Galun, R., Bach, U., Miller, J., Magdassi, S., 1996. Repellency of essential oils and their components to the human body louse, *Pediculus humanus humanus*. *Entomol. Exp. Appl.* 78, 309–314.
- Papachristos, D., Karamanoli, K., Stamopoulos, D., Menkissoglu-Spirodi, U., 2004. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Manage. Sci.* 60, 514–520.
- Piccolo, M.I., Vassena, C.V., Casadio, A.A., Massimo, J., Zerba, E.N., 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 35, 814–817.
- Piccolo, M.I., Vassena, C.V., Mougabure Cueto, G.A., Vernetti, M., Zerba, E.N., 2000. Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. *J. Med. Entomol.* 37, 721–725.
- Potts, B.M., Dungey, H.S., 2004. Interspecific hybridization on *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. *New Forest* 27, 115–138.
- Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A., 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA<sub>A</sub> receptors and a home-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Brit. J. Pharmacol.* 140, 1363–1372.
- Priestley, C.M., Burgess, I., Williamson, E.M., 2006. Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia* 77, 303–306.
- Rice, P.J., Coats, J.R., 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 1172–1179.

- Ryan, M.E., Byrne, O., 1988. Plant insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J. Chem. Ecol.* 14, 1965–1975.
- Statistica '99 Edition. StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA.
- Toloza, A.C., Zygadlo, J., Mougabure Cueto, G., Biurrún, F., Zerba, E., Picollo, M.I., 2006a. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 43, 889–895.
- Toloza, A.C., Zygadlo, J., Mougabure Cueto, G., Zerba, E., Faillaci, S., Picollo, M.I., 2006b. The fumigant and repellent activity of aliphatic lactones against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 55–56.
- Vassena, C.V., Mougabure Cueto, G., González Audino, P., Alzogaray, R.A., Zerba, E.N., Picollo, M.I., 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J. Med. Entomol.* 40, 447–450.



# Epidemiology of *Pediculus capitis* in elementary schools of Buenos Aires, Argentina

Ariel Toloza · Claudia Vassena · Anabella Gallardo · Paola González-Audino · María Inés Picollo

Received: 12 December 2008 / Accepted: 17 December 2008 / Published online: 16 January 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** The infestation with the human obligate ectoparasite *Pediculus humanus capitis* De Geer is a common public health problem affecting mainly schoolchildren worldwide. The aim of the present study was to investigate the infestation levels of head lice in elementary schools from Buenos Aires with resistant levels to permethrin >100. A total of 1,856 children aged 3–13 years old from eight selected elementary schools were examined for head lice. Pediculosis was observed in all the studied schools. The overall infestation rate was 29.7%. Girls were statistically significant more infested than boys, with infestation rate values of 36.1% and 26.7%, respectively ( $P < 0.0001$ ). Only 42 of the infested girls (12%) and 23 of the infested boys (11.4%) had >10 lice on their hair. The proportions of infested children—both girls and boys—in each age group were not found to differ significantly from one another. The infestation rate among schools varied from 19.12% to 42.74%. This indicated that pediculosis is relatively common in elementary schools from Buenos Aires, and those levels are of epidemic importance. The differences of pediculosis among the studied schools could be explained by the different control strategies applied by parents or advisors to eradicate head lice.

## Introduction

The infestation with the human obligate ectoparasite *Pediculus humanus capitis* De Geer is a common public health problem, which affect million of children worldwide (Gratz 1997). There are more cases of head louse infestation among elementary-school-age children than there are of all other communicable diseases combined, except for the common cold (Hensel 2000). Although some children with louse infestation are asymptomatic, the most common symptom is pruritus, which occurs due to sensitization to both louse salivary and fecal antigens and may be so intense that excoriations and secondary bacterial infection may occur (Malcolm and Bergman 2007). Transmission of head lice occurs through direct physical contact, especially head-to-head contact and via inanimate objects, also known as fomites (Takano-Lee et al. 2005). During the 1990s, pediculosis has increased worldwide as a result of product failures through resistance, improper application, formulation changes, and misdiagnosis (Burgess 2004; Kim et al. 2004). The rate of head louse infestation varies greatly from place to place throughout the world, and the most affected group consisted of children 3–14 years of age (Gratz 1997).

In Argentina, resistance to permethrin was first reported by Picollo et al. (1998), and further complementary studies were done (Picollo et al. 2000; Vassena et al. (2003); González Audino et al. 2005; Mougabure Cueto et al. 2008).

