



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

Tesis Doctoral

*Toxicidad, efecto antialimentario y  
repelente de metabolitos secundarios de  
Eucalyptus globulus (Labill) (Myrtaceae)  
sobre coleópteros de importancia agrícola*

**Ing. Agr. Serafina Russo**

Directoras

**Dra. Silvia R. Leicach**

**Dra. Nora Cabrera**

2013

## *DEDICATORIA*

*A mí mamá y a mí papá*

*A mí hermano: César*

*A mí cuñada: Graciela*

*A mis dulces y hermosas sobrinas: Pame y Dai*

*A mí gran amor: Juan Manuel*

*A mí confidente, amigo y consejero: Hugo*

## *Agradecimientos*

A Dios y a mis padres por haberme dado la vida, por darme la oportunidad de elegir este camino maravilloso del conocimiento a través del interminable mundo de la naturaleza, que cada día y a medida que pasa el tiempo me asombra más.

A mis directoras: Silvia Leicach, por haberme tendido su mano en el momento del comienzo de este proyecto, por haber confiado en mí. Gracias por la infinita paciencia en la lectura de las incontables veces que los manuscritos llegaron a sus manos, y la respuesta siempre inmediata. Gracias por haber contribuido a mi formación profesional, por los aprendizajes, Gracias Silvia. A Nora Cabrera: por estar pendiente de cada avance, ponerse triste con mis tristezas, y animarme a seguir adelante en mis bajones, gracias por estar. En cada día de encuentro para la “tesis” siempre aprendí cosas nuevas, gracias Nori, no terminaré de agradecerte nunca.

A las chicas de “La Plata” que siempre estuvieron con una sonrisa, un gesto de solidaridad, y de apoyo, las tengo presente a todas: Martita, Norma, Analía, Silvana, Fabiana, Cecilia, espero no haberme olvidado de ninguna.

Al personal docente y no docente de la Cátedra de Biomoléculas, siempre dispuestos a ayudarme ante cualquier duda, quiero agradecer especialmente a Marga por sus indicaciones precisas sobre la extracción de aceites en el comienzo de este proceso, siempre dispuesta, y luego con las explicaciones claras sobre los análisis estadísticos, gracias Marga, sabés que te aprecio mucho. Y obviamente no quiero dejar de agradecer a esa persona tan especial que siempre estuvo dispuesta a ayudarme, guiarme, poniendo el hombro y las ganas en la realización de todos los bioensayos que componen esta tesis, y a vos hay darte un gracias “con mayúsculas”, Gracias Hugo.

A la Cátedra de Zoología Agrícola, donde comenzaron mis primeros pasos en el aprendizaje de este mundo que nunca se termina de conocer, y en cada nuevo saber hay una alegría nueva. A todos: empezando por Horacio Rizzo, Alicia Pelicano, Graciela Mareggiani que con su experiencia me ayudaron cada día a crecer. A la par están y estuvieron Ana, Silvia, Paola, gracias “chicas”. Y no quiero dejar de agradecerles a Norma Zamuner que siempre con su tranquilidad ha logrado que baje mis aceleres, gracias, Normita. Y para la más jovencitas: Gisella, Estefania, y para

esa persona que no deja de acompañarme en cada momentito, siempre dispuesta a ayudar, siempre con una palabra de aliento y por sobre todas las cosas “amiga”, haciéndome reír con sus ocurrencias, gracias Heidi.

No me quiero olvidar de Marta Madia, y Silvia Gaetán, gracias por estar.

A las “chicas de abajo” y ellas saben quienes son, gracias por ser cómo son: Susana, Angelita, Aldana, y a alguien que ahora no está físicamente con nosotros, pero que estoy segura que nos acompaña, este donde este, siempre te tengo presente: Patricia, y a alguien que ahora está luchando por estar bien, Ro, estamos con vos. Gracias por estar siempre dispuesta ante cualquier duda de estadística, siendo super clara con tus explicaciones.

Un agradecimiento especial a Adriana Rodríguez por brindarme su ayuda desinteresada en las consultas realizadas de estadística que han logrado la culminación de la versión final de esta tesis.

Gracias a mis evaluadores, que con sus sugerencias e indicaciones han perfeccionado este trabajo en conjunto. Le agradezco en particular a la Dra. Marcela I. Schneider, por sus claras y precisas sugerencias.

Gracias a Ana Casais, Graciela Mattone y Maria Mamone: “mis amigas”, y ninguna de ellas es más importante que la otra, las tres forman parte de lo que soy hoy, GRACIAS, por estar en esta etapa, y siempre, LAS QUIERO.

A Betina, por acompañarme en este proceso con tus conocimientos, sabiduría, y por sobre todas con tu amor incondicional.

A mi familia, mi hermano, cuñada, y mis sobrinas: Pame y Dai, por haberme enseñado que la vida es linda, que vale la pena intentar cada día vivirla.

Y no por ser menos importante lo deje para el final, sino porque ese alguien es con quien comparto todos mis momentos, todos los caminos desde hace doce años, y en esta etapa tan especial me acompañó dándome lo mejor de él: su paciencia, su ánimo y por sobre todas las cosas su amor, GRACIAS AMOR.

***Gracias!!!!!!!!!!***

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE GENERAL.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XIX

### CAPITULO I

INTRODUCCION.....	1
Control de plagas en granos almacenados.....	1
Plagas de granos almacenados.....	3
Plagas de infestación primaria y secundaria.....	3
Manejo de las plagas.....	4
Insecticidas de origen vegetal.....	7
Metabolitos secundarios: rol como insecticidas.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	11
HIPOTESIS .GENERAL.....	11

### CAPITULO II

ACEITES ESENCIALES.....	12
INTRODUCCION.....	12
Propiedades físico-químicas.....	12
Terpenos: Generalidades.....	13
Mecanismo de acción de los aceites esenciales.....	15
Aceites esenciales en el control de plagas de granos almacenados.....	17
Familia Myrtaceae: Género <i>Eucalyptus</i> .....	18
Aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i> .....	19

Composición y rendimiento de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i> : factores condicionantes.....	19
Acción insecticida de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i> .....	20
<i>Eucalyptus globulus</i> .....	21
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
<b>HIPOTESIS</b> .....	23
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	24
Recolección de material vegetal de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	24
Extracción de aceites esenciales.....	24
Cromatografía de Gases. Expectrometría de Masas.....	26
Análisis estadístico.....	27
<b>RESULTADOS</b>	
Rendimiento de aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	28
Análisis de la composición de terpenos de los aceites esenciales de <i>E.</i> <i>globulus</i> .....	28
<b>DISCUSION</b> .....	33
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>CONTROL DE COLEÓPTEROS-PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS</b> .....	35
<b>INTRODUCCION</b> .....	35
<b>INSECTOS EN ESTUDIO</b> .....	37
Plagas de infestación primaria.....	37
<i>Sitophilus oryzae</i> (Familia Curculionidae).....	37
Plagas de infestación secundaria.....	39
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> (Familia Cucujidae).....	39
<i>Cryptolestes pusillus</i> (Familia Cucujidae).....	41
<i>Tribolium confusum</i> (Familia Tenebrionidae).....	42

<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general.....	43
Objetivos específicos.....	43
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>44</b>
Cría y mantenimiento de insectos en estudio.....	44
Bioensayos.....	45
Actividad insecticida.....	45
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
<i>Sitophilus oryzae</i> “gorgojo del arroz”.....	50
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> “carcoma dentada”.....	53
<i>Cryptolestes pusillus</i> “carcoma achatada”.....	56
<i>Tribolium confusum</i> “tribolio confuso”.....	58
Determinación de la concentración letal (CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> ) y el Tiempo efectivo de volteo (TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> ).....	61
<i>Sitophilus oryzae</i> “gorgojo del arroz”.....	62
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> “carcoma dentada”.....	63
<i>Cryptolestes pusillus</i> “carcoma achatada”.....	65
<i>Tribolium confusum</i> “tribolio confuso”.....	68
<b>DISCUSION.....</b>	<b>70</b>

#### **CAPÍTULO IV**

##### **ACTIVIDAD REPELENTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* SOBRE *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum***

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>72</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>76</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>76</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>76</b>
Actividad repelente.....	76
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>

<i>Sitophilus oryzae</i> “gorgojo del arroz” .....	78
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> “carcoma dentada” .....	82
<i>Cryptolestes pusillus</i> . “carcoma achatada” .....	83
<i>Tribolium confusum</i> “tribolio confuso” .....	88
<b>DISCUSION</b> .....	91

## **CAPÍTULO V**

### **ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* SOBRE *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum***

<b>INTRODUCCION</b> .....	95
<b>OBJETIVOS</b> .....	98
Objetivo general.....	98
Objetivos específicos.....	98
<b>HIPOTESIS</b> .....	98
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	99
<b>RESULTADOS</b> .....	100
<b>DISCUSION</b> .....	107
<b>CONCLUSIONES</b> .....	111
<b>REFERENCIAS</b> .....	113
<b>ANEXO I. CAPITULO III. CONTROL DE COLEOPTEROS-PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS</b> .....	161
<b>ANEXO II. CAPITULO IV. ACTIVIDAD REPELENTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>EUCALYPTUS GLOBULUS</i> SOBRE <i>Sitophilus oryzae</i>, <i>Oryzaephilus surinamensis</i>, <i>Cryptolestes pusillus</i> y <i>Tribolium confusum</i>....</b>	163



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Eucalyptus globulus</i> : árbol, flores y frutos.....	22
<b>Figura 2.</b> Trampa de Clevenger.....	25
<b>Figura 3.</b> Rendimiento de aceites esenciales (%) en hojas adultas (Ad) y juveniles (Juv) de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	28
<b>Figura 4.</b> Cromatograma de hojas adultas de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	29
<b>Figura 5.</b> Cromatograma de hojas juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	29
<b>Figura 6.</b> Estructuras químicas de los terpenos mayoritarios identificados en los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> Análisis de componentes principales. <b>J</b> (juveniles), <b>A</b> (adultas). Círculos blancos: terpenos no oxigenados; círculos grises: terpenos oxigenados.....	32
<b>Figura 8.</b> Adulto y larva de <i>Sitophilus oryzae</i> .....	38
<b>Figura 9.</b> Daño de <i>Sitophilus oryzae</i> sobre trigo.....	38
<b>Figura 10.</b> Larva y adulto de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	40
<b>Figura 11.</b> Larva y adulto de <i>Cryptolestes pusillus</i> .....	41
<b>Figura 12.</b> Larva y adulto de <i>Tribolium confusum</i> .....	42
<b>Figura 13.</b> Frascos de cría de insectos.....	45
<b>Figura 14.</b> Preparación de cajas de Petri para bioensayos.....	46
<b>Figura 15.</b> Concentración-respuesta.....	48
<b>Figura 16.</b> Distribución Normal.....	49
<b>Figura 17.</b> Concentración-Respuesta con transformación Probit y logarítmica.....	49
<b>Figura 18.</b> Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> tratado con diluciones de 1.8 cineol (0.20, 0.40, 0.60, y 0.80 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas.....	52
<b>Figura 19.</b> Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.40, 0.60, 0.80 y 1 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas.....	52
<b>Figura 20.</b> Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.40, 0.60, 0.80 y 1 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas ( $p < 0.05$ ) horas.....	53

<b>Figura 21.</b> Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> tratado con diluciones de 1,8 cineol (0.50, 0.75, 1, 1.25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>54</b>
<b>Figura 22.</b> Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.50, 0.75, 1, 1.25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>55</b>
<b>Figura 23.</b> Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.50, 0.75, 1, 1.25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>55</b>
<b>Figura 24.</b> Mortalidad (%) de <i>Cryptolestes pusillus</i> tratado con diluciones de 1,8-cineol (0, 0.4, 0.6 y 0.8 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>57</b>
<b>Figura 25.</b> Mortalidad (%) de <i>Cryptolestes pusillus</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.05, 0.15, 0.25, 0.35 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a las determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>57</b>
<b>Figura 26.</b> Mortalidad (%) de <i>Cryptolestes pusillus</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.05, 0.15, 0.25, 0.35 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>58</b>
<b>Figura 27.</b> Mortalidad (%) de <i>Tribolium confusum</i> tratado con diluciones de 1,8-cineol (0.50, 0.75, 1, 1.25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>60</b>
<b>Figura 28</b> Mortalidad (%) de <i>Tribolium confusum</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.50, 0.75, 1, 1.25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>60</b>
<b>Figura 29.</b> Mortalidad (%) de <i>Tribolium confusum</i> tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> (0.50, 0.75, 1, 1.25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas ( $p < 0.05$ ).....	<b>61</b>
<b>Figura 30.</b> Dispositivo utilizado para evaluar actividad repelente.....	<b>77</b>
<b>Figura 31.</b> Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre <i>Sitophilus oryzae</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>80</b>
<b>Figura 32.</b> Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre <i>Sitophilus oryzae</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>81</b>
<b>Figura 33.</b> Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> sobre <i>Sitophilus oryzae</i> en función del tiempo de exposición .....	<b>81</b>

