

A close-up photograph of a black and orange ladybug (Coccinella septempunctata) on a green leaf. The ladybug is positioned on the leaf, which is attached to a dark, textured tree trunk. The background is blurred, showing green foliage and brown leaves. The text "BIOPLAGUICIDAS" is overlaid in the center of the image.

BIOPLAGUICIDAS

Julio A. Zygadlo

AUTORES.

Peschiutta, M.L.

Bióloga, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba (2008), Doctora en Cs. Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (2015). Trabajó en la Universidad de la Patagonia San Juan Bosco (Sede Comodoro Rivadavia) en el área de la Ecofisiología Vegetal especializándose en frutales (cerezos) y el impacto de la principal plaga de este frutal: la babosita del peral. Realizó trabajos de campo en Comodoro Rivadavia, Bahía Solano y Río Mayo (Chubut) y Los Antiguos (Santa Cruz) (2009-2015). Participó en varios proyectos de investigación relacionados con estudios ecofisiológicos (medición de potencial hídrico, fotosíntesis, flujo, crecimiento) sobre especies arbóreas, cultivos frutales y especies nativas patagónicas; de los cuales obtuvo varias publicaciones. Actualmente se desempeña como Becaria Postdoctoral en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET-CÓRDOBA) (2017), estudiando los efectos de la cochinilla harinosa (*Planococcus ficus*) en los viñedos y su control utilizando aceites esenciales de plantas comerciales. Su área actual de investigación es el desarrollo de bioplaguicidas para el control de plagas de la vid.

Zunino, M.P.

En 1996 obtiene el título de Bióloga y se graduó de Dra. en Ciencias Biológicas en el 2005, ambos en la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, realizando sus estudios en la bioactividad antimicrobiana de los aceites esenciales y sus componentes. Actualmente se desempeña como Investigadora Adjunta en la Carrera de Investigador Científico de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV). Su tema de trabajo son los compuestos orgánicos volátiles su importancia en las interacciones entre artrópodos, microorganismos y granos en un sistema de almacenaje. Ha publicado artículos en libros y revistas científicas nacionales y extranjeras. Forma parte del grupo de investigación dirigido por el Dr. Julio Zygadlo. Ha participado como integrante y ha dirigido proyectos de investigación.

Merlo, C.

En el año 2006 obtuvo el título de Bióloga en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba y se graduó de Dra. en Ciencias Biológicas en el año 2013 en la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Es Investigadora Asistente en la Carrera de Investigador Científico de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), e investiga los compuestos volátiles bacterianos como semioquímicos e insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais*. Ha publicado artículos en libros y revistas científicas nacionales y extranjeras. Forma parte del grupo de investigación dirigido por el Dr. Julio Zygadlo. Ha participado como integrante y director de proyectos de investigación. En el año 2009 inicio su actividad docente y actualmente se desempeña como Profesora Adjunta de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba.

Goñi, M.L.

Ingeniera en alimentos egresada de la Universidad Nacional de Mar del Plata (Argentina). Obtuvo su doctorado en Ingeniería Química en PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur, Argentina) en 2014. Ha trabajado en la UGhent (Bélgica) y en el INSA-Toulouse (Francia) en el marco del programa Erasmus Mundus. Desde 2015 trabaja en la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) como becaria posdoctoral de CONICET. Su trabajo se centra en la impregnación supercrítica de polímeros y biopolímeros con compuestos activos naturales para obtener materiales activos aplicables en envasado de alimentos y como dispositivos de liberación controlada para la agroindustria.

Muratore, F.

Ingeniera química egresada en la Universidad Tecnológica Nacional (UTN, Facultad Regional Córdoba) en 2012. Desde 2015 realiza sus estudios de doctorado en Ciencias de la Ingeniería en la Universidad Nacional de Córdoba. Su proyecto de tesis involucra el desarrollo de papeles bioactivos por injerto de moléculas específicas en celulosa, en particular compuestos con actividad antimicrobiana e insecticida de origen natural.

Martini, R.E.

Investigadora Adjunta de CONICET y Profesora Adjunta de Termodinámica Química en la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). Obtuvo su doctorado en Ingeniería Química en PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur, Argentina) en 2007, realizando su tesis sobre el uso de fluidos cuasi y supercríticos en la separación de mezclas de polímeros y como medio de reacción para injerto de copolímeros. Realizó una estadía posdoctoral en la Universidad de Perugia (Italia) trabajando en procesamiento de polímeros nanocompuestos. Actualmente trabaja también en la modificación de polímeros comerciales con sustancias bioactivas por injerto químico e impregnación supercrítica.

Gañan, N.A.

Obtuvo su doctorado en Ingeniería Química en PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur, CONICET, Argentina) en 2014. Durante su tesis trabajó en la extracción y fraccionamiento de insecticidas naturales con fluidos supercríticos. Entre 2014 y 2016 fue becario posdoctoral de CONICET. Ha trabajado en la Universidad de Coimbra (Portugal) y en el Institut National des Sciences Appliquées (Toulouse, Francia) en el marco del programa Erasmus Mundus. Actualmente es Investigador Asistente de CONICET en la Universidad Nacional de Córdoba (Argentina). Su proyecto de investigación involucra el estudio de tecnologías de fluidos supercríticos para el desarrollo de materiales activos.

Lopretti, M.

Su formación académica inicial se realizó en la Universidad de la República, Uruguay, en el año 1978 obtiene el título de Licenciada en Ciencias Biológicas (Bioquímica), en 1991 logra un Msc (Máster en Ciencias) y en 1999 concluye su formación doctoral, realizando sus estudios en la bioquímica de la degradación y depolimerización de la lignina. Su formación académica fue ampliada con una formación post-doctoral en la Universidad de Caxias do Sul (Brasil), Grenoble (Francia), LANOTEC (Costa Rica) y Braganza (Portugal). Participo como investigadora y gerencio el Laboratorio Tecnológico del Uruguay, también fue directora de proyectos internacionales como CYTED. Su area de trabajo es Biomasa como fuente de productos químicos y energía Valorización de biopolímeros (de origen vegetal, animal, microbiano) por medio de procesos bioquímicos y /o tecnológicos. Enzimología, Microencapsulación , radiotrazadores , irradiación a altas dosis y mutagénesis inducida. Consorcios de nuevos microorganismos extremófilo y sus enzimas libres o inmovilizadas por radiopolimerización y otros. Producción de nanopartículas a partir de biopolímeros. Realizo un gran numero de publicaciones científicas en revistas y es editora de libros en el tema. También ha participado en congresos y reuniones científicas nacionales e internacionales.

Lluber, G.

Es Química Farmacéutica y Bioquímica Clínica (2017) de la Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Su tarea se a desarrollado en el area de producción de compuestos bioactivos. Su labor profesional la ha desempeñado en diferentes empresas nacionales e internacionales del area de la salud y de la ingeniería química. Es docente en el Centro de Investigación Nuclear, Uruguay. A participado en reuniones científicas y ha escrito trabajos científicos.

Pizzolitto, R.P.

En el año 2005 obtiene el título de Microbióloga y se graduó de Dra. en Ciencias Biológicas en el año 2011, ambos en la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, realizando sus estudios en la prevención de micotoxicosis en la industria avícola por microorganismos bioeliminadores de toxinas fúngicas. Desde el año 2014 se desempeña como Investigadora Asistente en la Carrera de Investigador Científico de CONICET, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), investigando los sesquiterpenos de *Fusarium verticillioides* y sus funciones en la interacción hongo-grano-insecto. Ha publicado artículos en libros y revistas científicas nacionales y extranjeras. Forma parte del grupo de investigación dirigido por el Dr. Julio Zygado. Ha participado como integrante de proyectos de investigación y en la actualidad dirige el proyecto titulado: "Compuestos volátiles de granos y los sesquiterpenos de *Fusarium verticillioides*: sus funciones en la interacción hongo-grano-insecto".

Dambolena, J.S.

Licenciado en Química (2003), de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Realizó su Tesis Doctoral en el estudio de monoterpenos para el control de *Fusarium verticillioides* y sus micotoxinas, obteniendo el Título de Doctor en Ciencias Biológicas en el año 2010. Se desempeña desde el año 2011 como Investigador Asistente en la Carrera de Investigador Científico de Conicet, investigando la participación de compuestos volátiles en la comunicación grano-insecto-hongo, y su potencial para el diseño un plaguicida de origen natural. En la actualidad dirige, el proyecto de denominado "Micovirus: una alternativa para el control biológico de *Fusarium verticillioides* y sus micotoxinas". Inició su actividad docente en el año 2004, ocupando el cargo de Profesor Asistente de la asignatura Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. En la actualidad se desempeña como profesor permanente en la Maestría de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, y como Profesor Ayudante Cat A en la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, ambos en la Universidad Nacional de Córdoba

Zygado, J.A.

Biólogo (1981) y Dr. en Cs. Biológicas (1989) de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Profesor Titular de Química Orgánica y de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Investigador Principal del CONICET. Los aceites esenciales y/o sus componentes son su área de investigación con énfasis sobre el desarrollo de bioplaguicidas. Los resultados de su trabajo se ven reflejados en ciento ochenta artículos publicados en revistas nacionales e internacionales y en trece capítulos de libros. Su labor fue premiada en once oportunidades por diferentes organizaciones. Trece alumnos han obtenido su título de postgrado, maestrías o doctorados, bajo su dirección. Él es editor asociado y revisor externo de algunas revistas científicas internacionales. Su labor ha sido subsidiada por organismos privados, estatales, nacionales e internacionales.

Índice.

7- 28.- LA COCHINILLA HARINOSA DE LA VID: ¿CÓMO CONTROLAR UNA PLAGA DE GRAN IMPACTO ECONÓMICO MUNDIAL?. PESCHIUTTA, María Laura

29 - 59.- ACEITES ESENCIALES COMO BIOPLAGUICIDAS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM*. EVALUACIÓN DE METODOS, ANALISIS DE ESTRUCTURA ACTIVIDAD. ZUNINO, María Paula.

60 - 70.- USO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO AGENTES DE BIOCONTROL PARA LA PRESERVACIÓN DE SILOS. MERLO, Carolina.

71 - 84.- FORMULACIONES DE LIBERACIÓN GRADUAL DE BIOPLAGUICIDAS. INCORPORACIÓN EN MATERIALES POLIMÉRICOS MEDIANTE IMPREGNACIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO. GOÑI, María L. ; MURATORE, Florencia ; MARTINI, Raquel E.; GAÑAN, Nicolás A.

85 - 107.- BIOMASA Y BIOPLAGUICIDAS. LOPRETTI, Mary; LLUBERAS, Gabriela.

108 - 123.- BIOPLAGUICIDAS. USO, EFICACIA, REGULACION Y MERCADO. PIZZOLITTO, Romina P.; DAMBOLENA, José S.; ZYGADLO, Julio A.

Prologo.

El crecimiento global y continuo de la población humana demanda un incremento permanente en la producción de alimentos. Esta situación se torna crítica en diferentes regiones del mundo, donde la producción agropecuaria se incrementa sobre la destrucción del ambiente, lo cual lleva a la contaminación del suelo, del agua además de una pérdida importante en la biodiversidad. Esta situación se ve agravada cuando el alimento almacenado para su comercialización y/o industrialización, también sufre un fuerte deterioro por la actividad de diferentes organismos, antes de llegar al consumidor. Existen varias plagas que afectan los alimentos a lo largo de su cadena de producción, ellos incluyen microorganismos, insectos, mamíferos, ácaros y nematodos. Esta situación se vuelve aun más complicada cuando se encuentran las micotoxinas producidas por hongos que deterioran el alimento y que en muchas ocasiones son diseminadas por la actividad de insectos o mamíferos. Con la llegada de los plaguicidas de origen sintético que mostraron una gran capacidad de toxicidad sobre las plagas, gran parte de estos problemas fueron resueltos. De cualquier manera, en los últimos años se ha desarrollado una fuerte presión por parte de los consumidores sobre las empresas productoras de estos compuestos, como también sobre los diferentes gobiernos y agricultores para que dejen de utilizar estos productos o al menos reducir en gran medida su aplicación. Esta presión surge asociada a la contaminación ambiental, al surgimiento de resistencia en la mayoría de las plagas (lo que llevo a un incremento en la aplicación de estas sustancias tóxicas para lograr los mismos resultados que se producían antes) y a enfermedades en la población que se las relaciona muchas veces con estos productos sintéticos presentes en los alimentos o en el agua. Esto ha conducido a un renovado interés en plaguicidas de origen natural, ya sean microbianos, obtenidos desde las plantas o de los animales, como aquellos que pueden surgir de las interacciones entre los organismos, feromonas ó semioquímicos. Estos nuevos compuestos biodegradables y sin la capacidad de dejar residuos tóxicos permiten una opción eco-químicamente amigable con el ambiente y el hombre. El uso de plantas o sus metabolitos para el control de diferentes plagas es una practica antigua en diferentes culturas, como la de India o China.

El presente libro esta enfocado desde el estado actual de los bio-plaguicidas y su proyección futura, este contiene diferentes temas con aportes relevantes y prácticos bajo la consigna de bio-plaguicidas. El primer capítulo abarca desde el ciclo biológico hasta métodos de control de la cochinilla harinosa una plaga de gran importancia en los cultivos de vid en Córdoba. El segundo tiene como objetivos una visión crítica de los diferentes métodos de bioensayos y estrategias de control para una plaga secundaria que afecta alimentos almacenados. Las bacterias como una estrategia para la protección del ensilaje es el tema del tercer capítulo. El cuarto y quinto capítulo son tecnológicos, sobre diferentes aspectos de transportar los bioplaguicidas para su uso en la cadena alimenticia. Por último, el sexto

capítulo hace un resumen de los bioplaguicidas y del nuevo mercado que ellos representan para el control de plagas en una estructura socio-económica global que no acepta los compuestos sintéticos.

Los autores también quieren expresar su agradecimiento a los siguientes organismos, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT 2012-2146 - Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica -Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba y el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED-BIORRECER) por la ayuda financiera otorgada para lograr la publicación de este libro.

Julio A. Zygodlo.

**LA COCHINILLA HARINOSA DE LA VID: ¿CÓMO CONTROLAR UNA PLAGA DE GRAN
IMPACTO ECONÓMICO MUNDIAL?.**

**ACEITES ESENCIALES COMO BIOPLAGUICIDAS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM*.
EVALUACIÓN DE METODOS, ANALISIS DE ESTRUCTURA ACTIVIDAD.**

ZUNINO, María Paula.

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal. IMBIV. CONICET. Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

Introducción.