Even though the epidemiological studies reported were in different cities of Argentina (Castro et al. 1994; Chouela et al. 1997; Doucet et al. 1997), these works were done more than 10 years ago before pyrethroid resistance was found in head louse populations. Thus, the aim of the present study was to investigate the infestation levels of

A. Toloza (✉) · C. Vassena · A. Gallardo · P. González-Audino · M. I. Picollo  
Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEFA/CONICET),  
Juan Bautista de La Salle 4397,  
ALO1603 Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina  
e-mail: atoloza@citefa.gov.ar

head lice in elementary schools from Buenos Aires with high resistant levels to permethrin.

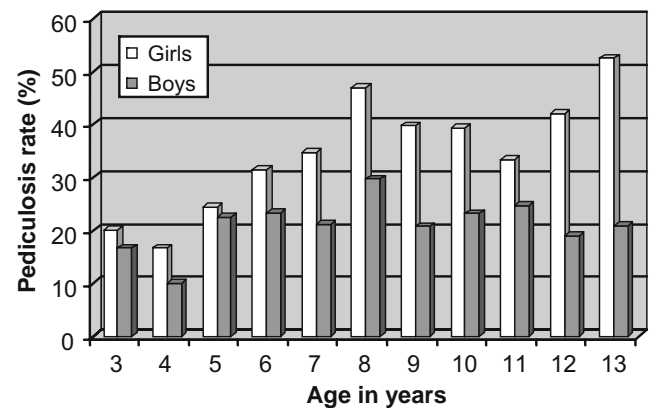
## Materials and methods

### Head lice

A total of 1,856 children aged 3–13 years old from eight selected elementary schools in Buenos Aires were examined for head lice during the period March to April 2006. Selected schools were those that had demonstrated high levels of permethrin resistance in previous studies of our laboratory (Picollo et al. 1998; Vassena et al. 2003). For the study at the schools, permission to perform the study was obtained from the educational authority of the Government of Buenos Aires City. In average, four to five consecutive visits were necessary to examine all the age groups in every school. All the studied schools were Argentinean Government owned and non-fee-paying. Only pupils whose parents had given informed consent for participation were examined. The freedom to refuse to participate in the research was clearly and amply established in each case. The entire head was examined carefully although special attention was paid to the nape of the head and behind the ears. The scalp was examined for a period of 5 min. Pediculosis was defined as the presence of at least one living adult, nymph and viable nit. Head lice were removed using a fine toothed antilouse metal comb. A form was filled for each examined pupil with the age and hair characteristics. Head lice were collected and transported to our laboratory as previously reported by Picollo et al. (1998). The protocol for lice collection was approved by the ad hoc committee of the Centro de Investigaciones en Plagas e Insecticidas (Research Center of Pests and Insecticides, Buenos Aires, Argentina) and archived in our laboratory.

### Statistical analysis

The data were compared using cross-tabulation with the chi-square test to study the bivariate relationships between the dependent variable (prevalence of lice) and independent variables. Statistical significance was considered at a



**Fig. 1** Prevalence of head lice infestation in different age groups

$P < 0.05$ . The average percentage of the eight schools was used for all calculations.

## Results

Pediculosis was observed in all the studied schools. The overall infestation rate was 29.7%. Girls were significantly more infested than boys, with infestation rate values of 36.1 and 26.7, respectively ( $P < 0.0001$ ; Table 1). More than 98% of the children had the permission of their parents. Concerning hair characteristics, most of the studied girls possessed long hair ( $n = 960$ ), and the boys had short hair ( $n = 885$ ). Thus, it was not possible to analyze infestation in relation to hair length. Only 42 of the infested girls (12%) and 23 of the infested boys (11.4%) had  $>10$  lice on their hair. However, no significant differences were found ( $\chi^2 = 0.04$ ;  $P = 0.85$ ). Concerning the total of children examined, the girls and boys infested with  $>10$  lice on their hair represented 4.3% and 2.6% of the infested pupils, respectively. In this case, significant differences were found ( $\chi^2 = 4.12$ ;  $P = 0.04$ ).

The prevalence of infestation in either girls or boys varied by age from 16.7% in age 4 to 52.6% in age 13; and from 10% in age 4 to 29.8% in age 8, respectively (Fig. 1). However, the proportions of infested children—both girls and boys—in each age group were not found to differ significantly from one another (Tables 2 and 3). The infestation rate among schools varied from 19.12% to 42.74% (Table 4).

