



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía
Programa de Doctorado en Ciencias de la Agronomía

**SUSCEPTIBILIDAD DE LA MOSCA DOMESTICA A
INSECTICIDAS SINTÉTICOS, BIOINSECTICIDAS
COMERCIALES,
ACEITES ESENCIALES NATURALES Y FORMULADO
COMO NANOEMULSIÓN**

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias de la Agronomía

GABRIELA ANTONIETA OYARCE MELÉNDEZ
CHILLÁN-CHILE
2025

Profesor Guía: Gonzalo Silva Aguayo
Dpto. de Producción Vegetal
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Producción Vegetal de la Facultad Ciencias Agronómicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Gonzalo Silva Aguayo
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. José Becerra Violido
Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel
Posgrado en Fitosanidad-Entomología y
Acarología
Colegio de Postgraduados

Dr. Álvaro Romero
Envu-USA Western Technical Services
Manager

Director de Programa:

Dr. Susana Fischer Ganzoni
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo sólo pudo llevarse a término gracias a la colaboración de todos los integrantes del Laboratorio de Entomología y Acarología Agropecuaria. El Dr. Gonzalo Silva que me acogió en su laboratorio y me presentó el fascinante mundo de los insectos, con quién compartí inquietudes y discusiones. Al Dr. J. Concepción, por sus revisiones rápidas y oportunas y sus comentarios en la escritura de la tesis y los artículos científicos enviados. Queda pendiente la visita a la Universidad de Chapingo. A Patricia Loyola, la experta en crianza de insectos, con su eterna paciencia para guiarme y acompañarme en esas tardes de bioensayos que parecían interminables. A Alejandra Villar, diplomática, quien me ayudó con varias de las gestiones para conseguir materiales y el preciado oro verde (también conocido como aceite esencial de paico) y me enseñó la importante labor del agrónomo en el campo. También a todos los tesisistas de pregrado y magíster que pasaron por el laboratorio, con quienes compartí mis conocimientos e inquietudes y también de los que aprendí. Mención especial a Natalia Fernández, quién diseñó varias de las figuras que agregué en este escrito.

Una de las cosas más valiosas que aprendí en este camino es que la ciencia no se hace encerrado en un laboratorio y es necesario salir a buscar conocimiento en otros lugares. Estoy eternamente agradecida con el equipo del Laboratorio de Nutrición de la Universidad San Sebastián, a cargo del Dr. Gustavo Cabrera y el Dr. Sergio Benavides, con quienes empezamos el camino de las nanoemulsiones, del que sólo tenía de referencia un puñado de papers y unos experimentos previos hechos durante la pandemia. Agradezco enormemente a Yeni Paredes quien estuvo conmigo en todo el proceso de preparación de las nanoemulsiones. Por su gran paciencia y su capacidad de buscarle explicación a cada detalle mínimo que ocurría mientras trabajábamos. No tengo duda alguna que será una gran doctora y espero algún día podamos volver a trabajar juntas.

Al Dr. Héctor Aguilar, que me ayudó con la última parte de mi tesis, cuando ya sentía que no tenía las fuerzas para terminar, agradezco su disposición y paciencia. Al Dr. José Becerra y a todo el equipo de Fitoquímica por ayudarme a dar mis primeros pasos en el camino de la investigación, y también por escuchar mis problemas, siempre buscando alguna solución. Quiero agregar también al Dr. Mario Silva, de quién siempre admiré su eterna vocación y pasión por las ciencias, la que perduró hasta sus últimos días. Sólo lamento no haber egresado antes para ir a su oficina, compartir un café de Gastón y recitarle un poema de Gabriela Mistral.

Y último, pero no menos importante, a todos mis seres queridos que me acompañaron durante este proceso, lamento mucho en algunos casos haberlos dejado de lado, pero sin duda fueron un pilar fundamental para terminar este proceso. Mis papás, mis hermanos, mis amigos y en especial a Felipe, por ser mi compañero de vida y estar conmigo en los momentos más difíciles.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Referencias	16
CAPÍTULO I.- Toxicity of synthetic and natural insecticides on the housefly, <i>Musca domestica</i> L., from dairy barns	22
Resumen	22
Abstract	23
Introduction	24
Materials and Methods	27
Results and Discussions	32
Acknowledgment	40
References Cited	40

CAPÍTULO II.- Adulticidal and repellent activity of essential oils from 3 cultivated aromatic plants against <i>M. domestica</i>	46
Resumen	46
Abstract	47
Introduction	48
Materials and Methods	50
Results	56
Discussion	61
Conclusions	65
References	66
CAPÍTULO III.- Nanoemulsión del aceite esencial de <i>Dysphania ambrosioides</i> para el control de <i>Musca domestica</i> L. (Diptera: Muscidae)	71
Resumen	71
Abstract	72
Introducción	73
Materiales y Métodos	77
Resultados y Discusión	83
Conclusiones	96
Referencias	97
CONCLUSIONES GENERALES	106

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO I.

Table 1	Insecticides against <i>Musca domestica</i> assessed under laboratory conditions.	29
Table 2	Lethal concentration 50% (LC ₅₀), slope (b), and Toxicity Ratio 50% (TR ₅₀) of synthetic and natural commercial insecticides against the larvae and pupae of <i>Musca domestica</i> .	33
Table 3	Percentage (%) of pupation and emergence of <i>Musca domestica</i> adults from larvae treated with cypermethrin, pirimiphos-methyl, D-limonene, azadirachtin and pyrethrins + PBO.	34
Table 4	Adult emergence of <i>M. domestica</i> from the pupae treated with pirimiphos-methyl, D-limonene, and pyrethrins+PBO.	37
Table 5	Lethal concentration 50% (LC ₅₀), slope (b), and Toxicity Ratio 50% (TR ₅₀) of synthetic and natural commercial insecticides against adults of <i>M. domestica</i> .	39

CAPÍTULO II.

Figure 1	Outline the components of the fumigant test device, showing the sample test tube lid (A), the tulle mesh (B), the Eppendorf tube (C), and the filter paper (D).	53
Figure 2	Scheme of the repellency test where the cage (A), the control and treatment Büchner flasks inside (B), the probe (C) that connects them to the flow meter (D), flask with distilled water (E), flask with activated carbon (F) and the fish tank pump (G).	54
Figure 3	Chemical composition of eucalyptus, fennel, and sage essential oils. a) A stacked plot bar shows each tested EO's relative abundance of components. "Others" represents the sum of 35 compounds with an overall abundance lower than 5%. b) Circular plot shows the percent of compounds, and their chemical classes identified in all the EOs studied (MH: Monoterpene hydrocarbon, MO: Monoterpene oxygenated, SH: Sesquiterpene hydrocarbon, SO: Sesquiterpene oxygenated, OC: other compounds).	56
Table 6	Chemical composition, relative abundance and classification of the components from evaluated essential oils.	58
Figure 4	(A) Fumigant and (B) contact toxicity of the EOs of eucalyptus, fennel, and sage against <i>M. domestica</i> adults.	59

Table 7	Fumigant toxicity lethal concentrations of 50% (LC ₅₀) and 90% (LC ₉₀) of the evaluated essential oils against <i>M. domestica</i> adults.	59
Table 8	Contact toxicity lethal concentration 50% and 90% of the evaluated essential oils against <i>M. domestica</i> adults	60
Figure 5	Repellence of <i>M. domestica</i> by eucalyptus, fennel, and sage EOs. “****” indicates significant differences in percent repellency between concentrations as determined by a one-way ANOVA test with a p-value (<0.005).	60
CAPÍTULO III.		
Tabla 9	Composición de los formulados según el contenido de aceite esencial de <i>D. ambrosioides</i> (DAEO), tween 80, relación tensiactivo/aceite (RTA) y maltodextrina.	78
Figura 6	Apariencia de los formulados A y B (de izquierda a derecha), sin diluir (A), diluidos 50 veces (B) y 100 veces (C), 24 horas posterior a su formulación.	84
Tabla 10	Tamaño promedio de gotas (MDS) e índice de polidispersión (PDI) de las formulaciones de aceite esencial de <i>D. ambrosioides</i> , luego de 24 horas de su formulación.	85
Figura 7	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las formulaciones A con aumento de 2 µm (D) y 0,5 µm (E) y del formulado B a 2 µm (F) y 0.5 µm (G).	85
Figura 8	Tamaño promedio de gotas (MDS) e Índice de polidispersión (PDI) de los formulados de <i>D. ambrosioides</i> almacenados durante 14 días a temperatura ambiente (H) y a 4° C (I).	87
Tabla 11	Composición química y porcentaje de abundancia relativa del aceite esencial de <i>D. Ambrosioides</i> y los formulados A y B.	92
Figura 9	Toxicidad fumigante del aceite esencial de <i>D. ambrosioides</i> (DAEO) puro y los formulados A y B contra adultos de <i>M. domestica</i> a las 24 (J) y 48 horas (K).	93
Tabla 12	Mortalidad por efecto fumigante y concentración letal 50% (CL ₅₀) del aceite esencial de <i>D. ambrosioides</i> puro y sus formulados contra adultos de <i>M. domestica</i> a las 24 y 48 horas.	94

RESUMEN

La mosca común (*Musca domestica* L., Diptera: Muscidae) es una plaga de relevancia agropecuaria y urbana, debido a su capacidad de transmitir enfermedades, reducir la calidad de productos agrícolas y causar molestias en humanos y animales. El principal método de control de infestaciones es el uso de insecticidas sintéticos. Sin embargo, el uso intensivo ha incrementado el desarrollo de resistencia en las poblaciones de moscas, haciéndolos menos efectivos y planteando riesgos para la salud humana y el ambiente. Una alternativa ampliamente estudiada son los aceites esenciales, destacando por su capacidad insecticida y repelente, que se manifiesta a través de diversos mecanismos de acción.

Por ello, esta investigación tuvo como objetivo evaluar comparativamente la susceptibilidad de larvas, pupas y adultos de *M. domestica* a insecticidas sintéticos, bioinsecticidas comerciales, aceites esenciales y nanoemulsiones del aceite esencial de *D. ambrosioides* en condiciones de laboratorio. En general, los resultados mostraron que *M. domestica* presentó distintos niveles de susceptibilidad, siendo larvas y pupas menos afectadas que los adultos. El insecticida formulado con piretrinas + PBO produjo la mayor mortalidad en todos los estadios evaluados. Los aceites esenciales de eucalipto (*E. globulus*), salvia (*S. officinalis*) e hinojo (*F. vulgare*) demostraron actividad insecticida, eliminando al 100% de los adultos tratados en concentraciones entre 35 y 150 $\mu\text{L L}^{-1}$, y un efecto repelente cercano al 90% en concentraciones menores de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$. El aceite esencial de paico (*D. ambrosioides*) mostró una mortalidad fumigante de 100% en concentraciones inferiores a 5 $\mu\text{L L}^{-1}$, efecto que también se observó en su formulación. Estos resultados sugieren que las moscas han desarrollado tolerancia a los insecticidas comerciales más utilizados para su control, siendo el uso de aceites esenciales y sus derivados una alternativa viable al uso de insecticidas convencionales, viéndose mejorada su actividad insecticida mediante su formulación como nanoemulsión.

SUMMARY

The common housefly (*Musca domestica* L., Diptera: Muscidae) is an important agricultural and urban pest due to its ability to transmit diseases, reduce the quality of agricultural products and cause nuisance to animals and humans. The primary method of controlling infestations is the use of synthetic insecticides, but their intensive use has increased the development of resistance in fly populations, making them less effective and posing risks to human health and the environment. A widely studied alternative is essential oils, which are notable for their insecticidal and insectistatic properties, which are manifested through various mechanisms of action.

Therefore, this research aimed to comparatively evaluate the susceptibility of larvae, pupae, and adults of *M. domestica* to synthetic insecticides, commercial bioinsecticides, essential oils and nanoemulsions of *D. ambrosioides* essential oil under laboratory conditions. The results showed that *M. domestica* exhibited varying levels of susceptibility, with larvae and pupae being less affected than adults. The pyrethrin + PBO-based insecticide produced the highest mortality rate across all life stages. Eucalyptus (*E. globulus*), sage (*S. officinalis*) and fennel (*F. vulgare*) essential oils demonstrated insecticidal activity, killing 100% of treated adults at concentrations between 35 and 150 $\mu\text{L L}^{-1}$, and a repellent effect close to 90% at concentrations below 20 $\mu\text{L L}^{-1}$. Paico (*D. ambrosioides*) essential oil was particularly effective, achieving 100% fumigant mortality at concentrations below 5 $\mu\text{L L}^{-1}$, an effect also observed in its formulations.

These results suggest that flies have developed tolerance to the most used commercial insecticides for their control, making essential oils and their derivatives a viable alternative, with their insecticidal activity enhanced by formulation as a nanoemulsion.

INTRODUCCIÓN

La mosca común, *Musca domestica* L. (Díptera: Muscidae), es un insecto del orden Díptera, que se caracterizan por tener dos alas membranosas y desarrolladas, y dos estructuras nudosas denominadas halterios, que les permiten maniobrar mientras vuela (Masciocchi et al., 2016; Robinson, 2020). Esta especie presenta una distribución cosmopolita y dada su gran capacidad para adaptarse a todo tipo de entornos, puede encontrarse en zonas urbanas, vinculada a hogares y restaurantes, zonas periurbanas próximas a basurales y heces de animales domésticos y agrícolas, donde se alimenta y crece en desechos orgánicos del ganado y planteles avícolas (Bautista, 2016).

Este insecto experimenta una metamorfosis completa, que incluye las etapas de huevo, larva, pupa y adulto. El ciclo de vida de esta especie es notablemente rápido, pudiendo completarse en 10 a 14 días en condiciones de temperatura óptima (25°C), que equivalen a 30 generaciones por año en regiones tropicales y menos de 10 en zonas templadas (Bautista, 2016; Robinson, 2020).

Los huevos, de color blanco y aproximadamente 1,5 mm de largo, son depositados en racimos y requieren de un ambiente húmedo para eclosionar. La duración de este proceso puede variar, entre 8 horas a 40°C o extenderse hasta 40 horas a 15°C (Masciocchi, 2016).

Las larvas, de color blanco cremoso y ápodas, cuentan con un aparato bucal masticador que les permite alimentarse de levaduras, bacterias y materia orgánica en descomposición. Pasan por tres instares larvales, similares en apariencia, pero progresivamente más grandes (de 3 a 15 mm de longitud). Al finalizar su desarrollo en el tercer estadio, la larva deja de alimentarse, contrae su cuerpo y forma el pupario. Este, inicialmente de color café, se oscurece con el tiempo, y entre 3 a 10 días después, emerge el adulto. Tras la emergencia, los individuos buscan un lugar seguro para expandir sus alas y endurecer su exoesqueleto (Bautista, 2016; Robinson, 2020).

El adulto mide entre 5 y 12 mm y su cuerpo está recubierto por abundantes pilosidades (setas). El tórax en su área dorsal presenta cuatro franjas longitudinales negras y la región ventral del abdomen es amarillo. Además, los adultos tienen un par de ojos compuestos rojos, tres ocelos simples y antenas cortas. Las hembras exhiben dimorfismo sexual, siendo de mayor tamaño que los machos y presentando una separación interocular más marcada (Masciocchi et al., 2016; Robinson, 2020). El aparato bucal es de tipo esponjoso (haustelo), con una probóscide carnosa y plegable que solo les permite consumir líquidos. Su saliva contiene enzimas digestivas que licúan los alimentos, los cuales posteriormente son absorbidos por capilaridad a través de esta estructura (Báez-Szelepka et al., 2015).

La dieta del adulto consiste principalmente en agua y carbohidratos, requiriendo las hembras un mayor consumo de proteínas para el desarrollo ovárico, obteniendo estos nutrientes principalmente de excretas animales y desechos orgánicos de origen antrópico, los cuales también funcionan como sustrato para la oviposición (Robinson, 2020).

Musca domestica es una plaga de importancia médica y veterinaria, debido a que sus hábitos alimenticios y reproductivos la convierten en vector mecánico de microorganismos patógenos. Estos se diseminan a través de su aparato bucal, pilosidades corporales, patas, alas y mediante regurgitación y defecación sobre alimentos y superficies (Báez-Szelepka et al., 2015; Robinson, 2020). Tiene la capacidad de transmitir mecánicamente más de 100 patógenos, incluyendo bacterias como *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Bacillus anthracis* (responsable del ántrax); protozoos como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; además de nemátodos como *Enterobius vermicularis* y *Taenia* spp, los cuales pueden transferirse de forma directa o indirecta a través de la contaminación de alimentos (Adenusi y Adewoga, 2013).

La infestación de *M. domestica* también produce daños en la producción agropecuaria por estrés animal, con una reducción de hasta el 30% en sistemas intensivos (Geden y Hogsette, 1994) y deterioro microbiológico en la leche, debido al aumento del conteo bacteriano (Holschbach y Peek, 2018). En áreas peridomésticas, las infestaciones de *M. domestica* generan malestar significativo en trabajadores rurales y en comunidades cercanas, ya que estas pueden dispersarse a zonas urbanas adyacentes en un rango de hasta 12 km (Robinson, 2020) y reducen la calidad de vida de las personas (Abbas et al., 2015). La extensión de zonas urbanas a nivel global también ha provocado una mayor cercanía con las zonas de producción agrícola, haciendo más prevalente el problema. Un ejemplo de lo anterior es lo descrito por Brown (2018), donde las infestaciones de mosca fueron uno de los principales motivos de demandas contra *Smithfield Foods*, teniendo que llegar a un acuerdo de 50 millones de dólares por molestias relacionadas con sus granjas de producción porcina. Se estima que el costo anual total del uso de insecticidas para el control de esta plaga en sistemas de producción de aves de corral, cerdos y productos lácteos rodea los 200 millones de dólares, valor con una tendencia a aumentar producto del incremento de precio de insecticidas más modernos (Geden et al., 2021). Dado esto, resulta necesario promover el control de las poblaciones de *M. domestica* con métodos alternativos para mantener el bienestar en áreas urbanas y rurales.

Las prácticas culturales, son uno de los métodos más efectivos para el control de *M. domestica* en planteles agrícolas (Geden et al., 2021). Estas consisten en un conjunto de prácticas de manejo realizadas por el personal, para reducir la incidencia de plagas y enfermedades. En el caso de establos, estas consisten en la mantención de la higiene y la eliminación de focos de proliferación de *M. domestica* (Watson et al., 2017). El ciclo de vida de este insecto se desarrolla vinculado a materia orgánica húmeda, por lo que el manejo y eliminación de desperdicios como estiércol, heno húmedo, ensilaje derramado y material de cama, entre otros al menos una vez por semana, ayuda a romper el ciclo y elimina nuevas fuentes de proliferación (Rutz et al., 2015). Igualmente, el uso de trampas y cintas adhesivas contribuye al control de poblaciones pequeñas y medianas de moscas, junto con el aislamiento de zonas sensibles y equipar puertas y ventanas con mosquiteros puede reducir el número de moscas y las posibilidades de contaminación de la leche (Rutz et al., 2015; Watson et al., 2017).

La disposición de los residuos orgánicos además evita la dispersión de las moscas a otros planteles y zonas aledañas, y esparcir el estiércol y materia de camas en una capa fina ayuda a que este se seque más rápido y cubrirlo con tierra elimina posibles larvas y pupas que puedan estar presentes (Abbas et al., 2013).

No obstante, la producción animal con el tiempo ha seguido la tendencia de intensificar sus sistemas, maximizando la producción y minimizando costos (Machtinger et al., 2021), lo que resulta en un incremento de la densidad animal y la producción de desechos, junto con la necesidad de almacenamiento y disposición de estos (Gerry, 2018; Clay et al., 2019). Lo anterior dificulta el manejo de residuos y conlleva a la recolección y almacenamiento de estos en las mismas instalaciones, lo que proporciona un sustrato constante para la proliferación de poblaciones de moscas, dificultándose aún más su control (Geden et al., 2021).

Otra alternativa de control y tal vez la más utilizada, es el control químico con insecticidas sintéticos, siendo los organofosforados (OPs), piretroides y neonicotinoides los grupos de mayor empleo a nivel mundial (Freeman et al., 2019). Los OPs — ésteres de ácido fosfórico— ejercen su efecto letal mediante la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa en la sinapsis nerviosa. Esta inactivación enzimática provoca la acumulación de acetilcolina, generando hiperestimulación colinérgica que se manifiesta en espasmos, parálisis y finalmente la muerte del insecto (Casida y Durkin, 2013). Los piretroides, por su parte, son moléculas sintéticas derivadas estructuralmente de las piretrinas naturales, caracterizadas por una base de ácido crisantémico esterificado con un alcohol aromático y modificadas con halógenos (Cl, Br) o grupos cianuro (CN⁻) para incrementar su estabilidad fotoquímica. Su mecanismo de acción neurotóxico implica el bloqueo específico de los canales de sodio voltaje-

dependientes en los axones, induciendo una despolarización prolongada de la membrana que altera la transmisión nerviosa, produce un rápido efecto *knockdown* o de derribo, que culmina en parálisis y muerte del insecto (Coats, 1990; Jayaraj et al., 2016). Por último, los neonicotinoides, derivados sintéticos de la nicotina, se clasifican estructuralmente en tres grupos: N-nitroguanidinas (imidacloprid, thiametoxam, clothianidin y dinotefuran), nitrometilenos (nitenpyram) y N-cianomidinas (acetamiprid y thiacloprid) (Jeschke y Nauen, 2008; Kundoo et al., 2018). Su alta solubilidad en agua les confiere propiedades sistémicas en plantas y versatilidad de modos de aplicación (aspersión, cebos o tratamiento de semillas) (Jeschke y Nauen, 2008). Actúan como agonistas irreversibles de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) en insectos, induciendo hiperexcitación neuronal, parálisis y muerte (Tomizawa y Casida, 2005). Aunque su alta afinidad por los nAChRs de insectos les otorga menor toxicidad aguda en vertebrados, su persistencia ambiental representa un riesgo ecológico significativo para polinizadores como *Apis mellifera* L. (Thompson, 2010; Simon-Delso et al., 2014).

Entre las alternativas comerciales al uso de insecticidas sintéticos para el control de *M. domestica*, destacan compuestos de origen natural como las piretrinas, spinosad y el aceite de Neem (*Azadirachta indica* J. Meliaceae). Las piretrinas se obtienen de extractos de *Tanacetum cinerariifolium* Sch. Bip. (Asteraceae) (Grdiša y Gršić, 2013) y consisten en seis compuestos activos divididos en dos grupos: derivados del ácido crisantémico (piretrina I, cinerina I,

jasmolina I) y derivados del ácido pirétrico (piretrina II, cinerina II, jasmolina II). Su mecanismo de acción —similar al de los piretroides sintéticos— altera la transmisión del impulso nervioso en insectos mediante el bloqueo de canales de sodio. Para mejorar su eficacia, se formula comúnmente con butóxido de piperonilo (PBO), un sinergista que inhibe las oxidasas de función mixta (FMO) en artrópodos (Pap et al., 2001). Pese a presentar baja toxicidad en mamíferos, son altamente tóxicas para organismos acuáticos (Osimitz et al., 2022).