**Figura 34.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición.....84

**Figura 35.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición.....84

**Figura 36.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición ....85

**Figura 37.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición.....87

**Figura 38.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición .....87

**Figura 39.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición.....88

**Figura 40.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición.....90

**Figura 41.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición .....90

**Figura 42.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición .....91

**Figura 43.** Índice Fagodisuasivo de 1,8-cineol sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum* en función de la concentración .....105

**Figura 44.** Índice Fagodisuasivo de aceites esenciales de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum* en función de la concentración.....106

**Figura 45.** Índice Fagodisuasivo de aceites esenciales de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*. en función de la concentración.....107

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición porcentual de terpenos en aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>E. globulus</i> .....	<b>31</b>
<b>Tabla 2.</b> Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>51</b>
<b>Tabla 3.</b> Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>54</b>
<b>Tabla 4.</b> Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de <i>Cryptolestes pusillus</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>56</b>
<b>Tabla 5.</b> Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de <i>Tribolium confusum</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>59</b>
<b>Tabla 6.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Sitophilus oryzae</i> calculada con 2 horas de exposición expresada como CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>62</b>
<b>Tabla 7.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>E. globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Sitophilus oryzae</i> calculada para la Concentración de 0,8 µl/cm <sup>2</sup> expresada como TE <sub>50</sub> y TE <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>63</b>
<b>Tabla 8.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>E. globulus</i> y 1,8-cineol contra. <i>Oryzaephilus surinamensis</i> calculada con media hora de exposición expresada como CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>64</b>
<b>Tabla 9.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Oryzaephilus surinamensis</i> calculada con 2 horas de exposición expresada como DL <sub>50</sub> y DL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>64</b>
<b>Tabla 10.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Oryzaephilus surinamensis</i> calculada para la Concentración de 1µl/cm <sup>2</sup> expresada como TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>65</b>

<b>Tabla 11.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8 cineol sobre <i>Cryptolestes pusillus</i> calculada con 12 horas de exposición expresada como CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>66</b>
<b>Tabla 12.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Cryptolestes pusillus</i> calculada con 24 horas de exposición expresada como CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>67</b>
<b>Tabla 13.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8 cineol sobre <i>Cryptolestes pusillus</i> calculada para la Concentración de 0,40 µl/cm <sup>2</sup> ) expresada como TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>67</b>
<b>Tabla 14.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Tribolium confusum</i> calculada con 0,5 horas de exposición expresada como CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>68</b>
<b>Tabla 15.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8 cineol sobre <i>Tribolium confusum</i> calculada con 2 horas de exposición expresada como CL <sub>50</sub> y CL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>69</b>
<b>Tabla 16.</b> Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol contra <i>Tribolium confusum</i> , calculada para la Concentración de 1µl/cm <sup>2</sup> expresada como TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> y los límites de confianza.....	<b>69</b>
<b>Tabla 17.</b> Actividad Repelente (%) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus glubulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Sitophilus oryzae</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>79</b>
<b>Tabla 18.</b> Actividad Repelente de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus glubulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Oryzaephilus surinamensis</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>83</b>
<b>Tabla 19.</b> Actividad Repelente de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus glubulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Cryptolestes pusillus</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>86</b>
<b>Tabla 20.</b> Actividad Repelente de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de <i>Eucalyptus glubulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Tribolium confusum</i> en función del tiempo de exposición.....	<b>89</b>

<b>Tabla 21.</b> Clases de Indices de Repelencia para <i>Sitophilus Oryzae</i> , <i>Oryzaephilus surinamensis</i> <i>Cryptolestes pusillus</i> , <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>93</b>
<b>Tabla 22.</b> Indices Nutricionales y Actividad fagodisuasiva de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Sitophilus oryzae</i> .....	<b>101</b>
<b>Tabla 23.</b> Indices Nutricionales y Actividad fagodisuasiva de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	<b>102</b>
<b>Tabla 24.</b> Índices Nutricionales y Actividad fagodisuasiva de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Cryptolestes pusillus</i> .....	<b>103</b>
<b>Tabla 25.</b> Indices Nutricionales y Actividad fagodisuasiva de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus</i> y 1,8-cineol sobre <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>104</b>
<b>Tabla I.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de <i>Sitophilus oryzae</i> .....	<b>161</b>
<b>Tabla II.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	<b>161</b>
<b>Tabla III.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de <i>Cryptolestes pusillus</i> .....	<b>162</b>
<b>Tabla IV.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>162</b>
<b>Tabla V.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre <i>Sitophilus oryzae</i> .....	<b>163</b>
<b>Tabla VI.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	<b>163</b>
<b>Tabla VII.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre <i>Cryptolestes pusillus</i> .....	<b>164</b>
<b>Tabla VIII.</b> Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>164</b>

<b>Tabla IX.</b> Comparación de las medias del PR (%) para cada una de las cantidades utilizadas para <i>Sitophilus oryzae</i> .....	<b>165</b>
<b>Tabla X.</b> Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para <i>Sitophilus oryzae</i> .....	<b>165</b>
<b>Tabla XI.</b> Comparación de las medias del PR (%) para cada uno de los tratamientos ensayados para <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	<b>165</b>
<b>Tabla XII.</b> Comparación de las medias del PR (%) para cada una de las cantidades utilizadas para <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	<b>166</b>
<b>Tabla XIII.</b> Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .....	<b>166</b>
<b>Tabla XIV.</b> Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para <i>Cryptolestes pusillus</i> .....	<b>166</b>
<b>Tabla XV.</b> Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los tratamientos y cantidades ensayadas para <i>Cryptolestes pusillus</i> .....	<b>167</b>
<b>Tabla XVI.</b> Comparación de las medias del PR (%) para cada uno de los tratamientos ensayados para <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>167</b>
<b>Tabla XVII.</b> Comparación de las medias del PR (%) para cada una de las cantidades utilizadas para <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>168</b>
<b>Tabla XVIII.</b> Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para <i>Tribolium confusum</i> .....	<b>168</b>

## RESUMEN

Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales han sido utilizados desde la antigüedad como condimento, por su sabor y aroma; también como agente antimicrobiano e insecticida, para repeler insectos y/o para proteger los productos almacenados. Constituyen eficaces alternativas a los plaguicidas sintéticos convencionales de amplio espectro con baja toxicidad para el medio ambiente, mayor biodegradabilidad y baja generación de resistencia. El objetivo de este trabajo fue: I) analizar la composición química y rendimiento de los aceites esenciales extraídos de hojas juveniles y adultas de *Eucalyptus globulus* (Labill) (Myrtaceae) y II) evaluar la potencial actividad biológica (insecticida, repelente y/o attractante, antialimentaria) y las alteraciones nutricionales producidas por esas esencias y 1,8-cineol en individuos adultos de *Sitophilus oryzae* (Linneo) (Coleoptera: Curculionidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Linneo) (Coleoptera: Cucujidae), *Cryptolestes pusillus* (Schönherr) (Coleoptera: Cucujidae) y *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae).

La extracción de los aceites esenciales se realizó mediante destilación por arrastre con vapor de agua, utilizando trampa de Clevenger. El aceite esencial obtenido se analizó por GC-EM. Se encontró un mayor porcentaje de aceites esenciales en hojas juveniles de *E. globulus* (1,75%) respecto de adultas (1,40 %). El análisis por CG y CG-EM detectó variaciones en las abundancias relativas de los terpenos mayoritarios, siendo éstos:  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, aromadendreno y globulol.

La actividad insecticida de los aceites se evaluó a través de la toxicidad por contacto mediante la técnica de impregnado de papeles de filtro. Los resultados corroboran una alta susceptibilidad de los insectos evaluados ante las esencias probadas. Así para obtener una mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae* fueron necesarias concentraciones de 1,8-cineol, y aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de 0,91, 1,19 y 1,52  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  respectivamente. Sobre *O. surinamensis* sólo se necesitaron 0,82  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de 1,8-cineol, mientras que fueron necesarios 1,59  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  y 2,29  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas respectivamente.



Los individuos adultos de *T. confusum* también mostraron una mayor susceptibilidad al 1,8-cineol (0,84  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) mientras los aceites esenciales de hojas juveniles debieron ser aplicadas a una concentración de 1,59 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  y los de hojas adultas a una de 2,29  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para obtener el mismo efecto. *C. pusillus* se comportó de una manera muy diferente, requiriendo una concentración casi diez veces mayor de 1,8-cineol en relación a la necesaria de los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas para producir una mortalidad del 50% de la población. Así para 1,8-cineol fueron necesarios 1,16  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , mientras que para hojas adultas y juveniles fue suficiente la concentración de 0,12  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  en ambos casos para alcanzar el mismo resultado.

El efecto repelente sobre los cuatro insectos ensayados, se determinó teniendo en cuenta el criterio de la libre elección de los insectos entre la esencia a evaluar y el control o testigo. En individuos adultos de *C. pusillus* los aceites esenciales obtenidos de hojas juveniles y adultas y 1,8-cineol mostraron valores de repelencia del 100, 93,33 y 91,66% respectivamente, a la cantidad de 20  $\mu\text{l}$ . Para *O. surinamensis*, los valores de repelencia obtenidos fueron de 80, 63,38 y 60% para 1,8-cineol, hojas juveniles y hojas adultas respectivamente a la misma cantidad. Los aceites esenciales obtenidos de hojas adultas, el 1,8-cineol y los aceites esenciales de hojas juveniles mostraron valores de repelencia de 85, 72 y 64% con 20  $\mu\text{l}$  de esencia en individuos adultos de *S. oryzae*. El comportamiento de *T. confusum* con la misma cantidad de producto fue diferente mostrando valores de 74, 63, y 62% de repelencia para hojas juveniles, 1,8-cineol y hojas adultas respectivamente.

Se determinaron las clases de repelencia para los cuatro insectos ensayados, al probar 1,8-cineol, IV para *O. surinamensis* y *C. pusillus* y III para *S. oryzae* y *T. confusum*. Para los aceites de hojas adultas las clases fueron IV para *S. oryzae* y *C. pusillus* y III para *O. surinamensis* y *T. confusum*. Los aceites de hojas juveniles obtuvieron clases de repelencia IV para *C. pusillus* y *T. confusum* y III para *S. oryzae* y *O. surinamensis*.

Para realizar el análisis de los posibles efectos sobre la fisiología nutricional y el efecto fagodisuasivo se utilizaron discos de harina. Los datos resultantes de los bioensayos confirmaron la modificación de los índices nutricionales sobre los cuatro insectos evaluados. Se observó una disminución de las tasas de crecimiento relativo

(TCR) y relativa de consumo (TRC) con el aumento de la concentración de cada uno de los aceites probados (hojas adultas y juveniles) y 1,8-cineol. La mortalidad, también resultó mayor a medida que aumentaba la concentración.

El Índice Fagodisuasivo (IF) varió negativamente en función del aumento de la concentración en los todos los tratamientos realizados, resultando menor a medida que aumentó la misma. Los mayores valores obtenidos fueron 94,86%, 90,83%, 83,32% y 67,48% para *S. oryzae*, *C. pusillus*, *O. surinamensis* y *T. confusum* respectivamente a las concentraciones más altas de 1,8-cineol analizadas.

Con los aceites esenciales de hojas adultas también se lograron altos valores: 94,51%; 76,23%; 86,06% y 49,43%, mientras que para las hojas juveniles los valores fueron 85,38%; 68,02%; 80,75% y 50,43% para *S. oryzae*, *C. pusillus*, *O. surinamensis* y *T. confusum* respectivamente con las concentraciones más altas ensayadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos los aceites esenciales de las hojas juveniles y adultas de *E. globulus* y 1,8-cineol, su principal componente, entre otros, poseen propiedades insecticidas, repelentes y fagodisuasivas sobre el estado adulto de estas importantes plagas de granos almacenados. Sin embargo sería necesario evaluar estos efectos en los distintos estados de desarrollo, a lo largo de su ciclo biológico para garantizar el menor desarrollo de las poblaciones de organismos potencialmente plagas bajo condiciones de almacenamiento. La evaluación de sus efectos sobre las especies de los mismos géneros también sería útil en el largo plazo para predecir si la erradicación de una especie podría conducir a la proliferación de otras menos susceptibles. Se debería evaluar además la relación costo-beneficio y la viabilidad del aceite como protector de granos almacenados, previo a su potencial aplicación comercial.