Las principales plagas de los granos almacenados y sus subproductos son los insectos y los ácaros. Entre ellos hay descritas 600 especies de plagas de escarabajos, 70 especies de polillas y cerca de 355 especies de ácaros que causan pérdidas cuantitativas y cualitativas de los alimentos. Los insectos herbívoros son responsables de la destrucción de un quinto de la producción anual mundial del total de cultivos. Una de las mayores razones por la cual ellos son considerados plagas, es la creación de hábitats artificiales manipulados por el hombre que son agro-ecosistemas para satisfacer sus necesidades de almacenamiento de alimento. En estos hábitats los cultivos se seleccionan por su gran tamaño, su alto rendimiento, valor nutritivo, y se agrupan en un área confinada. Esto no solamente satisface la demanda del hombre sino que provee al mismo tiempo, un entorno muy propicio para los insectos herbívoros. En las zonas tropicales y subtropicales, donde el clima proporciona un ambiente muy favorable para una amplia gama de insectos, se requieren enormes esfuerzos para suprimir las densidades de población de las diferentes plagas con el fin de lograr un suministro adecuado de alimentos. Después de cosechar el cultivo, es sometido a varias operaciones que, si son incorrectamente realizadas pueden dar lugar a graves pérdidas. Como punto de partida, siempre debe tenerse en cuenta que un grano intacto (entero) es un elemento esencial para el éxito del almacenamiento. Los granos agrietados o rotos proporcionan un punto de entrada para la infestación por insectos y hongos durante el almacenamiento. El daño a los granos puede suceder debido a la aplicación incorrecta de las prácticas posteriores a la cosecha como la trilla, el secado o el transporte (Sallam, 1999; Rajendran y Sriranjini, 2008). La contaminación de los productos alimenticios por los insectos es un gran problema para las industrias alimenticias. La necesidad de controlar los insectos hasta su eliminación total (“insectos cero”) lleva en muchos casos a realizar un uso incorrecto y excesivo de los insecticidas químicos, sin complementarlos con otras herramientas de control. Esta práctica resulta peligrosa desde varios puntos de vista: pone en riesgo la inocuidad del alimento y la salud del consumidor, genera rechazos por la población por el exceso de residuo, posee un elevado impacto

ambiental y puede comprometer la salud y la seguridad de quienes los manipulan (Carpaneto et al., 2012). Actualmente, según SENASA (Organismo responsable de garantizar y certificar la sanidad y calidad de la producción agropecuaria, pesquera y forestal) los productos más usados registrados son: cuatro principios activos preventivos y dos curativos. Dentro de los preventivos hay dos organofosforados: clorpirifosmetil y pirimifosmetil y dos piretroides: deltametrina y lambda cialotrina. Un preventivo de muy corta duración diclorvos (DDVP) y un curativo fumigantes a base de fosfina (fosfuro de hidrogeno), con diferentes presentaciones. De acuerdo a nuevas reglamentaciones tanto en Provincia de Córdoba como en Provincia de Santa Fe se ha prohibido los tratamientos curativos en carga y transporte de granos, si bien hay normas que los prohíben en todo el territorio nacional desde 1983 para el uso de fumigantes, hoy se suman estas provincias incluyendo el uso de agroquímicos (líquidos) (Laitano, 2011). El incremento de problemas asociados a los plaguicidas sintéticos de amplio espectro, como el aumento de costos y aplicación; resurgimiento y resistencia de las plagas a los insecticidas; efectos letales a organismos no blancos y a los usuarios; efecto residual y contaminación del ambiente (agotamiento de la capa de ozono, contaminación ambiental, residuos de pesticidas en el suelo) así como su uso a gran escala, han llevado a la necesidad de investigar sobre plaguicidas biodegradables con gran selectividad. Los nuevos insecticidas naturales deben ser más específicos, no fitotóxicos, no tóxicos a mamíferos, amigable con el ambiente, menos propenso a generar resistencia, deben ser relativamente menos caros y localmente disponibles. Esto llevó a re-examinar las prácticas centenarias de la protección de productos almacenados utilizando derivados vegetales los cuales se conocen de ser utilizados para resistir el ataque de los insectos (Rajashekar et al., 2012). Entre los compuestos naturales utilizados como insecticidas se encuentran los aceites esenciales (AE) y sus componentes particulares, los terpenos (Gershenzon y Dudareva, 2007; Rajendran y Sriranjini, 2008). Ejemplo de especies vegetales cuyos metabolitos fueron formulados como insecticidas son: *Azadirachta indica*, *Chrysanthemum cinerariaefolium* y *Carum carvi*.

Tipos de plagas

Las plagas de insectos varían de acuerdo con la región, la estación del año, el sistema y el periodo del almacenamiento. Los insectos plagas se pueden diferenciar, de acuerdo al tipo de infestación en plagas primarias y plagas secundarias. **Plagas primarias:** son aquellos insectos que atacan el grano sano, sin daño previo y producen la primera infestación. Son las más importantes durante el almacenamiento; sus fuentes de alimento son limitadas y mueren cuando éstas se agotan o cuando las poblaciones alcanzan altos niveles. Los insectos de esta clase pueden sobrevivir en los residuos de grano dentro de la estructura de almacenamiento. En muchos casos los daños que provocan comienzan en el

campo, antes del almacenamiento. Al completar su ciclo dejan el grano picado o dañado. Dentro del grupo de plagas primarias se encuentran el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*), el barrenador grande del grano (*Prostephanus truncatus*), la palomilla de los granos (*Sitotroga cerealella*) y el barrenillo de los granos (*Rhyzoperta dominica*). **Plagas secundarias:** estas plagas por el contrario, no atacan los granos íntegros, ya que no pueden penetrarlo por la estructura de protección del grano. Por lo tanto se alimentan de aquellos granos que ya han sido dañados por plagas primarias o sometidos a manejo o procesamiento, es decir granos rotos, productos, subproductos de la molienda y procesados. Las plagas secundarias tienen una variedad de alimentos más amplia y es posible que hagan su aparición en estadios muy tempranos de almacenamiento. Sin embargo, los daños no se consideran de importancia hasta que son causados por plagas primarias. Entre las plagas secundarias se encuentran las polillas (*Plodia interpunctella*, *Anagasta kühniella*), las carcomas (*Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus*, *C. ferrugineus*, *Tenebroides mauritanicus*), el gusano oscuro de la harina (*Tenebrio obscurus*), y los escarabajos tribolios (*Tribolium castaneum* y *T. confusum*) (García-Lara et al., 2007; Casini y Santajuliana, 2015). En este capítulo haremos referencia al insecto *Tribolium castaneum*, su control con AE, sus componentes principales, y las técnicas insecticidas utilizadas.

Características de *Tribolium* sp.

Este insecto pertenece al Orden Coleóptera y a la Familia de los Tenebrionidae. Este grupo de insectos es grande y variado y contiene más de 10000 especies de las cuales cerca de 100 están asociadas con productos almacenados. La mayoría de los tenebriónidos son de color negro o marrón oscuro y principalmente son fitófagos. Los adultos se caracterizan por tener solo 4 segmentos en el tarso de la pata trasera. La infestación por estos gorgojos resulta en un olor poco atractivo debido a la secreción de benzoquinonas en glándulas abdominales. Estas sustancias son nocivas para animales de sangre caliente en condiciones adecuadas de temperatura y humedad (Liang et al., 2016). Además, estas quinonas tóxicas contaminan las harinas y productos de la harina confiriéndoles olor desagradable y color grisáceo, por lo tanto se desprecia dicho producto por la presencia de excrementos, exuvios y restos de cadáveres.

Tanto *T. castaneum* como *T. confusum* son consideradas importantes plagas secundarias de granos almacenados y harinas. Ambos son probablemente las plagas secundarias más comunes de todas las materias primas vegetales almacenadas en todo el mundo, especialmente en climas tropicales y sub tropicales. Las dos especies atacan granos de maíz, trigo, harinas y productos alimenticios basados en granos, chícharos, frijoles, nueces sin cáscara, frutas deshidratadas, especias, chocolate, medicamentos, chiles

y de otros tipos de instalaciones. De todas formas los productos de granos molidos como harinas son su alimento preferido.

Tribolium castaneum es más común en zonas tropicales y es dominante con respecto a *T.confusum*. Este último se confunde frecuentemente con *T. castaneum* pero pueden ser separados observando los últimos tres segmentos de la antena que son muchos más grandes que los restantes en *T. castaneum* formando una clava, mientras que en *T. confusum* los últimos 5 segmentos aumentan gradualmente de tamaño hasta el final. *Tribolium confusum* al igual que *T. castaneum* se encuentra en productos de cereales triturados y son habitantes frecuentes de los molinos de harinas sobre todo en regiones templadas de todo el mundo. Otra diferencia que tienen estas especies es que *T. confusum* no es capaz de volar como lo hace *T. castaneum* (Sallam, 1999).

Caracteres de *Tribolium castaneum*.

El adulto mide de 3 a 4 mm, es de color que va de marrón rojizo a negruzco y de forma aplanada. Pueden vivir de uno a tres años. Presenta de 3 a 5 generaciones anuales. La cabeza y la parte superior del tórax están cubiertas de perforaciones y protuberancias y los élitros están surcados todo a lo largo. Los huevos son pequeños (0.5 mm), cilíndricos y blancos. Son pegajosos que hace que se cubran de harina y se peguen en los contenedores. Las larvas son alargadas de color blanco cremoso hasta tornarse amarillo marrón y están cubiertas de pelos finos. Miden de 5 a 6 mm de longitud. La cabeza es de color marrón pálido. Presentan generalmente entre 7 a 8 instares larvales. La pupa no tiene capullo, es de color blanco amarillento y luego se torna marrón (García Lara et al., 2007; CABI, 2007; Sallam, 1999).

Ciclo de vida

Las hembras depositan entre 350-400 huevos durante su vida adulta (5 a 8 meses) y puede llegar a poner hasta un máximo de 1000 huevos con temperaturas de entre 22 y 40 °C durante su desarrollo. Las larvas antes de pupar suelen permanecer dentro del grano (Sallam, 1999). Bajo condiciones óptimas de 35°C y de 60-80% de humedad relativa los tiempos de desarrollo para cada estadio son aproximadamente 3 días para los huevos, 16 días para las larvas y 5 días para las pupas (CABI, 2007). Tanto larvas como adultos causan daño. Los adultos son tolerantes a humedades relativas menores al 11% y pueden alimentarse de una amplia gama de alimentos y son colonizadores perfectos de nuevos hábitats (Sallam, 1999). Los adultos se dispersan en distancias cortas a través del vuelo. Los adultos y larvas se alimentan principalmente del germen de los cereales. Tienen una marcada tendencia caníbal y son depredadores de huevos y larvas de otras plagas de almacén (García Lara, 2007).

Familias de plantas cuyos aceites esenciales fueron utilizados como insecticida contra *Tribolium castaneum*.

Los AE de 100 especies distribuidas en 19 familias han sido estudiados en los últimos 15 años, para estudiar sus efectos insecticidas y repelentes contra el gorgojo rojo de la harina. Las familias más estudiadas fueron Lamiaceae, Rutaceae, Asteraceae y Myrtaceae con más de 10 especies cada una. Dentro de las Lamiaceae se estudiaron 10 géneros y de ellos los más frecuentes fueron *Mentha* (3 especies), y los géneros *Hyptis*, *Ocimum*, *Salvia* y *Vitex* con 2 especies cada uno. Incluso se estudiaron poblaciones de plantas diferentes dentro de la especie *Mentha suaveolens*. Mientras que dentro de las Rutaceae se estudiaron 6 géneros y de los cuales los más frecuentes fueron *Murraya* (6 especies), *Citrus* (5 especies), *Evodia* (3 especies) y *Zanthoxylum* (2 especies). Los géneros más frecuentes dentro de las Asteraceae fueron *Artemisia* (7 especies) y *Achillea* (2 especies) y dentro de las Myrtaceae los géneros *Eucalyptus* (6 especies), *Callistemon*, *Melaleuca* y *Syzygium* con 2 especies cada uno. En la Fig. 1 se muestra la frecuencia en el número de especies dentro de cada familia de plantas que fueron ensayadas para demostrar su efecto insecticida o repelente.

Tipos de bioensayos.

Con los AE de las diferentes familias nombradas más arriba se han realizado distintos tipos de ensayos: insecticida por fumigación, insecticida por contacto y ensayo de repelencia. Dentro del ensayo de insecticida por contacto se encuentran dos métodos diferentes: aquel en que la solución de aceite esencial es aplicada sobre un papel de filtro por donde caminarán los insectos a ensayar, y en el otro método dicha solución es aplicada en forma de gota sobre el dorso del insecto. En el primer caso hablamos de concentraciones letales y en el segundo de dosis letales. Cabe destacar que estos métodos son utilizados como insecticidas con casi todos los insectos que atacan a alimentos almacenados como los géneros *Sitophilus*, *Rhyzopertha*, *Oryzaephilus*, *Callosobruchus*, *Lasioderma* y otras especies de *Tribolium*. La frecuencia con que fueron estudiados estos métodos sobre *T. castaneum* se puede ver a continuación (Fig. 2):

El método fumigante fue el más estudiado. Esto se debería a la condición de volatilidad que tienen los AE teniendo en cuenta que estos insectos se encuentran en alimentos almacenados de ambientes cerrados y su aplicación en estos ambientes aseguraría que los compuestos no se pierdan fácilmente. De todas formas es un método de muy fácil aplicación. La toxicidad de los diferentes métodos se explica por las diferentes vías de ingreso del aceite esencial al insecto: absorbidos por la cutícula (efecto contacto), inhalados (efecto fumigante) o por sistema digestivo (efecto ingestivo). Mientras que el ensayo de repelencia no tiene que ver con la muerte del insecto sino con su alejamiento de

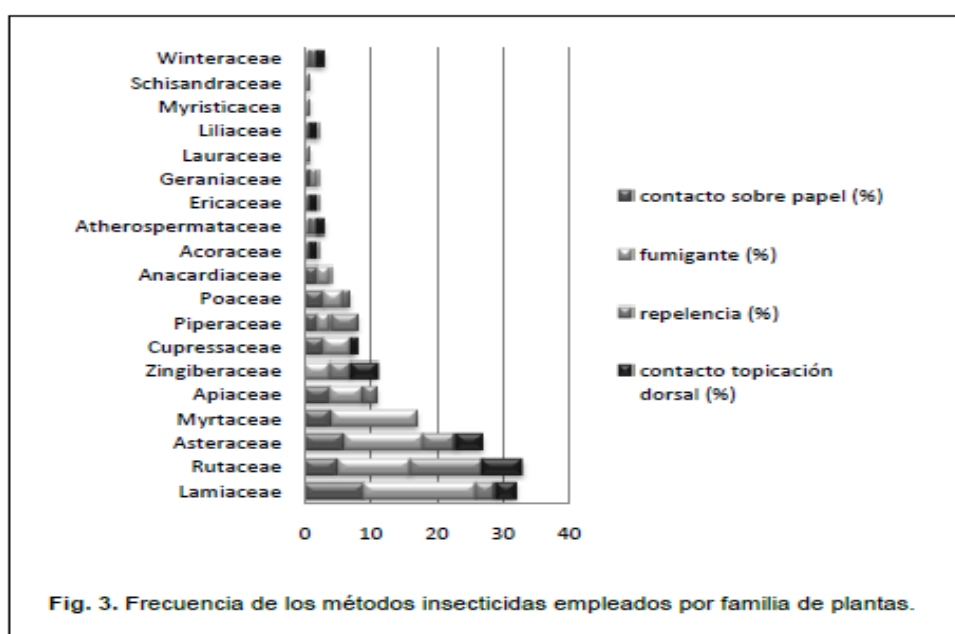
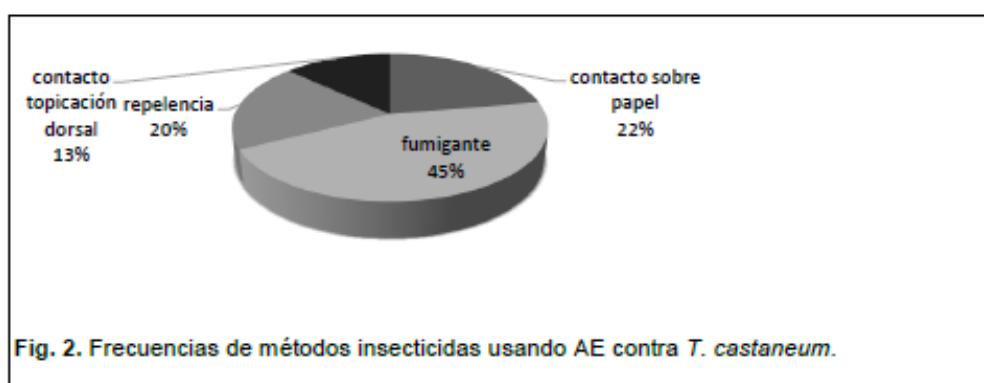
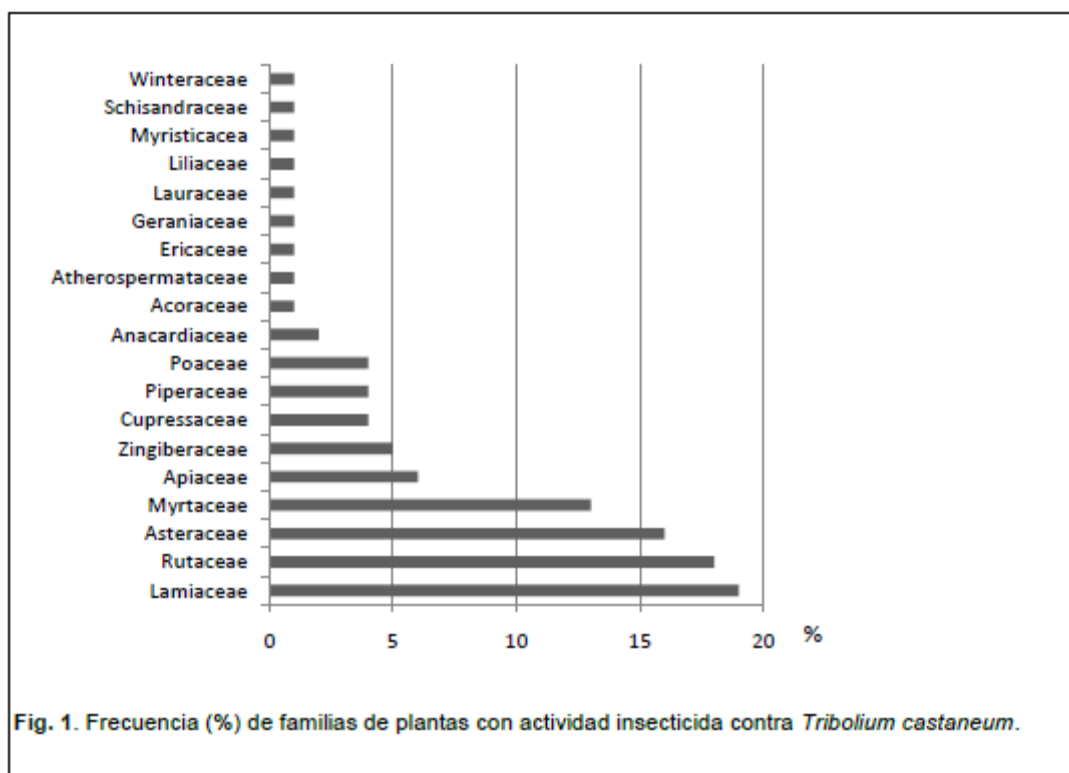
la fuente de alimento. Está relacionado más bien a su conducta. La cutícula de los insectos es secretada por una sola capa de células epidérmicas que cubre toda la superficie del insecto extendiéndose en el sistema traqueal, intestino anterior y posterior, y parte del sistema genital. Está compuesta por varias capas, desde el exterior: el cemento y la cera, luego la epicutícula, a continuación la exo- y la endocutícula (VincentyWegst, 2004). Las capas exo- y endocuticulares consisten en disposiciones de nanofibras de quitina altamente cristalinas embebidas en una matriz de proteínas, polifenoles y agua con pequeñas cantidades de lípidos. Se ha propuesto que los constituyentes de los AE (mezcla compleja de sustancias no polares y mínimamente polares) difunden en la cutícula horizontalmente y/o verticalmente. Por su difusión horizontal ellos alcanzan el sistema traqueal donde continúan moviéndose hasta llegar a todos los tejidos en el organismo, y por lo tanto alcanzan su sitio o sitios de acción. Difundiendo verticalmente, las sustancias atraviesan desde el tegumento a la epidermis y entran en el organismo (Werdin González et al., 2014). Teniendo en cuenta las familias de plantas cuyos AE fueron utilizados como insecticidas, tres de ellas, las más frecuentes, fueron estudiadas aplicando los cuatro métodos nombrados (Fig. 3).