El spinosad es una mezcla de espinosinas A y D que constituyen lactonas macrocíclicas producidas por la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* Mertz y Yao. Estas ejercen su acción insecticida mediante la activación prolongada de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) y GABA, induciendo hiperexcitación neuronal, parálisis y muerte (Salgado, 1998). Sus ventajas incluyen baja toxicidad en mamíferos, rápida degradación ambiental y selectividad hacia organismos no blanco (Khan, 2018).

El aceite de Neem, obtenido a partir de las semillas de *A. indica*, contiene como principio activo, la azadiractina, un limonoide tetranotriterpenoide caracterizado por un núcleo furanolactónico altamente oxidado (Nathan et al., 2004). El aceite de este árbol presenta múltiples mecanismos de acción, tales como la interrupción de la metamorfosis en larvas y pupas mediante la interferencia con la síntesis de ecdisteroides, un efecto antialimentario por bloqueo de receptores gustativos, y reducción de la fecundidad mediante

alteración de la vitelogénesis (Siriwattananarungsee et al., 2008). Sus ventajas lo posicionan como una alternativa sostenible, ya que posee bajo riesgo de desarrollo de resistencia, una rápida biodegradabilidad, compatibilidad con otras técnicas de manejo como el control biológico y cuenta con certificación para su uso en agricultura orgánica (OMRI, 2023), además de presentar baja toxicidad en mamíferos (Benelli et al., 2016).

El uso intensivo de insecticidas sintéticos ha propiciado el desarrollo de resistencia en *M. domestica*, la cual, según Busvine (1980), se define como 'la capacidad hereditaria de una población para sobrevivir a dosis letales mediante mecanismos fisiológicos, bioquímicos o conductuales'. Esta resistencia se manifiesta a través de dos vías principales: mecanismos metabólicos, que implican modificaciones enzimáticas para detoxificar compuestos, y mecanismos no metabólicos, asociados a alteraciones en los sitios de unión del insecticida o reducción de la penetración cuticular. Paralelamente, puede desarrollarse un fenómeno distinto conocido como tolerancia, que se refiere a la capacidad de soportar los efectos del insecticida sin involucrar necesariamente una desintoxicación fisiológica, sino a través de adaptaciones como cambios conductuales de evitación, una mayor capacidad de reparación de tejidos o una mayor tasa de reproducción que compensa la mortalidad (Dent, 2000; Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 2009).

El desarrollo de resistencia en *M. domestica* se ve favorecido por rasgos biológicos propios de la especie, como su alta fecundidad, ciclo vital corto y plasticidad térmica (Kaufman et al., 2010), entre otros. Esto constituye un problema global, con más de 84 casos documentados en múltiples regiones (Mota Sanchez y Wise, 2015), incluyendo Argentina (Acevedo et al., 2009), Estados Unidos (Freeman et al., 2019), China (Wang et al., 2012) y Turquía (Akiner y Caglar, 2012). La resistencia, no solo se limita a productos sintéticos como OPs (Abbas et al., 2015), piretroides (Khan, 2019) y neonicotinoides (Kavi et al., 2014), si no que también existen reportes en insecticidas de origen natural como piretrinas y su uso combinado con PBO (Kristensen et al., 2001) y espinosad (Khan, 2018). Esto trae como consecuencia un incremento en la frecuencia y dosis de aplicaciones de insecticidas necesarias para su control, produciendo un círculo vicioso que eleva los costos operativos y la contaminación ambiental, además de la persistencia de los insecticidas en ecosistemas, los cuales afectan organismos no blanco y degradan la fertilidad edáfica (Jayaraj et al., 2016), haciendo imperativa la investigación de alternativas sostenibles.

Los aceites esenciales (AEs) han surgido en los últimos años como una alternativa promisorio a los insecticidas sintéticos. Químicamente, se definen como mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles de origen vegetal, que cumplen funciones ecológicas clave en las plantas como defensa contra patógenos y herbívoros, atracción de polinizadores y comunicación interespecífica, entre otras (Pavela, 2015; Zuzarte y Salgueiro, 2015). Están

constituidos principalmente por hidrocarburos de tipo mono y sesquiterpenos y compuestos aromáticos (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos, cetonas, lactonas y fenoles). Estos son hidrofóbicos y miscibles en solventes orgánicos (Asbahani et al., 2015), y son sintetizados en estructuras especializadas de las plantas como tricomas glandulares, canales resiníferos o vacuolas de órganos específicos (flores, hojas, tallos o raíces). Su producción se ha descrito principalmente en plantas aromáticas de la familia Lamiaceae (*Mentha* spp.), Lauraceae (*Cinnamomum* spp.), Asteraceae (*Artemisia* spp.) y Rutaceae (*Citrus* spp.), entre otras (Gonzalez-Coloma et al., 2013). Se obtienen a través de la separación de la fase acuosa por hidrodestilación, arrastre por vapor y métodos mecánicos en frío, con rendimientos de extracción $\leq 1\%$ del peso fresco, por lo que son sustancias de alto valor comercial (Zuzarte y Salgueiro, 2015).

Los aceites esenciales son muy demandados en el mercado debido a su amplia actividad biológica, demostrando efecto como agentes antimicrobianos (antibacterianos y fungicidas), antioxidantes y bioplaguicidas con efectos acaricidas e insecticidas (Shaaban et al., 2012). En el ámbito del control de insectos, ejercen diversos mecanismos de acción que incluyen efectos insecticidas directos por neurotoxicidad, propiedades repelentes y disuasión alimenticia y de la ovipostura; además son capaces de regular el crecimiento al interferir con la metamorfosis (Gupta et al., 2023). Comparados con los insecticidas sintéticos convencionales, presentan ventajas ecológicas como su baja persistencia ambiental, mayor selectividad, lo que reduce el impacto sobre

organismos no blanco, y riesgo mínimo de desarrollar resistencia (Isman, 2006). Esta última característica se atribuye a su compleja composición química, donde la actividad insecticida surge de la sinergia entre múltiples compuestos que actúan sobre diversos blancos moleculares (Saroj et al., 2020).

Los AEs y sus componentes han demostrado eficacia en el control de *M. domestica*, con estudios que destacan especialmente aquellos provenientes de menta (*Mentha × piperita* L.) y jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Morey y Khandagle (2012), reportaron para estos aceites actividad larvicida significativa ($CL_{50} < 140$ ppm), junto con un efecto repelente en adultos superior al 85% y una inhibición de la oviposición del 98%. Resultados similares fueron obtenidos por Kumar et al. (2011) con el aceite de menta, quienes adicionalmente evaluaron el proveniente de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) en diluciones inferiores al 10%, logrando un 100% de inhibición en la emergencia de pupas. Estos efectos se atribuyen principalmente a la interacción de los terpenos mayoritarios, mentol y 1,8-cineol, con el sistema nervioso central de los insectos, provocando el bloqueo de canales iónicos y desregulación de neurotransmisores (Isman, 2020). En cuanto a lo reportado en otros AEs, Chintalchere et al. (2020), caracterizaron la actividad insecticida del aceite de laurel (*Laurus nobilis* L.), obteniendo concentraciones letales de $CL_{50} = 43.03$ mg dm⁻³ en adultos y 64 µL 0.25 L⁻¹ en pupas, observándose además deformidades morfológicas en los adultos que lograron emerger de las pupas tratadas.

Pavela (2008) evaluó la toxicidad de seis monoterpenos característicos de aceites esenciales provenientes de la familia Lamiaceae en adultos de *M. domestica*, demostrando que el timol, componente mayoritario de *Thymus vulgaris* L., y carvacrol, predominante en *Origanum vulgare* L., presentaron la mayor actividad tóxica por aplicación tópica, con dosis letales inferiores a 100 µg adulto⁻¹. Resultados similares fueron obtenidos al evaluar los monoterpenos γ-terpineno, p-cimeno y cineol, mostrando una alta toxicidad fumigante (DL₅₀ < 100 µg cm⁻³).

Estos hallazgos destacan el potencial insecticida de los AEs y sus componentes, los que además actúan en concentraciones muy bajas. Sin embargo, el uso de AEs en el control de plagas se ha visto limitado producto de su alta volatilidad y sensibilidad a factores ambientales como la luz, oxígeno y los cambios de temperatura, que provocan variaciones en su composición y rápida degradación (Botrel et al., 2012). Para superar estos desafíos, las técnicas de microencapsulación como la nanoemulsificación, surgen como una estrategia prometedora. Las nanoemulsiones son sistemas coloidales compuestos por dos fases líquidas inmiscibles (agua y aceite), que pueden organizarse en estructuras de tipo agua-en-aceite (W/O) o aceite-en-agua (O/W). Estos sistemas incorporan tensioactivos anfipáticos que reducen la tensión superficial y forman pequeñas gotitas de tamaño nanométrico (≤ 200 nm) que encapsulan los compuestos activos (Sharma et al., 2020). Esta tecnología ofrece múltiples ventajas como aumentar la solubilidad y el área de interfase, lo que mejora la distribución y

actividad biológica del aceite esencial (Pascual-Villalobos et al., 2019). Su producción es sencilla y económicamente viable, al no requerir solventes especiales (Pavoni et al., 2020).

Las nanoemulsiones muestran estabilidad termodinámica y cinética que previene la sedimentación o separación de fases, mientras protegen los compuestos activos de la degradación ambiental mediante su encapsulación. Junto a esto, permiten una liberación controlada de los compuestos activos (Sharma et al., 2020) y, dado su tamaño nanométrico, la penetración de los aceites a través de la cutícula de los insectos se incrementa, mejorando su eficacia para el control de plagas (López et al., 2021).

Hipótesis

1. *M. domestica* presenta mayor tolerancia a insecticidas sintéticos (cipermetrina, pirimifos-metil) que a bioinsecticidas comerciales (azadiractina, piretrinas).
2. Los aceites esenciales de plantas aromáticas cultivadas poseen efecto insecticida y repelente contra *M. domestica*.

Objetivo general

Evaluar en condiciones de laboratorio la susceptibilidad de *M. domestica* a insecticidas sintéticos, bioinsecticidas comerciales, aceites esenciales y nanoemulsiones de *D. ambrosioides* analizando sus efectos letales y subletales en larvas, pupas, y adultos.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad insecticida de azadiractina, D-limoneno, cipermetrina, piretrinas y pirimifos-metil y determinar sus dosis letales en larvas, pupas y adultos de *M. domestica*.
2. Evaluar la actividad insecticida y repelente de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), salvia (*Salvia officinalis*) y paico (*Dysphania ambrosioides*), y determinar sus concentraciones letales en adultos de *M. domestica*.
3. Desarrollar nanoemulsiones estables del aceite esencial de *D. ambrosioides* y evaluar su actividad insecticida.

Referencias

- Abbas, M. N., Sajeel, M., y Kausar, S. (2013). House fly (*Musca domestica*), a challenging pest; biology, management and control strategies. *Elixir Entomology*, 64, 19333–19338.
https://www.researchgate.net/publication/260285055_House_fly_Musca_domestica_a_challenging_pest_biology_management_and_control_strategies
- Abbas, N., Ali Shad, S., y Ismail, M. (2015). Resistance to Conventional and New Insecticides in House Flies (Diptera: Muscidae) From Poultry Facilities in Punjab, Pakistan. *Journal of Economic Entomology*, 108(2), 826–833.
<https://doi.org/10.1093/jee/tou057>
- Acevedo, G. R., Zapater, M., y Toloza, A. C. (2009). Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitology Research*, 105(2), 489–493.
<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1425-x>
- Akiner, M. M., y Caglar, S. S. (2012). Monitoring of five different insecticide resistance status in turkish house fly *Musca domestica* L. (Diptera: muscidae) populations and the relationship between resistance and insecticide usage profile. *Turkish Journal of Parasitology*, 36(2), 87–91. <https://doi.org/10.5152/tpd.2012.21>
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., y Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Báez-Szelepka, I., Fierros López, H., y Pérez Politrón, D. (2015). Aparato bucal de insectos. *Dugesiana*, 1(1), 19–33. <https://doi.org/10.32870/dugesiana.v1i1.3502>
- Bautista, C. R. (2016). *Entomología veterinaria esencial* (2nd ed., pp. 100–103). Instituto Nacional De Investigaciones Forestales Agrícolas Y Pecuarias.
- Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R., y Nicoletti, M. (2016). Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Natural Product Research*, 31(4), 369–386. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1214834>
- Botrel, D. A., Borges, S. V., de Barros Fernandes, R. V., Viana, A. D., Gomes da Costa, J. M., y Marques, G. R. (2012). Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. *International Journal of Food Science y Technology*, 47(11), 2289–2296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03100.x>
- Busvine, J. R. (1980). Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. *FAO Plant Production and Protection Paper*, 132.

- Casida, J. E., y Durkin, K. A. (2013). Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.002>
- Chintalchere, J. M., Dar, M. A., y Pandit, R. S. (2020). Biocontrol efficacy of bay essential oil against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-020-0138-7>
- Clay, N., Garnett, T., y Lorimer, J. (2019). Dairy intensification: Drivers, impacts and alternatives. *Ambio*, 49(1). <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01177-y>
- Coats, J. R. (1990). Mechanisms of toxic action and structure-activity relationships for organochlorine and synthetic pyrethroid insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 255–262. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087255>
- Dent, D. (2000). *Insect pest management* (pp. 107–110). Cabi Pub.
- Freeman, J. C., Ross, D. H., y Scott, J. G. (2019). Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.006>
- Geden, C. J., y Hogsette, J. A. (1994). *Research and extension needs for integrated management programs for livestock and poultry*, (pp. 213–220). Center for Medical, Agricultural, and Veterinary Entomology.
- Geden, C. J., Nayduch, D., Scott, J. G., Burgess, E. R., Gerry, A. C., Kaufman, P. E., Thomson, J., Pickens, V., y Machtinger, E. T. (2021). House fly (Diptera: Muscidae): Biology, pest status, current management prospects, and research needs. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1), 1–38. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmaa021>
- Gerry, A. C. (2018). *VetPestX: Database of pesticides for control of insect pests of animals*. <https://www.veterinaryentomology.org/vetpestx>
- Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Diaz, C. E., Fraga, B. M., y Santana-Meridas, O. (2013). Natural product-based biopesticides for insect control. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 3, 237–268. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.02770-0>
- Grdiša, M., y Gršić, K. (2013). Botanical insecticides in plant protection. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 78(2), 85–93.
- Gupta, I., Singh, R. V., Muthusamy, S., Sharma, M., Grewal, K., Singh, H. P., y Batish, D. R. (2023). Plant Essential Oils as Biopesticides: Applications, Mechanisms, Innovations, and Constraints. *Plants*, 12(16), 2916–2916. <https://doi.org/10.3390/plants12162916>

- Holschbach, C. L., y Peek, S. F. (2018). Salmonella in dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 34(1), 133–154. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.005>
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Isman, M. B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19(2), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>
- Jayaraj, R., Megha, P., y Sreedev, P. (2016). Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(3-4), 90–100. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012>
- Jeschke, P., y Nauen, R. (2008). Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*, 64(11), 1084–1098. <https://doi.org/10.1002/ps.1631>
- Kaufman, P. E., Nunez, S. C., Geden, C. J., y Scharf, M. E. (2010). Selection for Resistance to Imidacloprid in the House Fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(5), 1937–1942. <https://doi.org/10.1603/ec10165>
- Kavi, L. A. K., Kaufman, P. E., y Scott, J. G. (2014). Genetics and mechanisms of imidacloprid resistance in house flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.006>
- Khan, A. (2018). Spinosad resistance affects biological parameters of *Musca domestica* Linnaeus. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32445-8>
- Khan, A. (2019). Characterization of permethrin resistance in a *Musca domestica* strain: Resistance development, cross-resistance potential and realized heritability. *Pest Management Science*, 75(11), 2969–2974. <https://doi.org/10.1002/ps.5409>
- Kristensen, M., Spencer, A. G., y Jespersen, J. B. (2001). The status and development of insecticide resistance in Danish populations of the housefly *Musca domestica* L. *Pest Management Science*, 57(1), 82–89. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200101\)57:1%3C82::AID-PS251%3E3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200101)57:1%3C82::AID-PS251%3E3.0.CO;2-8)
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., y Satya, S. (2011). Insecticidal Evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Parasitology Research*, 110(5), 1929–1936. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2719-3>

- Kundoo, A. A., Dar, S. A., Mushtaq, M., Bashir, Z., Dar, M. S., Gul, S., Ali, M. T., y Gulzar, S. (2018). Role of neonicotinoids in insect pest management: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 333–339.
- Lagunes Tejeda, A., y Villanueva Jiménez, J. A. (2009). *Toxicología y manejo de insecticidas* (pp. 72–75). Colegio De Postgraduados En Ciencias Agrícolas. <https://books.google.cl/books?id=UmybHAAACAAJ>
- López, M. D., Cantó-Tejero, M., y Pascual-Villalobos, M. J. (2021). New Insights Into Biopesticides: Solid and Liquid Formulations of Essential Oils and Derivatives. *Frontiers in Agronomy*, 3. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.763530>
- Machtinger, E. T., Gerry, A. C., Murillo, A. C., y Talley, J. L. (2021). Filth fly impacts to animal production in the united states and associated research and extension needs. *Journal of Integrated Pest Management*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmab026>
- Masciocchi, M. (2016). Cuadernillo N°12 - “Mosca doméstica” *Musca domestica*. *Serie de Divulgación Sobre Insectos de Importancia Ecológica, Económica Y Sanitaria*, 12. https://drive.google.com/file/d/0B-uxp9ey-PYbUkFhZkl0Z0V3amM/view?resourcekey=0-rcYqlapSozdzGPc3Td_7Lq
- Morey, R. A., y Khandagle, A. J. (2012). Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. *Parasitology Research*, 111(4), 1799–1805. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3027-2>
- Mota-Sanchez, D., y Wise, J. C. (2015). *Arthropod Pesticide Resistance Database | Michigan State University*. The Arthropod Pesticide Resistance Database; Michigan State University. <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=speciesyearId=151>
- Nathan, S. S., Kalaivani, K., Murugan, K., y Chung, P. G. (2004). The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leaffolder. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 81(2), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.10.004>
- Organic Materials Review Institute. (2023). *OMRI Products List*. Organic Materials Review Institute (OMRI). <https://www.omri.org/us-list>
- Osimitz, T. G., Sioris, K., Gualtieri, J., Filandrinis, D., Seaverson, R., Carlson, A. M., Droege, W., & Kingston, R. (2022). Retrospective analysis of adverse effects associated with pyrethrins-containing products. *Toxicology Research and Application*, 6. <https://doi.org/10.1177/23978473211052700>

- Pap, L., Árvai, G., Bertók, B., Kurucz Ribai, Z., and Bakonyvári, I. (2001). Comparative evaluation of new synergists containing a butynyl-type synergophore group and piperonyl butoxide derivatives. *Pest Management Science*, 57(2), 186–190. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2%3C186::aid-ps290%3E3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2%3C186::aid-ps290%3E3.0.co;2-z)
- Pascual-Villalobos, M. J., Guirao, P., Díaz-Baños, F. G., Cantó-Tejero, M., y Villora, G. (2019). Chapter 9 - Oil in water nanoemulsion formulations of botanical active substances. In *Nano-Biopesticides Today and Future Perspectives* (pp. 223–247). Academic Press.
- Pavela, R. (2008). Acute and synergistic effects of some monoterpenoid essential oil compounds on the house fly (*Musca domestica* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(5), 451–459. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2008.10643653>
- Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., y Palmieri, G. F. (2020). An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials*, 10(1), 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>
- Robinson, W. H. (2020). *Urban entomology: insect and mite pests in the human environment* (pp. 298–300). Garland Science.
- Rutz, D. A., Geden, C. J., y Pitts, C. (2015). *Recomendaciones para el manejo de plagas en el ganado vacuno*. International System for Agricultural Science and Technology (AGRIS). <http://hdl.handle.net/1813/42391>
- Saroj, A., Vincent, O. O., Nayak, A. K., Zafar, H. S., Egbuna, C., y Sawicka, B. (2020). Chapter 6 Phytochemicals of Plant Derived Essential Oils: A Novel Green Approach Against Pests. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control* (pp. 65–79). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B9780128193044.000063>
- Shaaban, H. A. E., El-Ghorab, A. H., y Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 203–212. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.659528>
- Sharma, S., Loach, N., Gupta, S., y Mohan, L. (2020). Phyto-nanoemulsion: An emerging nano-insecticidal formulation. *Environmental Nanotechnology, Monitoring y Management*, 14, 100331. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100331>

- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., y Noome, D. A. (2014). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Siriwattananarungsee, S., Sukontason, K. L., Olson, J. K., Chailapakul, O., y Sukontason, K. (2008). Efficacy of neem extract against the blowfly and housefly. *Parasitology Research*, 103(3), 535–544. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1004-6>
- Thompson, H. M. (2010). Risk assessment for honeybees and pesticides-recent developments and “new issues.” *Pest Management Science*, 66(11), 1157–1162. <https://doi.org/10.1002/ps.1994>
- Tomizawa, M., y Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Wang, Q., Li, M., Pan, J., Di, M., Liu, Q., Meng, F., Scott, J. G., y Qiu, X. (2012). Diversity and frequencies of genetic mutations involved in insecticide resistance in field populations of the house fly (*Musca domestica* L.) from China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.12.007>
- Watson, D. W., Waldron, J. K., y Rutz, D. (2017). *El manejo integrado de las moscas en y alrededor de los establos de vacas lecheras y ganado*. International System for Agricultural Science and Technology (AGRIS). <http://hdl.handle.net/1813/47683>
- Zhang, Y., Guo, M., Ma, Z., You, C., Gao, X., y Shi, X. (2019). Esterase-mediated spinosad resistance in house flies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicology*, 29(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02125-y>
- Zuzarte, M., y Salgueiro, L. (2015). *Bioactive Essential Oils and Cancer* (pp. 19–61). Springer International Publishing.

CAPÍTULO I. Toxicity of synthetic and natural insecticides on the housefly, *Musca domestica* L., from dairy barns

Gabriela Oyarce ^{1*}, Gonzalo Silva¹, Álvaro Romero², J.C. Rodríguez-Maciel³ and Patricia Loyola¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

²Envu. 5000 Centre Green Way, Suite 400, Cary, NC 27513. USA

³Posgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México.