## ABSTRACT

Aromatic plants and essential oils have been used since antiquity for their flavor and aroma as condiments and also as antimicrobial agents and insecticides or insect repellents, to protect stored products. They can be effective alternatives to synthetic pesticides without causing adverse effects on the environment, because they do not exhibit a long persistence due to their greater biodegradability. The aim of this work was to analyze the composition and the yield of to adult and juvenile leaves essential oil and the potential insecticidal activity, repellency/attraction, antifeedant and nutritional alterations caused by 1,8-cineol and *Eucalyptus globulus* Labill essential oils extracted from adult and juvenile leaves on adult of *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus) (Coleoptera: Cucujidae), *Cryptolestes pusillus* (Schönherr) (Coleoptera: Cucujidae) and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae).

Extraction of essential oils was performed by hydrodistillation using a Clevenger apparatus. The essential oil was then analyzed by GC-MS. We found a higher percentage of essential oils in juvenile leaves of *E. globulus* (1.75%) compared to adult ones (1.40%). The analysis by GC and GC-MS detected variations in relative abundances of major terpenes  $\alpha$ -pinene, 1,8-cineole,  $\alpha$ -terpineol, aromadendrene and globulol, among others.

Insecticidal activity of the oils was assessed by contact toxicity using the impregnated filter paper technique. The results confirm a high susceptibility of evaluated insects towards the essences tested. Concentrations of 0, 91, 1, 19 and 1, 52  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  of 1,8-cineol, and essential oils from adult and juvenile leaves were needed, respectively, to achieve 50% mortality on *S. oryzae* population.

*O. surinamensis* adult needed only 0, 82  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  of 1,8-cineol, and 1,59  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  and 2,29  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , respectively, of juvenile and adult leaf essential oils to get to the same result. *T. confusum* adult also showed an increased susceptibility to 1,8-cineol (0,84  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) while essential oils from juvenile and adult leaves had to be applied at a concentration of 1,59  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  and 2,29  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , respectively, to obtain the same effect.

*C. pusillus* showed a different behaviour, since adult required a concentration of 1,8-cineol almost ten-fold higher ( $1,16\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) the concentrations of juvenile and adult essential oils required to obtain 50% mortality ( $0,12\mu\text{l}/\text{cm}^2$  for both essences).

Repellency towards the four insects tested was determined by their free choice between the treatment essence and the controls. Essential oils of juvenile leaves, adult leaves, and 1, 8-cineole showed repellency values of 100, 93,33 and 91,66%, respectively, towards *C. pusillus* adult at the highest concentration (20  $\mu\text{l}$ ). For *O. surinamensis* repellency at the same concentration were 80, 63.38 and 60% for 1,8-cineol, and essential oils of juvenile leaves and adult leaves, respectively. *S. oryzae* adult expressed repellency values at the same concentration, of 85, 72 and 64% to adult leaf essential oil, 1,8-cineol and juvenile leaf essential oil, respectively. *Tribolium confusum* differed from the others, showing values of 74, 63, and 62% repellency for juvenile leaves, 1,8-cineol and adult leaves respectively.

Repellency classes were also determined for the insects species tested. The compound 1,8-cineol was a class IV on *O. surinamensis* and *C. pusillus*, and III for *S. oryzae* and *T. confusum*. Adult leaf essential oil was class IV for *S. oryzae* and *C. pusillus*, and III for *O. surinamensis* and *T. confusum*. Repellency classes for juvenile leaf essential oil were IV for *C. pusillus* and *T. confusum*, and III for *S. oryzae* and *O. surinamensis*.

Flour disks were used to analyze possible nutritional physiology and antifeedant effects. The data from bioassays confirmed the modification of nutritional indices for the four insects tested. We observed a decrease of the relative growth rate (TCR) and on consumption (TRC) with increasing concentration of each of the tested oils (adult and juvenile leaves) and 1,8-cineole. Also, mortality increased with increasing compound concentrations. In the control test, acetone had the greatest values in both indices.

The feeding deterrent index (IF) varied positively according to increasing concentration. The highest values obtained were 94.86%, 90.83%, 83.32% and 67.48% for *S. oryzae*, *C. pusillus*, *O. surinamensis* and *T. confusum*, respectively, when 1,8-cineol was tested at the highest dose. The values of IF for adult leaves were 94.51%, 76.23%, 86.06% and 49.43% for *S. oryzae*, *C. pusillus*, *O. surinamensis* and

*T. confusum*, respectively, with the highest doses tested, whereas the corresponding values for young leaves were 85.38%, 68.02% 80.75% and 50.43%.

The results suggest that essential oils of *E. globulus* juvenile and adult leaves, and 1,8-cineole, their main component, have insecticidal, repellent, and feeding deterrent properties on the adult stage of these important pests of stored grain. However it would be necessary to evaluate these effects on different stages, to assess the most susceptible ones to control under storage conditions. The evaluation of their effects on species of the same genera may also be useful to predict in the long term whether the control of any of these species may lead to the proliferation of other less susceptible ones. Prior to their potential commercial application, the cost-benefit relationship should be assessed, as well as the viability of these essential oils for stored grain protection.

# CAPITULO I

## INTRODUCCION GENERAL

### Control de plagas en granos almacenados

Los granos destinados a la alimentación, semillas de cereales, oleaginosas y sus subproductos (harinas, sémolas, trozos gruesos pelados y germinados), constituyen el alimento básico del 50% de la población mundial (Rittaco, 2003).

La imposibilidad de consumirlos inmediatamente después de cosechados, el incremento de la producción debido al mejoramiento de las técnicas agrícolas y la distancia de las zonas de cosecha a los centros de consumo, hacen necesario almacenar los granos durante períodos prolongados (6 meses a un año) en lugares apropiados denominados silos, almacenes, etc. (Garcia Correia Tavares, 2002).

El deterioro que experimentan los granos almacenados, se debe no sólo a las condiciones y tiempo de almacenamiento, sino también a la acción conjunta de los siguientes factores (Bogliaccini, 2001; Rajendran, 2002; Casimi, 2009):

**-Físicos:** daños mecánicos que sufren los granos durante su cosecha, transporte, secado, limpieza, almacenamiento y distribución. El manejo inadecuado resulta en rozamiento, cortes, compresión, golpes y roturas, los cuales producen a su vez la brotación y descomposición de los mismos, favoreciendo la actividad de microorganismos y artrópodos.

**-Químicos:** los granos cosechados tienen generalmente un elevado porcentaje de humedad, siendo necesario someterlos al secado para evitar alteraciones químicas diversas. Si durante el almacenamiento del grano sano se mantiene un equilibrio entre humedad (<70%), temperatura (15 °C) y oxígeno intergranario, sólo ocurren

pequeños cambios, pero cuando el ensilaje es inadecuado, los componentes del grano sufren alteraciones.

**-Biológicos:** en los lugares de almacenamiento se pueden encontrar cuerpos extraños como polvillo, granos rotos y semillas de malezas, además de una fauna muy diversa formada por microorganismos (bacterias y hongos) y artrópodos, siendo común entre estos la presencia de insectos. La alta temperatura y humedad de los granos, sumados al apilamiento y presencia de granos partidos, proporcionan las condiciones adecuadas para acelerar el desarrollo de estos organismos.

Las infestaciones que ocasionan los insectos están favorecidas por sus movimientos así como por las condiciones de temperatura y humedad de los lugares de almacenamiento. La mayoría de los insectos que infestan granos recién almacenados son buenos voladores e invaden estos depósitos directamente desde el campo y/o desde otros centros de almacenaje en los cuales los granos ya han sido infestados. Estas poblaciones pueden alcanzar niveles muy altos en aquellos silos o almacenes que no son revisados con la debida frecuencia, en los pisos falsos o en los conductos de ventilación, en los equipos usados para mover los granos, o en granos descartados como basura, razón por la cual estas áreas deben ser mantenidas libres de insectos para reducir la migración hacia el grano recién cosechado.

El movimiento de los insectos dentro de la masa de granos se produce a una velocidad determinada por la temperatura de la misma. En verano y otoño, estas infestaciones ocurren sólo en la zona superficial de los silos, pero cuando baja la temperatura, se congregan en el centro y partes inferiores, y sólo pueden ser detectados cuando las poblaciones son muy elevadas. La humedad más favorable para la supervivencia de los insectos en los granos almacenados está en el rango de 12 a 18%.

En muchos casos, estas infestaciones se incrementan debido a que los insectos al alimentarse dejan expuesta la superficie del endosperma permitiendo la acción de los hongos y transportando sus esporas a otras áreas del grano, estimulando así su germinación en microhábitats humedecidos por sus actividades metabólicas.

Se ha comprobado que debido a la actividad metabólica desarrollada por insectos y hongos, la temperatura del grano puede incrementarse hasta valores de 43

°C. Si la temperatura excede los 15 °C, el nivel de la población de estos organismos puede elevarse rápidamente siendo importante inspeccionar los lugares de almacenaje cada 21 días para evitar que el grano sufra daños irreparables.

## **Plagas de granos almacenados**

De los órdenes de insectos, los Coleoptera (cascarudos, gorgojos, vaquitas), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Pscoptera (piojo de los libros) son junto con los ácaros, los artrópodos que poseen mayor incidencia en el ataque de productos almacenados tanto de origen animal como vegetal (Tremanterra *et al.*, 1999; Riudavets *et al.*, 2002; Rees, 2004; Nerio *et al.*, 2009). A nivel mundial se considera a los coleópteros como las plagas más frecuentes, con más de 600 especies asociadas a los granos almacenados (Kalinovic *et al.*, 2002; Rees, 2004; Pascual-Villalobos, 2006; Sahaf *et al.*, 2008).

Las pérdidas ocasionadas por estas plagas oscilan entre un 5% y 10% en países desarrollados y, alrededor del 50% en países en vía de desarrollo (Adam *et al.*, 2006). En la Argentina, las pérdidas registradas en poscosecha por la acción de insectos y/o ácaros oscilan alrededor del 8% de la producción total (INTA, 2008). Esta situación adquiere gran relevancia debido a la importancia que tiene la exportación de granos en la economía del país, así en la campaña 2010/2011 se exportaron 46.772 millones de toneladas de cereales (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2011).

La presencia de insectos en los granos constituye un serio problema al momento de su comercialización debido a las exigencias y regulaciones vigentes en cada país para la importación de granos. En la Argentina, las normas establecen el rechazo de toda mercadería con un solo insecto y/o ácaro vivo, en cualquier etapa de la comercialización (Resolución N° 1975/94, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2007).



## Plagas de infestación primaria y secundaria

De acuerdo al daño que producen y al nivel poblacional que adquieren en los granos almacenados se consideran dos categorías de infestación de plagas, primaria y secundaria (Metcalf y Flint, 1974; Yanucci *et al.*, 2001).

Las plagas de infestación primaria producen los mayores perjuicios ya que los insectos perforan el grano sano, que al estar dañado se denomina “picado”. Pertenecen a este grupo especies de las siguientes familias del orden Coleoptera: Curculionidae: *Sitophilus granarius* (Linneo) “gorgojo del trigo”; *Sitophilus oryzae* (Linneo) “gorgojo del arroz” y *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) “gorgojo del maíz” y Bostrichidae: *Prostephanus truncatus* (Horn) “barrenador mayor de los granos” y *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) “barrenador menor de los granos”. Dentro del orden Lepidoptera, la especie *Sitotroga cerealella* (Olivier) “palomita de los cereales” de la familia Gelechidae es la que produce el mayor daño (Bentancourt y Scatoni, 1999).

Las plagas de infestación secundaria son las que atacan los granos ya dañados por los insectos mencionados antes o rotos por causas mecánicas convirtiendo así el grano en harina. Se destacan del orden Coleoptera especies de las familias: Cucujidae: *Oryzaephilus surinamensis* (Linneo) “carcoma dentada” y *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) “carcoma achatada” y de la familia Tenebrionidae: *Tribolium confusum* Jacquelin du Val. “tribolio confuso” y *Tribolium castaneum* (Herbst) “tribolio castaño”. Otras plagas secundarias pertenecen a las familias Acaridae: *Acarus siro* (Linneo) “ácaro de la harina o de los granos” y Gliphacidae: *Glyphagrus domesticus* (Dee Geer) “ácaro doméstico común o ácaro del hogar” del orden Acarina (Quintanilla y Córdoba, 1978; Dell Horto Trivelli y Arias Velázquez, 1985).

## Manejo de las plagas

En la actualidad, la aplicación de plaguicidas es la práctica más común para el control de plagas de productos almacenados, debido a su eficacia y bajo costo (Zehler

y Arthur, 2000; Athanassiou *et al.*, 2004; Dal Bello y Padín, 2006; Rozman *et al.*, 2007; Sahaf *et al.*, 2008). Los insecticidas convencionales más empleados a nivel mundial son *organofosforados* como clorpirifosfometil, pirifosfometil, fenitrotion; y entre los *piretroides* (deltametrina) (CASAFE, 2005, 2006; Alleoni y Ferreira, 2006; Fields, 2006; Dos Santos Veloso *et al.*, 2008) en ocasiones sinergizado con butóxido de piperonilo.