Características de los bioensayos.

En base a la bibliografía consultada la mayoría de los métodos insecticidas se replican entre 3 y 6 veces. La mayoría de los investigadores utilizan 3 y 5 réplicas. Los insecticidas (comerciales) utilizados como controles positivos son: piretrinas (compuestos naturales que se encuentran en ciertas flores de crisantemos), piretroides (sustancias sintéticas de estructura muy parecida a las piretrinas, el más utilizado es la permetrina), bromuro de metilo, fosfina y malatión. Mientras que las sustancias utilizadas como control positivo de repelencia son: DEET (N,N-dietil-meta-toluamida) y etilbutilacetil aminopropionato. Los solventes utilizados para disolver los AE o sus compuestos principales son hexano y acetona. Pocos autores realizan experiencias demostrando que ambos solventes son inocuos para los insectos, pero por su alta volatilidad, al dejarlos secar por un determinado tiempo, no quedaría residuo y por lo tanto no presentarían toxicidad.

** Edad de los insectos adultos utilizados para los test:*

Las diferentes edades de los insectos adultos utilizadas para los diferentes test insecticidas y de repelencia van desde menores a una semana como mínima edad hasta un mes como máxima (ambas son las menos utilizadas). Las edades más utilizadas son insectos de una a dos semanas (34%) e insectos de una semana (29%) (Fig. 4). Cabe destacar que hay pocas publicaciones que estudian la oviposición de las hembras y el



desarrollo larval. De esos pocos estudios (analizados para este manuscrito) un 50% concluye que tanto las larvas como los insectos adultos presentan la misma susceptibilidad a la aplicación de los AE. Mientras que otro 50% concluye que los adultos son menos resistentes que las larvas. Con respecto a estudios de los diferentes estadios larvales también hay una misma proporción de estudios que muestran tres diferentes posturas: no hay diferencia de susceptibilidad a la aplicación del aceite entre estadios larvales; los estadios más grandes en edad son más resistentes que los más chicos y viceversa. Se deberían hacer más estudios sobre larvas para dilucidar una tendencia. De todas formas no se encontraron estudios en donde no se tenga en cuenta la edad del insecto, es decir en donde usen insectos de todas las edades que es lo que naturalmente ocurriría en un alimento contaminado por este insecto.

**Número de insectos utilizados en los diferentes test:*

En los test insecticidas tanto por contacto como fumigante hay un mayor rango de número de insectos utilizados en un test, mientras que en los test de repelencia la mayoría utilizó 20 insectos (Fig. 5). Tener en cuenta el número de insectos utilizados dentro de las unidades experimentales en los diferentes test es de suma importancia para poder comparar resultados entre diferentes autores. En los test insecticidas un 70% de los trabajos analizados utilizaron 10 insectos y un 23% utilizaron 20 insectos. Estos trabajos fueron utilizados para realizar un estudio de toxicidad en base a la composición de los AE. Con respecto a los test de repelencia hay menos variabilidad en la cantidad de insectos utilizados por unidad experimental ya que el 85% utilizó 20 insectos. El problema de este test está en la metodología empleada, que se detallará más adelante, y por eso se hace difícil comparar los resultados entre sí.

** Condiciones de Temperatura y Humedad de los ensayos.*

Menos del 20% de los trabajos analizados describen estas condiciones en que se hacen los diferentes test. Hay que tener en cuenta que es importante determinar estas condiciones ya que los AE contienen sustancias volátiles y pueden ser alteradas en su volatilidad sobre todo por la temperatura.

De esos pocos trabajos en la Tabla 1 se muestra el porcentaje de las distintas temperaturas y humedades empleadas. Se podría decir que las temperaturas preferidas están en los rangos de 25 a 28 °C y las humedades entre los 65 y 80 %.

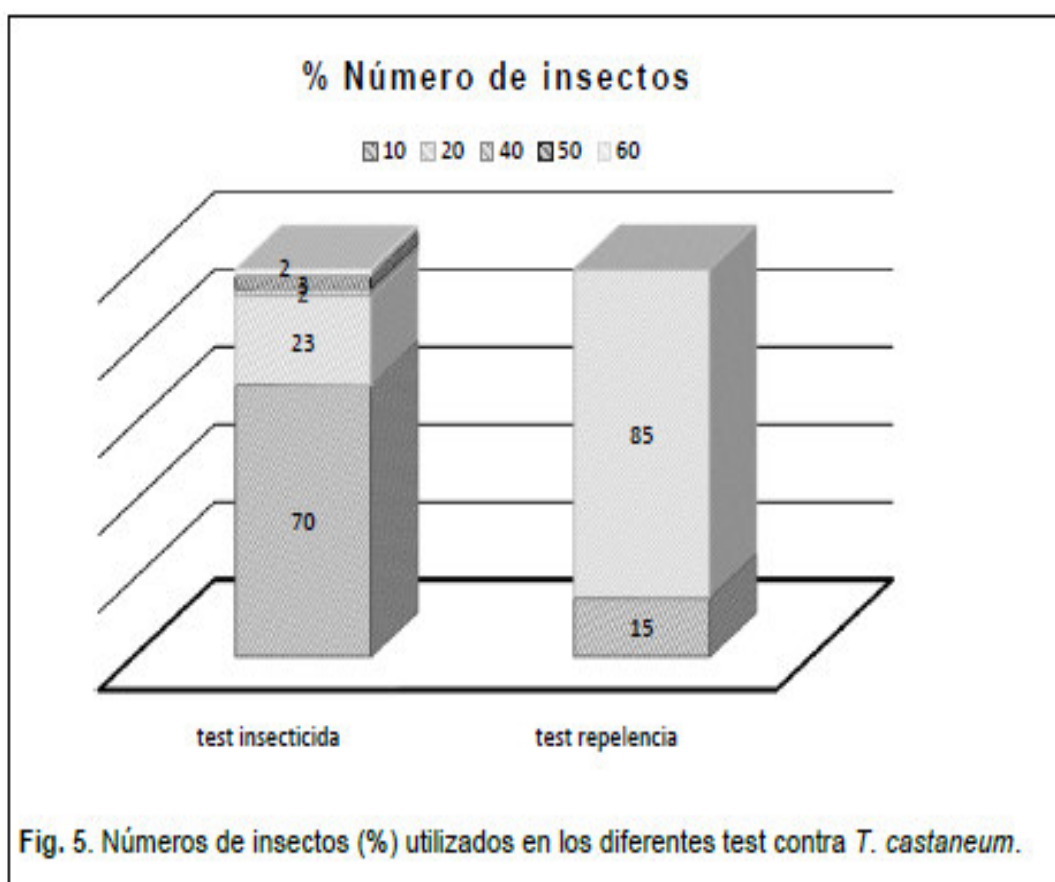
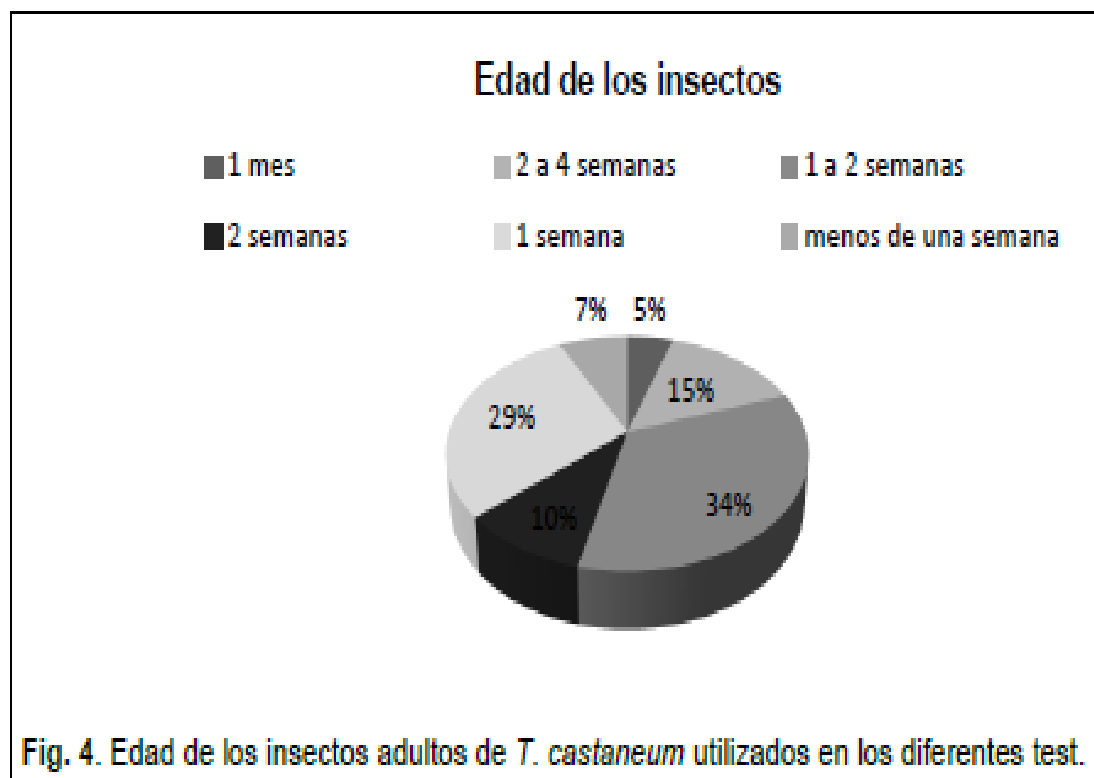
** Presencia o ausencia de alimento en los bioensayos.*

Esta característica es muy importante ya que condiciona mucho las CL_{50} sobre todo en los test fumigantes. De todos los trabajos analizados para este manuscrito el 76% no

utilizó alimento en sus ensayos insecticidas. En los test de repelencia en ningún momento se utilizó alimento ya que el método utilizado (mitades de papel de filtro con y sin compuesto) no es el adecuado para hacerlo (se discutirá más adelante). Del restante 24% de los ensayos que sí utilizaron alimento (ya sea grano o harina) la mitad aproximadamente fue tomada en cuenta para este estudio ya que la otra mitad presentaron sus resultados en valores de mortalidad que no son comparables con los trabajos en donde se presentan DL_{50} o CL_{50} (utilizados en este estudio). Hay que destacar que en los ensayos de insecticida por contacto solo el de topicación dorsal fue hecho con alimento y sólo el 13% dentro de este test. En un estudio hecho por Lee et al (2004) se vio que cinco AE estudiados fueron de 3 a 4 veces menos tóxicos (en términos de mortalidad) cuando fueron aplicados con alimento (trigo) al 50% de relación de llenado del recipiente donde se hizo el ensayo comparado con los ensayos sin alimento. Incluso con el aceite esencial de *Eucalyptus codonocarpa* este efecto se vio disminuido hasta 9 veces. Este estudio permitió suponer que estos AE son absorbidos en la superficie del trigo. De todas formas aclaran que estos AEs serían más seguros en términos de toxicidad humana que los fumigantes convencionales. Otra observación interesante de estos autores es que los cinco AE que contienen 1,8-cineol en altas concentraciones (>40%) mostraron el menor decrecimiento en la mortalidad en presencia de trigo, mientras que el aceite de *E. codonocarpa* que tiene solamente un 6% de este compuesto muestra una disminución muy grande. De esta forma se sugiere que el 1,8-cineol o es altamente tóxico o es menos absorbido que los otros dos componentes que forman parte como principales componentes del aceite de *E. codonocarpa* (p-cimeno y piperitona). Otros autores (Tripathi y Upadhyay, 2009) observaron que la CL_{50} en *T. castaneum* aumentó 4 veces con alimento comparado con los que no lo tenían, y hasta 15 veces más se observó para otros insectos. Teniendo en cuenta estas observaciones es muy importante considerar si los ensayos se hacen o no con alimento. Debido a las escasas publicaciones de dosis o concentraciones letales determinadas con alimento en los ensayos se aconseja profundizar en estos trabajos ya que darían una aproximación más real a su aplicación para el control de *T. castaneum*.

* *Otras características de los métodos a tener en cuenta.*

Pocos estudios determinan la persistencia del AE como insecticida en un determinado método. Entre ellos, Tripathi y Upadhyay (2009) midieron la persistencia del AE de *Hyptis suaveolens* como insecticida y muestran que el aceite a su dosis más alta aplicada (184,2 mg/250g de granos) sigue matando un 50% de *T. castaneum* a los 20 días posteriores a la aplicación del aceite. Mientras que a los 30 días ya no muestra ningún efecto. Otro problema a tener en cuenta es si el método se hace en recipientes abiertos o cerrados. En los cerrados la concentración aplicada es más controlada pero muchas veces



Temperaturas (°C)	Frecuencia (%)	Humedad (%)	Frecuencia (%)
23-27	46,7	40-45	9,1
26-28	33,3	65,0	36,4
29-30	20,0	68,0	9,1
		70-80	45,5

Tabla 1. Frecuencia (%) de las condiciones de temperatura y humedad de los test insecticidas realizados para *T. castaneum*.

se aleja de la realidad ya que no siempre se tienen los granos en recipientes herméticos. Kim y Lee (2014) observaron que la mortalidad cae en un 90% aproximadamente cuando se aplica AE en recipiente abierto respecto a un recipiente cerrado, debido a la pérdida de los compuestos volátiles. Muy pocas veces (< 2%) se hacen estudios del efecto de los AE sobre sitios de acción, como por ejemplo enzimas relacionadas al sistema nervioso central o enzimas antioxidantes o de detoxificación.

* *Variaciones en la toxicidad de un AE de la misma especie.*

Se sabe que la variación en la composición de los AE depende de varios factores como el genético, tipo y edad del órgano de la planta y condiciones del medioambiente. Los AEs con más compuestos oxigenados son más tóxicos; los aceites extraídos de plantas en floración fueron más insecticidas que los de plantas en estado vegetativo, por el aumento de compuestos oxigenados (Hashemi et al., 2013). Otra observación es que el AE de la misma planta extraído de las raíces es más tóxico en método por contacto que el extraído de las hojas. A su vez un mismo AE puede ser más tóxico en test por contacto que por fumigación (Wang et al., 2015a).