Revista: Southwestern Entomologist

Fecha de envío: 6 de mayo del 2025 **Fecha de publicación:** 15 de septiembre del 2025

Resumen

La mosca doméstica (*Musca domestica* L., Diptera: Muscidae) transmite enfermedades tanto al ser humano como al ganado. El principal método de control de esta plaga es el uso de insecticidas sintéticos. Sin embargo, su uso intensivo ha incrementado la resistencia en sus poblaciones. Dado esto, se requieren alternativas insecticidas con distintos modos de acción para el manejo rotacional. El objetivo de esta investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la toxicidad de formulaciones comerciales de cipermetrina, pirimifosmetilo, piretrinas + butóxido de piperonilo (PBO), aceite de neem, y D-limoneno sobre larvas, pupas y adultos de *M. domestica* provenientes de explotaciones ganaderas. Piretrina más el PBO exhibió la mayor mortalidad en moscas, con una CL₅₀ de 0.55 mL L⁻¹, sin diferencias significativas con respecto a la cipermetrina (CL₅₀ = 0.62 mL L⁻¹). Todos los insecticidas fueron menos eficaces contra los estadios inmaduros y las piretrinas más PBO fueron los tratamientos

más tóxicos contra larvas, pupas y moscas, probablemente porque el compuesto sinergista PBO bloqueó la acción de enzimas detoxificadoras.

Abstract

The housefly, (*Musca domestica* L., Diptera: Muscidae) transmits diseases to humans and livestock. Synthetic insecticides are the most effective way to deal with this pest. However, the intensive use of these chemicals has led to an increased resistance in housefly populations. Therefore, product alternatives with different modes of action are needed for rotational management to prolong their effectiveness. We assessed the toxicity of commercial formulations of cypermethrin, pirimiphos-methyl, pyrethrins + piperonil butoxide (PBO), neem oil, and D-limonene under laboratory conditions against the larvae, pupae, and adults of *M. domestica* obtained from dairy farms. The highest mortality rates against larvae, pupae and adult were shown by pyrethrins + PBO, this was most likely due to the action of detoxifying enzymes being blocked by the synergist PBO. with an $LC_{50} = 0.55 \text{ ml l}^{-1}$, which did not differ significantly from cypermethrin ($LC_{50} = 0.62 \text{ mL L}^{-1}$). All the insecticides were less effective against the immature stages. Pyrethrins + PBO exhibited the highest mortality against the larva, pupae, and adult houseflies, probably because the synergist PBO blocked the action of detoxifying enzymes.

Keywords: housefly, bioinsecticides, neem, pyrethrins, limonoids.

Introduction

The housefly, *Musca domestica* L., (Diptera: Muscidae), is an important insect in medical and veterinary contexts due to its role as a vector for various human and animal diseases. It serves as a reservoir for numerous pathogens, including *Shigella* and *Salmonella* species, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*, among others (Mansour et al. 2011, Al-Jasmine et al. 2019). Intensive animal farming in confinement creates optimal conditions for the proliferation of housefly populations, due to elevated temperatures, high humidity levels, and the presence of manure (Rutz et al. 2015). This environment can lead to stress in both animals and workers, facilitate the transmission of diseases, and result in economic issues, such as the spotting of eggs in poultry houses (Learmount et al. 2002).

Synthetic insecticides are frequently employed to manage housefly populations (Freeman et al. 2019). Furthermore, houseflies can travel up to 20 km in a single day in search of food (Masciocchi 2016, Soyelu et al. 2020), and the expansion of urban areas has led to the encroachment of residential zones on cattle farms. Both of these are subjected to insecticide treatments to diminish the prevalence of houseflies. As a result, this pest is overtreated with insecticides, which increases the risk of the development of resistance. The Arthropod Pesticide Resistance Database (<https://www.pesticideresistance.org/>) contains,

for *M. domestica*, more than 463 cases of insecticide resistance worldwide, including practically all the active compounds authorized for use against this pest.

A resistance management strategy consists of rotating insecticides affected by different mechanisms of resistance (Abbas et al. 2015, Scott 2016, Feng and Liu 2020). For *M. domestica*, the use of effective natural insecticides in control programs may cause both lethal and sublethal effects, which reduces the selection of resistant insects. Pyrethrins from *Tanacetum cinerariifolium* (Asteraceae) are traditional compounds to control houseflies, but they pose a high risk of cross-resistance as natural versions of pyrethroids. However, unlike its synthetic version, some commercial formulations contain several toxic compounds (pyrethrins I and II, Cinerin I and II, and Jasmolin I and II), which reduce the risk of resistance (Scott 2016). Another natural alternative is neem oil (*Azadirachta indica* J: Meliaceae), derived from an Indian tree that has been industrialized and currently has several commercial formulations for agricultural, urban, and veterinary use. Dad-Buneri et al. (2011) studied a commercial neem extract against third-instar larvae and documented their effect on fecundity. The LC_{50} of this extract was 0.25%. Although the treated larvae reached the adult stage, neem oil completely inhibited their ability to lay eggs. Similarly, Al-Jasime (2019) assessed a formulation of neem oil at concentrations of 0.1-1.0 ml l⁻¹ mixed with the diet for larvae, which caused 48-89% mortality. This compound caused abnormalities in treated insects, such as localized black spots or the complete blackening of bodies. Other commercial insecticides of natural origin are

avermectins and spinosyns; however, there is a high risk of resistance to these compounds (Shi et al. 2011, Khan and Shad 2014, Zhang et al. 2019).

This study aimed to assess the toxicity of commercial formulations of cypermethrin and pirimiphos-methyl and the bioinsecticides pyrethrins, neem oil, and D-limonene available in the Chilean market against the larvae, pupae, and adults of *M. domestica* obtained from a dairy farm.

Materials and Methods

Adult houseflies were collected from a cattle barn at the Facultad de Medicina Veterinaria of Universidad de Concepción in Chillan, Chile (GD: -36.594669, -72.084651), using a sweep net. The flies were then transported to the laboratory and identified using the taxonomic key of Masciocchi (2016). Inbreeding was prevented by adding flies collected from fields to the colony each year.

The houseflies were reared under laboratory conditions as described by Khater et al. (2019) in a bioclimatic chamber (Memmert GmbH IPS 749, Schwabach, Germany) under controlled conditions [25 ± 5 °C, $65 \pm 2\%$ relative humidity, and a photoperiod of 16:8 (L:D)]. The adults were provided with a cotton swab soaked in 5.0 g of milk powder, placed in a Petri dish, and replaced every 24 h. The eggs were collected daily and transferred to the rearing medium, which consisted of strips of absorbent paper stacked in layers moistened with 2.0% milk and sugar (v/v) inside a container with a lid until the larvae emerged.

The activity of insecticides (Table 1) against the larvae was assessed as described by Mohammed et al. (2021) with modifications. A total of 25 third instar larvae were placed in a 9 cm Petri dish and sprayed with 2 ml of each concentration of insecticide using a Potter spray tower (Burkard Manufacturing Co. Limited, Hertfordshire, England) at 10 psi. The mortality was recorded at 24, 48, and 72 h. An insect was classified as dead if it showed no movement after

being prodded with a dissection needle. The maximum mortality in the control group was 3.0%, and the mortality in the treatment group was adjusted using Abbott's formula (Abbott 1925).

The sublethal effects were determined by estimating the percentage of pupation and emergence of adults in the surviving larvae. Each treatment had 10 replicates of 20 larvae each with the following concentrations: cypermethrin at 1.0, 2.0, 12.5, 25.0, and 37.5 ml l⁻¹; pirimiphos-methyl at 2.8, 5.6, and 45 ml l⁻¹; D-limonene at 14.1, 56.0, 84.0, and 112.6 ml l⁻¹; azadirachtin at 0.04, 0.08, 0.6, 1.2, and 1.8 ml l⁻¹; and pyrethrins + PBO at 0.14, 0.28, 4.5, 6.75, and 9.0 ml l⁻¹. The untreated control consisted of distilled water.

The activity of insecticides against the larvae was assessed as described by Mohammed et al. (2021) with modifications. A total of 25 third instar larvae were placed in a 9 cm Petri dish and sprayed with 2 ml of each concentration of insecticide using a Potter spray tower (Burkard Manufacturing Co. Limited, Hertfordshire, England) at 10 psi. The mortality was recorded at 24, 48, and 72 h. An insect was classified as dead if it showed no movement after being prodded with a dissection needle. The maximum mortality in the control group was 3.0%, and the mortality in the treatment group was adjusted using Abbott's formula (Abbott 1925).

Table 1. Insecticides against *Musca domestica* assessed under laboratory conditions.

Cuadro 1. Insecticidas utilizados contra *Musca domestica* bajo condiciones de laboratorio.

Insecticide	Active ingredient	Recommended dose (ml l ⁻¹)	IRAC Group*	Company	WHO toxicity class**
Neem-X®	Azadirachtin	4.0	UN. Compounds of unknown or uncertain mode of action	Marketing Arm International Inc. USA.	IV. Unlikely to present acute hazard
Spee 3® EW	Pyrethrins+PBO	10.0	3. Sodium channel modulators	Anasac S.A. Chile	IV. Unlikely to present acute hazard
Lemonsoil® EC	D-limonene	84.0	UN. Compounds of unknown or uncertain mode of action	BTS Intrade Laboratories S.A. Chile	III. Slightly hazardous
Cyperkill 25 EC	Cypermethrin	6.0	3.-Sodium channel modulators	Anasac S.A. Chile	II. Moderately hazardous
Actellic® 50 EC	Pirimiphos Methyl	10.0	1.- Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors	Syngenta Chile S.A	II. Moderately hazardous

*IRAC= "The Insecticide Resistance Action Committee". The IRAC mode of action classification online (IRAC International, 2024) (www.irac-online.org). **The World Health Organization (WHO). Recommended Classification of Pesticides by Hazard. (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>).

The sublethal effects were determined by estimating the percentage of pupation and emergence of adults in the surviving larvae. Each treatment had 10 replicates of 20 larvae each with the following concentrations: cypermethrin at 1.0, 2.0, 12.5, 25.0, and 37.5 ml l⁻¹; pirimiphos-methyl at 2.8, 5.6, and 45 ml l⁻¹; D-limonene at 14.1, 56.0, 84.0, and 112.6 ml l⁻¹; azadirachtin at 0.04, 0.08, 0.6, 1.2, and 1.8 ml l⁻¹; and pyrethrins + PBO at 0.14, 0.28, 4.5, 6.75, and 9.0 ml l⁻¹. The untreated control consisted of distilled water.

The test on the pupae was performed as described by Mohammed et al. (2021). A total of 20 pupae that were 72-hour-old were placed in a 9-cm Petri dish treated with 2.0 ml of insecticide using a Potter tower at 10 psi. The biological response windows between 0 and 100% were observed only in pirimiphos methyl, pyrethrins + PBO, and D-limonene. Cypermethrin and azadirachtin did not kill any of the houseflies at all the concentrations assessed because all the treated pupae reached the adult stage. Each treatment consisted of 10 replicates of 20 pupae each with concentrations as follows: pirimiphos methyl at 5.6, 45.0, 90.0, and 135 ml l⁻¹; d-limonene at 7.0, 14.0, 56.0, 112.0, and 224.0 ml l⁻¹; and pyrethrins + PBO at 0.14, 0.28, 1.25, 5.0, and 20.0 ml l⁻¹. The number of adults that emerged was assessed after 7 days. The maximum mortality (unemerged pupae) in untreated control was 2.0%, and thus, the mortality in the treatments was adjusted using Abbott's formula (Abbott 1925).

The insecticidal activity on all the adult houseflies was assessed as described by Subaharan et al. (2021). Three-day-old male and female flies were immobilized at -20°C for 80 s as described by Velho et al. (2020). A volume of 2 μl of each treatment was applied on the ventral side of the abdomen with a micropipette. The houseflies were then placed in 250 ml plastic containers with cotton saturated with water and 2.0% sugar inside and covered with a cloth mesh secured with an elastic band. Each treatment had 20 replicates of 20 adult houseflies. The concentrations assessed were as follows: cypermethrin 0., 1.6, 3.1, 12.5, and 25 ml l^{-1} , pirimiphos-methyl 0.5, 0.7, 1.0, 1.4, 3.0, and 50 ml l^{-1} , D-limonene 14.0, 56.0, 70.0, 84.0, 98.0, and 112.0 ml l^{-1} , azadirachtin 0.1, 1.0, 2.0, and 3.0 ml l^{-1} , and pyrethrins + PBO 0.078, 0.090, 0.125, 0.156, 0.313, and 0.625 ml l^{-1} . The mortality was recorded 24 h after treatment, and the maximum mortality in untreated control was 5.0%; it was adjusted using Abbott's formula (Abbott 1925). The bioassays were carried out in a completely randomized experimental design, and the data were analyzed using SAS (SAS Institute 1999). The data obtained in each bioassay were tested for normality using a modified Shapiro-Wilks test, and the homogeneity of variances was tested using the Levene's test (Gomez 2019). If this distribution was present, the means were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test ($p < 0.05$). The lethal concentrations that killed 50% of the treated individuals (LC_{50}) were estimated using a Probit analysis (Finney 1971) with the ecotox package of the R software (Hlina et al. 2021).

Results and Discussions

Larvicidal activity

The highest mortality was obtained with pyrethrins + PBO (61.4% at 4.5 ml l⁻¹) with an LC₅₀ = 12.4 ml l⁻¹ (Table 2). Cypermethrin at 12.5 ml l⁻¹ produced 23.5% larval mortality and 32.94% when the dose was a double rate (LC₅₀ = 135.9 ml l⁻¹). The mortality with pirimiphos-methyl did not surpass 40%. The viscosity of this insecticide was inherent in its formulation, but it hindered testing at higher concentrations. Therefore, it was not possible to establish a full mortality dosage or perform a Probit analysis. Azadirachtin did not cause larval mortality at 0.6 ml l⁻¹ and only 6.91% with three-fold treatments of this concentration. D-limonene produced 15.6% mortality at 84 ml l⁻¹ and 80% at 168 ml. This resulted in an LC₅₀ = 81.6 ml l⁻¹. The toxicity ratio 50% (TR₅₀) (LC₅₀ treatment / LC₅₀ more toxic treatment) of pyrethrins was 22.8- and 6.6-fold more toxic than cypermethrin and D-limonene.

There was a noticeable decrease in the pupation rates with increasing dosage levels and only significant differences were observed with the untreated control in the highest concentrations tested (Table 3). This suggests that certain larvae treated with the highest concentrations at 72 h remained intoxicated and did not reach the pupal stage. Azadirachtin showed no significant differences compared to the untreated control. Similar results were observed in pupae that reached the adult stage. Only high concentrations of cypermethrin, pirimiphos-methyl, and pyrethrins + PBO differed significantly from the control.

Table 2. Lethal concentration 50% (LC₅₀), slope (b), and Toxicity Ratio 50% (TR₅₀) of synthetic and natural commercial insecticides against the larvae and pupae of *Musca domestica*.

Cuadro 2. Concentración letal 50 % (CL₅₀), pendiente (b) e índice de toxicidad 50% (TR₅₀) de insecticidas sintéticos y naturales comerciales contra las larvas y pupas de *Musca domestica*.

Bioassay	Treatment	b ±SE ^a	LC ₅₀ ^b	Pr>X ^{2c}	TR ₅₀ ^d
Larvicidal	Cypermethrin	0.42 ±0.14	282.8 [19.1–939.3]	0.0022	22.8
	Pyrethrins+PBO	1.02 ±0.071	12.4 [0.5 – 29.8]	0.0018	1.0
	D-limonene	2.5 ±1.4	81.3 [70.8 – 92.65]	0.0299	6.6
Pupicidal	Pirimiphos-methyl	1.5 ±0.53	745.9 [250.9-8.1 ×10 ⁸⁷]	0.0031	15.5
	Pyrethrins+PBO	0.95 ±0.08	6.46 [4.6-9.7]	0.0001	1.0
	D-limonene	2.29 ±1.03	79.7 [66.31-95.14]	0.0264	12.3

^aSlope value. ^bLethal Concentration at 50% (ml l⁻¹ water) of effect with confidence limits at 95% probability. ^cModel fit to a straight line. ^dToxicity ratio 50% (LC₅₀ treatment /LC₅₀ more toxic treatment).

The difference in toxicity between the pyrethrins and cypermethrin may be attributed to the presence of piperonyl butoxide (PBO) in the formulation. PBO inhibits cytochrome P450 monooxygenases and esterases, which reduces the amount of insecticide resistance (Demkovich et al. 2015, Scott 2016, Zhou et al. 2022). The lower susceptibility of the larvae to insecticides, mainly pyrethroids, has been previously documented in houseflies. Fu-xing et al. (2002) documented more tolerance to pyrethroid insecticides in the larvae than the adults due to the high activity of glutathione S-transferase (GST) enzymes.

Table 3. Percentage (%) of pupation and emergence of *Musca domestica* adults from larvae treated with cypermethrin, pirimiphos-methyl, D-limonene, azadirachtin and pyrethrins + PBO.

Cuadro 3. Porcentaje (%) de pupación y emergencia de adultos de *M. domestica* a partir de larvas tratadas con cipermetrina, pirimifos metil, D-limoneno, azadiractina y piretrinas + PBO.

Insecticide	Concentration (ml l ⁻¹)	Pupation* (%)	Adult emergence (%)
Cypermethrin	0.0	95.9 a	77.8 a
	1.0	86.6 a	67.7 ab
	2.0	76.6 ab	57.1 ab
	12.5	69.1 ab	46.8 bc
	25.0	63.8 ab	38.8 bc
	37.5	60.6 b	32.5 c
CV (%)**		12.9	22.4
Pirimiphos-methyl	0.0	90.1 a	63.9 a
	2.8	85.1 a	58.6 a
	5.6	81.9 ab	54.1 a
	45.0	61.8 b	48.8 a
CV (%)		5.4	15.1
D-limonene	0.0	96.5 a	74.7 a
	14.1	96.7 a	47.2 a
	56.0	84.4 a	51.4 a
	84.0	52.2 ab	47.2 a
	112.0	20.0 b	28.6 b
CV (%)		17.4	31.4
Azadirachtin	0.0	98.7 a	54.8 a
	0.04	98.9 a	46.7 a
	0.08	95.5 a	49.4 a
	0.6	90.0 a	35.5 a
	1.2	87.6 a	39.5 a
	1.8	83.3 a	32.1 a
	CV (%)		8.4
Pyrethrins+PBO	0.0	92.3 a	91.2 a
	0.14	83.5 a	83.9 a
	0.28	64.9 a	80.9 a
	4.5	37.1 ab	79.4 a
	6.75	22.7 ab	70.5 a
	9.0	18.6 b	47.6 b
CV (%)		18.1	28.3

*The number of pupae in control was considered 100%. **Coefficient of variation (CV). Mean values in each column with different letters are significantly different at 0.05 (Tukey test; $p=0.05$) level of probability.

Organophosphates, such as pirimiphos methyl, have been used for many years to control houseflies, which have developed resistance in various regions. Unlike pyrethroids, they are primarily used to control adult flies rather than larvae (Asid et al. 2017, Alzabib et al. 2023, Pai et al. 2023, Kather et al. 2019).

The lower toxicity of azadirachtin in this study contrasts with the findings of Ali Mhazar et al. (2023), who observed 94% mortality in the third-instar larvae at 72 h with a 1.285% concentration and an 80% decrease in the formation of pupae at lower concentrations. However, Illavarasan et al. (2016) documented a larvicidal activity of 50% with a concentration of 5 ml l⁻¹, which was almost three-fold higher than the highest concentration used in this study. Our results showed that azadirachtin exhibits insecticidal activity against larvae and pupae. However, the concentration of this compound in the product is not sufficient for control, so an alternative containing a higher concentration of azadirachtin is needed for use on flies.

The monoterpene D-limonene with 73.2% concentration of essential oil of *Citrus sinensis* L. was assessed by Kumar et al. (2014), who obtained larval mortality of 50% in 2 days with a concentration of 2.01 µl cm². Although D-limonene exhibited larvicidal activity, higher concentrations were necessary to achieve mortality rates comparable to those reported in the literature. Its lower efficacy may be due to the formulation and method used to study its activity.

Pupicidal activity

The pupae were the least susceptible to the insecticides tested. The only insecticide that showed significant toxicity at a commercial dose was the pyrethrins + PBO with 42% mortality ($LC_{50} = 6.46 \text{ ml l}^{-1}$). The rest of the insecticides exhibited mortality $< 10\%$ at a commercial dose, and cypermethrin and azadirachtin were less toxic (0% of dead pupae in all the concentrations tested). The concentrations of insecticides increased to achieve mortality rates from 0 to 100% for a Probit analysis. A three-fold higher dose of pirimiphos-methyl resulted in a maximum mortality rate of 27.7%, whereas a four-fold concentration of D-limonene (336 ml l^{-1}) achieved a mortality rate of 97.9%. The TR_{50} indicated that the treatment with pyrethrins + PBO was 115.5- and 12.3-fold more toxic than pirimiphos-methyl ($LC_{50} = 745.9 \text{ ml l}^{-1}$) and D-limonene ($LC_{50} = 79.7 \text{ ml l}^{-1}$) (Table 2). There were no significant differences between pirimiphos-methyl and azadirachtin in terms of adult emergence. In the rest of the insecticides, only the highest concentrations were significantly different from the control (Table 4).

The tolerance of pupae to insecticides is associated with a decrease in the rates of absorption of insecticides given the thickening of the cuticle (Koganemaru et al. 2013, Strycharz et al. 2013, Fang et al. 2015, Balabanidou et al. 2018). However, these results are not consistent with those of Ali-Mhazar et al. (2023), who assessed the ability of cypermethrin and azadirachtin to inhibit *M. domestica* pupae and concluded that both insecticides considerably decreased the rate of emergence of adults.

Similarly, Illavasaran et al. (2016) found that azadirachtin has significant pupicidal activity at five days after treatment. However, in their study, the authors did not use a commercial insecticide of neem but rather a freshly extracted fruit oil, which probably had a greater concentration of azadirachtin than the formulated insecticide.

Table 4. Adult emergence of *M. domestica* from the pupae treated with pirimiphos-methyl, D-limonene, and pyrethrins+PBO.

Cuadro 4. Porcentaje de emergencia de pupas de *M. domestica* tratadas con los insecticidas pirimifos metil. D-limonene y piretrinas + PBO.

Insecticide	Concentration (ml l⁻¹)	Adult emergence (%)
Pirimiphos-methyl	0.0	75.4 a
	5.6	68.3 a
	45.0	58.1 a
	90.0	54.1 a
	135.0	53.4 a
CV (%) [*]		15.1
D-limonene	0.0	80.0 a
	7.0	75.1 a
	14.0	61.8 a
	56.0	51.5 a
	113.0	49.0 ab
	224.0	20.0 b
CV (%)		31.1
Pirethrins + PBO	0.0	90.0 a
	0.14	84.3 a
	0.28	75.9 a
	1.25	77.0 a
	5.0	67.9 ab
	2.0	34.0 b
	CV (%)	

^{*}Coefficient of variation (CV). Mean values in each column with different letters are significantly different at 0.05 (Tukey test; $p=0.05$) probability level.