Para tratamientos curativos de granos almacenados se utiliza el fosforo de aluminio formulado como pastillas, pellets y bolsitas fumigantes (Collins *et al.*, 2002; Ducom *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2006; Navarro, 2006) y el DDVP (2,2 diclorovinil dimetil fosfato) aplicado en bodegas, molinos y espacios en general.

Aunque los tratamientos curativos no brindan protección contra futuras infestaciones, permiten el control de los insectos plaga en todos sus estados de desarrollo, larva, pupa y adulto (Chaudhry, 2000).

El uso de plaguicidas convencionales de amplio espectro ocasiona serios problemas en los agroecosistemas: muchos de ellos son tóxicos para los mamíferos, pueden dejar residuos en los granos y sus subproductos y pueden generar mecanismos de resistencia en los insectos plaga (Stadler *et al.*, 2003; Benhalima *et al.*, 2004; Athanassiou *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2009; Stefanazzi, 2010).

La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población de insectos para sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal (Nari y Hansen, 1999). Esta definición que coincide con la OMS (Organización Mundial de la Salud), es en realidad una simplificación máxima de un proceso biológico extremadamente complejo, la coevolución.

El desarrollo de resistencia es un proceso micro evolutivo que aparece por selección genética. Diversas especies de insectos han logrado sobrevivir de manera natural a condiciones adversas, mediante un proceso de adaptación gradual que contribuye a mantener el orden en los ecosistemas (Rosario y Hernández, 2001). Cuando un insecticida es utilizado intensivamente, ocasiona una fuerte presión de selección que actúa favoreciendo a los individuos que presentan una baja susceptibilidad debido a su genética, seleccionándolos como organismos de una

población que bajo esa presión sea estable en el tiempo. Contrastando con la lenta evolución de la resistencia a la defensa química y física de las plantas en los herbívoros, el desarrollo de resistencia a los insecticidas sintéticos ha sido extremadamente rápido porque seguramente la presión de selección ha sido mucho más rápida.

Debido a estos fenómenos evolutivos en herbívoros permitieron el desarrollo de sistemas enzimáticos ricos en los mismos, sobre todo en los organismos polífagos que en gran medida influyen en que tengan mejores aptitudes para desarrollar resistencia frente a un xenobiótico bajo una presión de selección.

El desarrollo de resistencia a los insecticidas convencionales ha aumentado exponencialmente como consecuencia de su aplicación repetitiva, por lo que es uno de los principales factores a considerar en todos los programas de control de plagas en productos almacenados (Bughio y Wilkins, 2004; Guedes *et al.*, 2006).

En los años noventa ya se habían registrado aproximadamente 600 especies de insectos resistentes a insecticidas convencionales (Metcalf, 1994). En Australia, se estimó que la resistencia a los piretroides sería cercana al 100% en 2010 (Collins, 2006). En la Argentina el primer caso de resistencia fue detectado en poblaciones de *T. castaneum* y *S. oryzae* frente al insecticida malation (organofosforados) (Picollo de Villar *et al.*, 1985), posteriormente, se informaron nuevos casos en otros insectos plaga de granos almacenados (Ferrero, 1988; Picollo de Villar *et al.*, 1992; Descamps, 2002; Stadler *et al.*, 2003).

En vista de los problemas planteados con los insecticidas corrientemente usados, se han desarrollado estrategias alternativas para el control de insectos que incluyen productos semi-sintéticos y métodos físicos como la utilización de atmósferas controladas y energía electromagnética (Alder *et al.*, 2000; MBTOC, 2002; Jayas, 2006), además de métodos alternativos de control biológico que involucran el uso de diatomeas, derivados microbianos y productos botánicos entre ellos reguladores de crecimiento de los insectos (Papachristos y Stamopoulus, 2002b; Athanassiou *et al.*, 2005; Leicach, 2006). En este contexto, el manejo integrado de plagas (MIP) se impone como una excelente estrategia de control, teniendo como objetivo el mantenimiento de los insectos por debajo de los niveles de daño

económico dentro de un marco de protección del ambiente (Dent, 2000). El MIP propone el uso combinado de métodos preventivos, biológicos, físicos y químicos.

En las últimas décadas los estrictos requerimientos para el registro de nuevas materias activas con acción insecticida, el aumento de la resistencia en insectos plaga, y los efectos colaterales sobre el ambiente, particularmente sobre organismos no blanco (especies benéficas y polinizadoras) incrementaron el interés en la búsqueda de plantas con propiedad plaguicida. Se cree que en la mayoría de los casos los productos naturales de origen vegetal pueden presentar ventajas sobre los plaguicidas sintéticos en términos de menor toxicidad para mamíferos, rápida degradación y disponibilidad local (Silva Aguayo, 2001; Aguirre Yela y Delgado, 2010).

## **Insecticidas de origen vegetal**

Los compuestos vegetales, de una gran versatilidad estructural, presentan propiedades muy diversas, pero su rol fisiológico en la planta no siempre es conocido. Los organismos vegetales sintetizan dos categorías de metabolitos: primarios y secundarios (Harborne, 1998).

Los metabolitos primarios (carbohidratos, proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos), son indispensables para el desarrollo y multiplicación de las plantas. Las rutas metabólicas primarias son comunes a todas las plantas, a diferencia de las secundarias, que varían considerablemente entre distintas especies, reflejando su historia evolutiva y relaciones taxonómicas. La característica de los metabolitos secundarios de ser específicos de un género o de una especie permite su clasificación a través de la taxonomía química (Einhellig, 1995; Leicach, 2006).

El metabolismo secundario incluye sustancias bioactivas como terpenos, terpenoides, esteroides, alcaloides, compuestos sulfurados, entre otros. Algunos cumplen roles fundamentales en el metabolismo primario, tal es el caso de la clorofila y los reguladores del crecimiento (auxinas, giberelinas, ácido abscísico), mientras para otros compuestos aún no se ha determinado su función en el metabolismo de la planta. Ciertos autores sugieren que son el resultado del proceso evolutivo vegetal,

que confiere mayor aptitud de supervivencia a las especies vegetales que los presentan (Harborne, 1982, 1989; Cox, 2002). Están presentes en todas las especies en concentraciones muy bajas, de allí su definición de secundario.

La presencia de metabolitos secundarios está en muchos casos asociada a la protección de los tejidos vegetales de la acción de organismos fitófagos (insectos, ácaros y nematodos entre otros), hongos, bacterias y virus, pudiendo además afectar a otros organismos. Mientras los metabolitos primarios son fundamentales en la adquisición de biomasa y función reproductiva, los secundarios están en general involucrados en las interacciones planta-herbívoro, incluyendo a los productos naturales que actúan como defensas químicas (Leicach, 2006).

Whittaker y Feenny (1971) utilizaron por primera vez la denominación *aleloquímicos*, para aquellas sustancias a través de las cuales los organismos de una especie afectan el crecimiento, salud, comportamiento y/o población de los de otra especie (excluyendo todas aquellas consideradas como nutrientes). Ante una agresión ocasionada por un factor biótico o abiótico, la planta puede responder aumentando la producción de aleloquímicos que la caracterizan ó bien disparando la síntesis “de novo” de defensas químicas a partir de estructuras precursoras que ya están presentes en la misma.

Se ha demostrado que la producción de aleloquímicos es una estrategia defensiva de muchos organismos vegetales, que puede afectar a herbívoros (Dakora y Phillips, 1996; Hammerschmidt y Schultz, 1996; Leicach, 2006).

Las *kairomonas* producidas por la plantas favorecen al insecto (organismo receptor), ya que lo orientan hacia ella, induciendo su alimentación u oviposición (Nordlung, 1981; Bernays, 2000; Mareggiani, 2001; Ruther *et al.*, 2002), mientras que las *allomonas* favorecen únicamente al emisor actuando como repelentes, alejando al insecto de la planta; como disuasivos de la alimentación u oviposición, como antibióticos que interrumpen el desarrollo y crecimiento de microorganismos o como antixenóticos que interrumpen el comportamiento de selección. Un tercer tipo, las *sinomonas*, benefician tanto al organismo que las libera como al que las recibe.

## **Metabolitos secundarios: rol como insecticidas**

Las características químico-estructurales de los metabolitos secundarios dan lugar a diferentes mecanismos de acción, muchos de los cuales les otorgan potencial como insecticidas. Pueden ser además usados como base para el diseño molecular de insecticidas semi-sintéticos, con persistencia y toxicidad sobre plagas específicas, disminuyendo el riesgo de toxicidad respecto de los plaguicidas sintéticos y por ende aumentando la seguridad alimentaria (Park *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de un insecticida está determinado por la ruta metabólica en la que interfiere. Los insecticidas pueden actuar como tóxicos físicos (aceites minerales), tóxicos respiratorios, neurotóxicos (carbamatos, fosforados, piretroides), tóxicos protoplásmicos, reguladores del crecimiento de los insectos (reguladores de la hormona juvenil y de la muda), inhibidores de la síntesis de quitina, reguladores del comportamiento, inhibidores de la fosforilación oxidativa, entre otras (Arregui y Puricelli, 2008).

Los aceites esenciales y otros extractos vegetales son mezclas de compuestos comúnmente ensayados para el control de insectos, que pueden actuar como insecticidas de contacto, repelentes, antialimentarios, esterilizantes, o afectando diferentes parámetros biológicos como la oviposición, tasa de desarrollo y duración del ciclo de vida (Papachristos y Stampoulos, 2002a, 2004; Tripathi *et al.*, 2003; Umoetok y Gerard, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Tapondjou *et al.*, 2005; Ferrero *et al.*, 2006; Stefanazzi *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006).

Los insecticidas naturales presentan en forma general la ventaja de degradarse con mayor velocidad que los sintéticos y no dejan residuos en el ambiente. Para que un insecticida natural sea comercialmente viable debe cumplir, además con una serie de requisitos tales como selectividad, baja toxicidad para los enemigos naturales y mamíferos, biodegradabilidad y baja fitotoxicidad (Vieira *et al.*, 2001).

La preocupación mundial relacionada con la preservación del medio ambiente, han determinado el interés de universidades, laboratorios e industrias por el uso de los productos naturales para el control de plagas. Entre los productos de origen botánico más utilizados para el control de insectos están las piretrinas, la rotenona, extractos del árbol del Neem y los aceites esenciales (Isman, 2006). La piretrina, es una

oleorresina extraída de las flores secas de *Tanacetum* sp. L. (Asteraceae) que contiene estructuras moleculares en base a las cuales se produjeron los piretroides sintéticos. Estos representaron a fines del siglo XX un 80% de las ventas de insecticidas, debido a su amplio espectro de acción, rápido efecto, excelente degradabilidad y baja toxicidad para mamíferos (Casida y Quistad, 1995, 1998). La rotenona, es un isoflavonoide que se extrae de las raíces de *Derris* sp. Lour. y de *Lonchocarpus* sp. Kunth (Fabaceae) utilizado como insecticida desde hace más de 150 años. El extracto de neem, obtenido de las semillas y frutos de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) es otro producto utilizado en la India desde hace más de 4.000 años para combatir insectos plagas de granos almacenados. El extracto obtenido de dichas semillas contiene triterpenos, el más importante de los cuales es la azadiractina (Ferreira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002).

Sin embargo, el desarrollo de fenómenos de resistencia a los piretroides limita su utilización. En el caso particular de las azadiractinas, de amplio uso en insectos fitófagos succionadores con una alta eficacia, que puede verse disminuida potencialmente debido a la aparición de mecanismos de resistencia presentes con el uso continuo sin rotación en el grupo de plaguicidas usados para el control (Caballero García, 2004; Isman, 2006; Soares Corrêa *et al.*, 2008; dos Santos Veloso *et al.*, 2008; Stefanazzi, 2010).

Numerosos investigadores han documentado la bioactividad de extractos vegetales y aceites esenciales frente a diferentes insectos plaga (Ramos Rodríguez, 2001; Seyoum *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2003; Dharmagadda *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2005; Barbosa de Azevedo *et al.*, 2008; Pícollo *et al.*, 2008; Ko Ko *et al.*, 2009).

En distintas Universidades Nacionales como las de Tucumán, San Luis, Córdoba, del Sur, de La Plata y Buenos Aires se desarrollan trabajos de investigación relacionados con la acción de extractos y aceites de especies vegetales aromáticas y medicinales sobre diversos órdenes de insectos, Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera y Diptera y otros organismos animales (Valladares *et al.*, 2003; Alvarez Colom *et al.*, 2005; García *et al.*, 2005b; Maggi *et al.*, 2005; Popich *et al.*, 2005; Stefanazzi *et al.*, 2005; Stevani *et al.*, 2005; Descamps *et al.*, 2006; Kahan *et al.*, 2007; Folcia *et al.*,

2008, 2009, 2010; Batallán, 2008; Bonino *et al.*, 2008; Padín *et al.*, 2008; Sosa *et al.*, 2008; Viglianco *et al.*, 2008; Bertoni y Palacios, 2009; Gamarra *et al.*, 2009; Viturro *et al.*, 2009; Stefanazzi, 2010).