Muchos AEs de plantas que crecen en diferentes zonas geográficas presentan diferencias en su composición y por lo tanto en el efecto insecticida (Hamdy et al., 2015).

Resistencia de *Tribolium castaneum* en comparación con otros insectos que atacan alimento almacenado.

Este insecto es uno de los que más ataca a los cereales y es uno de los más resistentes a los tratamientos antipesticidas (Hashemi et al. 2013). De todos los trabajos analizados para este manuscrito el 87,5% observan que *T. castaneum* es más resistente a los efectos insecticidas de los AE que el resto de los insectos evaluados de la misma manera. Los insectos que presentaron menor tolerancia a los AE en comparación con *T. castaneum* fueron: *Rhyzopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Callosobruchus*

chinensis, *C. maculatus*, *Sitophilus zeamays*, *S. oryzae* y *Lasioderma serricorne* (Lee et al 2004; Ogendo et al., 2008; Ebadollahi, 2011; Tripathi y Upadhyay, 2009; Negahban et al., 2007; KhaniyAsghari, 2012; Liu et al., 1999; Sahaf et al., 2008; Saroukolai et al., 2010; Wang et al. 2015a;2015b; You et al., 2014). Estos dos últimos insectos presentaron a su vez, en algunos trabajos mayor resistencia que *T. castaneum*, ocupando el 12,5% restante de los trabajos analizados. *S. oryzae* fue más resistente en test fumigante de AE pertenecientes a las Myrtaceae (Lee et al., 2004). Por otro lado, *Lasioderma serricorne* presentó mayor resistencia para un mismo AE (*Zanthoxylum armatum*) solo en el método fumigante, ya que en el método por contacto fue menos resistente que *T. castaneum* (Wang et al., 2015b). Lo contrario se observó con los AE de las Myrtaceae, los cuales fueron menos tóxicos para *L. serricorne* que para *T. castaneum* en el método por contacto (You et al., 2014). Con respecto a efectos repelentes de los AE se ha visto que hay pocos trabajos de repelencia que utilizan más de una especie de insecto. Entre estos podemos mencionar al trabajo de Tripathi y Upadhyay (2009) los cuales observaron que *T. castaneum* presentó menor susceptibilidad al efecto repelente del AE de *Hyptis suaveolens* que los insectos *C. maculatus*, *R. dominica*, *S. oryzae*. Mientras que Zhang et al. (2011) y You et al. (2014) observaron lo contrario, que *T. castaneum* presentó mayor susceptibilidad a la repelencia de otros AE con respecto a los insectos *Liposcelis bostrychophilay* a *L. serricone*, respectivamente.

Métodos insecticidas.

Método por contacto sobre papel de filtro.

Este método consiste en distribuir uniformemente una solución del AE sobre un círculo de papel de filtro ubicado en el piso de una cápsula de Petri. Allí se colocan generalmente entre 10 y 20 insectos. Se utilizaron para los siguientes análisis los dos tipos de unidades experimentales ya que no hubo grandes diferencias entre las concentraciones de aceites con composición semejante. Solo se utilizaron datos que miden mortalidad a las 24h y se utilizaron las CL_{50} expresadas en mg/cm^2 (aquellos valores que no fueron expresados así se transformaron dentro de su posibilidad). Los valores que fueron expresados en % de mortalidad no se tuvieron en cuenta para este estudio al igual que aquellos que no expresan actividad insecticida pero presentan una concentración máxima utilizada menor a la mayoría de las estudiadas. Teniendo en cuenta las diferentes dosis estudiadas para este método se observaron que las CL_{50} presentaron un valor mínimo de $0.07 mg/cm^2$ para la especie *Artemisia monospermay* un máximo de $7.4 g/cm^2$ para la especie *Artemisia herba alba*, ambas Asteraceae. A partir de este rango se determinaron arbitrariamente (dividiendo las especies aproximadamente a la mitad de acuerdo a las dosis ordenadas en forma creciente) dos grupos de especies que presentaron valores ≥ 0.3

mg/cm² considerando a las especies menos tóxicas y valores < 0.3 mg/cm² para las especies más tóxicas, en base a su CL₅₀. La Fig. 6 muestra la frecuencia de las familias de las diferentes especies que fueron estudiadas como insecticida por contacto y el porcentaje de las mismas con respecto a los dos grupos de CL₅₀ determinado anteriormente. Como se puede observar las Lamiaceae presentó el mayor porcentaje (26%) de especies con actividad por contacto, seguido por las Rutaceas (14%), Asteraceae y Myrtaceae (12% c/u). El menor porcentaje lo presentó Geranaceae con solo el 3% de las especies estudiadas. Dentro de las especies con AE más tóxicos (CL₅₀ < 0,3 mg/cm²) el 40% pertenece a especies de las Lamiaceae pertenecientes a los géneros *Origanum*, *Satureja*, *Mentha* y *Rosmarinus*.

Las Apiaceae es la familia que le sigue en toxicidad (20%) con todas sus especies dentro del rango de los aceites más tóxicos. Mientras que las especies de las Myrtaceae, Poaceae y Geraniaceae presentaron concentraciones dentro del rango de los menos tóxicos (CL₅₀ ≥ 0.3 mg/cm²) (ver tabla anexa 1). De acuerdo a estos datos se analizó la composición principal de los AEs teniendo en cuenta solo aquellos compuestos que presentaron un porcentaje igual o mayor al 8% del total del aceite. Los compuestos fueron agrupados en los siguientes grupos funcionales: hidrocarburos, cetonas, epoxi (1,8-cienol fue el único compuesto dentro de este grupo), fenilpropanoides y otros (en esta categoría se encuentran los alcoholes, aldehídos, esterés (acetatos) y algunos del grupo anterior cuando solo se presentaba en solo una especie). La siguiente figura (Fig. 7 A y B) muestra la proporción de los diferentes grupos químicos que componen los AE tanto en aquellos con CL₅₀ < 0.3 mg/cm² como los de CL₅₀ ≥ 0.3 mg/cm². También se tuvo en cuenta si esos grupos químicos se presentaban en una proporción mayor o menor al 50% del total del aceite. Como puede observarse en la Fig. 7 A, que corresponde a aquellos aceites más bioactivos, el grupo químico cetona fue el más abundante con un 46.7% de especies que presentaron ese grupo químico con un porcentaje >50 en su aceite. Entre estas especies se encuentran 3 especies: *Origanum vulgare*, *Satureja calamintha* y *Ruta chalepensis* con CL₅₀ < 0.1 (ver tabla anexa 1) cuyos aceites poseen pulegona en una proporción >50% para las dos primeras y 2-undecanona para *R. chalepensis*. Luego sigue la especie *Mentha suaveolens* cuyas tres poblaciones estudiadas presentaron mentona como mayor componente junto a pulegona y *Artemisia judaica* con más del 50% de tujona en su aceite. Ambos géneros presentaron valores de CL₅₀ ≤ 0.2 mg/cm². Luego le sigue el grupo de los hidrocarburos (40% de las especies) que estuvieron presentes en su mayoría en porcentajes menores al 50 (es decir, están presente junto a otro grupo químico como cetonas y alcoholes). En estos casos encontramos a la especie *Artemisia monosperma* con la CL₅₀ más baja (0.007 mg/cm²) de todas las especies estudiadas, que presentó un hidrocarburo aromático poco común en los AE, el capilleno. Este compuesto se encuentra junto al γ-terpineno y a una cetona aromática, la capillina (una cetona α, β-insaturada). Estas

moléculas serían las responsables de la toxicidad de este aceite. Otras especies dentro de este grupo cuyo AE poseen hidrocarburos en una proporción < al 50%, son *Astoma seselifolium*, *Astoma easeselifolia* y *Pituranthostortuosus* de la familia Apiaceae. Sus AE poseen sabineno como hidrocarburo acompañado de 4-terpineol como grupo alcohol. Como grupo químico “otros” se encuentran un aceite esencial (*Cupressus macrocarpa*) que tiene como mayor componente al alcohol 4-terpineol junto al hidrocarburo sabineno (pero en proporciones inversas con respecto al otro grupo) y al aceite de *Rosmarinus officinalis* con grupo epoxi (1,8-cineol) como mayor componente junto a la cetona alcanfor y al hidrocarburo α -pineno.

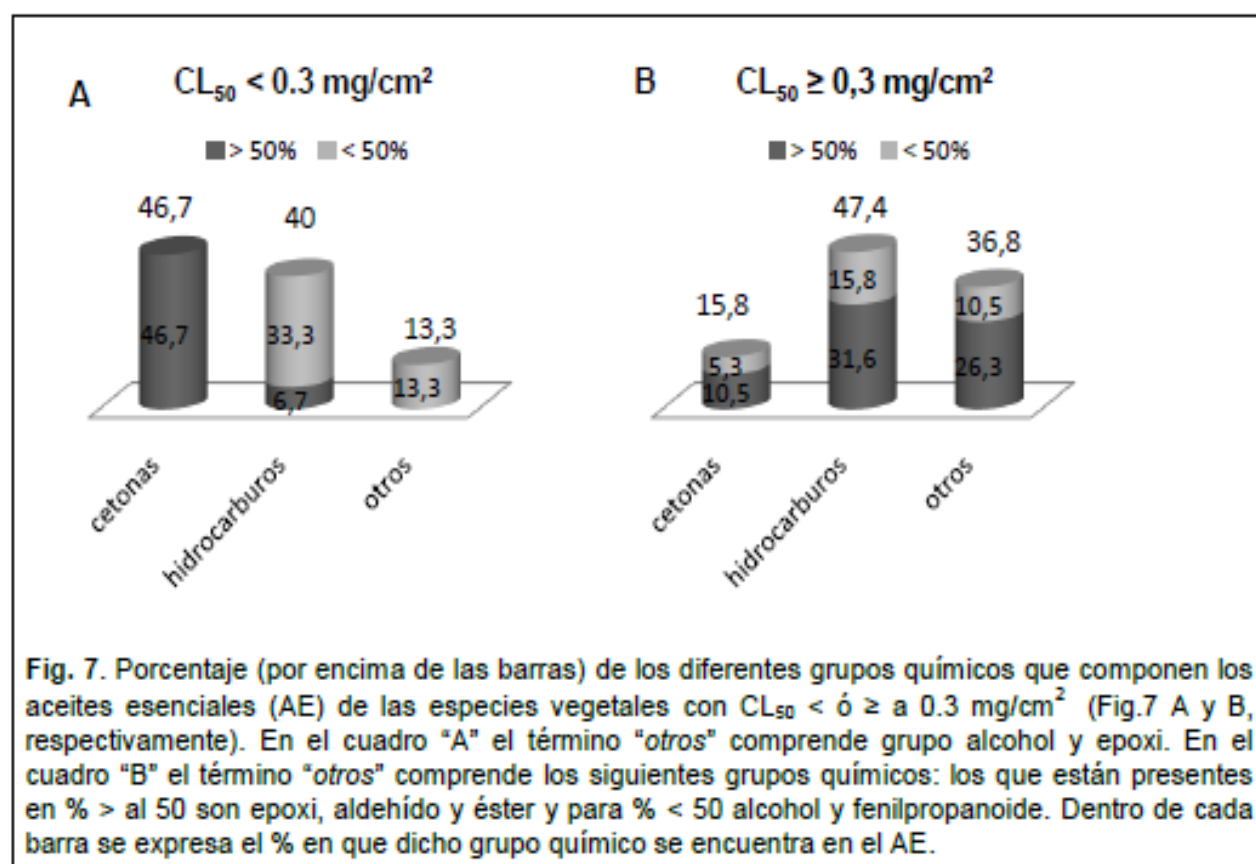
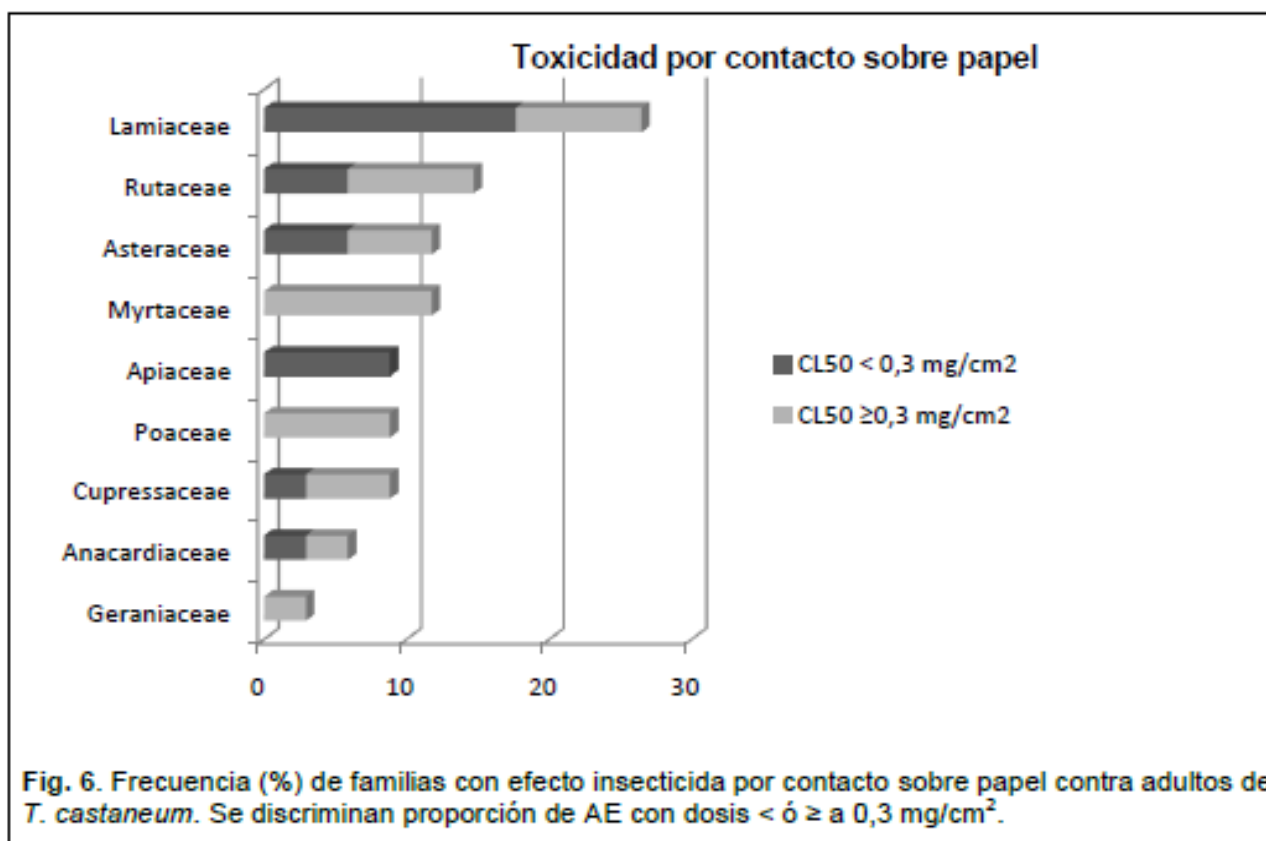
En la Fig. 7 B se muestran los porcentajes de los grupos químicos presentes en los AE con $CL_{50} \geq 0.3 \text{ mg/cm}^2$. Se puede observar que en este caso la mayoría (47.4%) presentó hidrocarburos en su composición principal y estos estuvieron presentes en una proporción >50% principalmente. Dentro de estos aceites se encuentran aquellos con limoneno como principal componente como las especies limón, pomelo y naranja (Rutaceae) (*Citrus x limón*, *C. paradisi* y *C. sinensis*); otros poseen α -pineno y 3-careno que son dos especies de la familia Cupressaceae y una Anacardaceae con α - y β -fellandreno. Los aceites ricos en cetonas poseen alcanfor y piperitona como mayores componentes. Finalmente se encuentra un 36.8% con aceites con “otros” grupos funcionales como epoxi, alcoholes como β -citronelol y geraniol, fenilpropanoide como el carvacrol y los menos tóxicos con aldehídos y éster como principal componente (ver tabla anexa 1).