Adulticidal activity

The control of *M. domestica* in barns and homes target adults by applying insecticides to the walls, ceiling and equipment. The larvae can be controlled by removing manure, feces, and refuse (Watson et al. 2017). Therefore, focusing control measures on adult houseflies is considered an effective approach for reducing their population density. Pyrethrins + PBO were the most toxic in adults, and nearly 100% of the flies were killed at an LC_{50} of 0.55 ml l^{-1} . Cypermethrin, with an LC_{50} of 0.62 ml l^{-1} , killed 69%. The confidence limits of both treatments overlapped, thus indicating non-statistical differences as suggested by Robertson et al. 2007 (Table 5). Pirimiphos-methyl ($LC_{50} = 1.1 \text{ ml l}^{-1}$) was significantly less toxic than cypermethrin but not significantly different from pyrethrins + PBO. Azadirachtin and D-limonene produced < 10% mortality. A double rate of D-limonene and azadirachtin achieved 81.3% and 42.0% mortality of the flies. The TR_{50} indicated that the pyrethrins + PBO were 1.3, 2.0, 196.2, and 89.1 more toxic than cypermethrin, pirimiphos-methyl, d-limonene, and azadirachtin (Table 5).

Table 5. Lethal concentration 50% (LC₅₀), slope (b), and Toxicity Ratio 50% (TR₅₀) of synthetic and natural commercial insecticides against adults of *M. domestica*.

Cuadro 5. Concentración letal 50 % (CL₅₀), pendiente (b) e índice de toxicidad 50% (TR₅₀) de insecticidas sintéticos y naturales comerciales contra adultos de *M. domestica*.

Insecticide	b ±EE^a	LC₅₀^b	Pr>X^{2c}	RT₅₀^d
Cypermethrin	1.83± 0.154	0.623 [0.513- 0.764]	0.171	1.3
Pirimiphos-methyl	2.53±0.28	1.1 [0.97 – 1.25]	0.249	2.0
Pyrethrins+PBO	0.999±0.08	0.552 [0.08 – 2.35]	<0.001	1.0
D-limonene	2.3±0.93	108.3 [0.51 – 1070.5]	0.527	196.2
Azadirachtin	1.88±0.75	49.2 [30.8 – 144.7]	0.0128	89.1

^aSlope value. ^bLethal Concentration at 50% (ml l⁻¹ water) of effect with confidence limits at 95% probability. ^cModel fit to a straight line. ^dToxicity ratio 50% (LC₅₀ treatment /LC₅₀more toxic treatment).

The high toxicity of pyrethrins combined with piperonyl butoxide, including its larvicidal efficacy, may be attributed to the presence of piperonyl butoxide in the formulation. Joffe et al. (2011) observed that the combination of PBO with pyrethrum resulted in 100% mortality of the houseflies, which was not achieved by any of the other natural products tested. Licup et al. (2024) reported that treatment with cypermethrin + tetramethrin + PBO resulted in 98.4% mortality at 15 min compared to 65.5% without PBO.

The low toxicity of cypermethrin against adult houseflies was also observed by Ahmadi et al. (2020), who assessed different populations of houseflies from dairy cattle farms, registering resistance ratios (RR) (LC₅₀ field population /LC₅₀

susceptible population) of 45 and 180-fold for the pyrethroids deltamethrin and cypermethrin. Pai et al. (2023) compared five populations of *M. domestica* and found that cypermethrin and pirimiphos-methyl showed a 100% mortality in a susceptible population, while a maximum toxicity between 70% and 10% of mortality was achieved in urban colonies. These researchers stated that pyrethroids and organophosphates have been used extensively to control houseflies, which may have led to an increase in cases of resistance.

Acknowledgment

We would like to thank the Universidad de Concepción and the Entomología y Acarología Agropecuaria laboratory for their support and funding in conducting this study.

References Cited

- Abbas, N., Ali Shad, S., y Ismail, M. (2015). Resistance to conventional and new insecticides in house flies (Diptera: Muscidae) from poultry facilities in Punjab, Pakistan. *Journal of Economic Entomology*, 108(2), 826–833. <https://doi.org/10.1093/jee/tou057>
- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Ahmadi, E., Jahangir Khajehali, y Fariborz Rameshgar. (2020). Evaluation of resistance to permethrin, cypermethrin and deltamethrin in different populations of *Musca domestica* (L.), collected from the Iranian dairy cattle farms. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.01.014>

- Ali-Mhazar, R. M., Muhammad, H. B., Muhammad, I. S., Sheraz, U. H., Sunaila, K., Hajra, S., Aqsa, B., Kiran, L., and Kamwan, W. (2023). Comparative efficacy of botanical extracts along with their biosynthesized zinc oxide nanoparticles against house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *University of Sindh Journal of Animal Sciences*, 7(04), 61–68. <https://doi.org/10.57038/usjas.v7i04.6648>
- Al-Jasime, Z. A., y Mehdi , N. S. (2019). Biological, biochemical and histological effects of supernemic (neem oil) on house fly *Musca domestica* L. larvae. *Biochemical y Cellular Archives*, 19(2), 4035–4041. <https://doi.org/10.35124/bca.2019.19.2.4035>
- Alzabib, A. A., Al-Sarar, A. S., Yasser Abobakr, y Saleh, A. A. (2023). Single and Combined Mutations of Acetylcholinesterase Gene Giving Resistance to Pirimiphos-Methyl in *Musca domestica* Slaughterhouse Populations. *Insects*, 14(3), 218–218. <https://doi.org/10.3390/insects14030218>
- Asid, A. N., Al-Ghamdi, K. M., Mangoud, A., Al-Asiry, K., Alkenani, N., y Anwar, Y. (2017). Synergistic effect of insecticides on the larvae and adults of housefly, *Musca domestica* L. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(4), 899–905.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., y Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>
- Dad Buner, I., Yousuf, M. J., y Anjum, S. I. (2011). Determination of LC50 of Chlorpyrifos and Neem extract on third instar larvae of house flies and their effect on fecundity. *Journal of Basic y Applied Sciences*, 7(2), 169–174. <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2011.07.02.15>
- Demkovich, M., Dana, C. E., Siegel, J. P., y Berenbaum, M. R. (2015). Effect of piperonyl butoxide on the toxicity of four classes of insecticides to navel orangeworm (*Amyelois transitella*) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(6), 2753–2760. <https://doi.org/10.1093/jee/tov237>
- Fang, F., Wang, W., Zhang, D., Lv, Y., Zhou, D., Ma, L., Shen, B., Sun, Y., y Zhu, C. (2015). The cuticle proteins: a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitology Research*, 114(12), 4421–4429. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4683-9>

- Feng, X., y Liu, N. (2020). Functional analyses of house fly carboxylesterases involved in insecticide resistance. *Frontiers in Physiology*, 11, 595009. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.595009>
- Freeman, J. C., Ross, D. H., y Scott, J. G. (2019). Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.006>
- Fu-xing, Z., Mo, W., y Ben-hua, T. (2002). Differences in susceptibility to insecticides between adults and larvae of housefly, (*Musca domestica* L.). *Insect Science*, 9(2), 23–27. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2002.tb00466.x>
- Gomez, K. A., and Gomez, A. A. (2019). Statistical Procedures for Agricultural Research. 2nd ed. John Wiley y Sons, Laguna, Philippines.
- Hlina, B. L., Birceanu, O., Robinson, C. S., Dhiyebi, H., y Wilkie, M. P. (2021). The relationship between thermal physiology and lampricide sensitivity in larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Journal of Great Lakes Research*, 47(1), S272–S284. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002>
- Illavarasan S., A. Jagadeeswaran, P. Shamsudeen, y A. Arivuchelvan. (2016). Evaluation of neem products for their larvicidal and pupicidal efficacies in comparison with cyromazine against the house fly (*Musca domestica*) in poultry. *Journal of Enviromental Sciences*, 30(1). <http://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810140401>
- Joffe, T., Gunning, R. V., Allen, G. R., Kristensen, M., Alptekin, S., Field, L. M., y Moores, G. D. (2011). Investigating the potential of selected natural compounds to increase the potency of pyrethrum against houseflies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, 68(2), 178–184. <https://doi.org/10.1002/ps.2241>
- Khan, H. A. A., Akram, W., y Shad, S. A. (2014). Genetics, cross-resistance and mechanism of resistance to spinosad in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Acta Tropica*, 130, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.006>

- Khater, H. F., y Geden, C. J. (2019). Efficacy and repellency of some essential oils and their blends against larval and adult house flies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 256–263. <https://doi.org/10.1111/jvec.12357>
- Koganemaru, R., Miller, D. M., y Adelman, Z. N. (2013). Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.001>
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., y Satya, S. (2011). Insecticidal Evaluation of essential oils of *Citrus sinensis* L. (Myrtales: Myrtaceae) against housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Parasitology Research*, 110(5), 1929–1936. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2719-3>
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., y Satya, S. (2014). Biocontrol potential of essential oil monoterpenes against housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.013>
- Learmount, J., Chapman, P., y MacNicoll, A. (2002). Impact of an insecticide resistance strategy for house fly (Diptera: Muscidae) control in intensive animal units in the United Kingdom. *Journal of Economic Entomology*, 95(6), 1245–1250. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.6.1245>
- Licup, B. P. E., Purnamasari, L., Olarve, J. P., y Dela Cruz, J. F. (2024). Evaluation of adulticidal efficacy of cypermethrin, tetramethrin, and piperonyl butoxide in housefly (*Musca domestica*). *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 16(3), 222–228. <https://doi.org/10.20473/jkl.v16i3.2024.222-228>
- Mansour, S. A., Bakr, R. F. A., Mohammed, R. I., y Hasaneen, N. M. (2011). Larvicidal activity of some botanical extracts, commercial insecticides and their binary mixtures against the housefly, *Musca domestica* L. *The Open Toxicology Journal*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.2174/1875414701104010001>
- Masciocchi, M. (2016). “Mosca doméstica” *Musca domestica*. Serie de Divulgación Sobre Insectos de Importancia Ecológica, Económica Y Sanitaria, Cuadernillo N°12. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Bariloche, Argentina.

- Mohammed, A. A., Ahmed, F. A., Kadhim, J. H., y Salman, A. M. (2021). Susceptibility of adult and larval stages of housefly, *Musca domestica* to entomopathogenic fungal biopesticides. *Biocontrol Science and Technology*, 31(10), 1016–1026. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1917513>
- Pai, H.-H., Chang, C.-Y., Lin, K.-C., y Hsu, E.-L. (2023). Rapid insecticide resistance bioassays for three major urban insects in Taiwan. *Parasites y Vectors*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06055-x>
- Rutz, D. A., Geden, C. J., and Pitts, C. (2015). *Recomendaciones para el manejo de plagas en el ganado vacuno*. International System for Agricultural Science and Technology (AGRIS). <http://hdl.handle.net/1813/42391>
- SAS Institute. (1999). SAS Language Reference. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Scott, J. G. (2016). Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest Management Science*, 73(4), 716–722. <https://doi.org/10.1002/ps.4328>
- Shi, J., Zhang, L., y Gao, X. (2011). Characterisation of spinosad resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, 67(3), 335–340. <https://doi.org/10.1002/ps.2073>
- Soyelu, O. J., Oluwamakinde, B. A., y Okonji, R. E. (2020). Effect of neem, siam weed and vetiver oils on physiological reactions and fitness of house fly, *Musca domestica* L. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 24(3), 519–523. <https://doi.org/10.4314/jasem.v24i3.20>
- Strycharz, J. P., Lao, A., Li, H., Qiu, X., Lee, S. H., Sun, W., Yoon, K. S., Doherty, J. J., Pittendrigh, B. R., y Clark, J. M. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant 91-R strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(2), 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.010>
- Subaharan, K., Senthoorraja, R., Manjunath, S., Thimmegowda, G. G., Pragadheesh, V. S., Bakthavatsalam, N., Mohan, M. G., Senthil-Nathan, S., David, K. J., Basavarajappa, S., y Ballal, C. (2021). Toxicity, behavioural and biochemical effect of *Piper betle* L. essential oil and its constituents against housefly, *Musca domestica* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 174, 104804. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104804>

- Velho, M. C., Cossetin, L. F., Godoi, S. N. de, Santos, R. C. V., Gündel, A., Monteiro, S. G., y Ourique, A. F. (2020). Nanobiopesticidas: Desenvolvimento e atividade inseticida de nanoemulsões contendo óleo de limão-siciliano ou óleo de eucalipto. *Natural Product Research*, 35(24), 6210–6215. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1837809>
- Watson, D. W., Waldron, J. K., y Rutz, D. (2017). *El manejo integrado de las moscas en y alrededor de los establos de vacas lecheras y ganado*. International System for Agricultural Science and Technology (AGRIS). <http://hdl.handle.net/1813/47683>
- Zhang, Y., Guo, M., Ma, Z., You, C., Gao, X., y Shi, X. (2019). Esterase-mediated spinosad resistance in house flies *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Ecotoxicology*, 29(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02125-y>
- Zhou, G., Li, Y., Jeang, B., Wang, X., Cummings, R., Zhong, D., y Yan, G. (2022). Emerging mosquito resistance to piperonyl butoxide-synergized pyrethroid insecticide and its mechanism. *Journal of Medical Entomology*, 59(2), 638–647. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab231>

CAPÍTULO II. Adulticidal and repellent activity of essential oils from 3 cultivated aromatic plants against *M. domestica*

Gabriela Oyarce ^{1*}, Patricia Loyola¹, Michelle Iubini-Aravena¹, Álvaro Romero², J.C. Rodríguez-Maciel³, José Becerra⁴ y Gonzalo Silva-Aguayo¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.

²Envu. 5000 CentreGreen Way, Suite 400, Cary, NC 27513. USA

³Posgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México.

⁴Laboratorio de Química de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, Concepción 4070386, Chile.

Revista: Insects

Fecha de envío: 22 de marzo del 2025 **Fecha de publicación:** 20 de mayo del 2025

Resumen

La mosca común (*Musca domestica* L.) transmite enfermedades tanto a los animales como a las personas. El control de estos insectos se basa en el uso de insecticidas, pero estos productos químicos son cada vez menos eficaces y plantean problemas de seguridad para el medio ambiente y las personas, por lo que es necesario la búsqueda de alternativas. Dado esto, este trabajo evaluó la actividad insecticida y repelente de los aceites esenciales de eucalipto, hinojo y salvia contra adultos de *M. domestica* en condiciones de laboratorio. Los resultados de estos bioensayos indicaron que los tres aceites demostraron propiedades insecticidas y repelentes; El aceite de eucalipto fue el fumigante más eficaz, eliminando al 100% de los adultos con la concentración de 34 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire, mientras que el aceite de hinojo mostró mayor toxicidad por contacto, con una mortalidad del 100 % a 150 $\mu\text{L L}^{-1}$. Todos los aceites mostraron un porcentaje de repelencia mayor al 85% en concentraciones inferiores a 20 $\mu\text{L L}^{-1}$. Estos hallazgos destacan la efectividad de

los aceites esenciales y sus componentes como alternativas ecológicas al uso de insecticidas sintéticos.

Abstract

The house fly, *Musca domestica* L., is a pest of great medical and agricultural importance, serving as a vector for various diseases and undermining the quality of agricultural products. Traditionally, synthetic insecticides have been the primary means of control; however, their efficacy has declined over time, and they are now less preferred due to their safety and environmental concerns. This study evaluated the insecticidal and repellent properties of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Foeniculum vulgare* and *Salvia officinalis* against *M. domestica*. All EOs exhibited insecticidal activity: eucalyptus achieved 100% fumigant mortality at 34 $\mu\text{L L}^{-1}$ air and showed the lowest LC_{50} (18.1 $\mu\text{L L}^{-1}$ air), while fennel and sage required 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ air. In contrast, fennel showed the highest contact toxicity (100% mortality at 150 $\mu\text{L L}^{-1}$). Repellency exceeded 87% for all EOs, with sage being the most repellent at the lowest concentration tested (94% at 5 $\mu\text{L L}^{-1}$). These results highlight the potential use of essential oils and their constituents as environmentally friendly alternatives for the control of *M. domestica*. However, further field validation and studies on individual components and their synergistic combinations are needed to understand their efficacy and fully optimize their use.

Keywords: essential oils, biopesticides, pest management, housefly.

1. Introduction

The housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), is an insect species closely linked to human settlements and livestock production systems. It has a cosmopolitan distribution and is commonly found in urban, peri-urban, and agricultural areas, especially in buildings that house birds and livestock [1]. This species rapidly completes its life cycle, often in less than two weeks, and can produce up to 12 generations in a single summer [2]. Houseflies flourish in environments abundant in organic matter, such as animal manure, soiled animal bedding, and household waste [3].

M. domestica is a pest because of its feeding and reproductive behaviors, and it acts as a vector for over 100 species of pathogenic microorganisms that affect humans and domestic animals. These pathogens include those responsible for infant diarrhea, anthrax, cholera, taeniasis, typhoid fever, trypanosomiasis, anaplasmosis, and tuberculosis, among others [4]. The increase in house fly populations causes discomfort and stress in animals, reducing livestock product yields and complicating their commercialization when contamination occurs [3].

Synthetic contact insecticides have been used for years to control this pest due to their low cost and effectiveness [5]. However, the extensive use of these insecticides has resulted in resistance among housefly populations, primarily to pyrethroids, with over 80 documented cases worldwide [6]. Additionally, users are

increasingly concerned about the environmental risks and consequences associated with synthetic insecticides [7]. Therefore, there is an urgent need to explore alternative control methods that are environmentally friendly, non-toxic, and less likely to cause resistance.

Among these alternatives are essential oils (EOs), complex aromatic substances derived from plants. These oils play vital roles in plant defense and signaling, such as attracting pollinators and beneficial insects [8,9]. The main components of EOs are plant secondary metabolites with significant pest control potential [10]. These are well established as multifunctional bioactive agents, with comprehensive reviews documenting their broad-spectrum insecticidal, repellent, and growth-disrupting properties against arthropod pests [11–13]. These studies highlight their efficacy in fumigation, oviposition deterrence, and contact toxicity, mechanisms often linked to their dominant terpenoid constituents. Botanical extracts are also environmentally friendly, safe, and non-toxic to humans, pets, and other non-target organisms [14]. Additionally, the large-scale production of plant EOs for the perfume and food industries ensures their availability at low prices, and their extraction does not harm the environment [15]. This research aimed to evaluate the fumigant properties, contact toxicity, and repellency of EOs from eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), and sage (*Salvia officinalis* L.) against adult *M. domestica* under laboratory conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*; Product Code: 7545) and sage (*Salvia officinalis*; Product Code: 7610) essential oils were commercially sourced from Now® Essential Oils (Now Foods, Bloomingdale, IL, USA), with certified 100% purity. According to the manufacturer's specifications, both oils were distilled with steam, with eucalyptus distilled from leaves and small branches, and sage distilled from partially dried leaves. In contrast, fennel (*Foeniculum vulgare*) essential oil was produced in-house via hydro distillation using a Clevenger apparatus (4 h, 1:10 plant-to-water ratio) and dried aerial parts (leaves and flowers; harvested [March/2018]). For all bioassays, the essential oils were diluted in high-purity acetone (99.5%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany; CAS 67-64-1) to ensure consistency in the test solutions.

2.2. Insect rearing

Adult specimens of *M. domestica* were collected in the field using entomological nets at the Estación Experimental Ganadera of the Faculty of Veterinary Sciences at Universidad de Concepción and then transferred to the Laboratorio de Entomología y Acarología Agropecuaria at the Faculty of Agronomy of the Universidad de Concepción. Management practices for houseflies at the experimental station included the removal of animal feces and bedding every 15 days, along with the application of AGITA® WG (Neonicotinoid, Thiametoxam insecticide [10% (w/w), water-dispersible granules, Kwizda Agro,

Germany]) at the start of the summer season. The origin of the individuals used in the bioassays was not specified as they were not reared in discrete generations. To prevent inbreeding, field-collected individuals were added to the colony annually.

Rearing was performed based on the protocol by [15] with modifications. *M. domestica* specimens were kept at 27 ± 1 °C, $50 \pm 5\%$ relative humidity, and a 16: 12 hours light: darkness photoperiod in a bioclimatic chamber (Memmert GmbH IPS 749, Schwabach, Germany) inside cubic shaped meshes (50 x 50 x 50 cm). Adults were fed ad libitum with distilled water and granulated sugar in separate Petri dishes. A mixture of wheat bran and whole milk with 2%(w/v) granulated sugar was provided for oviposition. Eggs were collected twice a week and stored in modified paper containers. Larvae were fed with moistened strips of paper with milk and 2% (w/v) sugar disposed inside the containers.

2.3. Chemical analysis of EOs

The chemical composition of EOs was determined using a gas chromatograph (GC,Agilent 7890, Santa Clara, CA, USA) coupled with an HP-5MS capillary column (length of 30 m, inner diameter of 0.25 mm, thin film of 0.25 µm and injection volume of 1 µL). The initial temperature of the equipment was 60 °C, which was maintained for 5 min, with an increase of 10 °C every minute until 280 °C, where it was held for 15 min. The relative percentages of the compounds from *E. globulus*, *F. vulgare* and *S. officinalis* were obtained using

helium as the mobile phase and a mass selective detector (Agilent 5975 C, Santa Clara, CA, USA), and the components were identified using the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 17).

2.4. Bioassays

2.4.1. Fumigant toxicity assay

Fumigant activity was evaluated using a device developed by the Laboratorio de Entomología y Acarología Agropecuaria [16] (Figure 1). The setup consisted of a 500 mL plastic container with a modified lid containing two perforations. A small test tube lid was inserted through the perforations, and an Eppendorf tube was secured using a transparent tulle mesh. Inside the Eppendorf tube, a piece of filter paper was placed and impregnated with the corresponding volume of EOs. The tulle mesh acted as a physical barrier to prevent direct contact between the flies and the impregnated filter paper while allowing the dispersion of volatile compounds within the container. A cotton swab moistened with distilled water and a 2% (w/v) sugar solution was placed inside the container. Each treatment included five replicates and fifteen adult flies (1–3 days old) per container, without sex differentiation. The untreated control consisted of filter paper placed in the tube without impregnation. Mortality was assessed 48 h after exposure to the treatment.



Figure 1. Outline the components of the fumigant test device, showing the sample test tube lid (A), the tulle mesh (B), the Eppendorf tube (C), and the filter paper (D).