**Table 1** Prevalence of head louse infestation among different sexes

Gender	No. children examined	No. children with lice	% with lice	$\chi^2$	$P$ value
Girls	970	350	36.08	–	–
Boys	886	201	22.67	–	–
Total	1,856	551	29.69	39.81	0.0001

**Table 2** Severity of pediculosis among girls

Age	No. children examined	No. children with lice	% with lice
3	25	5	20.0
4	54	9	16.67
5	45	11	24.44
6	146	46	31.51
7	112	39	34.82
8	151	71	47.02
9	108	43	39.81
10	127	50	39.37
11	126	42	33.33
12	57	24	42.10
13	19	10	52.63
$\chi^2$			18.10
<i>P</i> value			0.053

## Discussion

The 29.7% infestation rate found in the present work shows the problem of head lice in schools from Buenos Aires. This value is higher than 5%, the infestation value when *P. h. capitis* is considered of epidemic importance (Clore 1988). In addition, all the examined schools possessed infestation values above it. This indicated that pediculosis is relatively common in elementary schools from Buenos Aires. This value is similar to those reported by different authors previously to the detection of pyrethroid resistance in head lice from Buenos Aires. For example, Castro et al. (1994) reported that pediculosis in Buenos Aires Province ranged from 12% to 56.8% with an annual mean of 38.04%. Moreover, Perotti et al. (2004) found that the 29.8% of examined pupil in La Rioja Province exhibited at least one living head louse. Upper infestation rates were

**Table 3** Severity of pediculosis among boys

Age	No. children examined	No. children with lice	% with lice
3	18	3	16.67
4	40	4	10
5	31	7	22.58
6	124	29	23.39
7	99	21	21.21
8	141	42	29.79
9	130	27	20.77
10	95	22	23.16
11	105	26	24.77
12	79	15	18.99
13	24	5	20.81
$\chi^2$			7.31
<i>P</i> value			0.695

**Table 4** Head lice infestation by school

School	No. children examined	No. children with lice	% with lice
1	165	39	23.64
2	387	74	19.12
3	183	64	34.97
4	578	178	30.79
5	80	25	31.25
6	94	31	32.98
7	245	87	35.51
8	124	53	42.74

reported by Doucet et al. (1997) in primary schools of Córdoba Province with an average infestation of 45.32%.

Our study showed that girls were more infected with head lice than boys. This is in accordance with the 37.82% and 53.07% infestation levels found in boys and girls in 1993 in Argentina by Doucet et al. (1997). This tendency has also been reported by many authors in different countries like the UK, Australia, South Africa, Turkey, and Brazil (Downs et al. 1999; Speare and Buettner 1999; Govere et al. 2003; Kokturk et al. 2003; Heukelbach et al. 2005). These findings could be explained by the fact that girls tend to spend more time playing in close contact with each other than boys. This gender-related behavioral difference is of considerable importance since head-to-head contact is an important route of transmission as well as the passive transference like combing, air movements, and towelings (Takano-Lee et al. 2005).

These indicate that pediculosis in Argentina is a serious sanitary problem affecting mostly school children. There are innumerable studies on the prevalence of head lice in school-aged children worldwide. For example, in Israel, Australia, South Africa, Poland, Brazil, the UK, and Gaza, 0.48–43.4% of children were found to be infested (Rosenfeld et al. 1993; Speare and Buettner 1999; Govere et al. 2003; Buczek et al. 2004; Heukelbach et al. 2005; Thomas et al. 2006; Al-Shawa 2006). The addition of data set collected in schools or entire populations into mathematical epidemic models, as proposed by Stone et al. (2008), would bring new insights in order to predict and understand the infestation dynamic of head lice.

In Argentina, although the actual tendency in every non-fee-paying school is not to exclude the children having nits or adults, a writing note is sent to the parents or advisors indicating that the children has lice and that a treatment is required. The differences of pediculosis among the studied schools could be explained by the different control strategies applied by parents or advisors to eradicate head lice. In Argentina, there are two basic treatment options for head louse: wet combing and topical insecticide formula-

tions. The most common insecticides applied against head lice contain as active ingredient permethrin, D-phenothrin, cyclic silicones, botanical extracts, benzyl alcohol, vinegar, or essential oils. Moreover, the only prescript pediculicide available contains lindane. Unfortunately, most of the OTC products available in Argentina have not been tested against head lice in in vitro assays. Finally, the lack of guidelines for the detection and management of head lice in elementary schools from Buenos Aires, as well as the insecticide problem, has probably led to high infestation levels such as the reported in this work.

**Acknowledgements** The authors wish to thank to all the authorities of the elementary schools where head lice material was collected. We thank Dr. Gastón Mougabure Cueto for their valuable cooperation. This investigation received financial support from Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina), and Laboratorio Elea S.A.C.I.F y A. (Argentina). The experiments in this work comply with the current laws of Argentina.