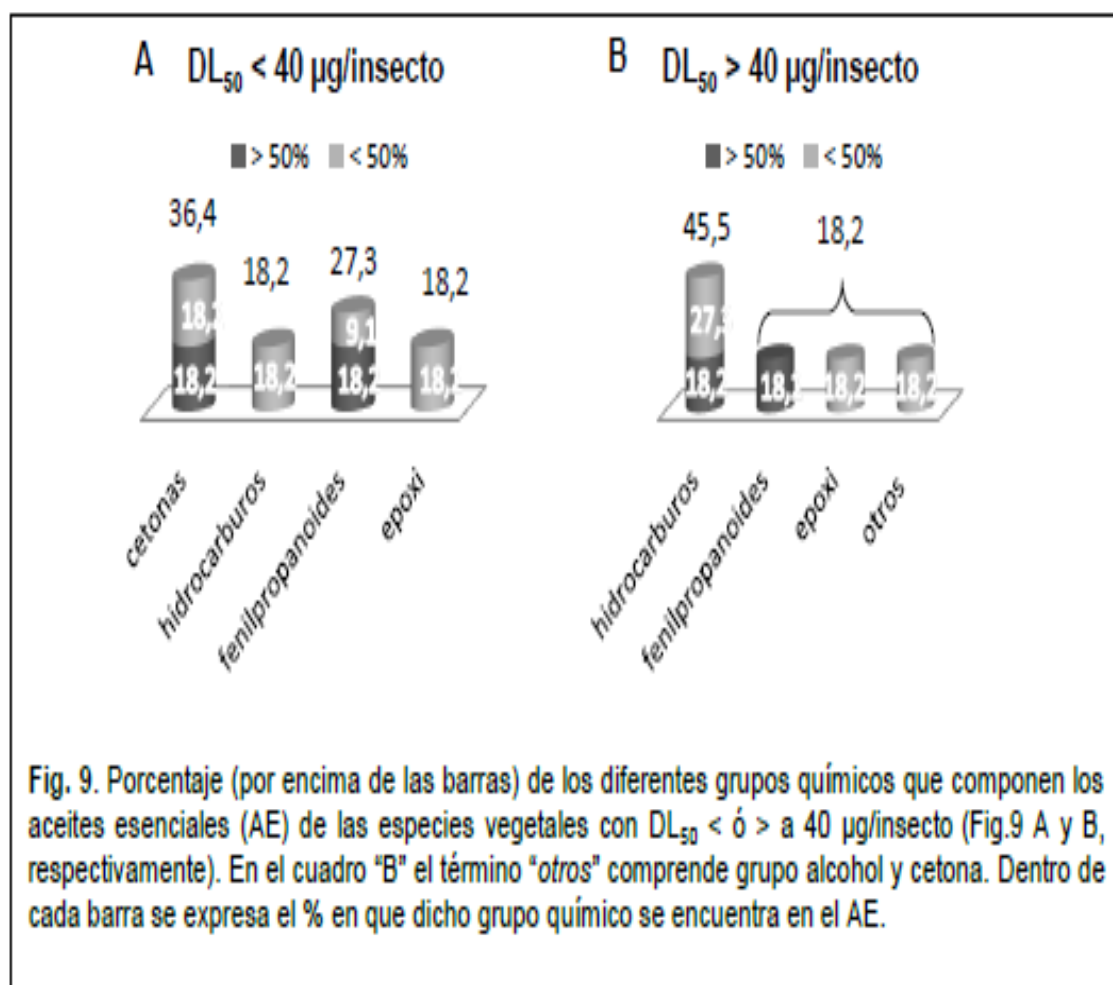
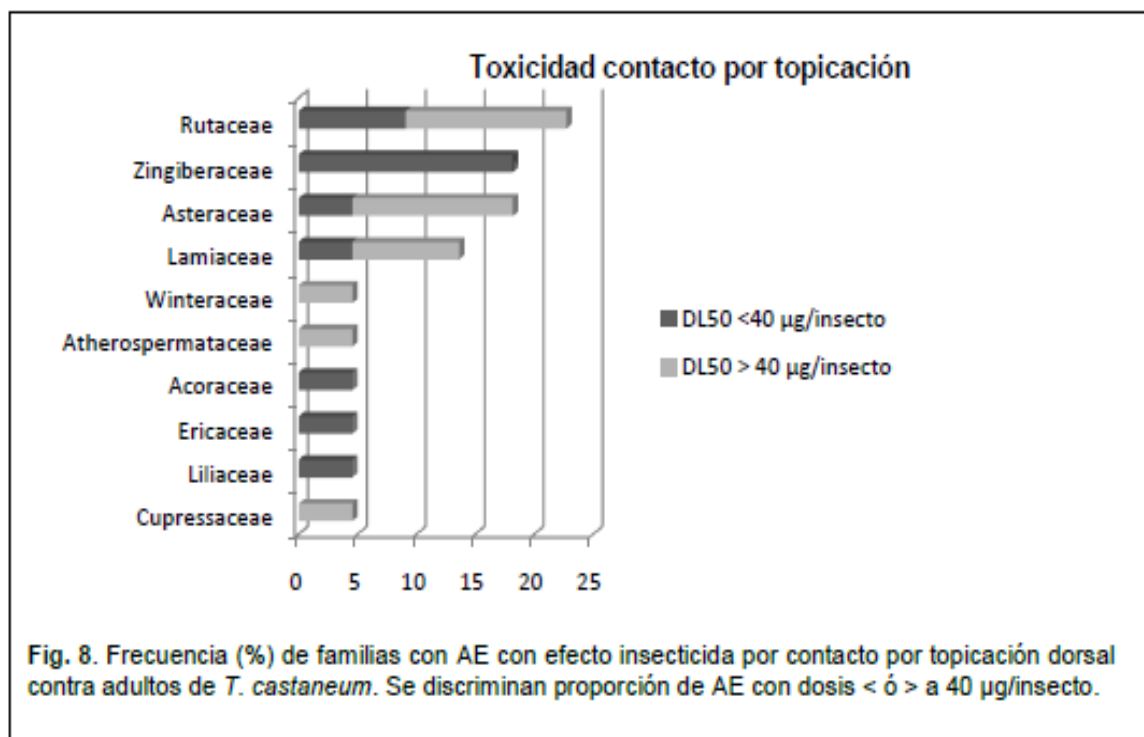
Método por contacto por topicación dorsal.

Este método consiste en aplicar en el dorso del insecto una gota de una solución del aceite esencial. El volumen de la gota aplicada con micro jeringa, en el 86% de los casos, fue de 0.5 μl por insecto. Solo un 14% aplicó 1 μl . El volumen aplicado es de importancia por el tamaño del insecto ya que un gran volumen podría causar cierto estrés en el insecto que modificarían los resultados esperados como insecticida. En estos ensayos solo el 13% fue hecho con alimento. Es decir que luego de tratar al insecto se lo llevó a una cámara con alimento durante 24h y luego se contó la mortalidad. En este método se analizaron 23 AEs cuyas dosis presentaron valores entre 1,2 y 7400 $\mu\text{g/insecto}$. La Fig. 8 muestra la frecuencia de familias de plantas que se estudiaron con actividad insecticida por topicación dorsal y la proporción de los aceites con dosis por encima y por debajo de 40 $\mu\text{g/insecto}$. Este rango se eligió teniendo en cuenta las diferentes dosis analizadas y separando a todas las especies aproximadamente por la mitad de acuerdo a un orden ascendente de DL_{50} . De esta forma consideramos más tóxicos aquellos aceites con $DL_{50} < 40 \mu\text{g/insecto}$ y menos tóxicos los $> 40 \mu\text{g/insecto}$. A diferencia del método anterior, en este caso los AE más estudiados pertenecen a las Rutaceae (23%), Zingiberaceae y Asteraceae (18% c/u), siguiendo las

Lamiaceae (14%) y las restantes con un 5% c/u. Las especies de las Rutaceae, Asteraceae y Lamiaceae presentaron una proporción mayor de AE con dosis por encima de 40 µg/insecto, mientras que las especies de las Zingiberaceae, Acoraceae, Ericaceae y Liliaceae presentaron aceites con $DL_{50} < 40$ µg/insecto.

Las familias restantes Atheroespermataceae, Winteraceae y Cupressaceae presentaron aceites menos tóxicos (>40 µg/insecto). Teniendo en cuenta el criterio anterior (del método contacto sobre papel) con respecto a la composición de los AE más y menos tóxicos, en la Fig. 9 se muestran las proporciones de los principales grupos químicos presentes en los aceites y en qué cantidad se encuentran. Para el grupo de AE con $DL_{50} < 40$ µg/insecto (los más tóxicos), al igual que el método de contacto sobre papel, vuelve a ser mayoritario el grupo químico cetona con un 36,4% de las especies estudiadas, aunque presenta mayor diversidad de grupos funcionales (Fig. 9 A). Le siguen los fenilpropanoides (27,3%) y finalmente los hidrocarburos y el grupo epoxi que se encuentran en un 18,2% de los AE estudiados. En el grupo de las cetonas, a diferencia del método anterior (contacto por papel), éstas se encuentran tanto con valores mayores y menores al 50% del AE (en la misma proporción). En el primer caso los compuestos son: 2-furil metil cetona (72% del AE) presente en la especie *Perilla frutescens* (Lamiaceae) con una de las dosis más bajas (1,2 µg/insecto) y por otro lado se encuentra la especie *Rhododendron thymifolium* (Ericaceae) con una mezcla de cetonas como β -elemenona y germacrona. Los AE con proporción de cetonas $<50\%$ del aceite se encuentran junto a compuestos aromáticos oxigenados como la elemicina (*Atalantia guillauminii*, Rutaceae) o son mezcla de tres cetonas (*Acorus calamus*, Acoraceae) (ver tabla anexa 1). Los grupos químicos hidrocarburos y epoxi se encuentran en su totalidad en porcentajes $< 50\%$ del aceite, por lo tanto están presentes junto a otros grupos químicos. Los hidrocarburos están presentes como mezcla de al menos dos o tres compuestos mayoritarios como por ejemplo β -pineno y cariofileno en la especie *Amomum maximum* o junto a un alcohol, ejemplo sabineno y 4-terpineol como en la especie *Zingiber purpureum*, ambas Zingiberaceae. El grupo epoxi (1,8-cineol) se encuentra junto a un hidrocarburo como β -pineno en *Artemisia stolonifera* (Asteraceae) y limoneno en *Amomum tsaoko* (Zingiberaceae). Ambas especies con $DL_{50} < 20$ µg/insecto. Los AE con grupo químico fenilpropanoide que están presentes en proporción $>50\%$ contienen o un solo compuesto de este tipo como el estragol en *Etilingera yunnanensis* (Zingiberaceae) o mezcla de dos moléculas como metileugenol y safrol en *Lirio pemuscari* (Liliaceae). Ambas especies poseen DL_{50} entre 10 y 25 µg/insecto (ver tabla anexa 1). La especie *Zanthoxylum armatum* (Rutaceae) tiene en su composición anetol ($<50\%$) junto a 1,8-cineol (epoxi) y una cetona (tridecanona). Esta especie posee una $DL_{50} = 32,2$ µg/insecto. Con respecto a los AE que presentaron dosis más altas (>40 µg/insecto). Los hidrocarburos fueron los representativos





con un 45,5% de las especies (Fig. 9 B). Este patrón también se observó para el método de contacto por papel. Aquellas especies que presentaron α -pineno junto a hidrocarburos sesquiterpénicos (*Platycladus orientalis* – Cupressaceae y *Drimys winteri* - Winteraceae) como el cubebeno y cariofileno fueron más tóxicos ($DL_{50} < 200 \mu\text{g/insecto}$) que los que poseen solo limoneno (como el aceite de naranja) o β -pineno junto a sabineno, o hidrocarburo aromático como el camazuleno (*Hyptis suaveolens* y *Dendranthema indicum*, Lamiaceae y Asteraceae, respectivamente). Los demás AE estudiados que presentaron diversos grupos químicos varían entre los que presentaron epóxidos sesquiterpénicos, lo más tóxicos (*Zanthoxylum dissitum*, Rutaceae), junto a otra Rutaceae, *Citrus wilsonii*, cuyo aceite posee una mezcla de alcohol, éster, hidrocarburo y aldehído como principales componentes. Dentro del grupo de fenilpropanoides la especie con safrol (*Laurelia sempervirens*, Atherospermataceae) fue más tóxica que la que presentó estragol (la albahaca *O. basilicum*, Lamiaceae). Entre los que presentaron cetonas, aquellos AE que tiene alcanfor fueron los menos tóxicos (*Artemisia absinthium* y *A. herba alba*, Asteraceae) con $DL_{50} > 2600\mu\text{g/insecto}$ (ver tabla anexa 1). En ambos métodos por contacto se observa que los AEs con cetonas son más tóxicos que los que tienen hidrocarburos como componentes principales.

Método por fumigación.

Es uno de los métodos más estudiados y el que presenta mayor homogeneidad en la metodología empleada. Los volúmenes de los recipientes donde se colocan los insectos varían de 1000 ml a 25-28 ml, siendo estos últimos los más usados. La solución del AE se coloca en un papel de filtro en la tapa del recipiente y se coloca una malla o vaselina para evitar que el insecto haga contacto directo con el AE. De esta forma la toxicidad actuaría directamente en forma de vapor. En este método es muy importante la temperatura a la cual se hacen los ensayos y la presión de vapor de los componentes del AE. La comparación de toxicidades fumigantes entre sí se hace difícil debido a la gran variabilidad asociada con la velocidad de acción, la especie en estudio, estadio, cepa y presencia o ausencia de alimento en el test. De todas formas se intenta encontrar alguna relación entre las toxicidades de los diferentes AE y sus composiciones principales. En este método los AE de 16 familias (74 especies), de plantas fueron estudiados como fumigantes (Fig. 10). La familia Lamiaceae fue jamás estudiada con una frecuencia del 20%, siguiendo las familias Myrtaceae (18%) y Rutaceae y Asteraceae (14%). Los rangos de concentraciones que se usaron para realizar un estudio de la composición del AE en cuanto a sus grupos químicos (siguiendo criterios anteriores) fueron AE con CL_{50} mayores y menores a $30 \mu\text{l/l}$. De esta forma, las cuatro primeras familias nombradas junto a tres familias más, presentaron AE con un amplio rango de CL_{50} , teniendo las tres primeras AE más tóxicos en su mayoría ($CL_{50} < 30 \mu\text{l/l}$). Por otro

lado, las familias Winteraceae, Lauracea y Atherospermataceae, a pesar de su baja frecuencia (1%) presentaron AE con CL_{50} más tóxicas ($<30 \mu\text{l/l}$). Las restantes familias presentaron $CL_{50}>30 \mu\text{l/l}$ (Fig. 10).

En este estudio 40 especies presentaron CL_{50} entre 1,7 y 29 $\mu\text{l/l}$ para el primer rango de concentración, y 34 especies concentraciones que van desde 30,1 a 4200 $\mu\text{l/l}$ para el segundo rango de concentraciones. Con respecto a la composición de los AE y su toxicidad, podemos ver que en este método los grupos químicos de los AE más tóxicos son bastante homogéneos mientras que en los aceites menos tóxicos abundan los hidrocarburos (Fig. 11).

El 27,5% de las especies cuyo aceites esenciales son más tóxicos ($CL_{50}<30$) presentan compuestos epoxi (específicamente 1,8-cineol) en su aceite con porcentajes que van de 13% (*Achillea wilhelmsii*, Asteraceae) al 82% (*Eucalyptus nicholii*, Myrtaceae) de 1,8 cineol. Las altas proporciones de este compuesto se ven en las Myrtaceae y algunas especies de Asteraceae. Entre esta última, la especie *Artemisia tolonifera* presentó una CL_{50} muy baja (1,86 $\mu\text{l/l}$) con 1,8-cineol en un 33% junto a β -pineno en su aceite. Otras especies de Asteraceae tienen CL_{50} bajas y presentan además de 1,8-cineol, hidrocarburos como limoneno y sabineno en proporciones inferiores al 22% (ver tabla anexa 1). Luego le sigue con un 25% las especies que tienen cetonas e hidrocarburos como principales grupos químicos en su composición del AE. La mayoría de los AE que poseen como principal grupo químico cetonas se encuentran en una proporción $>50\%$, sobre todo en las Lamiaceae. Lo contrario pasa con los AE que poseen hidrocarburos como grupo principal que se presentan en proporciones $< 50\%$. Entre los AE que poseen cetonas se encuentra la especie *Perilla frutescens* (Lamiaceae) que presenta alta toxicidad con una $CL_{50}=4,1 \mu\text{l/l}$ y posee 2-furil metil cetona. Otras cetonas presentes en concentraciones superiores al 50% son pulegona (*Origanum vulgare* y *Satureja calmintha*), alcanfor (*Artemisia sibirica*), piperitenona (*Eucalyptus codonocarpa*), safrol (*Piper auritum*), mentona (*Mentha suaveolens*) (ver tabla anexa 1). Otro grupo químico importante (20% de las especies) son los fenilpropanoides con una proporción en su mayoría $>50\%$ del AE. Dentro de este grupo se encuentra el compuesto safrol (aromático) que está presente en la especie *Laurelia sempervirens*, única especie estudiada de la familia Atherospermataceae, que mostró la CL_{50} más baja (1,7 $\mu\text{l/l}$). Le siguen en toxicidad especies usadas como condimento, entre los que se encuentran como componentes principales el cinamaldehído presente en *Cinnamomum aromaticum* (Lauraceae), anetol en *Cuminum cyminum* y *Foeniculum vulgare* (Apiaceae), eugenol en *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), el estragol en *Ocimum basilicum* y *Agastache foeniculum* (Lamiaceae). Con respecto a los aceites menos tóxicos (con $CL_{50}<30 \mu\text{l/l}$) es notable la gran proporción de hidrocarburos presentes en dichos AE que en su mayoría se encuentran en proporciones $<50\%$.