2.4.2. Contact toxicity assay

The insecticidal activity was assessed in adult flies using a modified version of the method described by [17], where individuals were exposed topically instead of to impregnated filter paper for better exposure control. Three-day-old flies, without sex differentiation, were immobilized by placing them at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 90 s. Then, $1\text{ }\mu\text{L}$ of each essential oil (EO), diluted in acetone, was applied to the ventral side of the abdomen. Each treatment consisted of five replicates, with fifteen adult flies per replicate, and an untreated control (acetone only) was included. After treatment, the flies were transferred to 500 mL plastic containers containing a cotton ball saturated with distilled water and a 2% (w/v) sugar solution. The containers were covered with tulle netting. Mortality was recorded 24 h

2.4.3. Repellency assay

Repellency was evaluated using the method of [18] with modifications (Figure 2). Two Büchner flasks were placed in an entomological cage (100 × 80 × 80 cm) and connected to an aquarium air pump probe. The airflow, previously filtered with activated carbon and distilled water, was displaced through the probe. Inside each flask, 1 mL of 0.5, 1.0, and 2.0% (v/v) solution of diluted EO was added to 9 mL of milk for the treatment and 1 mL of acetone with 9 mL of milk for the control. The airflow was constantly adjusted to 0.5 L min⁻¹ with a flow meter. In the center of the cage, fifty 7-day-old flies were released, and the number of flies that landed in each flask was counted after 2 h. Five replicates were considered for each concentration, and the repellency percentage was calculated using the following formula [19]:

$$R(\%) = \left(\frac{C - T}{C} \right) \times 100$$

C = number of flies in the control, T = number of flies in the treatment.

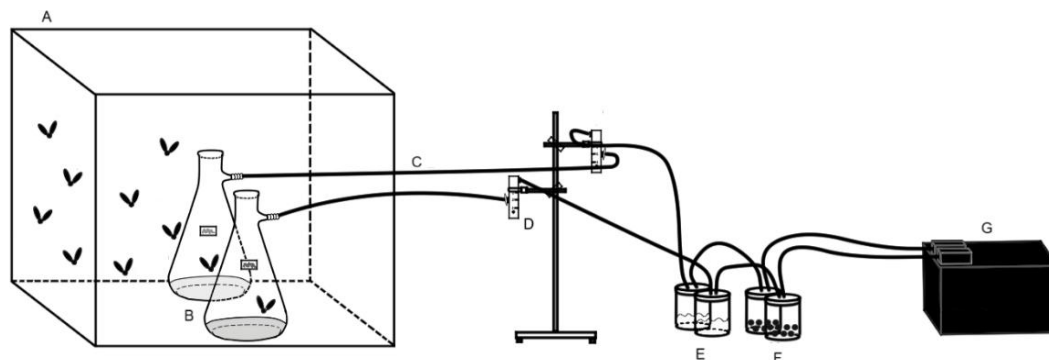


Figure 2. Scheme of the repellency test where the cage (A), the control and treatment Büchner flasks inside (B), the probe (C) that connects them to the flow meter (D), flask with distilled water (E), flask with activated carbon (F) and the fish tank pump (G).

2.5. *Data analysis*

Bioassays were conducted using a completely randomized experimental design. The data obtained were statistically analyzed using the Statistical Analysis System (SAS) software Version 9.00. [20]. Mortality percentages were corrected using Abbott's formula [21], and mean comparisons were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test ($p < 0.001$). Additionally, a Probit analysis was conducted to estimate the LC₅₀ and LC₉₀ values with 95% confidence intervals (CI) using the R package "ecotox" [22]. LC values were considered significantly different when their 95% CIs did not overlap. Chi-square and p-values were also reported in this analysis.

3. Results

3.1. Chemical composition of EOs

All EOs exhibited distinct chemical compositions, with a higher presence of monoterpene hydrocarbons (MHs). However, oxygenated monoterpenes (MOs) were the most abundant compounds (Figure 3). Eucalyptus and sage also contained sesquiterpene hydrocarbons (SHs) and oxygenated sesquiterpenes (SOs), with sage showing the most remarkable chemical diversity. In contrast, fennel was composed exclusively of monoterpenes.

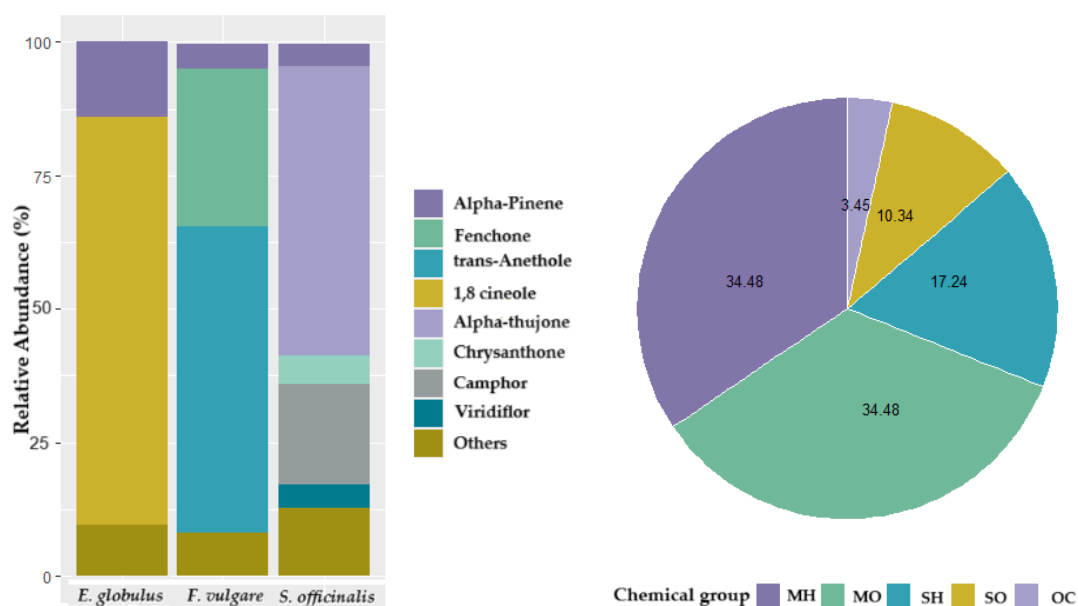


Figure 3. Chemical composition of eucalyptus, fennel, and sage essential oils. a) A stacked plot bar shows each tested EO's relative abundance of components. "Others" represents the sum of 35 compounds with an overall abundance lower than 5%. b) Circular plot shows the percent of compounds, and their chemical classes identified in all the EOs studied (MH: Monoterpene hydrocarbon, MO: Monoterpene oxygenated, SH: Sesquiterpene hydrocarbon, SO: Sesquiterpene oxygenated, OC: other compounds).

Alpha-pinene was present in all EOs, with an abundance of at least 4%, while Beta-pinene, Beta-myrcene, and Gamma-terpinene each accounted for less than 1% of the total composition (Table 6). The predominant compounds in eucalyptus EO were the monoterpene Alpha-pinene (14%) and the MO 1,8-cineole (76.5%). In fennel, the MOs fenchone (29.5%) and trans-anethole (57%) were the main components, while in sage, the MOs camphor (18.8%) and Alpha-thujone (54.3%) were the most abundant.

3.2. Fumigant toxicity

All the evaluated EOs showed fumigant toxicity against adult house flies (Figure 4). The three treatments (eucalyptus, fennel, and sage essential oils) achieved 100% mortality at 34, 50, and 50 $\mu\text{L L}^{-1}$ air, respectively. At the LC_{90} level, eucalyptus essential oil proved to be the most effective treatment at 25.8 $\mu\text{L L}^{-1}$ air. There were no significant differences in the LC_{90} between fennel and sage essential oils, with values of 41.2 and 47.7 $\mu\text{L L}^{-1}$ air, respectively (Table 7).

Table 6. Chemical composition, relative abundance and classification of the components from evaluated essential oils.

Compounds	RT¹ (min)	<i>Eucalyptus</i> <i>globulus</i> (%)	<i>Foeniculum</i> <i>vulgare</i> (%)	<i>Salvia</i> <i>officinalis</i> (%)
α-Pinene	5.702	14	4.644	4.03
Camphene	5.976	-	0.366	2.39
β-Phellandrene	6.455	-	0.108	-
β-Pinene	6.517	0.312	0.257	0.437
β-Myrcene	6.79	0.364	0.556	0.424
α-phellandrene	7.056	-	1.759	-
o-Cymene	7.449	-	0.143	0.277
D-limonene	7.541	-	1.897	0.916
1,8-Cineole	7.579	76.475	-	2.16
Γ-terpinene	8.127	0.272	0.438	0.27
L-Fenchone	8.75	-	29.489	-
α-Thujone	9.125	-	-	54.32
Chrysanthone	9.27	-	-	5.33
Camphor	9.821	-	0.466	18.8
Borneol	10.189	-	-	1.052
Terpinen-4-ol	10.403	-	-	0.275
Estragole	10.766	-	2.14	-
Bornyl acetate	12.331	-	-	0.565
Trans-anethole	12.434	-	57.278	-
Camphene	13.405	3.07	-	-
α-Gurjunene	14.45	2.589	-	-
Caryophyllene	14.613	-	-	1.583
Humulene	15.151	-	-	1.352
Aromadendrene	15.264	1.389	-	-
(+)-Ledene	15.79	-	-	0.51
Epiglobulol	16.769	0.204	-	-
Globulol	17.137	0.966	-	-
Viridiflorol	17.251	0.358	-	4.21
Epimanool	24.027	-	-	0.588
Monoterpene hydrocarbon		18.018 (5)	10.168 (9)	8.744 (7)
Oxygenated monoterpene		76.475 (1)	89.373 (4)	82.502 (7)
Sesquiterpene hydrocarbon		3.978 (2)	-	3.445 (3)
Oxygenated sesquiterpene		1.528 (3)	-	4.21 (1)
Others		-	-	0.588 (1)
Total identified (%)		99.999	99.541	93.489

¹RT: Retention index.

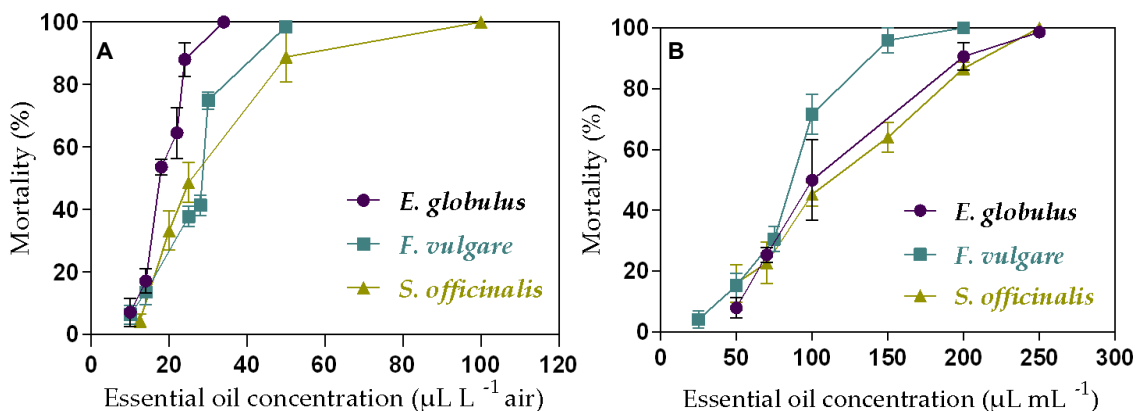


Figure 4. (A) Fumigant and (B) contact toxicity of the EOs of eucalyptus, fennel, and sage against *M. domestica* adults.

Table 7. Fumigant toxicity lethal concentrations of 50% (LC₅₀) and 90% (LC₉₀) of the evaluated essential oils against *M. domestica* adults.

Essential oils	LC ₅₀ (LC 95%)* ($\mu\text{L L}^{-1}$ aire)	LC ₉₀ (LC 95%)* ($\mu\text{L L}^{-1}$ aire)	Equation	Chi-Square	PGOF**
Eucalyptus (<i>E. globulus</i>)	18.1 a [17.3–19.0]	25.8 a [24.4–27.6]	$Y = 0.168x - 3.05$	6.47	0.167
Fennel (<i>F. vulgare</i>)	26.6 b [22.3–31.9]	41.2 b [34.9–56.8]	$Y = 0.088x - 2.34$	13.8	0.008
Sage (<i>S. officinalis</i>)	28.2 b [20.8–39.9]	47.7 b [37.2–85.4]	$Y = 0.0658x - 1.85$	9.25	0.02

*Lethal concentration at 50 and 90% effectiveness with their respective fiducial limits at 95% probability, **p-values for the goodness of fit test. Different letters in the same column indicate that their confidential limits do not overlap.

3.3. Contact toxicity

Similarly, all EOs exhibited contact toxicity (Figure 4). At the LC₉₀ level, the treatment with the highest contact toxicity was fennel essential oil at $130 \mu\text{L L}^{-1}$ (Table 8). The eucalyptus and sage essential oils behaved very similarly, as their cut-off values overlapped.

Table 8. Contact toxicity lethal concentration 50% and 90% of the evaluated essential oils against *M. domestica* adults.

Essential oils	LC ₅₀ (LC 95%)* ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	LC ₉₀ (LC 95%)* ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Equation	Chi-Square	PGOF**
Eucalyptus (<i>E. globulus</i>)	111 ab [91.1–131]	180 b [155–229]	Y = 0.0184x – 2.03	10.5	0.033
Fennel (<i>F. vulgare</i>)	86.7 a [81.2–92.5]	130 a [121–142]	Y = 0.0297x – 2.57	3.51	0.476
Sage (<i>S. officinalis</i>)	117 b [108–127]	203 b [188–222]	Y = 0.0150X – 1.76	4.15	0.386

*Lethal concentration at 50 and 90% effectiveness with their respective fiducial limits at 95% probability, **P-values for the goodness of fit test. Different letters in the same column indicate that their confidential limits do not overlap.

3.4. Repellency

All essential oils demonstrated repellency against adult *M. domestica*. Eucalyptus EO at a $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ concentration showed significantly lower repellency (53%) than all other concentrations evaluated (Figure 5). In contrast, fennel and sage EOs exhibited repellency percentages more significant than 85% across all tested concentrations, with no significant differences.

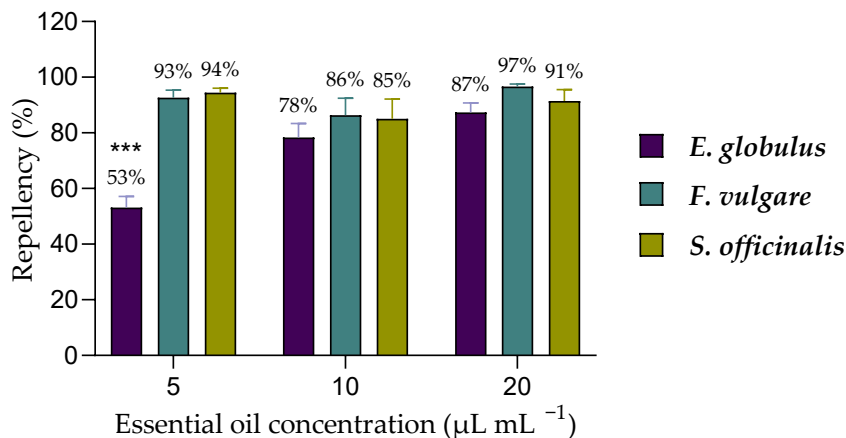


Figure 5. Repellence of *M. domestica* by eucalyptus, fennel, and sage EOs. “***” indicates significant differences in percent repellency between concentrations as determined by a one-way ANOVA test with a p-value (<0.005).

4. Discussion

Monoterpenes are among the primary components of essential oils, consisting of two isoprene units formed by ten carbon atoms. They are divided into two main groups: hydrocarbon monoterpenes and oxygenated molecules. The latter are also known as monoterpenoids and include oxygenated functional groups in their structure [9]. Recent studies indicate that the bioactivity of monoterpenes is linked to their effects on the nervous system, with the ability to alter the function of ion channels, such as γ -aminobutyric acid type A receptors (GABAARs), nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), tyramine receptors (TA), octopamine receptors (OA), transient receptor potential (TRP) channels, and enzymes like acetylcholinesterase (AChE) and Na⁺/K⁺-ATPase in insects [23,24].

Eucalyptus EO exhibited the strongest fumigant toxicity in our study, attributable to its main components, 1,8-cineole (76.5%) and α -pinene (14%). These results align with [25], which reported comparable fumigant activity for *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth EO against *M. domestica* adults, achieving 100% mortality within 15 min. Notably, *E. cinerea* EO contained an even higher 1,8-cineole concentration (>90%), further supporting its pivotal role in toxicity. The insecticidal potency of 1,8-cineole is further supported by [26], where 1,8-cineole exhibited multiple toxic effects at 5.0 mg kg⁻¹, causing direct larval toxicity through ingestion (LC₅₀ = 1.59 mg kg⁻¹), reducing pupation rates by 67.5% and adult emergence by 75%. Additionally, biochemical analyses revealed its capacity

to competitively inhibit cytochrome P450 enzymes. These findings underscore 1,8-cineole's efficacy as both a fumigant on adults and larvicide, highlighting its versatility as an insecticide.

The EO with the highest contact toxicity, *Foeniculum vulgare*, typically contains trans-anethole (48–90%) and fenchone (3–10%) as major components, along with minor constituents such as estragole, α -pinene, and p-cymene [12,27]. Our analysis revealed a similar profile, though with a notably higher fenchone content (29.5%) compared to the literature, while trans-anethole (57.3%) fell within the reported range (Table 6). The insecticidal activity of fennel EO and its primary components has been well documented. For example, [14] reported that trans-anethole exhibited the highest toxicity against *M. domestica* larvae and pupae ($LC_{50} = 0.58\%$), followed by fennel EO ($LC_{50} = 1.57\%$) and fenchone ($LC_{50} = 17.22\%$). In addition, 100% larval mortality was achieved at 2.5% for trans-anethole and 10% for fennel EO. These findings align with [28], where it was demonstrated that trans-anethole and lemongrass EO (*Cymbopogon citratus*; 45.23% geranial) showed superior adulticidal activity compared to α -cypermethrin (1%). Notably, their combination caused 100% mortality in under 5 min ($KT_{50} = 3.2$ min) and induced morphological deformities in larval mouthparts and antennae. Importantly, these compounds exhibited low toxicity to non-target organisms (*Tetragonula pegdeni* and *Poecilia reticulata*). Collectively, these results highlight trans-anethole as the primary driver of fennel EO's contact toxicity, particularly against *M. domestica* larvae and pupae. Moreover, its efficacy

can be significantly enhanced through synergistic combinations with other bioactive compounds, suggesting promising potential for targeted formulations.

While *Salvia officinalis* EO exhibits a variable composition [29–32], it is typically dominated by camphor, α -thujone, 1,8-cineole, viridiflorol, and β -thujone. Our chemical analysis revealed a profile particularly rich in α -thujone (54.3%) and camphor (18.8%), with minimal 1,8-cineole (2.2%). These findings correlate well with the bioactivities reported by [29], where both sage and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) EOs demonstrated strong repellency and oviposition inhibition against *Calliphora vomitoria* (2.5 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$), along with notable contact toxicity ($\text{LD}_{50} = 1.2 \mu\text{L}/\text{insect}$) and fumigant activity ($\text{LC}_{50} = 16.64 \mu\text{L L}^{-1}$ air).

The insecticidal properties of these major components have been further characterized in other diptera species. For example, [33] demonstrated that thujone exhibits broad-spectrum toxicity against *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), affecting all life stages ($\text{LC}_{50} < 66 \text{ mg/mL}$) and achieving complete oviposition deterrence at 5% (v/v). Conversely [34], found camphor to be relatively ineffective against *M. domestica*, showing <50% repellency and low toxicity even in susceptible strains. Notably, the repellent activity observed in our study appears primarily attributable to α -thujone, given its high concentration and the minimal contribution of 1,8-cineole. This aligns with established mechanisms of monoterpene activity, where compounds like thujone are known to interact with insect odorant-binding proteins, disrupting normal behavioral responses [35].

Essential oils and their components can effectively control agricultural pests. Field studies conducted in the USA, Chile, and other countries show that EO-based insecticides effectively manage soft-bodied insects, stinging insects, and mites [15]. These products can be used alone or in combination with conventional insecticides, enhancing their toxicity through synergistic interactions [36]. Similar effects have been observed in insect pests exposed to pyrethroids, such as permethrin, deltamethrin, β -cyfluthrin, and natural pyrethrins [36,37]. Furthermore, insecticides from various chemical classes have produced similar outcomes, including imidacloprid [38], temephos, malathion [39], phosphine gas [40], and neem-oil-based bioinsecticides [41]. Combining conventional insecticides with EOs may help reduce the chemical burden on the environment and lessen the risk of resistance developing in pest populations [42].

However, their commercial use requires careful consideration of potential irritant effects on mammals. Key components such as α -thujone (neurotoxicity, dermatitis), camphor (respiratory irritation), and 1,8-cineole (bronchial spasms) pose documented risks to airways and skin at high concentrations [43–46]. As demonstrated by formulated products like cinnamon-EO-based bioherbicides (patent WO 2019/238948) [47], proper dilution and encapsulation can reduce toxicity risks by over 100-fold while maintaining efficacy [48]. This highlights the critical next step for our findings: developing optimized formulations of the tested EOs (eucalyptus, fennel, sage) to maximize their pest control potential while

minimizing mammalian exposure risks.

5. Conclusions

All the tested essential oils demonstrated significant topical and fumigant toxicity and strong repellency against adult *M. domestica*. The evidence indicates that these activities are closely associated with the most abundant compounds found in essential oils. However, it is vital to confirm these findings by assessing the toxicity of these individual compounds on *M. domestica*. The results emphasize the potential ability of essential oils and their components to control *M. domestica*, and could be incorporated into pest management programs or used to develop new insecticidal products. These products could also be utilized against other dipteran pests of agricultural and medical significance.