## References

- Al-Shawa R (2006) Head louse infestations in Gaza governorates. *J Med Entomol* 43:505–507
- Buczek A, Markowska-Gosik D, Widomska D, Kawa I (2004) Pediculosis capitis among schoolchildren in urban and rural areas of eastern Poland. *Eur J Epidemiol* 19:491–495
- Burgess IF (2004) Human lice and their control. *Annu Rev Entomol* 49:457–481
- Castro DC, Abrahamovich A, Cicchino A, Rigoni A, Rafaelli C, Barrio A (1994) Prevalencia y estacionalidad de la Pediculosis capitis en la población infante-juvenil de la región sanitaria, Buenos Aires, Argentina. *Rev Saude Pública* 28:295–299
- Chouela E, Abeldaño A, Cirigliano M, Ducard M, Neglia V, Forgia M, Colombo A (1997) Head louse infestations: epidemiologic survey and treatment evaluation in Argentinian schoolchildren. *Int J Dermatol* 36:819–825
- Clare ER (1988) Nursing management of pediculosis. *Pediatr Nur* 3:4
- Doucet M, Miranda M, Arce MA (1997) Prevalences of *Pediculus humanus capitis* and *Sarcoptes scabiei* in primary schools of Córdoba, Argentina. Analysis in relation to sex, age and socio-economic conditions. *Res rev Parasitol* 57:67–69
- Downs MR, Harvey I, Kennedy CT (1999) The epidemiology of head lice and scabies in the UK. *Epidemiol Infect* 122:471–477
- González-Audino P, Barios S, Vassena C, Mougabure Cueto G, Zerba E, Picollo MI (2005) Increased monooxygenase activity associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J Med Entomol* 42:342–345
- Govere JM, Speare R, Durrheim DN (2003) The prevalence of pediculosis in rural South African schoolchildren. *S Afr J Sci* 99:21–23
- Gratz NG (1997) Human lice. Their prevalence, control and resistance to insecticides—a review 1985–1997. WHO/CTD/WHOPES/ 97.8
- Hensel RN (2000) The challenge of choosing a pediculicide. *Public Health Nurs* 17:300–304
- Heukelbach J, Wilcke T, Winter B, Feldmeier H (2005) Epidemiology and morbidity of scabies and pediculosis capitis in resource-poor communities in Brazil. *Brit J Dermatol* 153:150–156
- Kim H, Symington S, Lee S, Clark JM (2004) Serial invasive signal amplification reaction for genotyping permethrin-resistant (kdr-like) human head lice, *Pediculus capitis*. *Pest Biochem Physiol* 80:173–182
- Kokturk A, Baz K, Bugdayci R, Sasmaz T, Tursten U, Kaya T, Ikizoglu G (2003) The prevalence of pediculosis capitis in schoolchildren in Mersin, Turkey. *Int J Dermatol* 42:694–698
- Malcolm CE, Bergman JN (2007) Trying to keep ahead of lice: a therapeutic challenge. *Skin Ther letter* 11:1–6
- Mougabure Cueto G, Zerba E, Picollo MI (2008) Evidence of pyrethroid resistance in eggs of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) from Argentina. *J Med Entomol* 45:693–697
- Perotti A, Catalá S, Ormeño A, Zelazowska M, Bilinski S, Braig H (2004) The sex ratio distortion in the human head louse is conserved over time. *BMC genetics* 5:1–13
- Picollo MI, Vassena C, Casadio A, Massimo J, Zerba E (1998) Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol* 35:814–817
- Picollo MI, Vassena C, Mougabure Cueto G, Vernetti M, Zerba E (2000) Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. *J Med Entomol* 37:721–725
- Rosenfeld J, Manor O, Mumcuoglu K (1993) Relationship of sociodemographic variables and head lice infestation among elementary school children in Bet Shemesh. *Isr J Zool* 39:177–183
- Speare R, Buettner P (1999) Head lice in pupils of a primary school in Australia and implications for control. *Int J Dermatol* 38:285–290
- Stone P, Wilkinson-Herbots H, Isham V (2008) A stochastic model for head lice infections. *J Math Biol* 56:743–763
- Takano-Lee M, Edman J, Mullens B, Clark M (2005) Transmission potential of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Int J Dermatol* 44:811–816
- Thomas D, McCarroll L, Roberts R, Karunaratne P, Roberts C, Casey D, Morgan S, Touhig K, Morgan J, Collins F, Hemingway J (2006) Surveillance of insecticide resistance in head lice using biochemical and molecular methods. *Arch Dis Child* 91:777–778
- Vassena CV, Mougabure Cueto G, González Audino P, Alzogaray R, Zerba E, Picollo MI (2003) Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J Med Entomol* 40:447–450