El compuesto hidrocarburo limoneno se encuentra entre los más tóxicos dentro de este rango de CL_{50} y estando presente en proporciones $>50\%$ del AE (Rutaceae). Los AE con mezcla de α -pineno y δ -careno, también estuvieron entre los más tóxicos dentro de este grupo (Cupressaceae). Entre los AE que tienen cetonas es de notar que la tujona y 2-undecanona, que presentaron alta toxicidad en los test por contacto, en el método fumigante esos aceites estuvieron entre los menos tóxicos. Los AE con el compuesto piperitenona presentaron baja toxicidad en todos los métodos. Los AE menos tóxicos presentaron aldehídos y mezcla de hidrocarburos con epoxi o alcoholes, pertenecientes a algunas especies de Poaceae y Myrtaceae (ver tabla anexa 1).

Método de repelencia.

Este método es uno de los más difíciles de comparar entre los diferentes trabajos, debido a que no se reporta en ningún caso una concentración repelente 50, como existe en los demás métodos estudiados. Por lo tanto, la gran diversidad de concentraciones usadas (16 a 800 nl/cm^2), la diversidad de tiempo que pasa entre la puesta del compuesto a ensayar y la lectura de la repelencia (1,5 a 24h) y los diferentes ensayos utilizados hace dificultoso la comparación. A pesar de esto el 91,7% de los métodos usan el semicírculo de papel de filtro en cápsula de Petri para evaluar repelencia. Este método consiste en cortar un círculo de papel de filtro del tamaño de una cápsula de Petri por la mitad. Luego, en una mitad se agrega la solución del compuesto a ensayar y en la otra el solvente solo. Se pegan ambas mitades y luego de evaporar el solvente, y sin colocar comida, se agregan 20 insectos, la mayoría de las veces, en el centro de la cápsula. Teniendo en cuenta que los AE son volátiles y que en corto tiempo saturan la cápsula, no parecería el mejor método para evaluar repelencia, sin embargo es el método usado por excelencia con estos insectos. Solo un método de todos los estudiados, consistió en dividir un papel de aluminio en 4 y agregar comida rociada con la solución del AE (Ogendo et al., 2008). Otro método diferente fue el bioensayo de elección (two choice) que consistió en la unión de dos frascos (García et al., 2007). Debido a esta variabilidad en las características de los ensayos, para analizar los datos se tuvieron en cuenta: el test del medio círculo, los AE de plantas que presentaron una repelencia mayor al 80%, concentraciones que van desde 16 a 200 nl/cm^2 y repelencia medida a las 2h de iniciado el ensayo. De acuerdo a las características anteriores en la Fig. 12 se muestran las frecuencias de los AE de las diferentes familias con dosis que van de 16 a 200 nl/cm^2 . Los AE con mayor efecto repelente (dosis < 40 nl/cm^2) pertenecen a Lamiaceae, Asteraceae, Poaceae y una proporción pequeña de Rutaceae, mientras que las familias que presentaron dosis mayores pertenecen a las Liliaceae, Piperaceae y la mayor parte de las Rutaceae. Dentro de los componentes de los AE responsables del efecto repelente podemos mencionar en primer lugar a los hidrocarburos, ya que fueron los

mayoritarios con una proporción del 47.4% en los AE. Los demás componentes se presentaron en porcentajes que van del 15.8 al 21.1 (Fig. 13). Los hidrocarburos que se presentaron en proporciones <50% del AE (el 26.3% de ellos) se caracterizan por ser hidrocarburos sesquiterpénicos como el β cariofileno, camazuleno, canfeno, cedreno, elemeno, germacreno D y selineno. Dichos compuestos se encuentran en la especie *Dendranthema indicum* (Asteraceae) y *Murraya kwangsiensis* junto con *M. exótica* (Rutaceae). También dentro de las Piperaceae, las especies *Piper marginatum* (población de Turbaco o Bolívar) y *P. multiplinervium* presentaron efecto repelente con hidrocarburos sesquiterpénicos en su AE. Es de destacar que los hidrocarburos monoterpénicos se presentaron en proporciones >50% dentro del AE (21.1% de los casos), como por ejemplo el limoneno y pineno en las especies *Evodia calcicola* y *E. trichotoma* de las Rutaceae, con fuerte efecto repelente (ver tabla anexa 1).

Otros compuestos a destacar son los alcoholes, que ocuparon el segundo lugar dentro de los compuestos repelentes en cuanto a frecuencia en la composición de los AE. Entre ellos se destacan el geraniol y citronelol presentes en *Cymbopogon distan* (Poaceae) y *Citrus wilsonii* (Rutaceae). Luego le siguen alcoholes sesquiterpénicos como eudesmol, espatulenol presentes en especies de las Rutaceae (*Murraya* sp). Dentro de los AE repelentes con fenilpropanoides como compuestos mayoritarios se mencionan al metileugenol, safrol, anetol y estragol que se encuentran presentes en especies de las Liliaceae y Piperaceae. En menor proporción se encuentran como componentes principales la cetona 2-furil metil cetona y el epoxi 1,8-cineol, presentes en las especies *Perilla frutescens* (Lamiaceae) y *Artemisia stolonifera* (Asteraceae), respectivamente (ver tabla anexa 1).

Relación de toxicidad entre los aceites esenciales y sus componentes principales puros.

En varios estudios de actividad de aceites esenciales fueron evaluados también los componentes principales de los mismos. En la figura 14 se puede observar la frecuencia, en cuanto a toxicidad comparada con el aceite esencial, de los componentes puros. El 50% de los componentes puros principales de los AE evaluados presentó un efecto tóxico menor al AE completo. Esto nos hace pensar que muchos AE presentan sinergismos entre sus componentes y por lo tanto el mismo es más tóxico que su componente principal (Zhang et al., 2015a; Lee et al., 2004; You et al., 2014, 2015; Wang et al., 2014; Chen et al., 2014; Kim y Lee, 2014; Wang et al., 2015c). Dentro de este grupo se destaca el 1,8-cineol, el cuál presentó menor toxicidad que el AE en el test fumigante principalmente. Otro grupo químico para destacar dentro de este grupo de menor actividad son los hidrocarburos, los cuales presentaron menor toxicidad en repelencia y topicación dorsal principalmente. Entre ellos mencionamos al β -cariofileno, limoneno y sabineno. El limoneno en los AE del género *Citrus*

(Rutaceae) presentó una tendencia a disminuir la toxicidad por contacto a medida que este compuesto aumentaba su concentración en el AE (Tabla anexa 1). Por otro lado está el grupo de los componentes que fueron más tóxicos que el AE (28%), entre los que se destacan los fenilpropanoides como el estragol y anetol (Kim y Lee, 2014; Wang et al., 2015b) y las cetonas como la piperitenona y la 2-furil metil cetona (Bossou et al., 2015; You et al., 2014). Este último compuesto, presente como componente principal (72%) del AE de *Perilla frutescens*, presentó la particularidad de tener diferente comportamiento en cuanto a toxicidad de acuerdo al test insecticida. Fue más tóxico que el AE en el test fumigante, menos tóxico en el test por topicación dorsal e igual de eficiente que el AE completo en repelencia (You et al., 2014). El grupo de los componentes que presentaron igual efecto que el AE (aprox. 22%) fue muy variado en cuanto a tipos de compuestos químicos y principalmente presentaron igual efecto en el test de repelencia (You et al., 2014, 2015, Zhang et al., 2011).

Componentes puros de AE y su toxicidad.

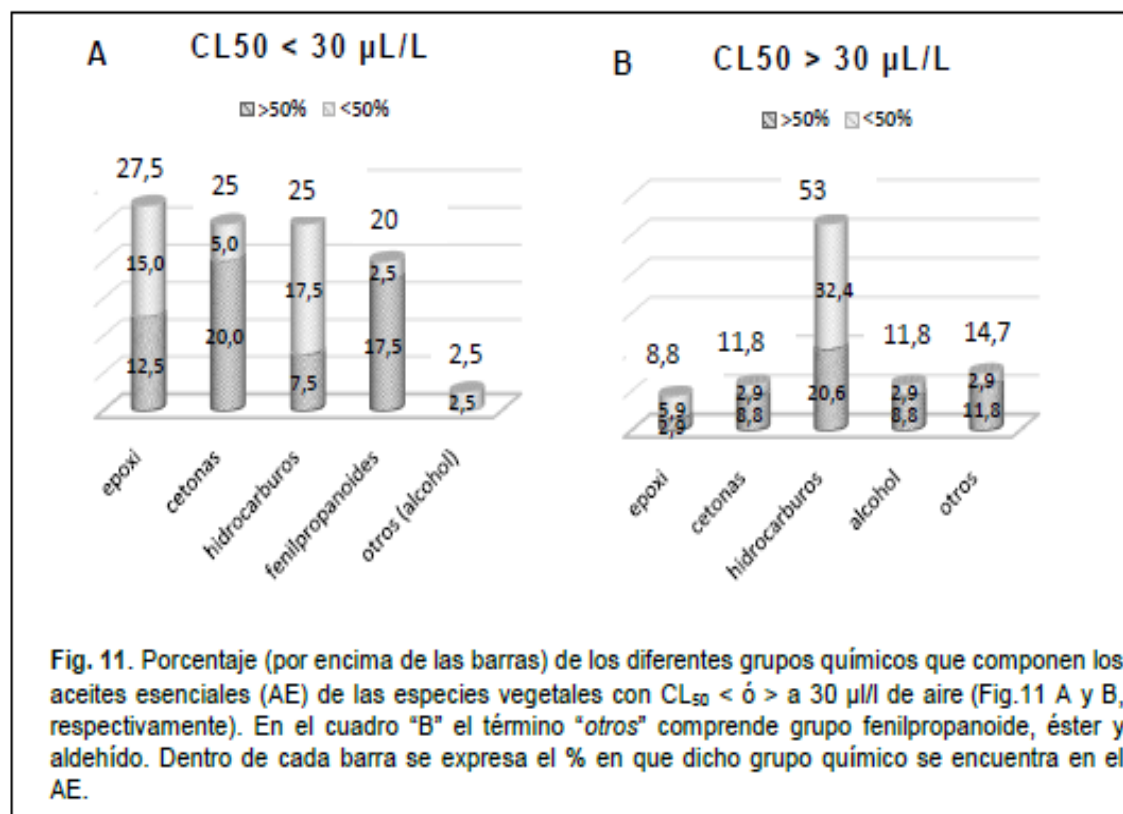
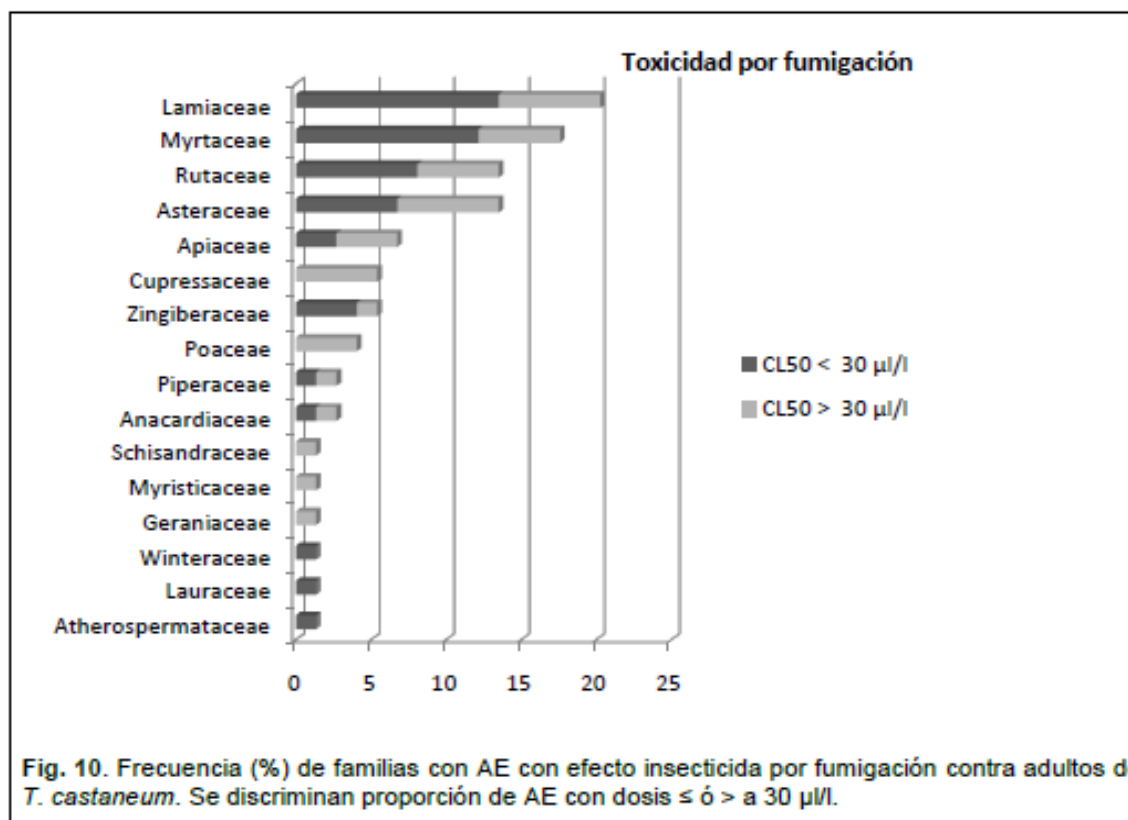
Al igual que en la toxicidad de los AE el test más estudiado es el fumigante, pero en este caso el segundo más estudiado es el test de contacto por topicación dorsal y el menos frecuente el de contacto sobre papel (Fig. 15).