References

1. Bautista, C.R. Entomología Veterinaria Esencial; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias: Coyoacán, México, 2016; pp. 100–103.
2. Robinson, W.H. Urban Entomology; Garland Science: Blacksburg, VA, USA, 2020; pp. 298–300.
3. Abbas, M.N.; Sajeel, M.; Kausar, S. House Fly (*Musca domestica*), a Challenging Pest; Biology. Management and Control Strategies. *Elixir Entomol.* **2013**, 64, 19333–19338. <https://doi.org/10.1080/03601230701316481>
4. Adenusi, A.A.; Adewoga, T.O.S. Studies on the Potential and Public Health Importance of Non-Biting Synanthropic Flies in the Mechanical Transmission of Human Enterohelminths. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2013**, 107, 812–818. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt095>
5. Freeman, J.C.; Ross, D.H.; Scott, J.G. Insecticide Resistance Monitoring of House Fly Populations from the United States. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, 158, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.006>
6. Mota-Sanchez, D.; Wise, J.C. The Arthropod Pesticide Resistance Database. 2025. Available online: <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=151> (accessed on 28 February 2025).
7. Egbuna, C.; Sawicka, B.; Tijjani, H.; Kryeziu, T.L.; Ifemeje, J.C.; Skiba, D.; Lukong, C.B. Chapter 4—Biopesticides, Safety Issues and Market Trends. In *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 43–53.
8. Pavela, R. Essential Oils for the Development of Eco-Friendly Mosquito Larvicides: A Review. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, 76, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>
9. Zuzarte, M.; Salgueiro, L. Essential Oils Chemistry. In *Bioactive Essential Oils and Cancer*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 19–61.
10. Pavela, R. History, Presence and Perspective of Using Plant Extracts as Commercial Botanical Insecticides and Farm Products for Protection against Insects—A Review. *Plant Prot. Sci.* **2016**, 52, 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>

11. Isman, M.B.; Miresmailli, S.; Machial, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 197–204. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>
12. Gahukar, R.T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. *Crop Prot.* **2012**, *42*, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.07.026>
13. Mossa, A.T.H. Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J. Environ. Sci. Technol.* **2016**, *9*, 354–378. <https://doi.org/10.3923/jest.2016.354.378>
14. Abdel-Baki, A.-A.S.; Aboelhadid, S.M.; Sokmen, A.; Al-Quraishy, S.; Hassan, A.O.; Kamel, A.A. Larvicidal and Pupicidal Activities of Essential Oil, Trans-Anethole and Fenchone against House Fly and Their Inhibitory Effect on Acetylcholinesterase. *Entomol. Res.* **2021**, *51*, 568–577. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12550>
15. Khater, H.F.; Geden, C.J. Efficacy and Repellency of Some Essential Oils and Their Blends against Larval and Adult House Flies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *J. Vector Ecol.* **2019**, *44*, 256–263. <https://doi.org/10.1111/jvec.12357>
16. Villanueva-Pereira, T.; Silva-Aguayo, G.; Rodríguez, M.; Rodríguez-Maciel, J.C.; Cabrera-Barjas, G.; Romero, Á.; Oyarce, G. Insecticidal and Repellent Activity of Essential Oils of Cinnamon, Lemon, and Peppermint against House fly. *Chil. J. Agric. Res.* **2025**, *85*, 318–329. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392025000300318>
17. Acevedo, G.R.; Zapater, M.; Toloza, A.C. Insecticide Resistance of House Fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitol. Res.* **2009**, *105*, 489–493. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1425-x>
18. Tangpao, T.; Krutmuang, P.; Kumpoun, W.; Jantrawut, P.; Pusadee, T.; Cheewangkoon, R.; Sommano, S.R.; Chuttong, B. Encapsulation of Basil Essential Oil by Paste Method and Combined Application with Mechanical Trap for Oriental Fruit Fly Control. *Insects* **2021**, *12*, 633. <https://doi.org/10.3390/insects12070633>
19. Morey, R.A.; Khandagle, A.J. Bioefficacy of Essential Oils of Medicinal Plants against House fly, *Musca domestica* L. *Parasitol. Res.* **2012**, *111*, 1799–1805. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3027-2>
20. SAS Institute. Language Guide for Personal Computer Release, 6th ed.; SAS Institute: Cary, NC, USA, 1998.

21. Abbott, W.S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.* **1925**, 18, 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
22. Hlina, B.L.; Birceanu, O.; Robinson, C.S.; Dhiyebi, H.; Wilkie, M.P. The Relationship between Thermal Physiology and Lampricide Sensitivity in Larval Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*). *J. Great Lakes Res.* **2021**, 47, S272–S284. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002>
23. Jankowska, M.; Rogalska, J.; Wyszowska, J.; Stankiewicz, M. Molecular Targets for Components of Essential Oils in the Insect Nervous System—A Review. *Molecules* **2018**, 23, 34. <https://doi.org/10.3390/molecules23010034>
24. Liu, Z.; Li, Q.X.; Song, B. Pesticidal Activity and Mode of Action of Monoterpenes. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, 70, 4556–4571. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00635>
25. Rossi, Y.E.; Palacios, S.M. Insecticidal Toxicity of *Eucalyptus Cinerea* Essential Oil and 1,8-Cineole against *Musca domestica* and Possible Uses According to the Metabolic Response of Flies. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, 63, 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.019>
26. Gharib, A.M.; El-Shewy, A.M.; Hamouda, S.S.A.; Gad, H.A.; Abdelgaleil, S.A.M. Insecticidal, Biochemical and Histological Effects of Monoterpenes against *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J. Asia Pac. Entomol.* **2024**, 27, 102256. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2024.102256>
27. Debnath, S.; Kumar, H.; Sharma, A. Foeniculum vulgare from Spice to Pharma: Recent Advances in Its Medicinal Value, Bioactivities and Perspectives. *Trad. Integr. Med.* **2023**, 8, 217–229. <https://doi.org/10.18502/tim.v8i2.13087>
28. Soonwera, M.; Mounghipmalai, T.; Puwanard, C.; Sittichok, S.; Sinthusiri, J.; Passara, H. Adulticidal Synergy of Two Plant Essential Oils and Their Major Constituents against the House fly *Musca domestica* and Bioassay on Non-Target Species. *Heliyon* **2024**, 10, e26910. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26910>
29. Bedini, S.; Guarino, S.; Echeverria, M.C.; Flamini, G.; Ascriczzi, R.; Loni, A.; Conti, B. *Allium sativum*, *Rosmarinus officinalis*, and *Salvia officinalis* Essential Oils: A Spiced Shield against Blowflies. *Insects* **2020**, 11, 143. <https://doi.org/10.3390/insects11030143>
30. Damyanova, S.; Mollova, S.; Stoyanova, A.; Gubenia, O. Chemical Composition of *Salvia officinalis* L. essential oil from Bulgaria. *Ukr. Food J.* **2016**, 5, 695–700. <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2016-5-4-8>

31. Khedher, M.R.B.; Khedher, S.B.; Chaieb, I.; Tounsi, S.; Hammami, M. Chemical Composition and Biological Activities of *Salvia officinalis* Essential Oil from Tunisia. *EXCLI J.* **2017**, *16*, 160–173. <https://doi.org/10.17179/excli2016-832>
32. El Euch, S.K.; Hassine, D.B.; Cazaux, S.; Bouzouita, N.; Bouajila, J. *Salvia officinalis* Essential Oil: Chemical Analysis and Evaluation of Anti-Enzymatic and Antioxidant Bioactivities. *S. Afr. J. Bot.* **2019**, *120*, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.010>
33. Jaffar, S.; Lu, Y. Toxicity of Some Essential Oils Constituents against Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Insects* **2022**, *13*, 954. <https://doi.org/10.3390/insects13100954>
34. Tian, Y.; Hogsette, J.A.; Norris, E.J.; Hu, X.P. Topical Toxicity and Repellency Profiles of 17 Essential Oil Components against Insecticide-Resistant and Susceptible Strains of Adult *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Insects* **2024**, *15*, 384. <https://doi.org/10.3390/insects15060384>
35. Emilie, D.; Mallent, M.; Menut, C.; Chandre, F.; Martin, T. Behavioral Response of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) to 20 Plant Extracts. *J. Econ. Entomol.* **2015**, *108*, 1890–1901. <https://doi.org/10.1093/jee/tov118>
36. Norris, E.J.; Gross, A.D.; Bartholomay, L.C.; Coats, J.R. Plant Essential Oils Synergize Various Pyrethroid Insecticides and Antagonize Malathion In *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol.* **2019**, *33*, 453–466. <https://doi.org/10.1111/mve.12380>
37. Suwannayod, S.; Sukontason, K.L.; Pitasawat, B.; Junkum, A.; Limsopatham, K.; Jones, M.K.; Somboon, P.; Leksomboon, R.; Chareonviriyaphap, T.; Tawatsin, A.; et al. Synergistic Toxicity of Plant Essential Oils Combined with Pyrethroid Insecticides against Blow Flies and the House Fly. *Insects* **2019**, *10*, 178. <https://doi.org/10.3390/insects10060178>
38. Faraone, N.; Hillier, N.K.; Cutler, G.C. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127774>
39. Sarma, R.; Adhikari, K.; Mahanta, S.; Khanikor, B. Combinations of Plant Essential Oil Based Terpene Compounds as Larvicidal and Adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9471. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45908-3>

40. Khaliq, A.; Ullah, M.I.; Afzal, M.; Ali, S.; Sajjad, A.; Ahmad, A.; Khalid, S. Management of *Tribolium castaneum* Using Synergism between Conventional Fumigant and Plant Essential Oils. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **2020**, *40*, 781–788. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00131-w>
41. Kolani, L.; Sanda, K.; Agboka, K.; Mawussi, G.; Koba, K.; Djouaka, R. Investigation of Insecticidal Activity of Blend of Essential Oil of *Cymbopogon schoenanthus* and Neem Oil on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Essent. Oil Bear. Plant.* **2016**, *19*, 1478–1486. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1221742>
42. Isman, M.B. Commercial Development of Plant Essential Oils and Their Constituents as Active Ingredients in Bioinsecticides. *Phytochem. Rev.* **2020**, *19*, 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>
43. de Groot, A.C.; Schmidt, E. Tea tree oil: Contact allergy and chemical composition. *Contact Dermat.* **2016**, *75*, 129–143. <https://doi.org/10.1111/cod.12591>
44. Lee, M.Y. Essential oils as repellents against arthropods. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 6860271. <https://doi.org/10.1155/2018/6860271>
45. Santos, C.D.; Cabot, J.C. Persistent effects after camphor ingestion: A case report and literature review. *J. Emerg. Med.* **2015**, *48*, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2014.05.015>
46. Juergens, U.R.; Dethlefsen, U.; Steinkamp, G.; Gillissen, A.; Repges, R.; Vetter, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respir. Med.* **2003**, *97*, 250–256. <https://doi.org/10.1053/rmed.2003.1432>
47. Jijakli, H.; Maso, S.D.; Parisi, O. Bio-Herbicide Based on Essential Oil. Patent Application No. 16/973,986, 14 June 2019.
48. Maes, C.; Meersmans, J.; Lins, L.; Bouquillon, S.; Fauconnier, M.L. Essential oil-based bioherbicides: Human health risks analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9396. <https://doi.org/10.3390/ijms22179396>

Capítulo III. Nanoemulsión del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* para el control de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae)

Gabriela Oyarce^{1*}, Yeni Paredes-Padilla², Patricia Loyola¹, Miryams Millán², Álvaro Romero³, J.C. Rodríguez-Maciel⁴, José Becerra⁵, Gonzalo Silva-Aguayo¹, Sergio Benavides-Valenzuela² and Gustavo Cabrera-Barjas²

¹Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile. gabrielaoyarce@udec.cl

²Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Ciencias para el Cuidado de la Salud, Universidad San Sebastián, Concepción 4080871, Chile.

³Envu. 5000 CentreGreen Way, Suite 400, Cary, NC 27513. USA.

⁴Posgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México.

⁵Laboratorio de Química de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, Concepción 4070386, Chile.

Resumen

El aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* es conocido mundialmente por sus propiedades medicinales y para el control de plagas y enfermedades. En el caso de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), plaga de importancia médica, agropecuaria y urbana, uno de los métodos más utilizados para su control son los insecticidas sintéticos. No obstante, el uso extensivo de estos tiene efectos negativos como contaminación ambiental, daños en la salud de las personas y animales y el desarrollo de resistencia a insecticidas, siendo este último un problema prevalente para el control de esta mosca. Se han reportado más de 80 casos de resistencia a nivel mundial para esta especie, que incluyen a los compuestos activos más utilizados como organofosforados, piretroides y neonicotinoides. Dada la necesidad de alternativas para el control de *M. domestica*, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad fumigante del aceite esencial puro y formulado como nanoemulsión de *D. ambrosioides* sobre adultos de *M. domestica*. Tanto el aceite esencial puro como formulado mostró actividad fumigante en concentraciones inferiores a 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire. El formulado A reportó la toxicidad más alta a las 24 horas ($\text{LC}_{50} = 2,89 \mu\text{L L}^{-1}$ aire), un tamaño de gotas promedio inferior a los 20 nm y se mantuvo estable por más de 14 días.

Estos resultados sugieren que el aceite esencial de *D. ambrosioides* puede ser utilizado en bajas concentraciones para el control de *M. domestica* y su formulación como nanoemulsión incrementa su actividad insecticida.

Abstract

The essential oil of *Dysphania ambrosioides* is renowned worldwide for its medicinal properties and its effectiveness in controlling pests and diseases. One of the most widely used methods of controlling *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), a pest of medical, agricultural and urban importance, is the use of synthetic insecticides. However, their extensive use has negative consequences, including pollution, harm to human health and the development of resistance. The latter is a particularly prevalent problem in *M. domestica*, with over 80 cases of resistance worldwide to insecticides such as organophosphates, pyrethroids, and neonicotinoids. Considering the need for alternative methods of controlling *M. domestica*, this study aimed to evaluate the fumigant activity of pure and formulated *D. ambrosioides* essential oil against adult *M. domestica*, as well as the stability of these formulations over time. Both pure and formulated essential oils exhibited high fumigant activity at concentrations below 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ of air. Formulation A exhibited the greatest toxicity after 24 hours ($\text{LC}_{50} = 2.89 \mu\text{L L}^{-1}$ air), had an average droplet size of less than 20 nm and remained stable for over 14 days. These results suggest that *D. ambrosioides* essential oil can be used at low concentrations to control *M. domestica*, and that formulating it as a nanoemulsion increases its insecticidal activity.

Keywords: nanoemulsions, essential oils, housefly.

1. Introducción

La mosca doméstica (*Musca domestica* L.) (Díptera: Muscidae), es un insecto asociado a asentamientos humanos, siendo su presencia frecuente en zonas urbanas y en sistemas de producción pecuaria (Bautista, 2016). Este insecto es considerado plaga debido a que sus hábitos de alimentación y reproducción lo convierten en vector de microorganismos patógenos en humanos y animales domésticos. La mosca es capaz de transmitir más de 100 agentes causantes de enfermedades, entre los que se incluyen ántrax, cólera, teniasis, fiebre tifoidea, tripanosomiasis, anaplasmosis y tuberculosis, entre otros (Adenusi y Adewoga, 2013).

El método de control más utilizado es la aspersión de insecticidas sintéticos de contacto sobre larvas y adultos de grupos como organofosforados, piretrinas, piretroides y neonicotinoides (Freeman et al., 2019). Sin embargo, su uso prolongado ha propiciado el desarrollo de resistencia. The Arthropod Pesticide Resistance Database (<https://www.pesticideresistance.org/>) registra más de 80 casos de resistencia en *M. domestica*, los que incluyen todos los grupos químicos mencionados anteriormente utilizados para su control (Mota-Sanchez y Wise, 2022). Sumado a esto, existe una creciente preocupación por el impacto de los insecticidas en la salud de las personas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el uso de plaguicidas en países en desarrollo causa más de un millón de intoxicaciones al año (Martínez-Valenzuela

y Gómez-Arroyo, 2007), ocurriendo principalmente en las personas que trabajan y viven en áreas rurales, producto de su exposición continua (Guzmán-Plazola et al., 2016). La aplicación de insecticidas además contamina el ambiente, ya que estos productos y sus componentes activos pueden volatilizarse en el aire, liberarse en el suelo y dispersarse a otros lugares a través de cursos de agua (Metfaul et al., 2020). Producto de esto, existe un creciente interés por parte de usuarios y consumidores en la búsqueda de opciones más naturales, menos contaminantes y con un menor riesgo para la salud de las personas y la producción alimentaria (Egbuna y Sawicka, 2020).

Los aceites esenciales (AEs) han emergido como una alternativa promisorio para el control de insectos. Estos se definen como mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles, que en la naturaleza cumplen funciones ecológicas clave en plantas como defensa contra patógenos y herbívoros, atracción de polinizadores y comunicación interespecífica (Pavela, 2015; Zuzarte y Salgueiro, 2015). En el ámbito del control de plagas, poseen actividad insecticida a través de diversos mecanismos de acción, entre ellos, neurotoxicidad, alterando el ciclo de vida de los insectos y repelencia, al evitar la alimentación y la ovipostura (Gupta et al., 2023).

Los AEs y sus componentes han demostrado actividad insecticida contra *M. domestica*, entre los que destacan el de menta (*Mentha piperita*) y jengibre (*Zingiber officinalis*), como larvicidas y repelentes (Morey y Khandagle, 2012). Los compuestos timol y carvacrol, obtenidos del AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) y orégano (*Origanum vulgare*) también actúan como adulticidas (Pavela, 2009), y Oyarce et al. (2025) demostraron que los aceites esenciales de hinojo (*Foeniculum vulgare*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y salvia (*Salvia officinalis*) poseen toxicidad por contacto, fumigante y repelencia en adultos de *M. domestica*.

Estudios recientes destacan el potencial insecticida del aceite esencial de paico (*Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin y Clemants; Amaranthaceae). Originaria de México, que se caracteriza por ser una especie de ciclo corto y perenne, que crece en suelos arenosos próximos a ríos y lagos (Kandsi et al., 2023). Sus hojas, cubiertas por filamentos glandulares aromáticos, producen el compuesto ascaridol, al cual se le atribuye el olor característico de la planta (Cavalli et al., 2004). El paico es utilizado tradicionalmente por sus propiedades medicinales y estudios han demostrado que su aceite esencial posee actividad antibacteriana, antifúngica, anitparasítica e insecticida (Pandey et al., 2017). La actividad insecticida ha sido estudiada contra plagas de interés agrícola como *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), 1855 (Coleoptera: Curculionidae) asociada a granos almacenados (Chu et al., 2011; Mendesil et al., 2012; Langsi et al., 2018) y plagas de importancia médica como *Culex quinquefasciatus* (Say), 1848

(Díptera: Culicidae) (Almadiy, 2020), estableciéndose además el uso de su aceite esencial como alternativa a los insecticidas piretroides para el control de *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) en países de África central (Bigoga et al., 2013; Bossou et al., 2013) además de que reporta actividad adulticida contra *M. domestica* (Pavela et al., 2017).

Pese a esto, el uso directo de los AE para el control de plagas es limitado, producto de su corta vida útil e inestabilidad ambiental, junto con la falta de estudios en campo, donde podría verse reducida su eficacia (Singh y Pandey 2021). Una forma de mejorar su aplicación es la incorporación del AE en sistemas coloidales a través de la nanoemulsificación. Esta consiste en la mezcla entre dos líquidos inmiscibles entre sí, donde la fase discontinua (aceite), se dispersa sobre otra en mayor abundancia (fase continua) con ayuda de la adición de surfactante. A través de interacciones fisicoquímicas entre surfactante y aceite se forman micelas, las cuales cumplen la función de proteger al compuesto activo y facilitan su dispersión en la fase continua (Pavoni et al., 2020). La formulación impide la degradación del aceite y permite su liberación controlada en el tiempo, lo que facilita el almacenamiento, manipulación y transporte del compuesto activo (Montefuscoli et al., 2013). Dado esto, el objetivo de esta investigación fue estudiar la actividad fumigante del aceite esencial puro y formulado como nanoemulsión de *D. ambrosioides* sobre adultos de *M. domestica* y evaluar la estabilidad de los formulados en el tiempo.

2. Materiales y métodos

2.1. Aceite esencial

El aceite esencial de paico (*D. ambrosioides*) (DAEO) se obtuvo de un cultivo establecido en la estación experimental “El Nogal” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, Región de Ñuble, Chile. La extracción se realizó a partir de hojas y semillas secas (cosecha [Abril/2022]) por hidrodestilación con un equipo Clavenger (4 h, 1:10 relación planta-agua) y almacenado a 4° C hasta su uso (Oyarce et al., 2025).

2.2. Formulación

Las nanoemulsiones se prepararon combinando diferentes concentraciones de DAEO, maltodextrina y el tensioactivo no iónico Tween 80, evaluando además distintas proporciones de tensioactivo/aceite (RTA) y agua destilada (Tabla 9). El tensioactivo Tween 80 se adquirió de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania) y la maltodextrina con un equivalente de dextrosa de 19 (DE19, pureza >99,9%, conforme a la FDA) se obtuvo de Oregon Chem Group (Santiago, Chile).

Las nanoemulsiones se elaboraron según lo descrito por Campelo et al. (2017). Inicialmente la maltodextrina se preparó en agua destilada con agitación constante a 50° C y luego, se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se añadió el DAEO en la solución de maltodextrina y se homogeneizó utilizando un equipo de alta velocidad

ultraturrax (Velp Scientifica, MB, Italia) a 5.000 rpm. Finalmente, sin detener la agitación, se incorporó el tween 80 y se mantuvo la homogeneización durante 8 minutos a 10.000 rpm.

Basándose en el diseño previamente descrito y una caracterización cualitativa de los preparados, se seleccionaron dos formulados para su posterior caracterización, el formulado A (15% p/v DAEO, 10% p/v Tween 80 y 1% de maltodextrina) y el formulado B (20% p/v DAEO, 10% p/v Tween 80 y 1% de maltodextrina).

Tabla 9. Composición de los formulados según el contenido de aceite esencial de *D. ambrosioides* (DAEO), tween 80, relación tensiactivo/aceite (RTA) y maltodextrina.

DAEO (%p/v)	Tween 80 (%p/v)	RTA	Maltodextrina (%p/v)
15	1,0	1:4	1,0
20	5,0	1:2	5,0
25	10,0	3:4	10,0

2.3 Caracterización de los formulados

2.3.1. Medición del tamaño de gotas

El tamaño promedio de las gotas (MDS) y el índice de polidispersión (PDI) de las formulaciones se midió con el equipo 90 Plus Particle Size Analyzer (Malvern Panalytical, Reino Unido). Los formulados se diluyeron 50 veces y luego se depositaron en cubetas desechables de cuatro lados lisos a una temperatura de 25° C y humedad del 85%. Los límites inferior y superior

de tamaño para este instrumento son 1 nm y 6 μm , respectivamente. Las mediciones del DMS y PDI se realizaron por triplicado para cada emulsión.

2.3.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La morfología y estructura de las nanoemulsiones se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se ubicó una gota de 20 μL de la muestra en una película de carbono recubierta con una rejilla de cobre de 300 mallas durante 2 minutos. El exceso de líquido se absorbió con papel filtro y luego se tiñó negativamente con una gota de 20 μL de acetato de uranilo al 2,0% (p/v) durante 1-2 minutos y se dejó secar a temperatura ambiente. La rejilla se examinó en un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1200 EXII (JEOL Ltd. Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 80 kV.

2.3.3. Estabilidad frente a la dilución

Los formulados se diluyeron en agua destilada en proporciones de 1:50 y 1:100 y se evaluó cualitativamente su apariencia y formación de fases.

2.4. Composición química del DAEO puro y formulado

La composición química del DAEO puro se determinó en un cromatógrafo de gases (YL6500 GC System, Anyang-si, Gyeonggi-do, Korea) acoplado a una columna capilar HP-5MS (longitud de 30 m, diámetro interior de 0,25 mm, película delgada de 0,25 μm) y un volumen de inyección de 1 μL . La temperatura inicial del equipo fue de 100° C, los que se mantuvieron durante 3 min, con un incremento de 6° C cada minuto hasta alcanzar los 280°

C, que se mantuvieron durante 35 min. Los porcentajes relativos de los compuestos de *D. ambrosioides* se obtuvieron utilizando helio como fase móvil y un detector selectivo de masas (Chrozen GC Mass Espectrometer, Anyang-si, Gyeonggi-do, Korea) y los componentes se identificaron utilizando la biblioteca de espectros de masas NIST/EPA/NIH (NIST 17).