En la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires se han realizado ensayos para evaluar la efectividad de extractos y aceites esenciales presentes en especies vegetales como *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), *Senecio grisebachii* Baker (Asteraceae) y *Picrasma crenata* (Vell) Engl. (Simaroubaceae) entre otras, ensayadas sobre plagas de granos almacenados (Leicach *et al.*, 2005; Mareggiani *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2005, 2012; Chludil *et al.*, 2007; Russo *et al.*, 2005, 2006, 2011).

Sobre la base de las propiedades de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y su principal componente: 1,8-cineol hemos propuesto el siguiente objetivo general:

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la potencial actividad biológica (insecticida, repelente y/o attractante, antialimentaria) y las alteraciones nutricionales producidas por aceites esenciales extraídos de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol, su principal componente, en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*.

La hipótesis planteada es:

## **HIPOTESIS GENERAL**

Los metabolitos secundarios del aceite esencial extraído de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* presentan actividad insecticida, repelente y/o attractante, antialimentaria y modifican la fisiología nutricional en individuos adultos de cuatro plagas potenciales de granos almacenados: *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*.



# CAPITULO II

## ACEITES ESENCIALES

### INTRODUCCION

#### **Propiedades físicos-químicas**

Las especies aromáticas pueden biosintetizar en todos sus órganos, es decir, brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, las células epidérmicas o tricomas glandulares monoterpenos (diez átomos de carbono) y sesquiterpenos (quince átomos de carbono), que constituyen los componentes mayoritarios de sus aceites esenciales.

Los aceites esenciales son líquidos volátiles, transparentes, en ocasiones coloreados, solubles en lípidos y en solventes orgánicos no polares y menos densos que el agua.

Otras de sus características es que son inestables ante la luz y el oxígeno, los agentes oxidantes y reductores, los pH extremos, o las trazas de metales que pueden catalizar su descomposición (Bandoni, 2000). Poseen la propiedad de refractar la luz polarizada, característica utilizada en el control de pureza, ya que cada aceite presenta un índice de refracción característico. Presentan valor particular de poder rotatorio, debido a que algunos de sus componentes químicos son ópticamente activos.

Los aceites esenciales son considerados mezclas complejas de más de 100 componentes que incluyen compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, algunos alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides entre los grupos más comunes de compuestos volátiles. En la mayoría de los casos poseen dos o tres elementos en altas

concentraciones mayormente terpenos y terpenoides con el resto, incluidos los fenil propanoides en proporciones mucho menores (Bakkali *et al.*, 2008).

## Terpenos: Generalidades

Los isoprenoides, más conocidos como terpenoides derivan del acoplamiento de un número entero de unidades isopreno que ocurre a través de la ruta biosintética del **ácido mevalónico** a través de la cual se origina el isopentenil pirofosfato (Porter y Spurgeon, 1981; Leicach, 2006).

Wallach (1887) propuso la clasificación de terpenos de acuerdo al número de átomos de carbono que poseen, clasificación reconocida a nivel mundial y seguida por cuantos trabajan con terpenoides. La unidad básica de los terpenoides: el isopreno, constituido por 5 átomos de carbono. A partir de ella se forman los monoterpenos (C10), los sesquiterpenos (C15), etc.

Muchos de los monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos son compuestos cíclicos, como  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -cadineno, ácido dextropimárico o lanosterol. También existen ejemplos de derivados acíclicos como mirceno, farnesol, geraniol, linalol, escualeno.

Los terpenos característicos de los aceites esenciales son monoterpenos y sesquiterpenos, es decir aquellos de menor peso molecular, y por lo tanto más volátiles.

Entre los monoterpenos, una de las grandes familias de productos naturales (Grayson, 2000) hay una gran variedad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que, incluyen isómeros no sólo funcionales sino también de posición y geométricos. Se han identificado como producto del metabolismo secundario de los vegetales, aunque no son exclusivos de ellos. Son bastantes frecuentes en representantes de familias de angiospermas como Apiacea, Asteraceae, Lamiaceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Poaceae y Rubiaceae). Entre los monoterpenos más comunes de las plantas aromáticas están:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol (Harbone, 1998; Leicach, 2006).

La presencia de monoterpenos volátiles en los aceites esenciales constituye una importante estrategia de defensa contra insectos y hongos patógenos (Langenheim, 1994; Kouk y Dhaliwal, 2001; Tholl *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2009).

Los sesquiterpenos, ampliamente distribuidos en la naturaleza, forman parte de los aceites esenciales, particularmente de hongos, plantas no vasculares e incluso bacterias como *Streptomyces*. Al contar con una unidad más de isopreno que los monoterpenos, presentan mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional, resultando en hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc. Aunque se les ha atribuido diversas funciones como hormonas vegetales (ácido abscísico o fitoalexinas) y como antibióticos de origen fúngico, al igual que los monoterpenos pueden actuar como inhibidores de especies vegetales. Entre los sesquiterpenos con propiedades alelopáticas se incluyen compuestos tales como el farnesol, el  $\gamma$ -bisaboleno, el cariofileno y sesquiterpenolactonas como los partenólidos partenina y achilina (Abraham *et al.*, 2000; Kobaisy *et al.*, 2001; Leicach, 2006).

Los aceites esenciales varían en la constitución y proporción de sus principios activos determinando así sus propiedades biológicas (Croteau *et al.*, 2000; Betts, 2001; Pichersky *et al.*, 2006; Leicach, 2010). Por ejemplo, el aceite esencial de *Origanum compactum* (Linneo) (Lamiaceae) tiene carvacrol y timol como componentes principales; linalol es el componente principal de *Coriandrum sativum* (Linneo) (Apiaceae); mientras  $\alpha$ - y  $\beta$ -tuyeno y alcanfor predominan en *Cinnamomum camphora* (Linneo) (Lauraceae) y *Artemisia* sp. (Linneo) (Asteraceae). *E. globulus* (Labill) (Myrtaceae) posee como componente principal 1,8-cineol. En *Anethum graveolens* (Linneo) (Apiaceae):  $\alpha$ -felandreno y limoneno (tanto en hoja como en semilla) acompañando al componente principal carvona. Mentol es el componente principal de especies del género *Mentha* (Linneo) (Lamiaceae), seguido por la cetona mentona.

Los aceites esenciales pueden variar su composición por diversos factores entre los que se destacan: condiciones geobotánicas del medio, clima, altitud, latitud, exposición a la luz, tipo de suelo, pluviosidad; método del cultivo, fertilizantes,

abonos y pesticidas; edad de la planta y su estado fenológico; época de recolección y parte de la planta (órgano cosechado); modo de almacenamiento y manejo del material vegetal (fresco, seco, fermentado), tratamiento postcosecha; modo de obtención del aceite (destilación (hidrodestilación, extrusión)) (Azcón y Talón, 2000; Taiz y Zeiger, 2006).

Las plantas aromáticas y sus aceites esenciales se han utilizado desde la antigüedad por su sabor y aroma como condimento; también como agente antimicrobiano e insecticida y para repeler insectos o proteger los productos almacenados (Regnault-Roger y Vincent, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). Constituyen eficaces alternativas a los plaguicidas sintéticos sin producir efectos adversos sobre el ambiente, ya que no persisten en él por su biodegradabilidad (Dorman y Deans, 2000; Isman, 2000; Isman y Machial, 2006).

Durante la última década, se han utilizado como fumigantes y como insecticidas por contacto, ya que poseen mecanismos de reglamentación menos estrictos debido a la larga historia de su uso (Isman, 2006) y están siendo considerados como posibles candidatos para el manejo de malezas (Singh *et al.*, 2003; Batish *et al.*, 2004, 2007), plagas y enfermedades de las plantas (Pawar y Thaker, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).

## **Mecanismos de acción de los aceites esenciales**

Es poca la información disponible sobre el mecanismo de acción de los aceites esenciales como agentes de control. Sin embargo dada su lipofolicidad es probable que afecten la estructura y/o funcionalidad de las membranas. Los aceites esenciales pueden permear fácilmente la membrana plasmática accediendo rápidamente al citoplasma de las células receptoras, siendo éste su efecto primario. Si el organismo receptor no puede detoxificarlos en el citosol pueden atravesar las membranas de las organelas e interferir en diferentes funciones fisiológicas (Einhellig, 1995).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales como el de todas las moléculas bioactivas está estrechamente relacionado con las estructuras químicas de

sus componentes. Su actividad biológica depende del tipo de grupo funcional y de su posición en la molécula tanto como de su volatilidad y su peso molecular (Tripathi *et al.*, 2009). Algunos aceites esenciales y/o sus componentes mayoritarios resultan tóxicos a través del contacto directo o del ingreso al organismo por vía respiratoria (Pascual-Villalobos, 2002; Negahban *et al.*, 2006; Kordali *et al.*, 2006; López *et al.*, 2008).

Mientras que algunos afectan la fisiología nutricional de los insectos ya sea por modificar su comportamiento (actuando como antialimentarios) o produciendo efectos tóxicos por ingestión (Huang *et al.*, 2000; Pungitore *et al.*, 2005; Benzi *et al.*, 2009). Por otro lado muchos aceites han resultado ser altamente efectivos por su acción repelente (Nerio *et al.*, 2009; Ukeh *et al.*, 2009).

Debido a las características ya mencionadas algunos autores postulan a los aceites esenciales como potenciales reemplazantes de los dos fumigantes más utilizados en la actualidad, fosfina y bromuro de metilo, en el control de plagas de almacén (Shaaya y Rafaeli, 2007).

Se ha comprobado que algunos aceites o sus componentes provocan síntomas específicos que sugieren actividad neurotóxica (Kostyukovsky *et al.*, 2002; Yu y Dayan, 2005; Isman, 2006). Según los ensayos realizados por Houghton *et al.* (2006) algunos monoterpenos causan mortalidad en los insectos por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Sin embargo, estudios de toxicidad realizados con limoneno, linalol, mentol, mentona,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno sobre adultos de *S. oryzae* (Lee *et al.*, 2002), demostraron la falta de relación directa entre la toxicidad y la inhibición del AChE. Así la mentona obtenida de *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae), altamente tóxica (DL<sub>95</sub> 25  $\mu$ l/l) sobre *S. oryzae*, tuvo poco efecto inhibitorio sobre la AChE ( $k_i$  =0.39 mM), mientras que el menos tóxico, el  $\beta$ -pineno (DL<sub>95</sub> 107  $\mu$ l/l) mostró altos niveles de inhibición sobre esta enzima ( $k_i$  =0.0028 mM) (Lee *et al.*, 2001a; Ketoh *et al.*, 2002).

En investigaciones recientes se comprobó que algunos aceites esenciales y en particular los monoterpenos actúan sobre los receptores de la octopamina exclusivos de los insectos, este neurotransmisor interviene en la modulación de la actividad muscular en los mismos, haciéndolos altamente selectivos dada la ausencia de los

correspondientes receptores en los vertebrados (Enan, 2001, 2005; Price y Berry, 2006; Rajendran y Sriranjini, 2008).

## **Aceites esenciales en el control de plagas de granos almacenados**

Hasta el presente se han realizado numerosas investigaciones sobre la acción de los aceites esenciales de diferentes especies vegetales sobre coleópteros que atacan granos almacenados.

Se han estudiado los aceites esenciales de varias especies de la familia *Asteracea* (géneros *Chrysanthemum* (Linneo), *Ageratum* Linneo y *Artemisia* L.) sobre coleópteros brúquidos y curculiónidos. La especie *C. coronarium* Linneo produjo en adultos de *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) por aplicación tópica considerable mortalidad (Perez y Pascual Villalobos, 1999), mientras que el extraído de hojas de *Ageratum conyzoides* Linneo resultó muy efectivo para el control de *S. zeamaiz* en maíz (Bouda *et al.*, 2001). Kordali *et al.* (2006), encontraron que las esencias de *A. absinthium* Linneo, *A. santonicum* Linneo y *A. spicigera* C. Koch producían sobre la misma especie una mortalidad mayor.