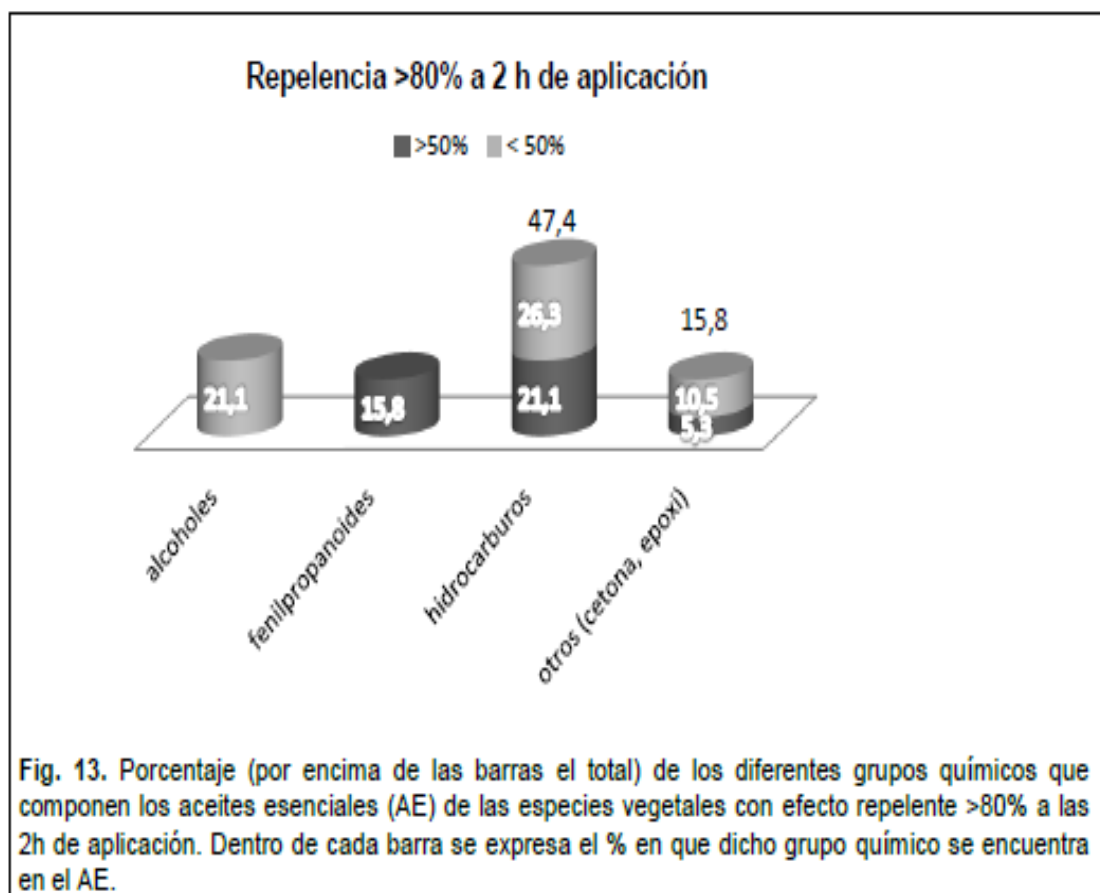
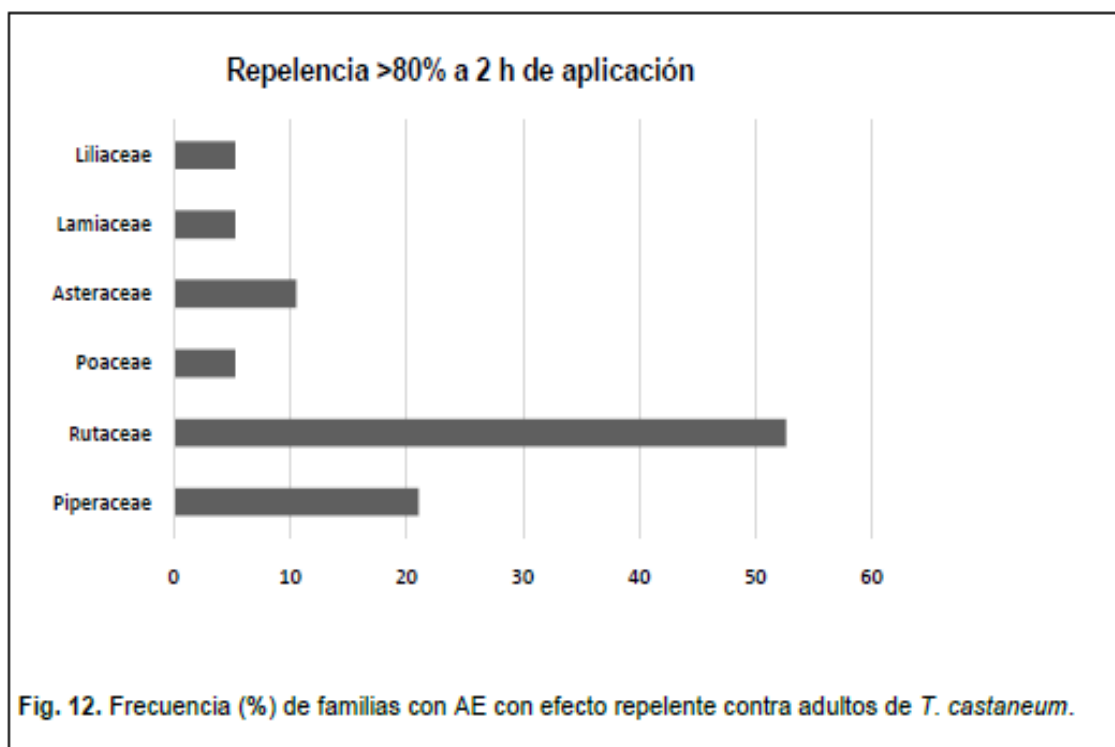
-Toxicidad por contacto sobre papel.

En este test los compuestos más tóxicos fueron las cetonas (-) carvona y fenchona, el cuminaldehido y los alcoholes linalool y geraniol con $CL_{50} < 0,2 \text{ mg/cm}^2$ (Abdelgaleil et al., 2009). Los compuestos menos tóxicos fueron el alcanfor, 1,8-cineol, (-) mentol, mirceno y canfeno, con $CL_{50} > 0,5 \text{ mg/cm}^2$ (Abdelgaleil et al., 2009).

-Toxicidad por contacto topicación dorsal.

Tres cetonas fueron los compuestos más tóxicos para este método, germacrona, furilmetil cetona y 2-tridecanona con $DL_{50} < 0,6 \text{ } \mu\text{g/insecto}$ (Liang et al., 2016; You et al., 2014; Wang et al., 2015b). Con una toxicidad (DL_{50}) que va de 12 a 50 $\mu\text{g/insecto}$ le siguen los hidrocarburos limoneno y β pineno (entre los más tóxicos) y el 1,8-cineol, terpinen 4-ol, estragol, neril acetato, citronelol, camazuleno, y terpineno, isoeugenol, β cariofileno, dhumuleno y sabineno (ver tabla anexa 2). En el rango de los menos tóxicos con dosis $> 50 \text{ } \mu\text{g/insecto}$ se encuentra el alcanfor, eugenol, metileugenol, terpinoleno, 3-careno, linalool, mirceno y α pineno. El γ elemeno no presentó actividad. Hay que mencionar que ciertos compuestos como β pineno, estragol, y terpineno, 1,8 cineol y limoneno fueron estudiados





por varios autores y presentan diferentes DL_{50} . El hidrocarburo β pineno, por ejemplo, presentó una DL_{50} de 22,1 $\mu\text{g/insecto}$ en los trabajos de Zhang et al. (2015^a) y Chen et al. (2014), mientras que en el trabajo de Wang et al. (2009) la DL_{50} fue de 92,4 $\mu\text{g/insecto}$. En los primeros dos trabajos este compuesto fue aislado desde el aceite esencial de *Artemisia stolonifera* y *Citrus wilsonii*, respectivamente, utilizando cromatografía en columna de sílica gel. En el trabajo de Wang et al. (2009) el β pineno fue un producto comercial. Esta diferencia también se nota en el γ terpineno con DL_{50} de 35,6 y 103 $\mu\text{g/insecto}$ (Wang et al., 2015c y Wang et al., 2009, respectivamente), aunque en este caso la dosis más alta correspondió al compuesto comprado comercialmente. El epoxi 1,8-cineol fue evaluado 5 veces con dosis de 18-19 y de 139,6 c (Zhang et al., 2015; Guo et al., 2015b; Wang et al., 2009; 2014; 2015b). Este compuesto en tres casos fue aislado desde el AE correspondiente y en dos trabajos comprado comercialmente. De todas formas la dosis más alta corresponde a uno de los productos comerciales mientras que la dosis del otro producto comercial se asemejó a la de los aislados. Exactamente lo mismo ocurrió con el limoneno también evaluado 5 veces con dosis de 13,4-15 por un lado y de 283 $\mu\text{g/insecto}$ por el otro (ver tabla anexa 2). El estragol fue evaluado dos veces y ambos compuestos fueron de origen comercial con DL_{50} de 20,4 y 73 $\mu\text{g/insecto}$ (Guo et al., 2015b y Kim y Lee, 2014).

-Toxicidad por método fumigante.

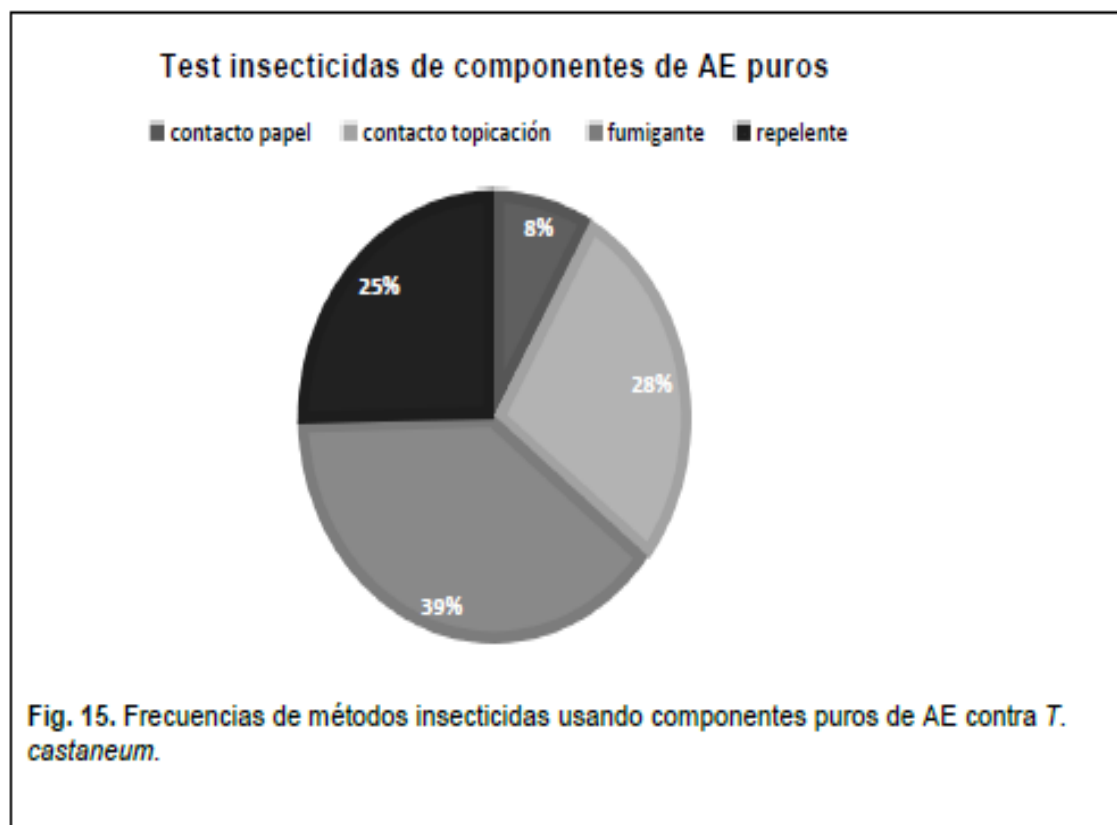
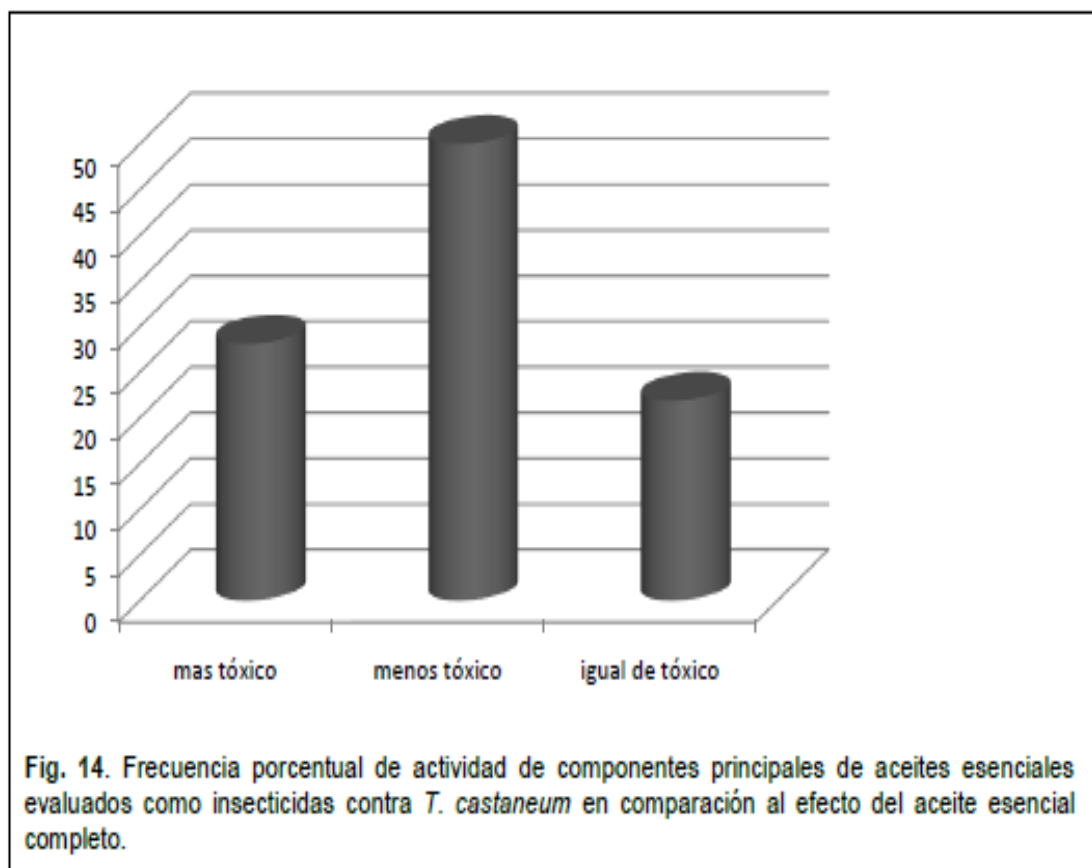
Es el método más frecuente. Las dosis en este método podrían dividirse en 4 rangos: < 1; 1-10; 11-80 y >100 $\mu\text{l/l}$. Dentro del primer grupo que fueron los más tóxicos, se encuentran tres compuestos oxigenados (borneol, timol y 1,8-cineol). En el segundo grupo se encuentran dos cetonas (2 furilmetil cetona, piperitona), el terpinen-4-ol y anetol, y abundan los hidrocarburos como el limoneno, 3 careno, terpinoleno, γ -terpineno y β - pineno. En el grupo con dosis entre 11 y 80 $\mu\text{l/l}$ se encuentran las cetona alcanfor, carvona y fenchona; fenilpropanoides como el eugenol, estragol y carvacrol; los esterres como el linalil- y bornil acetato. También se encuentran el linalool y los hidrocarburos sabineno y nuevamente el β - pineno. La diferencia con el β - pineno que está en el primer rango es que ese fue de origen comercial y el ensayo consistió en colocar 60 insectos suspendidos en un tubo aireado dentro del contenedor donde se colocó el compuesto a ensayar. Mientras que los β - pinenos dentro del tercer rango fueron aislados desde los AE estudiados y el método aplicado es el descrito en la sección de más arriba. Estas diferencias en DL_{50} vuelven a encontrarse con los compuestos limoneno, alcanfor, linalool y el 1,8-cineol, éste último se encuentra en los tres primeros rangos de DL_{50} (ver tabla anexa 2). Estas diferencias halladas podrían deberse a las diferentes condiciones en que se realizaron los ensayos, al origen del compuesto puro, su pureza y cepa del insecto. El hidrocarburo α - pineno en los dos últimos métodos presentó menor toxicidad que su isómero β - pineno.

-Repelencia.

Este test como se dijo antes es uno de los más variados en cuanto a concentraciones utilizadas y tiempo en que se mide la repelencia. Para este trabajo se tomó la repelencia a las 24h y haciendo un listado en orden descendente de concentraciones usadas y de porcentaje de repelencia podemos mencionar que el fenilpropanoide estragol fue uno de los más repelentes, seguido de los hidrocarburos limoneno, β - pineno y β -cariofileno. También fueron muy repelentes los alcoholes citronellol, espatulenol y geraniol con porcentajes de repelencia ≥ 80 . Mientras que los hidrocarburos canfeno y γ -terpineno y el 1,8-cineol fueron los menos repelentes con valores $< 60\%$ de repelencia. El limoneno presentó variaciones en su índice de repelencia, presentando valores altos de repelencia en dos casos y uno del 20%. Los métodos fueron realizados de forma semejante aunque la diferencia está en la obtención del compuesto, la dosis menos repelente (20%) corresponde al compuesto aislado desde el AE por cromatografía en columna (concentración 16 nl/cm²) (Zhang et al., 2011) mientras que el de repelencia del 88% es de origen comercial. De todas formas en el trabajo de You et al. (2014) el limoneno también fue aislado desde el AE y presentó la máxima repelencia (100%) (ver tabla anexa 2).

Conclusiones sobre problemas de la aplicación de AE.