En el caso de los formulados, primero se extrajo el aceite contenido en estos con el procedimiento descrito por de-Godoi et al. (2017). Se colocaron 100 μL de la nanoemulsión en un bloque seco de calentamiento (ACCUBLOCK™, Labnet International Inc., Edison NJ, USA) a 50° C durante 15 min. A continuación, se añadió 1 mL de acetonitrilo y la mezcla se homogeneizó con un vórtex durante 1 min. Por último, la solución se centrifugó a 10.000 rpm, se recogió el sobrenadante resultante y se diluyeron 5 μL de este en 1000 μL de acetonitrilo. Posteriormente, se hizo el análisis de cromatografía gaseosa, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el aceite esencial puro.

2.5. Estabilidad de los formulados en almacenamiento

La estabilidad física de las nanoemulsiones se evaluó mediante inspección visual y medición de sus valores de MDS y PDI durante 14 días de almacenamiento a temperatura ambiente y refrigeradas a 4° C, tomando mediciones cada 7 días.

2.6. Actividad insecticida del aceite esencial puro y formulado de *D. ambrosioides* contra *M. domestica*

2.6.1. Colecta y cría de insectos

Se colectaron adultos de *M. domestica*, utilizando redes entomológicas en la Estación Experimental Ganadera de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción. Las prácticas de manejo de la mosca en la estación experimental consistieron en la eliminación de heces y camas de animales cada 15 días, junto con la aplicación del insecticida AGITA® WG (neonicotinoide, tiametoxam [10% (p/p), gránulos dispersables en agua, Kwizda Agro, Alemania]) al inicio de la temporada estival.

La colonia se estableció en el Laboratorio de Entomología y Acarología Aplicada de la Universidad de Concepción, según lo descrito por Khater y Geden (2019) con modificaciones. Los especímenes de *M. domestica* se mantuvieron a 27 ± 1 ° C, 50 ± 5 % de humedad relativa y un fotoperíodo de 16: 12 horas de luz: oscuridad en una cámara bioclimática (Memmert GmbH IPS 749, Schwabeach, Alemania) en jaulas entomológicas (50 x 50 x 50 cm). Los adultos se alimentaron *ad libitum* con agua destilada y azúcar granulada en placas de Petri separadas. Para la ovipostura se proporcionó una mezcla de salvado de trigo y leche entera con un 2,0% (p/v) de azúcar granulada. Los huevos se colectaron dos veces por semana y se almacenaron en recipientes de cartón con la tapa modificada para permitir el intercambio de gases. Las

larvas se alimentaron con tiras de papel humedecidas con leche y azúcar al 2,0% (p/v) dispuestas dentro de los recipientes.

2.6.2. Bioensayo fumigante

La toxicidad fumigante se evaluó utilizando un dispositivo desarrollado por el Laboratorio de Entomología y Acarología Agropecuaria (Oyarce et al., 2025). Cada tratamiento incluyó cinco réplicas con quince moscas adultas de 1 a 3 días de edad por recipiente, sin diferenciación por sexo. El control consistió en papel de filtro colocado en el tubo sin impregnar. El DAEO puro y sus formulaciones se evaluaron en un rango de 0,5 a 5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire y la mortalidad se evaluó a las 24 y 48 horas y se corrigió con la fórmula de Abbot (1925).

2.7. Análisis de datos

En los parámetros evaluados en la caracterización fisicoquímica de las emulsiones y la toxicidad por fumigación, se verificaron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene). Al cumplirse los supuestos, se aplicó un ANOVA con post-hoc de Tukey y de lo contrario, se usó Kruskal-Wallis con corrección de Dunn utilizando el software R (R Core Team, 2023), con los paquetes *car* (Fox y Weinsberg, 2019), y *FSA* (Ogle et al., 2016). Además, se realizó un análisis Probit para estimar la concentración letal 50% (CL_{50}), con sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95% utilizando el paquete de R *ecotox* (Hlina et al., 2021), siendo valores de CL_{50}

significativamente diferentes cuando sus IC del 95% no se superponen (Robertson et al., 2007).

3. Resultados y Discusión

3.1 Características de los formulados

En cuanto al aspecto, los formulados presentaron una apariencia turbia, de color lechoso y homogénea, característica de la formación de una emulsión. Al diluirlas 50 y 100 veces, estas se mantuvieron homogéneas y adquirieron una apariencia más translúcida (Figura 6). El cambio de coloración de la emulsión se atribuye a la disminución de la concentración de aceite y a la mayor disgregación de las gotas dentro de la emulsión, lo que disminuye la dispersión de la luz, y, por tanto, hace que sean menos visibles, según el efecto Tyndall (Kim et al., 2018). El principio de la prueba de dilutabilidad es que la fase continua puede ser agregada en mayores proporciones que la fase discontinua en cualquier nanoemulsión, sin afectar la estabilidad de esta (Gurpreet y Singh 2018; Sharma et al., 2010), lo que indica que los formulados pueden ser diluidos para facilitar su dosificación y posterior aplicación.

Al visualizar la morfología de las formulaciones con la técnica de TEM, en ambas se aprecian gotas de forma esférica y dispersa, con algunas de forma irregular y aglomeradas entre sí (Figura 7). Las gotas del formulado A poseen un tamaño promedio inferior a los 20 nm, mientras las del formulado B se encuentran por sobre los 200 nm (Tabla 10). Ambas formulaciones se

pueden considerar nanoemulsiones, ya que el tamaño promedio de sus gotas está en el rango de los 20 – 500 nm (Barradas y de Holanda, 2020; Pavoni et al., 2020). En cuanto al índice de polidispersión (PDI), se reportaron valores inferiores a 0,15 (Tabla 10). El PDI describe que tan uniforme es la distribución de las gotas dentro de una emulsión. Este valor fluctúa entre 0 y 1, donde valores cercanos al 1 indican que la emulsión contiene gotas de tamaños muy distintos, las que podría agregarse entre sí y coalescer. Valores más cercanos a 0, idealmente menores a 0,25, indican que las gotas poseen un tamaño similar y se encuentran dispersas en la fase continua, lo que permite una mayor estabilidad de las nanoemulsiones en el tiempo (Azmy et al., 2019).

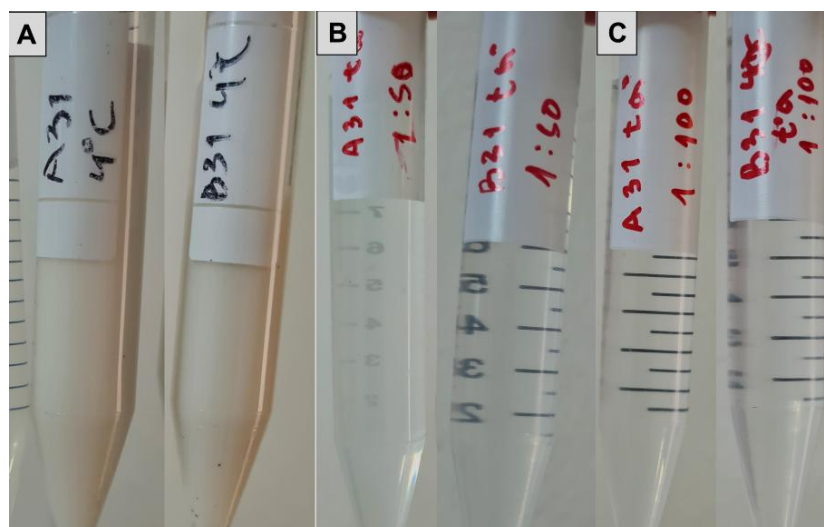


Figura 6. Apariencia de los formulados A y B (de izquierda a derecha), sin diluir (A), diluidos 50 veces (B) y 100 veces (C), 24 horas posterior a su formulación.

Tabla 10. Tamaño promedio de gotas (MDS) e índice de polidispersión (PDI) de las formulaciones de aceite esencial de *D. ambrosioides*, luego de 24 horas de su formulación.

Formulado	MDS (nm)	PDI
Formulación A	11,9 ± 0,2 a	0,105 a
Formulación B	67,4 ± 1,0 b	0,132 b

Letras distintas indican diferencias significativas en ambos grupos ($p < 0,005$), según la prueba de t-student.

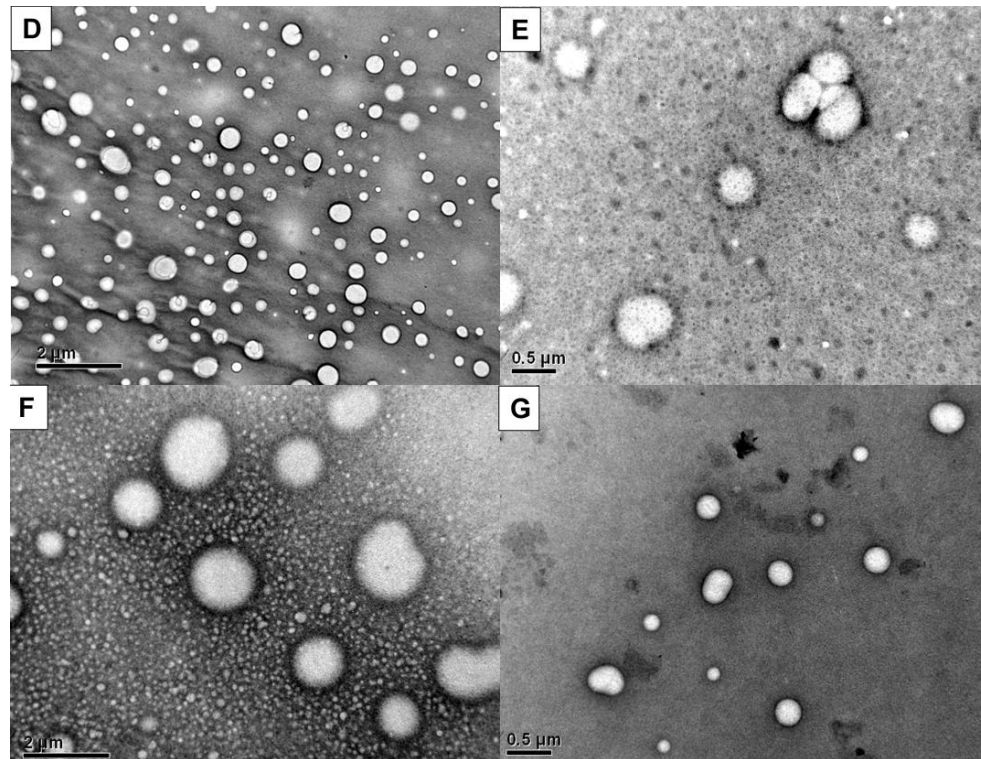


Figura 7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las formulaciones A con aumento de 2 μm (D) y 0,5 μm (E) y del formulado B a 2 μm (F) y 0,5 μm (G).

El tamaño pequeño de las gotas en los formulados obtenidos es una característica deseable en una emulsión (Hashem et al., 2018), ya que mientras más pequeñas sean las gotas, menor es la probabilidad de que sus componentes se separen (cremación) y las gotas dentro del aceite se agrupen

entre sí y aumenten su tamaño (coalescencia). Junto a esto, la biodisponibilidad del aceite aumenta, ya que es mayor su solubilidad en la fase continua, lo que mejora su bioactividad (McClements, 2011). Esto se vio reflejado en el estudio realizado por Anjali et al. (2011), el cual consistió en evaluar la eficacia del aceite de Neem formulado como nanoemulsión contra *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae), donde obtuvieron emulsiones con un DMS entre 31 y 251 nm y los formulados más activos fueron aquellos con un menor tamaño de gotas. Por otra parte, Salazar et al. (2022) evaluaron la formación de nanoemulsiones de aceite esencial de *Laureliopsis philippiana* Looser (1934) para el control de la polilla tomate (*Tuta absoluta* Meyrick, 1917, Lepidoptera: Gelechiidae), siendo las nanoemulsiones más estables aquellas con un DMS de 40,64 nm y un PDI de 0,3, que además exhibieron una mayor mortalidad que el aceite esencial puro. Draz et al. (2022) obtuvo resultados similares al evaluar nanoformulados de AEs de anís (*Pimpinella anisum* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum* L.) contra *S. zeamais* y *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797). Ambos formulados tuvieron un PDI entre 0,209 y 0,37, con un DMS de 88,83 nm para la formulación de cilantro, y 103,7 nm para las de anís y reportaron una mayor actividad insecticida respecto del aceite esencial puro.

3.2. Estabilidad en almacenamiento

Ambas formulaciones reportaron una tendencia a incrementar su DMS y PDI en el tiempo. En el formulado A, estas variaciones no fueron significativas, manteniendo un tamaño de gotas por debajo de los 20 nm, mientras que, en el B, se produjo un crecimiento del tamaño de las gotas más marcado, partiendo de 68 nm hasta alcanzar los 239 nm (Figura 8). La prueba estadística de ANOVA reveló que la conservación a temperatura ambiente en la formulación A presentó un tamaño de gotas significativamente menor que la formulación B en todos los tiempos evaluados ($p < 0,001$), manteniéndose este durante 14 días y fluctuando su PDI entre 0,105 a 0,11. En el caso de la formulación B, el tamaño de las gotas comienza en 68 nm y alcanza los 239 nm y su PDI varía entre 0,132 a 0,162, diferencia que además fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) en todos los tiempos evaluados, lo que indica un proceso de inestabilidad diferencial entre ambas formulaciones.

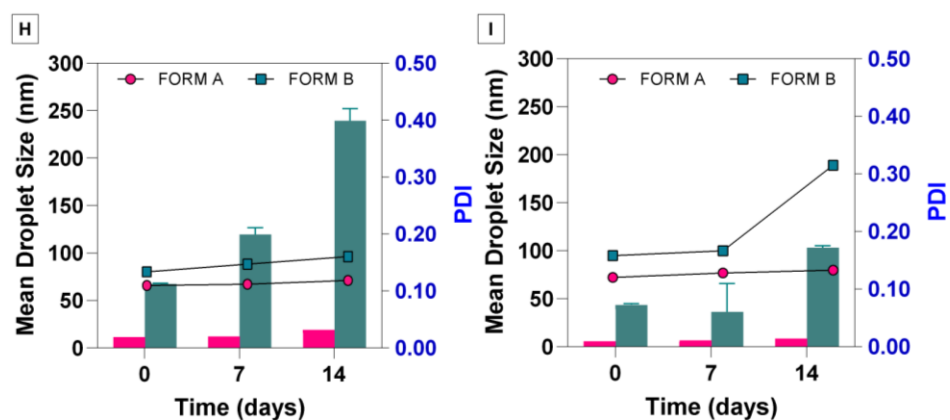


Figura 8. Tamaño promedio de gotas (MDS) e Índice de polidispersión (PDI) de los formulados de *D. ambrosioides* almacenados durante 14 días a temperatura ambiente (H) y a 4° C (I).

En el almacenamiento en frío (4° C), se observó una tendencia similar, existiendo diferencias significativas entre ambas formulaciones. No obstante, el crecimiento de las gotas en el tiempo ocurrió más lento comparado con el almacenamiento a 25° C. En el caso de la formulación A su DMS y PDI se mantienen en el rango de 5,6 – 8,6 nm y 0,08 – 0,103 respectivamente. Para el formulado B, el rango del DMS varía entre 43,5 nm – 103 nm. A pesar de que el tamaño de gotas fue menor para este tipo de almacenamiento, transcurridos los 7 días se observó una variación significativa del PDI, incrementando este valor de 0,14 a 0,32.

Mazarei y Rafati, (2019) obtuvieron resultados similares al evaluar la estabilidad de nanoemulsiones de aceite esencial de *Satureja khuzestanica* Jamzad (Lamiaceae) almacenadas a 4° C y 25° C durante 12 semanas. Estos formulados se mantuvieron estables por más de ocho semanas, y en ambas condiciones se observó un aumento del DMS en el tiempo. No obstante, el crecimiento de las gotas fue más lento en los formulados almacenados en frío que en aquellos a temperatura ambiente. Esta observación concuerda con los planteamientos de Lifshitz-Slezov y Wagner, que sugieren que la maduración de Ostwald presenta una relación inversa con la temperatura absoluta; es decir, al reducir la temperatura, la movilidad y solubilidad de las gotas dentro de una emulsión disminuye, lo que reduce la posibilidad de coalescer entre sí y su tasa de crecimiento es menor (Ee et al., 2008; Delmas et al., 2011).

Las diferencias reportadas en cuanto a la estabilidad de los formulados pueden atribuirse en parte, a su composición. Doi et al. (2019) estudiaron el impacto de la liberación de aromas en nanoemulsiones de aceite de ajo (*Allium sativum* L., Amaryllidaceae), donde un mayor contenido promovió la retención de los sabores, pero a su vez, redujo la estabilidad física de la emulsión. Sumado a esto, el aumento del contenido de aceite disminuye la eficiencia de la homogenización, lo que se vincula a un mayor tamaño promedio de gotas (Hassanzadeh et al., 2022). Rachmadi et al, (2015) obtuvo resultados similares al estudiar la eficiencia de encapsulación de silimarina y curcumina, donde al agregar más fase dispersa, hubo una reducción en la eficiencia de encapsulación. Estos reportes coinciden con lo observado en este trabajo, donde el formulado B (20% de DAEO), tuvo un mayor DMS que el formulado A (15% de DAEO).

Además del contenido de aceite esencial, su proporción respecto al surfactante es un factor importante por considerar, ya que, si este se encuentra en proporciones equitativas, el surfactante es capaz de rodear completamente al aceite y encapsularlo, lo que reduce la interacción entre gotas y la degradación del aceite (Davidou-Pardo et al., 2015). También una mayor proporción de surfactante influye en el índice de polidispersión de manera inversamente proporcional, disminuyendo este al aumentar el contenido de surfactante, ya que promueve la formación de micelas en la fase continua (Zhou et al., 2023). Al respecto, Choupanian et al. (2017) caracterizó

nanoemulsiones de aceite de Neem para el control de *S. zeamais* y *T. castaneum*, evaluando la proporción de aceite esencial y el surfactante tween 80, donde las nanoemulsiones más estables y con un tamaño de gota menor a los 100 nm, fueron aquellas donde la proporción de surfactante fue de 1,5 veces la del aceite. De igual manera, Mazarei y Rafati (2019), encontraron que los formulados más estables fueron aquellos que se componían de un 3,0% de AE de *S. khuzestanica* y un 9,0% de la combinación de surfactantes tween 80 y Span 80. Sin embargo, Giuliano et al. (2024) hicieron lo inverso y obtuvieron nanoemulsiones estables de *A. sativum* utilizando una proporción de 3:1 de aceite esencial y el surfactante tween 80. Aunque este trabajo no evaluó la estabilidad de las nanoemulsiones en el tiempo y existe una relación entre un mayor contenido de surfactante y una nanoemulsión más estable, reducir el contenido de este en un formulado es un atributo deseable en un producto con potencial de ser comercializado.

Al analizar la mayoría de los productos utilizados en el ámbito agrícola, su formulación no contempla un porcentaje de surfactante superior al 10%, ya que una mayor proporción de este aumenta considerablemente los costos de producción (Castro et al., 2013). El tween 80 es uno de los emulsificadores sintéticos más utilizados en emulsiones donde se requiere dispersar un aceite en una fase continua (O/W) (Marhamati et al., 2021). No obstante, su uso puede tener efectos negativos en la salud (Lüdke et al., 2022) y existen alternativas de menor costo, como surfactantes derivados de la proteína de

soya, fosfolípidos como la lecitina y las saponinas, que además de presentar propiedades emulsificantes, se obtienen como subproductos de la agricultura, siendo de menor costo, inocuos y más sustentable (Zhao et al., 2023). Teniendo esto en cuenta, que parte de la estabilidad observada en los formulados de este estudio se atribuye al alto contenido de tween 80 (>15% p/v), si se desea desarrollar un producto comercial, este no resulta viable, siendo necesario su reducción en la fórmula, la búsqueda de alternativas o el uso combinado con otros productos.

3.3 Composición química del DAEO y sus formulados

Se lograron identificar seis compuestos distintos en el aceite esencial de *D. ambrosioides* (Tabla 11), los cuales representaron el 96% de la composición total. Los compuestos predominantes fueron ascaridol (34,5%), isoascaridol (34,5%) y p-cymene (21,7%). Esta composición es similar a la reportada en otros trabajos con la misma especie, siendo uno de los principales componentes del aceite esencial ascaridol (5-87%), p-cymene (2-47%) y α -terpinene, (5-72%) (Monzote et al. 2006, Singh y Pandey 2021). La variación en los porcentajes de abundancia y sus constituyentes puede atribuirse a la amplia distribución geográfica de *D. ambrosioides*, el tejido extraído, edad de la planta y su fecha de cosecha, sumado al método de extracción y secado empleados (Rohloff et al., 2005).

En el caso de los formulados A y B, los principales constituyentes del DAEO, p-cymene, ascaridol e isoascaridol, se mantuvieron predominantes; sin embargo, se observaron variaciones en la abundancia de ascaridol, las que podrían atribuirse a la alta sensibilidad que posee esta molécula a los cambios de temperatura, sufriendo un reordenamiento térmico y formando el isómero isoascaridol a temperaturas de 100-150° C (Rimada et al., 2007), pudiendo además ocurrir este fenómeno durante el análisis de cromatografía gaseosa (Cavalli et al, 2004). Igualmente, la composición de la nanoemulsión tiene un efecto sobre la liberación de los compuestos volátiles y la retención de estos, pudiendo atribuirse al contenido de DAEO y surfactante, el cual difirió en ambos formulados (Duce et al., 2017; Hassanzadeh et al., 2022).

Tabla 11. Composición química y porcentaje de abundancia relativa del aceite esencial de *D. Ambrosioides* y los formulados A y B.

Compuestos	RT ¹ (min)	Area (%)		
		EO	Form A	Form B
p-cymene	3,41	21,72	39,9	32,7
cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	4,83	1,01	-	-
ascaridol	7,20	34,47	5,0	9,6
piperitone oxide	7,61	3,28	3,0	1,2
isoascaridol	8,60	34,5	38,9	36,6
alpha-limonene diepoxide	9,54	1,24	-	-
Total		96,22	87,0	86,5

¹Tiempo de retención en minutos.