Los aceites esenciales provenientes de especies de la familia *Labiatae* fueron evaluados sobre huevos de *T. confusum* y *Ephestia kuehniella* Zeller (Pyralidae). Las esencias de *Pimpinella anisum* Linneo (anís) y *Cuminum cyminum* Linneo (comino) provocaron mortalidad total con una dosis de 169.9  $\mu\text{l/l}$  de aire en huevos de las dos especies ensayadas, mientras el orégano *Origanum syriacum* Linneo var. *Bevanii* (Holmes) causó una mortalidad de 77% y 89% en *T. confusum* y *E. kuehniella* respectivamente con la misma dosis (Tunc *et al.*, 2000). Keita *et al.* (2001) probó que las esencias extraídas de *Ocimum basilicum* Linneo y *O. gratissimum* Linneo a dosis de 400  $\mu\text{l}/50\text{g}$  de caolín aplicadas sobre semillas de poroto proporcionaba una protección por un período de tres meses contra el ataque de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae). El aceite esencial de *O. herba* Linneo aplicado directamente sobre el grano produjo mortalidad total en adultos de *A. obtectus*, además de inhibir la oviposición y la incubación de esta especie (Baricevic *et al.*, 2001). Papachristos y Stampoulos (2003) probaron el efecto de los aceites

esenciales de *Lavandula hybrida* Reverchon “lavandin” y *Rosmarinus officinalis* Linneo “romero” sobre larvas y pupas de esta misma especie resultando más susceptibles las primeras con CL<sub>50</sub> de 0.6 y 76 µl/l aire respectivamente. Por otra parte, se demostró que los aceites esenciales de “lavandin” ejercían un efecto repelente sobre individuos adultos de *S. zeamais* y *C. ferrugineus* y larvas de *Tenebrio monitor* Linneo (Tenebrionidae) (Cosimi *et al.*, 2009).

Algunos autores probaron aceites esenciales extraídos de especies de las familias Brassicaceae y Lauraceae. Los aceites obtenidos de semillas de *Brassica nigra* Linneo (Brassicaceae) aplicadas sobre granos de maíz resultaron efectivos en el control de adultos de *S. zeamais* (Gupta *et al.*, 2000) mientras que el aceite esencial de *B. juncea* (Linneo) aplicado en papeles de filtro con una concentración de 3,5 µg cm<sup>-2</sup> fue eficaz sobre *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobidae), en evaluaciones por contacto y por fumigación (Kim *et al.*, 2003a). Estos autores demostraron también la acción insecticida del aceite esencial de *C. cassia* (Ness) (Lauraceae) y de *B. juncea* en adultos de *S. oryzae* (Kim *et al.*, 2003b).

## **Familia Myrtaceae: Género *Eucalyptus***

Entre las diversas plantas aromáticas, la familia Myrtaceae comprende 130 géneros que incluyen 2900 especies de árboles o arbustos perennifolios, con follaje rico en tricomas glandulares, distribuidos en regiones tropicales y subtropicales, algunas de las cuales también están presentes en Europa.

El género *Eucalyptus* L' Hér (del griego *eu*: bien y *kalipto*: cubrir, debido a que sus flores están bien protegidas por sus sépalos y pétalos fusionados) originario de Australia y de Tasmania, está representado por más de 700 especies distribuidas en todo el mundo, y es ampliamente utilizado para la obtención de pasta de papel y madera. Las especies de *Eucalyptus* no sólo proporcionan biomasa sino que producen aceites esenciales utilizados en farmacia, perfumería e industria (Brooker y Kleinig, 2006).

## **Aceites esenciales de *Eucalyptus***

Las hojas de *Eucalyptus* son ricas en aceites esenciales, que se pueden obtener por destilación por arrastre con vapor (Bruneton, 1995; FAO Forestry Department, 1995). Las especies importantes en ese sentido son: *E. citriodora* (Hook) “gomero con olor a limón”; *E. globulus* Labill “eucalipto azul de Tasmania”; *E. polybractea* R.T. Baker, “mallee de hojas azules” y *E. camaldulensis* Dehnh “eucalipto rojo”. El aceite esencial de *E. citriodora* es uno de los principales en términos de volumen extraído a nivel mundial (Green, 2002).

El aceite esencial de eucalipto ha sido considerado como GRAS (Generally recognized as safe) por autoridades de EE.UU. en la categoría de Alimentos y Medicamentos y clasificado como no tóxico (USEPA, 1993). Incluso el Consejo de la Unión Europea ha aprobado el uso de aceite de eucalipto como aromatizante en alimentos y caramelos ( $\leq 5$  mg/kg) (Consejo de Europa, 1992; Batish, 2008).

Los aceites extraídos de las diferentes especies de *Eucalyptus* poseen entre sus componentes principales 1,8-cineol, eucamalol, citronelal,  $\alpha$ -pineno, *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, entre otros (Dellacassa *et al.*, 1990; Cimanga *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Batish *et al.*, 2006; Ceferino *et al.*, 2006; Saad *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006; Lucia *et al.*, 2007; Sartorelli *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Leicach, 2010)

## **Composición y rendimiento de los aceites esenciales de *Eucalyptus*: factores condicionantes**

La composición y el rendimiento de los aceites esenciales de *Eucalyptus* están determinados por factores como la variabilidad genética, tipo y edad de las hojas y la influencia de factores ambientales, además de los tratamientos silviculturales y la forma de ejecución del muestreo y análisis del aceite (Boland, 1991; Chalcat *et al.*, 1995; Zrira y Benjlali, 1996; Mandal *et al.*, 2001; Vitti y Brito, 2003; Viturro *et al.*, 2003; Leicach *et al.*, 2010).



Leicach *et al.* (2010) estudiaron la influencia del déficit de agua sobre plántulas de *E. camaldulensis* en etapa de vivero determinando su capacidad moduladora sobre la proporción relativa de los componentes del aceite esencial, y demostrando un aumento en la proporción de componentes oxigenados debido a dicho estrés.

El 1,8-cineol, también conocido como eucaliptol, es un éter monoterpénico bicíclico, 1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano, que constituye un promedio del 70% en la esencia del *E. globulus*, utilizada para su obtención comercial (Clark y Cameron, 2000).

Mantero *et al.* (2007) realizaron en la República Oriental del Uruguay el estudio sistemático del aceite esencial de hojas de tres subespecies de *E. globulus*: spp *globulus*, Labill. spp *maidennii* F. Muell. y spp. *bicostata* (Maiden, Blakely et Simmonds) Kira, la determinación del porcentaje de 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno y la influencia de diversas variables. Encontraron que *E. bicostata* producía el mayor porcentaje de 1,8-cineol, mientras la subespecie *maidennii* presentaba el mayor rendimiento en aceite. Al evaluar los efectos de la época de cosecha sobre la producción de 1,8-cineol estos autores concluyeron que la mayor producción ocurre entre los meses de mayo a setiembre, particularmente en departamentos de la zona del norte (Rivera y Tacuarembó).

### **Acción insecticida de los aceites esenciales de *Eucalyptus***

El aceite esencial de *Eucalyptus* puede ser utilizado como insecticida y repelente. De hecho, es conocido desde hace cientos de años por su acción antibacteriana, antiséptica y antifúngica (Dellacasa *et al.*, 1989; Derwirth *et al.*, 2009). Estas propiedades son bien conocidas debido a componentes como 1,8-cineol, citronelal, citronelol, acetato de citronelilo,  $\rho$ -cymeno, eucamalol, limoneno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, alocimeno, y aromadendreno (Li *et al.*, 1995, 1996; Romagni *et al.*, 2000; Cimanga *et al.*, 2002; Batish *et al.*, 2006; Brooker y Kleinig, 2006; Leicach, 2006; Su *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales de eucalipto pueden actuar como un repelente natural contra mosquitos (Seyoum *et al.*, 2003; Nathan, 2007) y otros artrópodos dañinos, además de actuar como antialimentarios sobre herbívoros (Fradin y Day, 2002; Kuehn, 2005; Batish *et al.*, 2008).

Numerosos autores han comprobado la efectividad de las distintas especies de *Eucalyptus* sobre las plagas de granos almacenados, en particular sobre especies del orden Coleoptera. Lee *et al.* (2004) demostraron que *E. nicholii* Maiden & Blakeli, *E. codonocarpa* Blakeli & Mc Kie; *E. blakelyi* Maiden, poseen una potente toxicidad sobre *S. oryzae*, *T. castaneum* y *R. dominica*.

Los aceites esenciales de *E. saligna* (Smith) (Myrtaceae) resultaron ser efectivos como repelentes y mostraron toxicidad en el control de *C. maculatus* (Tapondjou *et al.*, 2005). La acción ovicida de *E. camaldulensis* fue demostrada sobre *T. confusum*, *T. castaneum*, *C. maculatus*, *S. oryzae* y *E. kuehniella* (Tunc *et al.*, 2000; Negahban y Moharramipour, 2007) mientras que *E. citriodora*, *E. nicholii*, *E. codonocarpa*, *E. blakelyi*, *E. saligna*, *E. intertexta* y *E. sargentii* resultaron efectivas como repelentes e insecticidas al ser ensayadas con *S. oryzae*, *T. castaneum*, *T. confusum*, *R. dominica* y *C. maculatus* (Tinkeu *et al.*, 2004; Tapondjou *et al.*, 2005).

Papachristos y Stamopoulos (2002a y b, 2004) estudiaron la acción de *E. globulus* sobre el brúquido *A. obtectus* y verificaron las propiedades repelentes, menor número de huevos, disminución de larvas neonatas así como la influencia adversa en la emergencia de estados juveniles.

El aceite esencial de *E. globulus* ha sido usado como repelente de garrapatas, ácaros y nematodos (Pandey *et al.*, 2000; Chagas *et al.*, 2002; Gardulf *et al.*, 2004; Ibrahim *et al.*, 2006; Saad *et al.*, 2006; Batish *et al.*, 2008). Lucia *et al.* (2007) comprobaron que es tóxico para larvas de *A. aegypti*. Tanto el aceite como su mayor componente el 1,8-cineol, mostraron toxicidad sobre el “piojo de la cabeza” *Pediculus humanus capitus* Haeckel (Pediculicidae) (Yang, *et al.*, 2004).

### ***Eucalyptus globulus***

*Eucalyptus globulus* Labill (*globulus*: redondeado, refiriéndose a la flor o al fruto (= *E. gigantea* Desf.): “eucalipto blanco”, “eucalipto azul” es un árbol de follaje persistente, de gran porte, de 30 a 55 metros de altura, aunque en su hábitat original puede alcanzar los 90 metros. Se caracteriza por el tronco color ceniciento, con corteza lisa que se desprende fácilmente en láminas en los ejemplares adultos. La copa es piramidal, alta, los tallos jóvenes son tetragonos, blanquecinos pubescentes. Las hojas son enteras, perennes y coriáceas, las juveniles son opuestas, sésiles, de base cordada, de color gris-azulado, de 8-15 cm de longitud y 4-8 cm de ancho, mientras que las adultas son alternas, pecioladas, con la base cuneada, linear-lanceoladas, de 15-25 cm de longitud, con el ápice acuminado, de color verde oscuro, con la nerviación marcada. Las flores son axilares, solitarias o en grupos de 2 a 3, de hasta 3 cm de diámetro, con numerosos estambres de color blanco. El fruto es una cápsula campaniforme de color glauco y cubierta de un polvo blanquecino, de 1.4-2.4 cm de diámetro (Figura 1). La floración es en septiembre-octubre. La multiplicación es por semillas (Cozzo, 1976; Winkler *et al.*, 2005).



**Figura 1.** *Eucalyptus globulus*: árbol, flores y frutos

Es algo sensible a las sequías prolongadas. Prefiere suelos ligeramente ácidos y frescos. No resiste el frío intenso (Golfari, 1985; Inta-Soporcel, 2000). El área más propicia de distribución en Argentina es la franja marítima costera que se extiende desde Mar del Plata hasta Necochea, internándose en forma de cuña hasta formar un vértice con la localidad de Balcarce. Esta región se caracteriza por sus veranos frescos (temperatura media de enero 19,5-20,5°C) tal como ocurre en su área natural (Toral Ibañez y Salgado, 1987; Nakama *et al.*, 2000).

Sus hojas producen aceites esenciales que destilados se destinan a las industrias químico-farmacéuticas y de confitería. En medicina popular se utilizan las hojas en infusión y vapores. Las hojas son anticatarrales, balsámicas y expectorantes. Tiene poder antiséptico, además de febrífugo. Por su poder antiséptico y su agradable aroma se usa en multitud de preparados medicinales para combatir los resfriados.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Analizar la composición química y rendimiento de los aceites esenciales extraídos de hojas juveniles y adultas de *Eucalyptus globulus*.

### **Objetivo específico**

Comparar el rendimiento y la composición química de los aceites esenciales extraídos de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus*.

## **HIPOTESIS**

El contenido de aceite esencial en hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* es mayor al de hojas adultas.