Korunic et al. (2008) concluyeron que el uso potencial de los AE contra las plagas de granos almacenados debe vencer ciertas barreras. Una de ellas es la relativa alta concentración que se necesitaría de ellos para proteger mucha cantidad de granos, otra es la diferencia en su efectividad contra varias especies de insectos plagas de grano, y el alto precio del mercado que tienen actualmente los AE. Para ello proponen o bajar los precios de los AE, sembrar cantidades significativas de plantas cuyos AE mostraron efectividad en controlar los insectos plagas (Ebadollahi, 2011), o sintetizarlos. Estudios sobre los aromas que generan, la volatilidad y persistencia de los mismos en los silos, la aireación, la penetración, la adsorción, etc. son características que se deberían seguir estudiando para el diseño de un AE efectivo. Otra característica que se debería estudiar es la toxicidad hacia los humanos y otros mamíferos de las dosis que se aplicarían para el control de los insectos en granos almacenados. También cómo afecta al grano en sí mismo, en cuanto a su vigor y su calidad química. Además, el desarrollo de formulaciones es necesaria para mejorar la potencia y estabilidad y establecer una estandarización para productos derivados de AE y bajar los costos. De todas formas los estudios de los AE de los diferentes insectos plagas son importantes para el diseño de un AE sintético efectivo.



Bibliografía.

- Abbad A., Kasrati A., Jamali C.A., Zeroual S., M'hamed T.B., Spooner-Hart R., Leach D. (2014). Insecticidal properties and chemical composition of essential oils of some aromatic herbs from Morocco. *Nat. Prod. Res.* 28: 2338–2341.
- Abdelgaleil S.A.M., Mohamed M.I.E., Badawy M.E.I., El-arami S.A.A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J Chem. Ecol.* 35: 518–525.
- Abou-Taleb H. K., Mohamed M.I.E., Shawir M.S., Abdelgaleil S.A.M. (2015). *Nat. Prod Res.* 30: 710-714.
- Bachrouch O., Ferjani N., Haouel S., Jemâa J.M.B. (2015). Major compounds and insecticidal activities of two Tunisian *Artemisia* essential oils toward two major coleopteran pests. *Ind. Crops Prod.* 65: 127–133.
- Bossou A.D., Ahoussi E., Ruysbergh E., Adams A., Smagghe G., De Kimpe N., Avlessi F., Sohounhloue D.C.K., Mangelinckx S. (2015). Characterization of volatile compounds from three *Cymbopogon* species and *Eucalyptus citriodora* from Benin and their insecticidal activities against *Tribolium castaneum*. *Ind. Crops Prod.* 76: 306–317.
- Caballero-Gallardo K., Olivero-Verbel J., Pino-Benítez N., Stashenko E.E. (2014). Chemical composition and bioactivity of *Piper auritum* and *P. multiplinervium* essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat.* 13: 10 – 19.
- Carpaneto B., Abadía B., Bartosik R. (2012). Control Integrado de Plagas en granos almacenados y subproductos. Material de divulgación. INTA-PRECOP: Eficiencia de Poscosecha. Unidad Integrada Balcarce INTA-FCA.
- Casini C. y Santajuliana M. (2015). Control de plagas en granos almacenados. Artículo técnico. PRECOP-INTA.
- Chaubey M. K. (2012). Acute, lethal and synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecologia Balkanica* 4: 53-62.
- Chaubey M.K. (2007). Toxicity of essential oils from *Cuminum cyminum* (Umbelliferae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Electron. J. Environ. Agricul. Food Chem.* 6: 1719-1727.
- Chen H.P., Yang K., You C.X., Du S.S., Cai Q., He Q., Geng Z.F., Deng Z.W. (2014). Chemical constituents and biological activities against *Tribolium castaneum* (Herbst) of the essential oil from *Citrus wilsonii* leaves. *J. Serb. Chem. Soc.* 79: 1213-1222.
- Chen H.P., Yang K., Zheng L.S., You C.X., Cai Q., Wang C.F. (2015). Repellent and insecticidal activities of shyobunone and isoshyobunone derived from the essential oil of *Acorus calamus* rhizomes. *Pharmacogn. Mag.* 11: 675–681.
- Delazar A., Yari S.M., Chaparzadeh N., Asnaashari S., Nahar L., Delazar N., Sarker S.D. (2015). Chemical composition, free-radical-scavenging and insecticidal properties, and general toxicity of volatile oils isolated from various parts of *Echinophora orientalis*. *JEOBP* 18: 1287 – 1297.
- Ebadollahi A. (2011). Chemical constituents and toxicity of *Agastache foeniculum* (pursh) kuntze essential oil against two stored-product insect pests. *Chil. J. Agr. Res.* 71: 212-217.
- García M., Gonzalez-Coloma A., Donadel O.J., Ardanaz C.E., Tonn C.E., Sosa M.E. (2007). Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochem. Syst. Ecol.* 35: 181-187.
- García-Lara S., Espinosa Carrillo C., Bergvinson D.J. (2007). Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. México, D.F.: CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo).
- Gershenson J., Dudareva N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3: 408-414.
- Guo S.S., You C.X., Liang J.Y., Zhang W.J., Geng Z.F., Wang C.F., Du S.S., Lei N. (2015b). Chemical composition and bioactivities of the essential oil from *Etligeria yunnanensis* against two stored product insects. *Molecules* 20: 15735-15747.
- Guo S.S., You C.X., Liang J.Y., Zhang W.J., Yang K., Geng Z.F., Wang C.F., Du S.S., Lei N. (2015a). Essential oil of *Amomum maximum* Roxb. and its bioactivities against two stored-product insects. *J. Oleo Sci.* 64: 1307-1314.
- Haider S.Z., Mohan M., Pandey A.K., Singh P. (2015). Repellent and fumigant activities of *Tanacetum nubigenum* Wallich. ex DC essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Oleo Sci.* 64: 895-903.
- Hamdi S.H., Hedjal-Chebheb M., Kellouche A., Khouja M.L., Boudabous A., Ben Jemaa J.M. (2015). Management of three pests' population strains from Tunisia and Algeria using *Eucalyptus* essential oils. *Ind. Crops Prod.* 74: 551–556.
- Hashemi S.M., Hosseini B., Estaji A. (2013). Chemical composition and insecticidal properties of the essential oil of *Salvia leriifolia* Benth (Lamiaceae) at two developmental stages. *J. Essent. Oil Bearing Pl.*, 16: 806-816.

- Huang Y., Ho S.H., Lee H.C., Yap Y.L. (2002). Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Stored Prod. Res. 38: 403–412.
- Jaramillo-Colorado B., Julio-Torres J., Duarte-Restrepo E., Gonzalez-Coloma A., Julio-Torres L.F. (2015). Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq Colombiano. Bol. Latinoam. Caribe Plant Med. Aromat. 14: 343 – 354.
- Kasrati A., Jamali C.A., Bekkouche K., Spooner-Hart R., Leach D., Abbad A. (2015). Chemical characterization and insecticidal properties of essential oils from different wild populations of *Mentha suaveolens* subsp. timija (Briq.) Harley from Morocco. Chemistry and Biodiversity 12: 823-831.
- Kasrati A., Jamali C.A., Bekkouche K., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A. (2014). Comparative evaluation of antioxidant and insecticidal properties of essential oils from five Moroccan aromatic herbs. J Food Sci Technol 52: 2312-2319.
- Khani A., Asghari J. (2012). Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. J. Insect Sci. 12: art. 73.
- Kim S.I., Lee D.W. (2014). Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. J. Asia-Pacific Entomol. 17: 13–17.
- Korunic Z., Rozman V., Kalinovic I. (2008). The potential use of natural essential oils in the fumigation of stored agricultural products – (review). Proceedings of the 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Product – CAF2008 / Guo D., Shlomo N., Yang J., Tao C., Jin Z., Li Y., Liu Y., Wang H. (ur.). - Chengdu, China : Sichuan Publishing Group ; Sichuan Publishing House of Science & Technology , 2008. 511-519 (ISBN: 978-7-5364-6470-4).
- Laitano G. (2011). Control de plagas en granos almacenados. La correcta elección del plaguicida puede ser el éxito del control de plagas en granos almacenados. Dpto. Comercial Rizobacter Argentina SA. <http://www.engormix.com/MA-agricultura/soja/articulos/control-de-plagas-en-granos-almacenados-t3574/415-p0.htm>.
- Lee B.H., Annis P.C., Tumaalii F., Choi W.S. (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. J. Stored Prod. Res. 40: 553–564.
- Liang J.Y., You C.X., Guo S.S., Zhang W.J., Li Y., Geng Z.F., Wang C.F., Du S.S., Deng Z.W., Zhang J. (2016). Chemical constituents of the essential oil extracted from *Rhododendron thymifolium* and their insecticidal activities against *Liposcelis bostrychophila* or *Tribolium castaneum*. Ind. Crops Prod 79: 267–273.
- Liu Z.L., Du S.S. (2011). Fumigant components from the essential oil of *Evodia rutaecarpa* Hort Unripe fruits. E-J. Chem. 8: 1937-1943.
- Liu Z.L., Ho S.H. (1999). Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). J. Stored Prod. Res. 35: 317-328.
- Mondal M., Khalequzzaman M. (2006). Toxicity of essential oils against red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Bio-Sci. 14: 43-48.
- Negahban M., Moharrampour S., Sefidkon F. (2007). Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. J. Stored Prod. Res. 43: 123–128.
- Ogendo J.O., Kostyukovsky M., Ravid U., Matasyoh J.C., Deng A.L., Omolo E.O., Kariuki S.T., Shaaya E. (2008). Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. J. Stored Prod. Res. 44: 328–334.
- Othira J.O., Onek L.A., Deng, L.A., Omolo, E.O. (2009). Insecticidal potency of *Hyptis spicigera* preparations against *Sitophilus zeamais* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) on stored maize grains. Afr. J. Agricul. Res. 4: 187-192.
- Rajashekar Y., Bakthavatsalam N., Shivanandappa T. (2012). Botanicals as Grain Protectants. Psyche Vol 2012, Article ID 646740, 13 pages.
- Rajendran S., Sriranjini V. (2008). Plant products as fumigants for stored-product insect control. J. Stored Prod. Res. 44: 126–135.
- Rozman V., Kalinovic I., Korunic Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. J. Stored Prod. Res. 43: 349–355.
- Sahaf B.Z., Moharrampour S., Meshkatsadat M.H. (2008). Fumigant toxicity of essential oil from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). J. Asia-Pacific Entomol. 11: 175–179.
- Sallam M.N. (1999). Insect damage: Damage on Post-harvest. Post-harvest Operations. Ed.: AGSI/FAO: Danilo Mejia (Technical), Beverly Lewis (Language&Style). International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE). INPhO- Post-harvest Compendium.

- Saroukolai A.T., Moharrampour S., Meshkatsadat M.H. (2010). Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. J. Pest Sci. 83:3–8.
- Shukla J., Tripathi S.P., Chaubey M.K. (2008). Toxicity of *Myristica fragrans* and *Illicium verum* essential oils against flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). EJEAFCh 7: 3059-3064.
- Tripathi A.K., Upadhyay S. (2009). Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests. Int. J. Trop. Insect Sci. 29: 219–228.
- Ulukanli Z., Çenet M., Öztürk B., Bozok F., Karabörklü S., Demirci S.C. (2015). Chemical characterization, phytotoxic, antimicrobial and insecticidal activities of *Vitex agnus-castus* essential oil from east Mediterranean region. JEOBP 18: 1500 – 1507.
- Upadhyay R.K., Jaiswal G. (2007). Evaluation of biological activities of Piper nigrum oil against *Tribolium castaneum*. Bull. Insectology 60: 57-61.
- Varma J., Dubey N.K. (2001). Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. Int. J. Food Microbiol. 68: 207–210.
- Vincent J.F.V., Wegst U.G.K. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. Arthropod Struct. Dev. 33: 187–199.
- Wang C.F., Yang K., You C.X., Zhang W.J., Guo S.S., Geng Z.F., Du S.S., Wang Y.Y. (2015a). Chemical composition and insecticidal activity of essential oils from *Zanthoxylum dissitum* leaves and roots against three species of storage pests. Molecules 20: 7990-7999.
- Wang C.F., Zhang W.J., You C.X., Guo S.S., Geng Z.F., Fan L., Du S.S., Deng Z.W., Wang Y.Y. (2015b). Insecticidal constituents of essential oil derived from *Zanthoxylum armatum* against two stored-product insects. J Oleo Sci. 64: 861-868.
- Wang J., Zhu F., Zhou X.M., Niu C.Y., Lei C.L. (2006). Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Stored Prod. Res. 42: 339–347.
- Wang J.L., Li Y., Lei C.L. (2009). Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Nat. Prod. Res. 23: 1080-1088.
- Wang Y., You C.X., Wang C.F., Yang K., Chen R., Zhang W.J., Du S.S., Geng Z.F., Deng Z.W. (2014). Chemical constituents and insecticidal activities of the essential oil from *Amomum tsaoko* against two stored-product insects. J. Oleo Sci. 63: 1019-1026.
- Wang Y., You C.X., Yang K., Wu Y., Chen R., Zhang W.J., Liu Z.L., Du S.S., Deng Z.W., Geng Z.F., Han J. (2015c). Bioactivity of essential oil of *Zingiber purpureum* rhizomes and its main compounds against two stored product insects. J. Econ. Entomol. 108: 925-932.
- Werdin González J.O., Gutiérrez M.M., Ferrero A.A., Fernández Band B. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. Chemosphere 100: 130–138.
- Wu Y., Zhang W., Li Z., Zheng L., Wang P., Wei J., Huang D., Tian Z., Li X., Du S. (2015b). Toxic activities of *Platyclusus orientalis* against *Lasioderma serricorne* and *Tribolium castaneum* in stored tobacco. Tobacco Sci. Technol. 48: 31-35; 56.
- Wu Y., Zhang W.J., Wang P., Yang K., Huang D. Y., Wei J.Y., Tian Z.F., Bai J.F., Du S.S. (2015a). Contact toxicity and repellency of the essential oil of *Liriope muscari* (DECN.) Bailey against three insect tobacco storage pests. Molecules 20: 1676-1685.
- Yang K., You C.X., Wang C.F., Guo S.S., Li Y.P., Wu Y., Geng Z.F., Deng Z.W., Du S.S. (2014). Composition and repellency of the essential oils of *Evodia calcicola* Chun ex Huang and *Evodia trichotoma* (Lour.) Pierre against three stored product insects. J. Oleo Sci. 63: 1169-1176.
- Yang K., You C.X., Wang C.F., Lei N., Guo S.S., Geng Z.F., Du S.S., Ma P., Deng Z.W. (2015). Chemical composition and bioactivity of essential oil of *Atalantia guillauminii* against three species stored product insects. J. Oleo Sci. 64: 1101-1109.
- You C.X., Yang K., Wu Y., Zhang W.J., Wang Y., Geng Z.F., Chen H.P., Jiang H.Y., Du S.S., Deng Z.W., Liu Z.L. (2014). Chemical composition and insecticidal activities of the essential oil of *Perilla frutescens* (L.) Britt. aerial parts against two stored product insects. Eur Food Res Technol *in press*.
- You C.X., Zhang W.J., Guo S.S., Wang C.F., Yang K., Liang J.Y., Wang Y., Geng Z.F., Du S.S., Deng Z.W. (2015). Chemical composition of essential oils extracted from six *Murraya* species and their repellent activity against *Tribolium castaneum*. Ind. Crops Prod. 76: 681–687.
- Zapata N., Smagghé G. (2010). Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. Ind. Crops Prod. 32: 405–410.
- Zhang J.S., Zhao N.N., Liu Q.Z., Liu Z.L., Du S.S., Zhou L., Deng Z.W. (2011). Repellent constituents of essential oil of *Cymbopogon distans* aerial parts against two stored-product insects. J. Agric. Food Chem. 59: 9910–9915.

- Zhang W.J., Yang K., You C.X., Wang Y., Wang C.F., Wu Y., Geng Z.F., Su Y., Du S.S., Deng Z.W. (2015a). Bioactivity of essential oil from *Artemisia stolonifera* (Maxim.) Komar. And its main compounds against two stored-product insects. J. Oleo Sci. 64: 299-307.
- Zhang W.J., You C.X., Yang K., Wang Y., Su Y., Geng Z.F., Du S.S., Wang C.F., Deng Z.W., Wang Y.Y. (2015b). Bioactivity and chemical constituents of the essential oil from *Dendranthema indicum* (L.) Des Moul. Against two stored insects. J. Oleo Sci. 64: 1-8.