3.4. Actividad fumigante de DAEO y sus formulados

Tanto el aceite esencial puro como sus formulados exhibieron una alta toxicidad fumigante, reportando el formulado A una mortalidad del 100% con una concentración de 3,6 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire, seguido del DAEO y el formulado B en concentraciones cercanas a 5,0 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire (Figura 9). Al estimar la concentración letal 50% (CL_{50}), el formulado A obtuvo el valor más bajo a las 24 horas ($\text{CL}_{50} = 2,89 \mu\text{L L}^{-1}$ de aire), mientras que el DAEO registró el valor más bajo a las 48 horas ($\text{CL}_{50} = 1,81 \mu\text{L L}^{-1}$ de aire) (Tabla 12). A su vez, el formulado B reportó la menor toxicidad, con un CL_{50} de 3,86 y 2,86 $\mu\text{L L}^{-1}$ a las 24 y 48 horas respectivamente (Tabla 12). Estos resultados sugieren que el formulado A es el más tóxico; sin embargo, las diferencias entre el porcentaje de mortalidad observado no fueron significativas tanto a las 24h ($p\text{-value} = 0,969$), como a las 48 h ($p\text{-value} = 0,285$).

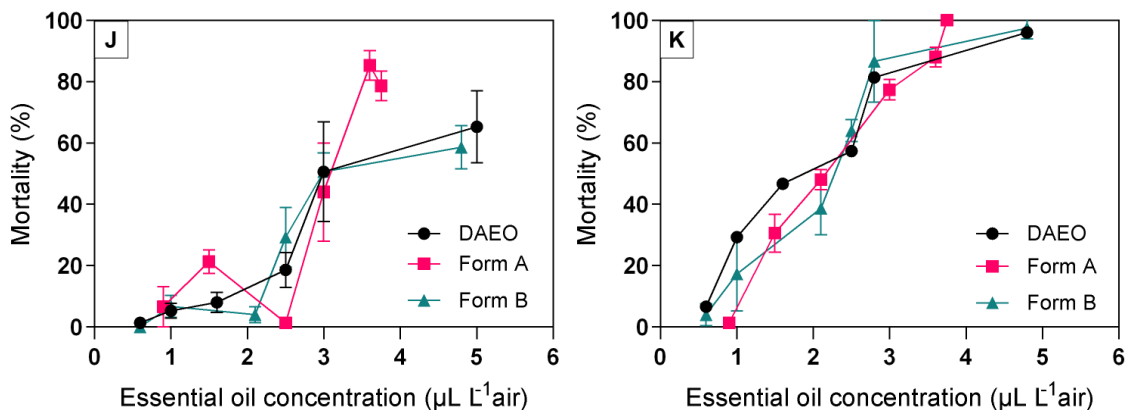


Figura 9. Toxicidad fumigante del aceite esencial de *D. ambrosioides* (DAEO) puro y los formulados A y B contra adultos de *M. domestica* a las 24 (J) y 48 horas (K).

Tabla 12. Mortalidad por efecto fumigante y concentración letal 50% (CL₅₀) del aceite esencial de *D. ambrosioides* puro y sus formulados contra adultos de *M. domestica* a las 24 y 48 horas.

Tratamiento	Concentración ($\mu\text{L L}^{-1}$ aire)	Mortalidad \pm SD* (%) 24 hrs	Mortalidad \pm SD* (%) 48 hrs
<i>D.ambrosioides</i>	1,00	5,33 \pm 5,6	29,9 \pm 12,3
	1,60	8,00 \pm 7,3	46,67 \pm 8,2
	2,50	18,65 \pm 12,8	57,33 \pm 10,1
	3,00	50,65 \pm 36,4	81,33 \pm 12,8
	5,00	65,32 \pm 26,4	96,00 \pm 8,9
	LC ₅₀ (LC 95%)**	3,88	1,81
		[3,08 – 5,64]	[1,18 – 2,51]
Formulación A	1,00	1,33 \pm 3,0	1,33 \pm 2,9
	1,60	6,66 \pm 14,9	30,66 \pm 13,8
	2,50	21,33 \pm 8,7	48,00 \pm 7,3
	3,60	44,00 \pm 35,8	77,33 \pm 7,6
	3,75	85,33 \pm 10,9	100 \pm 0,0
	LC ₅₀ (LC 95%)**	2,89	2,21
		[2,56 – 3,32]	[1,77 – 2,61]
Formulación B	1,00	6,67 \pm 8,2	17,33 \pm 12,1
	2,00	4,00 \pm 5,9	38,67 \pm 8,7
	2,40	29,33 \pm 21,9	64,00 \pm 3,7
	2,80	50,66 \pm 13,8	86,67 \pm 13,3
	4,80	58,66 \pm 15,9	97,46 \pm 3,5
	LC ₅₀ (LC 95%)**	3,86	2,86
		[2,02 – 11,0]	[2,15 – 4,2]

*SD: Desviación estándar. **Concentraciones letales al 50 % y al 90 % de eficacia con sus respectivos límites fiduciales al 95 % de probabilidad.

Existen antecedentes de la actividad insecticida del aceite esencial *D. ambrosioides* como aspersión en campo y fumigante en bodegas para evitar la infestación en granos almacenados y productos alimenticios (Pandey et al., 2012). En particular, los componentes de los aceites esenciales destacan por su acción como fumigantes debido a su volatilidad (Lee et al., 2003). Bernardes et al. (2018) evaluó la actividad fumigante del DAEO sobre *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae), eliminando

al 100% de los individuos tratados con una concentración de 20 $\mu\text{L L}^{-1}$ aire. En otro bioensayo realizado por Chu et al. (2011), evaluaron el DAEO crudo y su componente principal, (Z)-ascaridol, sobre *S. zeamays*, reportando una dosis letal 50% (DL_{50}) de 2,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 0,86 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente. Otro estudio realizado en la misma especie por Denloye et al. (2010), demostró la actividad fumigante de este aceite esencial, obteniendo una CL_{50} entre 1,33 y 1,90 $\mu\text{L L}^{-1}$ aire y además el aceite mostró efecto ovicida. En cuanto a sus efectos sobre *M. domestica* y otras especies emparentadas, Pavela et al. (2017), estudió la toxicidad del DAEO en adultos, cuyos compuestos más abundantes fueron cis-ascaridol (35%) y trans-ascaridol (26%), presentando una $\text{DL}_{50} = 51,7 \mu\text{g adulto}^{-1}$ y actuando además como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). La evidencia de la actividad insecticida del DAEO coincide con lo observado, reportándose en este trabajo una alta toxicidad del DAEO y sus formulados, lo que podría atribuirse a sus componentes más abundantes.

4. Conclusiones

Se lograron obtener nanoemulsiones estables del aceite esencial de *D. ambrosioides*, destacando los atributos del formulado A, que presentó una toxicidad similar a la del aceite esencial puro de *D. ambrosioides*, un tamaño de gotas pequeño y estabilidad por más de 14 días. Estos resultados enfatizan el potencial de los aceites esenciales y sus componentes para el control de plagas y su formulación para el desarrollo de productos comerciales, siendo este el primer trabajo que describe el potencial fumigante del aceite esencial de *D. ambrosioides* contra la mosca común. No obstante, este estudio realizó una exploración muy general de los formulados, presentando varias limitaciones y siendo estos resultados insuficientes para el desarrollo de un prototipo aplicable comercialmente. En investigaciones futuras, resulta necesario evaluar con más detalle los componentes de la formulación y su proporción, reduciendo el contenido de surfactante tween 80 y/o remplazándolo con otros productos. Dada la alta actividad insecticida del DAEO, es factible su uso en concentraciones más bajas, priorizando la obtención de un formulado más estable y la adición de otros componentes que puedan facilitar su aplicabilidad en el campo.

Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2), 265–267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Adenusi, A. A., & Adewoga, T. O. S. (2013). Studies on the potential and public health importance of non-biting synanthropic flies in the mechanical transmission of human enterohelminths. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(12), 812–818. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt095>
- Almadiy, A. A. (2020). Chemical profile, mosquitocidal, and biochemical effects of essential oil and major components of *Dysphania ambrosioides* against *Culex quinquefasciatus* Say. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(33), 41568–41576. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10137-z>
- Anjali, C. H., Sharma, Y., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2011). Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest Management Science*, 68(2), 158–163. <https://doi.org/10.1002/ps.2233>
- Azmy, R. M., E. El Gohary, E. G., Mahmoud, D. M., Salem, D. A. M., Abdou, M. A., & Salama, M. S. (2019). Assessment of larvicidal activity of nanoemulsion from *Citrus sinensis* essential oil on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(3), 61–67. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.35100>
- Barradas, T. N., & de Holanda e Silva, K. G. (2020). Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(2), 1153–1171. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01142-2>
- Bautista, C. R. (2016). *Entomología Veterinaria Esencial* (2nd ed., pp. 100–103). Instituto Nacional De Investigaciones Forestales Agrícolas Y Pecuarias.
- Bernardes, W. A., Silva, E. O., Crotti, A. E. M., & Baldin, E. L. L. (2018). Bioactivity of selected plant-derived essential oils against *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 77, 16–19. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.02.007>

- Bigoga, J. D., Saahkem, P. A., Ndindeng, S. A., Ngondi, J. L., Nyegue, M., Oben, J. E., & Leke, R. G. F. (2013). Larvicidal and Repellent Potential of *Chenopodium ambrosioides* Linn Essential Oil against *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae). *The Open Entomology Journal*, 7(1), 16–22. <https://doi.org/10.2174/1874407901307010016>
- Bossou, A. D., Mangelinckx, S., Yedomonhan, H., Boko, P. M., Akogbeto, M. C., De Kimpe, N., Avlessi, F., & Sohounhloue, D. C. K. (2013). Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasites & Vectors*, 6(1), 337. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-337>
- Campelo, P. H., Junqueira, L. A., de Resende, J. V., Domingues Zacarias, R., de Barros Fernandes, R. V., Botrel, D. A., & Vilela Borges, S. (2017). Stability of lime essential oil emulsion prepared using biopolymers and ultrasound treatment. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S564–S579. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1303707>
- Castro, M. J. L., Ojeda, C., & Cirelli, A. F. (2013). Advances in surfactants for agrochemicals. *Environmental Chemistry Letters*, 12(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0432-4>
- Cavalli, J.-F., Tomi, F., Bernardini, A.-F., & Casanova, J. (2004). Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochemical Analysis*, 15(5), 275–279. <https://doi.org/10.1002/pca.761>
- Choupanian, M., Omar, D., Basri, M., & Asib, N. (2017). Preparation and characterization of neem oil nanoemulsion formulations against *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum* adults. *Journal of Pesticide Science*, 42(4), 158–165. <https://doi.org/10.1584/jpestics.d17-032>
- Chu, S. S., Feng Hu, J., & Liu, Z. L. (2011). Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, 67(6), 714–718. <https://doi.org/10.1002/ps.2112>

- Davidov-Pardo, G., Joye, I. J., & McClements, D. J. (2015). Encapsulation of resveratrol in biopolymer particles produced using liquid antisolvent precipitation. Part 1: Preparation and characterization. *Food Hydrocolloids*, 45, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.023>
- de Godoi, S. N., Quatrin, P. M., Sagrillo, M. R., Nascimento, K., Wagner, R., Klein, B., Vianna, R. C., & Ourique, A. F. (2017). Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* oil. *BioMed Research International*, 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/2723418>
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A.-C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., Cates, M. E., & Bibette, J. (2011). How to prepare and stabilize very small Nanoemulsions. *Langmuir*, 27(5), 1683–1692. <https://doi.org/10.1021/la104221q>
- Denloye, A., Makanjuola, W. A., Teslim, O. K., Alafia, O. A., Kasali, A. A., & Eshelokun, A. O. (2010). Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) products from Nigeria against three storage insects. *Journal of Plant Protection Research*, 50(3), 379–384. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0064-7>
- Doi, T., Wang, M., & McClements, D. J. (2019). Emulsion-based control of flavor release profiles: Impact of oil droplet characteristics on garlic aroma release during simulated cooking. *Food Research International*, 116, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.056>
- Draz, K. A., Tabikha, R. M., Eldosouky, M. I., Darwish, A. A., & Abdelnasser, M. (2022). Biototoxicity of essential oils and their nano-emulsions against the coleopteran stored product insect pests *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* herbst. *International Journal of Pest Management*, 70(4), 1–15. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2036862>
- Duce, C., Vecchio Cipriotti, S., Spepi, A., Bernazzani, L., & Tinè, M. R. (2017). Vaporization kinetic study of lavender and sage essential oils. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130(1), 595–604. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6503-1>
- Ee, S. L., Duan, X., Liew, J., & Nguyen, Q. D. (2008). Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chemical Engineering Journal*, 140(1), 626–631. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.12.016>

- Egbuna, C., & Sawicka, B. (2020). *Chapter 4—Biopesticides, Safety Issues and Market Trends. Natural Remedies for pest, Disease and Weed Control* (pp. 43–53). Academic Press.
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R companion to applied regression* (3rd ed.). Sage Publications, Inc.
- Freeman, J. C., Ross, D. H., & Scott, J. G. (2019). Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.006>
- Giuliano, G., Campolo, O., Forte, G., Urbaneja, A., Meritxell Pérez-Hedo, Latella, I., Palmeri, V., & Giulia Giunti. (2024). Insecticidal activity of *Allium sativum* essential oil-based nanoemulsion against *Spodoptera littoralis*. *Insects*, 15(7), 476–476. <https://doi.org/10.3390/insects15070476>
- Gupta, I., Singh, R. V., Muthusamy, S., Sharma, M., Grewal, K., Singh, H. P., y Batish, D. R. (2023). Plant Essential Oils as Biopesticides: Applications, Mechanisms, Innovations, and Constraints. *Plants*, 12(16), 2916–2916. <https://doi.org/10.3390/plants12162916>
- Gurpreet, K., & Singh, S. K. (2018). Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(5), 781–789. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000422>
- Guzmán-Plazola, P., Guevara-Gutiérrez, R. D., Olgún-López, J. L., & Mancilla-Villa, O. R. (2016). Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. *Idesia (Arica)*, 34(3), 69–80. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292016000300009>
- Hashem, A. S., Awadalla, S. S., Zayed, G. M., Maggi, F., & Benelli, G. (2018). *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18802–18812. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2068-1>

- Hassanzadeh, H., Alizadeh, M., Hassanzadeh, R., & Ghanbarzadeh, B. (2022). Garlic essential oil-based nanoemulsion carrier: Release and stability kinetics of volatile components. *Food Science & Nutrition*, 10(5), 1613–1625. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2784>
- Hlina, B. L., Birceanu, O., Robinson, C. S., Dhiyebi, H., & Wilkie, M. P. (2021). The relationship between thermal physiology and lampricide sensitivity in larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Journal of Great Lakes Research*, 47(1), S272–S284. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2021.10.002>
- Kandsi, F., Lafdil, F. Z., El Hachlafi, N., Jeddi, M., Bouslamti, M., El fadili, M., Seddoqi, S., & Gseyra, N. (2023). *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin and Clemants: bridging traditional knowledge, photochemistry, preclinical investigations, and toxicological validation for health benefits. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02658-4>
- Khater, H. F., & Geden, C. J. (2019). Efficacy and repellency of some essential oils and their blends against larval and adult house flies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Journal of Vector Ecology*, 44(2), 256–263. <https://doi.org/10.1111/jvec.12357>
- Kim, S., Jeong, M., Lee, J. W., Kim, S. Y., Choi, C. K., & Kang, Y. T. (2018). Development of nanoemulsion CO₂ absorbents for mass transfer performance enhancement. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 94, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.icheatmasstransfer.2018.03.012>
- Langsi, D. J., Tofel, H. K., Fokunang, C. N., Suh, C., Elo, K., Caboni, P., & Nukenine, E. N. (2018). Insecticidal activity of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* and *Cupressus sempervirens* and their binary combinations on *Sitophilus zeamais*. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 024–034. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2018.3.2.0032>
- Lee, S., Peterson, C. J., & Coats, J. R. (2003). Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 39(1), 77–85. [https://doi.org/10.1016/s0022-474x\(02\)00020-6](https://doi.org/10.1016/s0022-474x(02)00020-6)

- Lüdtke, F. L., Stahl, M. A., Grimaldi, R., Bruno, M., Gigante, M. L., & Paula, A. (2022). Optimization of high-pressure homogenization conditions to produce nanostructured lipid carriers using natural and synthetic emulsifiers. *Food Research International*, 160, 111746–111746. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111746>
- Marhamati, M., Ranjbar, G., & Rezaie, M. (2021). Effects of emulsifiers on the physicochemical stability of oil-in-water nanoemulsions: A critical review. *Journal of Molecular Liquids*, 340, 117218. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117218>
- Martínez-Valenzuela, C., & Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(4), 185–200.
- Mazarei, Z., & Rafati, H. (2019). Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT*, 100, 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.094>
- Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., & Megharaj, M. (2020). Pesticides in the urban environment: A potential threat that knocks at the door. *Science of the Total Environment*, 711, 134612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134612>
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/c0sm00549e>
- Mendesil, E., Tadesse, M., & Negash, M. (2011). Efficacy of plant essential oils against two major insect pests of coffee (Coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, and antestia bug, *Antestiopsis intricata*) and maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(3), 366–372. <https://doi.org/10.1080/03235408.2011.587286>
- Montefuscoli, A. R., Werdin González, J. O., Palma, S. D., Ferrero, A. A., & Fernández Band, B. (2013). Design and development of aqueous nanoformulations for mosquito control. *Parasitology Research*, 113(2), 793–800. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3710-y>

- Monzote, L., Montalvo, A. M., Almanonni, S., Scull, R., Miranda, M., & Abreu, J. (2006). Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*, 52(3), 130–136. <https://doi.org/10.1159/000092858>
- Morey, R. A., & Khandagle, A. J. (2012). Bioefficacy of essential oils of medicinal plants against housefly, *Musca domestica* L. *Parasitology Research*, 111(4), 1799–1805. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3027-2>
- Mota-Sanchez, D., & Wise, J. C. (2015). *Arthropod Pesticide Resistance Database | Michigan State University*. The Arthropod Pesticide Resistance Database; Michigan State University. <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=151>
- Ogle, D. H., Doll, J. C., Wheeler, A. P., & Dinno, A. (2016). *Introductory fisheries analyses with R*. Crc Press, Taylor & Francis Group.
- Oyarce, G. A., Loyola, P., Iubini-Aravena, M., Romero, Á., Rodríguez-Maciel, J. C., Becerra, J., & Silva-Aguayo, G. (2025). Adulticidal and repellent activity of essential oils from three cultivated aromatic plants against *Musca domestica* L. *Insects*, 16(5), 542–542. <https://doi.org/10.3390/insects16050542>
- Pandey, A. K., Palni, U. T., & Tripathi, N. N. (2012). Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. oil for the safety of pigeon pea seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4066–4071. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0896-4>
- Pandey, A. K., Kumar, P., Singh, P., Tripathi, N. N., & Bajpai, V. K. (2017). Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Pavela, R. (2009). Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*, 30(2), 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.06.005>

- Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.050>
- Pavela, R., Maggi, F., Lupidi, G., Mbuntcha, H., Woguem, V., Womeni, H. M., Barboni, L., Tapondjou, L. A., & Benelli, G. (2017). *Clausena anisata* and *Dysphania ambrosioides* essential oils: from ethno-medicine to modern uses as effective insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10493–10503. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0267-9>
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). An overview of micro- and nanoemulsions as vehicles for essential oils: Formulation, preparation and stability. *Nanomaterials*, 10(1), 135. <https://doi.org/10.3390/nano10010135>
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing* [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rachmadi, U. W., Permatasari, D., Rahma, D., & Rachmawati, H. (2015). Self-nanoemulsion containing combination of curcumin and silymarin: Formulation and characterization. *Research and Development on Nanotechnology in Indonesia*, 2(1), 37–48.
- Rimada, R. S., Jeandupex, R., & Cafferata, L. F. R. (2007). La estabilidad térmica de Ascaridol en solución acuosa. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(1), 115.
- Robertson, J. L., Russel, R. M., Savin, N. E., Preisler, H. K., & Jones, M. M. (2007). *Bioassays with Arthropods*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420004045>
- Rohloff, J., Dragland, S., Mordal, R., & Iversen, T.-H. (2005). Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield, and quality of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4143–4148. <https://doi.org/10.1021/jf047998s>

- Salazar, A. M., Arismendi, N., López, M. D., Vargas, M., Schoebitz, M., Palacio, D. A., Becerra, J., Cedeño, B., & Zapata, N. (2022). Stability of the oil-based nanoemulsion of *Laureliopsis philippiana* (Looser) and its insecticidal activity against tomato borer (*Tuta absoluta* Meyrick). *Industrial Crops and Products*, *188*, 115635–115635. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115635>
- Sharma, N., Bansal, M., Visht, S., Sharma, P. K., & Kulkarni, G. T. (2010). Nanoemulsion: A new concept of delivery system. *Chronicles of Young Scientists*, *1*(2), 2–6.
- Singh, P., & Pandey, A. K. (2021). *Dysphania ambrosioides* essential oils: from pharmacological agents to uses in modern crop protection—a review. *Phytochemistry Reviews*, *1*(21). <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09752-6>
- Zhao, S., Wang, Z., Wang, X., Kong, B., Liu, Q., Xia, X., & Liu, H. (2023). Characterization of nanoemulsions stabilized with different emulsifiers and their encapsulation efficiency for oregano essential oil: Tween 80, soybean protein isolate, tea saponin, and soy lecithin. *Foods*, *12*(17), 3183–3183. <https://doi.org/10.3390/foods12173183>
- Zhou, Y., Luo, X., Wang, Z., McClements, D. J., Huang, W., Fu, H., & Zhu, K. (2023). Dual role of polyglycerol vitamin E succinate in emulsions: An efficient antioxidant emulsifier. *Food Chemistry*, *416*, 135776–135776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135776>
- Zuzarte, M., & Salgueiro, L. (2015). *Bioactive Essential Oils and Cancer* (pp. 19–61). Springer International Publishing.

CONCLUSIONES GENERALES

M. domestica presentó una alta tolerancia tanto a los insecticidas sintéticos cipermetrina y pirimifos metil como a los bioinsecticidas piretrinas + PBO, azadiractina y D-limoneno, variando su eficacia según el estado de desarrollo del insecto ya que en el control de larvas y pupas se requirió aplicar dosis mayores a las recomendadas, en cambio los adultos fueron más susceptibles, especialmente con las piretrinas.

Los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), salvia (*Salvia officinalis*) y paico (*Dysphania ambrosioides*) presentaron actividad insecticida y repelente contra adultos de *M. domestica*, destacando entre estos la actividad insecticida del aceite esencial de paico puro y formulado como nanoemulsión.

Los resultados derivados de esta investigación indican que las opciones comerciales para el control de *M. domestica* poseen una eficacia reducida y resulta necesaria la búsqueda de alternativas para su control, siendo una opción factible el uso de productos formulados con aceites esenciales y sus componentes, destacando entre los estudiados el aceite esencial de *D. ambrosioides*, el cual formulado mejoró su bioactividad y se mantuvo estable por más de 14 días.