Las hojas adultas de *Eucalyptus globulus* poseen mayor proporción de terpenos oxigenados que las hojas juveniles.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Recolección de material vegetal de *Eucalyptus globulus***

Durante el mes de marzo de 2005 se recolectaron hojas juveniles y adultas de *E. globulus* en la localidad de Lobería, provincia de Buenos Aires (Latitud: 38°9'48''S, Longitud: 58°46'53''O). Se tomaron muestras al azar en un área de 40 ha, entre las 12:00 y 15:30 horas, momento en el cual la concentración de aceites esenciales por parte de la planta es mayor. Las hojas recolectadas fueron inmediatamente trasladadas al laboratorio para realizar su limpieza y extracción de los aceites esenciales. El material cosechado se sometió a un breve zarandeo para quitar elementos extraños, se eliminaron además aquellas hojas con síntomas de deterioro o enfermedad.

### **Extracción de Aceites Esenciales**

Los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles se obtuvieron en el laboratorio de la cátedra de Química de Biomoléculas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Se cortaron 150 g de material fresco de cada tipo de hojas (juveniles ó adultas) en pequeños trozos (1-2 cm) para aumentar la superficie de contacto y facilitar su extracción.

La extracción se realizó mediante destilación por arrastre con vapor de agua, utilizando trampa de Clevenger. La hidrodestilación es un proceso físico que consiste en la separación por calor de sustancias volátiles conjuntamente con agua destilada,

que pasan a estado de vapor a una temperatura menor que la ebullición de esta última.

Las muestras se colocaron (150 g) en balones de 2 l con 1200 ml. de agua destilada. El aceite esencial se extrajo durante 2 horas (Figura 2), a partir del momento en que comenzó la ebullición determinando el volumen obtenido en cada caso.



**Figura 2.** Trampa de Clevenger

Las esencias obtenidas de hojas adultas y juveniles se acondicionaron en forma separada en frascos de vidrio de 20 cm<sup>3</sup> de color caramelo con cierre hermético, agregando la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro, como agente desecante.

Los aceites se mantuvieron en un freezer a una temperatura de -18 °C hasta el momento del análisis por cromatografía gaseosa (CG) y por CG acoplada a un espectrómetro de masa (CG-MS). Se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento (hojas juveniles, hojas adultas). El porcentaje de rendimiento de cada

aceite esencial se calculó como el cociente entre el peso de aceite extraído y el peso del material vegetal fresco. Los datos de volúmenes de aceite esencial fueron referidos a 100 g de material vegetal fresco y analizado estadísticamente.

El cálculo del rendimiento de los aceites esenciales se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \text{Rendimiento en aceite (ml)} \times 100 / \text{Peso del material verde usado (g)}$$

## **Cromatografía de Gases. Espectrometría de Masa**

La cromatografía de gases y su acoplamiento con la espectrometría de masas constituyen una herramienta muy eficaz para la cuantificación e identificación de los componentes volátiles de mezclas complejas.

Los aceites esenciales de *E. globulus* se analizaron en un cromatógrafo de gases CG 6890N Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas MS 5973 (Agilent Technologies Inc). Se utilizó una columna capilar HP-5-MS (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ ) y nitrógeno como gas portador. Las condiciones del CG fueron las siguientes: la temperatura del inyector 250 °C y la del detector 280 °C. El programa de temperatura utilizado: Temperatura inicial 60 °C por 2 minutos, rampa de 8 °C/minuto hasta 280 °C y luego isotérmico por 10 minutos. Como estándar interno se utilizó hexadecano (1  $\mu\text{l}$ ). Tanto el hexadecano como el 1,8-cineol y otros patrones comerciales fueron provistos por Fluka Chemicals, Alemania.

Los componentes del aceite esencial se identificaron tentativamente comparando sus espectros de masa con datos de NIST 98L Database del Software del espectrómetro y se confirmaron por comparación con datos ya publicados (Adams, 2007) y/o de patrones comerciales.

La información obtenida mediante CG permite la identificación de los componentes de una esencia, sin embargo se puede realizar una buena aproximación utilizando el tiempo de retención del compuesto ( $t_R$  = tiempo que tarda en atravesar la columna en las mismas condiciones). Aunque teóricamente el tiempo de retención de una molécula es una constante bajo las mismas condiciones de trabajo, éstas son

difícilmente reproducibles y suelen variar con la temperatura, la velocidad de flujo del gas transportador, además de la longitud de la columna, el tiempo base, la naturaleza y grosor de la película de la fase líquida. Con el fin de evitar el efecto de esos factores se utilizan los **Índices de Kováts**. El sistema de los índices de retención de Kováts se basa en la comparación entre la posición en el cromatograma de la señal de un analito (que forma parte de la muestra co-inyectada con la serie homóloga de hidrocarburos lineales) y dos señales de estos hidrocarburos, tales que una corresponde al que eluye antes del componente de interés y la otra al que eluye después, utilizando la siguiente relación matemática para calcularlos, en el caso de que sea una corrida cromatográfica con programación de temperatura:

$$IK=100*n+100*[(tX-tn)/(tN-tn)]$$

donde :

IK: índice de Kováts.

n: número de carbonos del hidrocarburo patrón que eluye antes del analito de interés.

tX: tiempo de retención del analito de interés.

tn: tiempo de retención del hidrocarburo patrón que eluye antes del analito de interés.

tN: tiempo de retención del hidrocarburo patrón que eluye después del analito de interés (Kováts, 1958, 1965; Ferreira Gonzalez, 1997; Barquero Quirós, 2006).

## **Análisis estadístico**

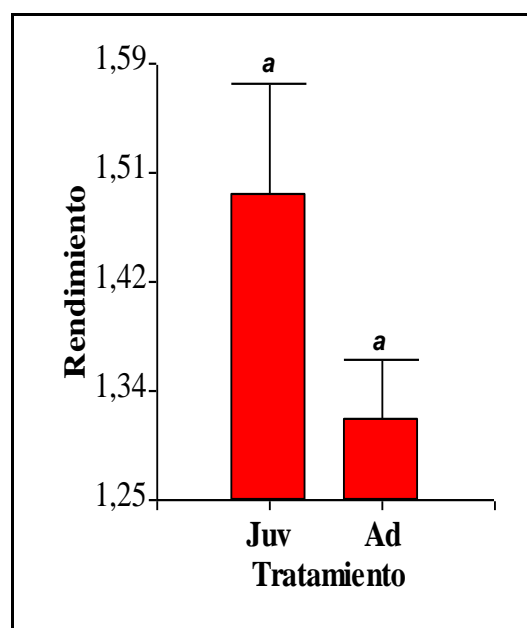
El rendimiento de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* se analizó mediante ANOVA y análisis multivariado de componentes principales ( $p \leq 0,05$ ).



## RESULTADOS

### Rendimiento de aceite esencial de *E. globulus*

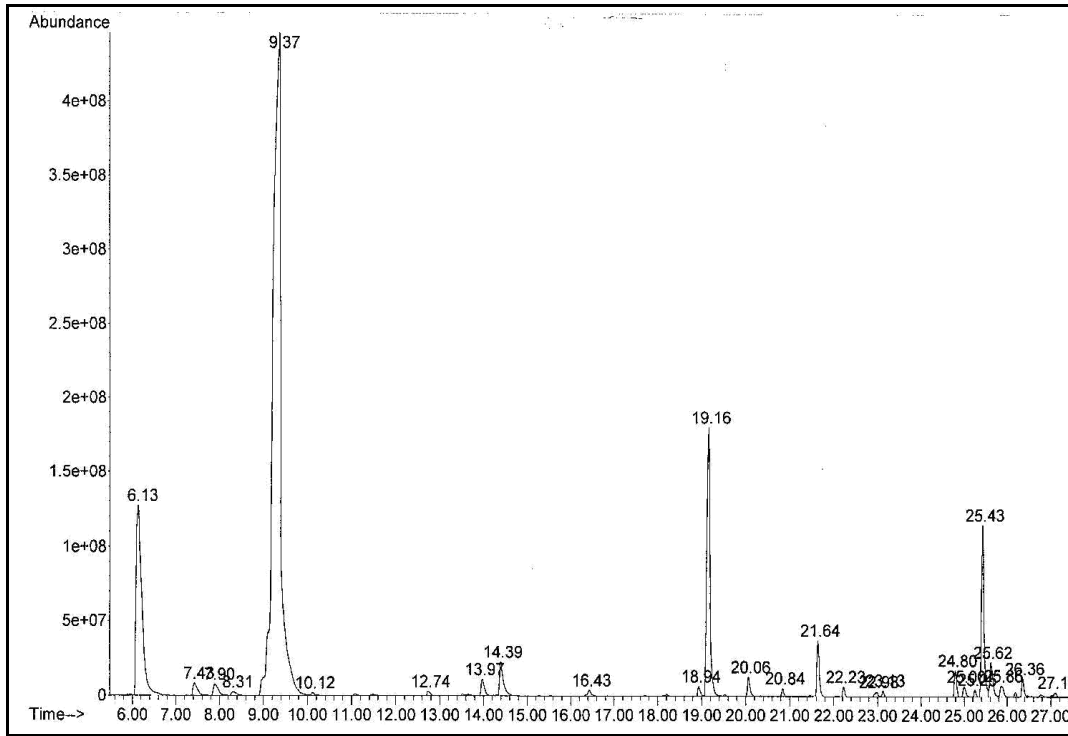
El rendimiento de aceites esenciales en hojas juveniles ( $1,49 \pm 0,26$  % v/p), fue superior sólo en un 12 % al de hojas adultas ( $1,31 \pm 0,14$  % v/p), con valores medios que no difieren significativamente entre sí (Figura 3).



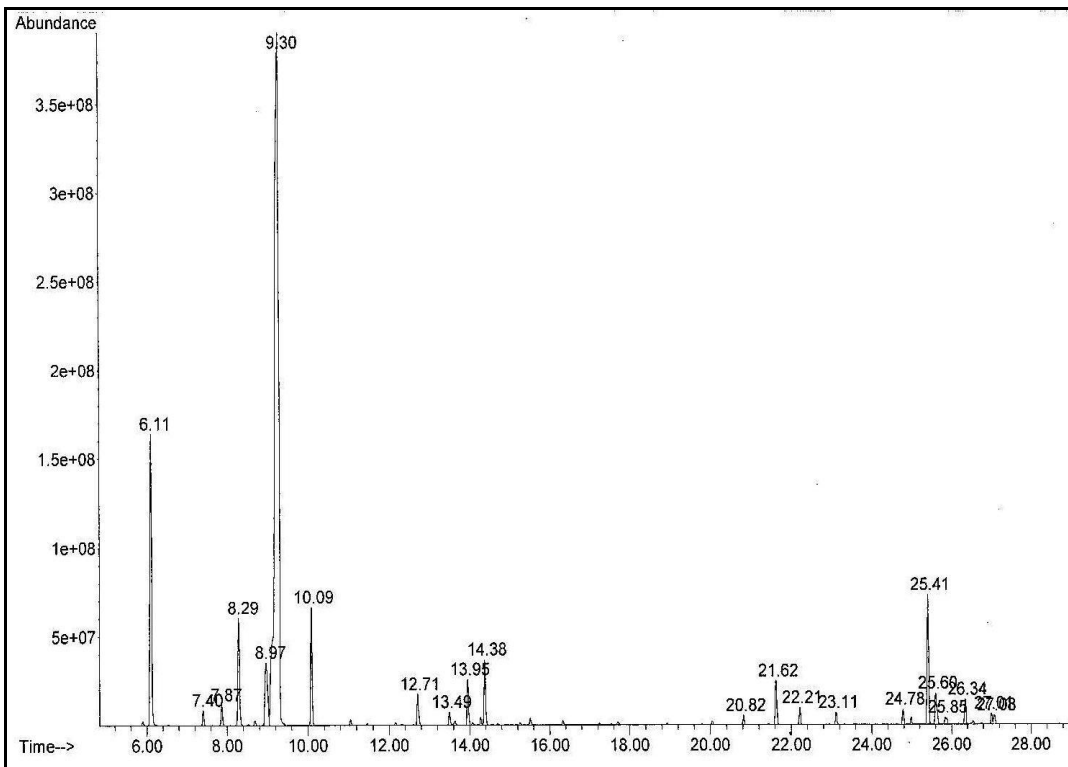
**Figura 3.** Rendimiento de aceites esenciales (%) en hojas adultas (Ad) y juveniles (Juv) de *Eucalyptus globulus*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ )

### Análisis de la composición de terpenos de los aceites esenciales de *E. globulus*

El análisis de los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* mostró mezclas complejas de mono y sesquiterpenos, identificándose un total de 19 compuestos (Figuras 4 y 5).

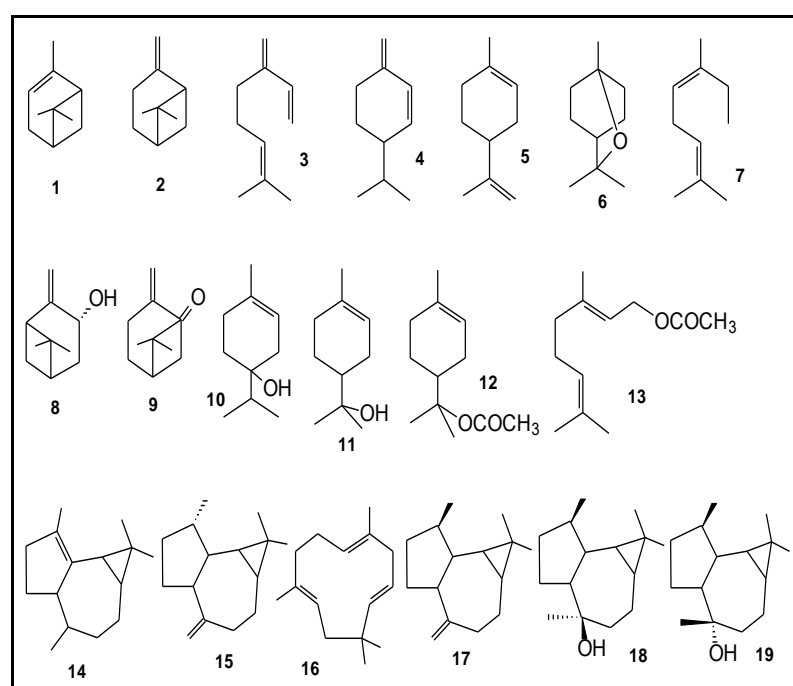


**Figura 4.** Cromatograma de hojas adultas de *Eucalyptus globulus*



**Figura 5.** Cromatograma de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus*

El porcentaje de terpenos oxigenados fue mayor en el aceite esencial de hojas adultas (80,32% p/v) que en el de hojas juveniles (61,65% p/v) lo cual se debe en gran parte a la mayor proporción de 1,8-cineol, acetato de  $\alpha$ -terpinilo y globulol. 1,8-cineol resultó el componente mayoritario en ambas esencias, con 62,11% y 52,26% en hojas adultas y juveniles respectivamente. Los terpenos no oxigenados representaron un 15,2 y 27,35% en la esencia de hojas adultas y juveniles, respectivamente (Figura 6 y Tabla 1)



**Figura 6.** Estructuras químicas de los terpenos identificados en los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus*

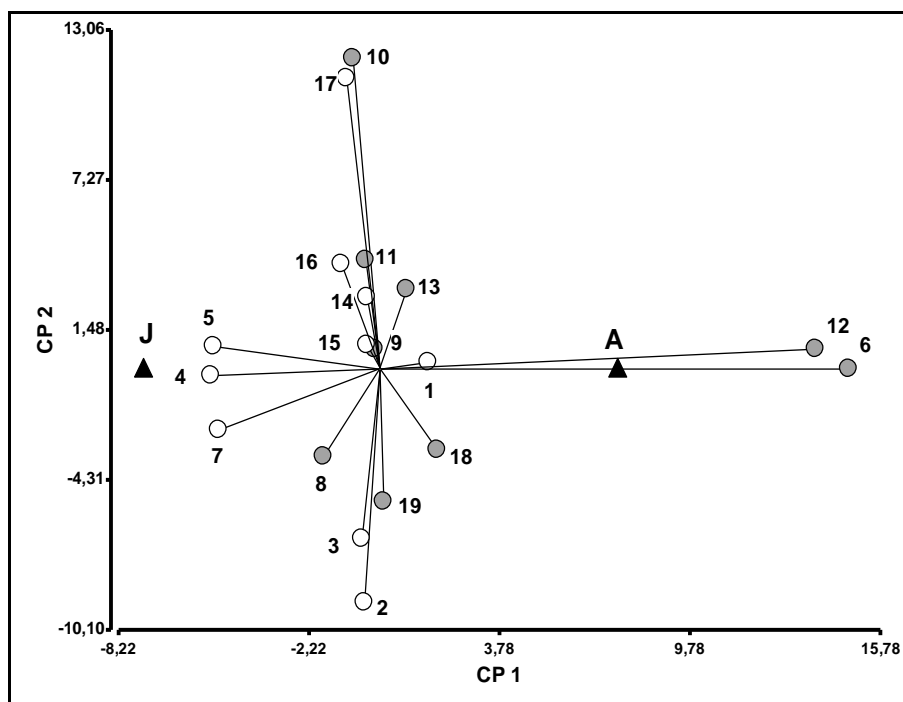
**Tabla 1.** Composición porcentual de terpenos en aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus*

	Terpeno	IK	Hojas Adultas	Hojas Juveniles
<b>1</b>	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	939	11,00 $\pm$ 0,61	9,98 $\pm$ 0,41
<b>2</b>	<b><math>\beta</math>-pineno</b>	979	0,53 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,21
<b>3</b>	<b>Mirceno</b>	991	0,52 $\pm$ 0,12	0,91 $\pm$ 0,19
<b>4</b>	<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	1011	0,23 $\pm$ 0,11	3,78 $\pm$ 0,63
<b>5</b>	<b>Limoneno</b>	1034	0,08 $\pm$ 0,01	3,59 $\pm$ 0,09
<b>6</b>	1,8-cineol	1036	62,11 $\pm$ 1,03	52,26 $\pm$ 1,29
<b>7</b>	<b>cis-<math>\beta</math>-ocimeno</b>	1046	0,19 $\pm$ 0,11	3,57 $\pm$ 0,59
<b>8</b>	<i>trans</i> -pinocarveol	1150	0,24 $\pm$ 0,17	1,43 $\pm$ 0,21
<b>9</b>	Pinocarvone	1174	0,09 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,09
<b>10</b>	1-terpinen-4-ol	1190	0,65 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,44
<b>11</b>	$\alpha$ -terpineol	1206	1,50 $\pm$ 0,22	1,81 $\pm$ 0,33
<b>12</b>	Acetato de $\alpha$ -terpinilo	1344	9,16 $\pm$ 0,93	-
<b>13</b>	Acetato de geranilo	1382	0,57 $\pm$ 0,20	-
<b>14</b>	<b><math>\alpha</math>-gurjeneno</b>	1408	0,17 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,11
<b>15</b>	<b>Aromadendreno</b>	1437	1,29 $\pm$ 0,42	1,57 $\pm$ 0,28
<b>16</b>	<b><math>\beta</math>-humuleno</b>	1455	1,01 $\pm$ 0,38	1,81 $\pm$ 0,27
<b>17</b>	<b>Alloaromadendreno</b>	1463	0,18 $\pm$ 0,06	0,86 $\pm$ 0,09
<b>18</b>	Globulol	1588	5,31 $\pm$ 0,44	4,11 $\pm$ 0,35
<b>19</b>	Epiglobulol	1627	0,69 $\pm$ 0,17	0,62 $\pm$ 0,11
	<b>Terpenos oxigenados</b>		80,32	61,65
	<b>Terpenos no oxigenados</b>		15,20	27,35
	<b>Total de terpenos identificados</b>		95,34	88,96
	<b>Compuestos no identificados</b>		4,66	11,04

Cada valor representa la media  $\pm$  desvío estándar para (n=4). IK: Índice de Kováts. Los compuestos sin negrita son oxigenados y los compuestos en negrita son no oxigenados.

El análisis multivariado de componentes principales (ACP) de ambos tratamientos muestra que el Componente 1 que explica el 97% de la variabilidad permite separar el aceite esencial de hojas adultas (**A**) del de hojas juveniles (**J**). 1,8 cineol (**6**) es el autovector positivo de mayor magnitud para diferenciar los tratamientos **A** (adultas) de **J** (juveniles). Le siguen en importancia los autovectores del acetato de  $\alpha$ -terpinilo (**12**), el globulol (**18**), el  $\alpha$ -pineno (**1**) y en menor proporción el acetato de geranilo (**13**). Las componentes negativas están asociadas a tres terpenos no oxigenados: limoneno (**5**),  $\alpha$ -felandreno (**4**) y *cis*- $\beta$ -ocimeno (**7**) (Figura 7).

El Componente 2, relacionado a componentes minoritarios, sólo explica el 3% de la variabilidad y está asociado positivamente a dos terpenos no oxigenados: mirceno (**3**) y  $\beta$ -pineno (**2**) y dos terpenos oxigenados:  $\lambda$ -terpinen-4-ol (**10**) y  $\alpha$ -terpineol (**11**) y negativamente a *cis*- $\beta$ -ocimeno (**7**), aromadendreno (**15**) y  $\beta$ -humuleno (**16**) (Figura 7).



**Figura 7.** Análisis de componentes principales. **J** (juveniles), **A** (adultas), **círculos blancos** (terpenos no oxigenados) **círculos grises** (terpenos oxigenados)

Estos resultados concuerdan con los presentados en la Tabla 1 donde el porcentaje de 1,8-cineol es significativamente mayor (62,11%) en hojas adultas respecto de hojas juveniles (52,26%). Los terpenos oxigenados que en la Figura 2 se encuentran en color gris: 1,8-cineol (6), el acetato de  $\alpha$ -terpinilo (12), el acetato de geranilo (13) y el globulol (18) se encuentran asociados a hojas adultas. Mientras que los terpenos no oxigenados que figuran en blanco: el  $\beta$ -pineno (2), mirceno (3),  $\alpha$ -felandreno (4), limoneno (5), *cis*- $\beta$ -ocimeno (7) están asociados a hojas juveniles.

## DISCUSION

La composición y el rendimiento de los aceites esenciales de *Eucalyptus* está relacionado con la variación de numerosos factores entre los que hay que considerar: variabilidad genética (Simões y Spitzer, 1999), localización geográfica, variaciones estacionales, factores ambientales, tipo y edad de las hojas, tratamientos silviculturales y forma de ejecución del muestreo y análisis del aceite (Boland *et al.*, 1991; Zrira y Benjilali, 1996; Andrade y Gomes, 2000; Mandal *et al.*, 2001; Viturro *et al.*, 2003; Brooker y Kleining, 2006; Figueredo *et al.*, 2008; Leicach *et al.*, 2010).

El rendimiento y la composición de terpenos del aceite esencial varían ampliamente entre especies e inclusive entre individuos (Chalchat *et al.*, 2001; Pagula *et al.*, 2000; Pappas y Sheppard-Hanger, 2000). Tesevic *et al.* (2009), investigaron la influencia de la especie sobre el rendimiento de aceite esencial determinando en *E. globulus* valores relativamente más bajos (1,21%) que otras especies: *E. microtheca* F. Muell (2,3%), *E. tereticornis* S.M. (3,4%) y *E. grandis* W. Hill ex Maiden (4,7%).

En el presente trabajo se obtuvieron concentraciones de terpenos de 1,49% y 1,31% para hojas juveniles y adultas respectivamente. Resultados que sugieren que la edad de las hojas es un factor determinante de la concentración de aceites esenciales, conclusión a la que llegaron también otros autores (Silvestre *et al.*, 1997; Wildy *et al.*, 2000), así las hojas completamente expandidas no lignificadas poseen la mayor proporción de aceites esenciales como lo informaron Doran y Bell (1994). Silvestre *et*

*al.* (1997) confirmaron estos conceptos obteniendo concentraciones de 2,7% y 1,9% para hojas juveniles y adultas respectivamente en *E. globulus*.

Se pudo comprobar en estos ensayos un 80,32% y 61,65% de terpenos oxigenados en hojas adultas y juveniles, mientras que los niveles de terpenos no oxigenados resultaron 27,35% y 15,2% para hojas juveniles y adultas, respectivamente, coincidiendo con lo reportado por otros investigadores quienes corroboraron que la composición de los aceites esenciales también depende de la edad de las hojas, con características particulares para hojas juveniles, maduras y senescentes (Batish *et al.*, 2006). Otros autores también confirmaron lo anterior (Chennoufi *et al.*, 1980; Ahmadouch *et al.*, 1985; Leicach, 2010) quienes demostraron que los aceites esenciales de hojas juveniles tienden a tener altos niveles de terpenos no oxigenados, mientras que los que provienen de hojas adultas tienen una tendencia a un incremento de terpenos oxigenados.

El análisis por CG-EM realizado en este estudio mostró mezclas complejas de mono y sesquiterpenos, identificándose un total de 19 compuestos, siendo 1,8-cineol el componente principal con 62,11% y 52,26% en hojas adultas y juveniles respectivamente.

Otros componentes mayoritarios son:  $\alpha$ -pineno (11,00% - 9,98%), acetato de  $\alpha$ -terpinilo (9,16% - 0,00%), globulol (5,31% - 4,11%),  $\alpha$ -terpineol (1,50% - 1,81%), aromodandreno (1,29% - 1,57%),  $\beta$ -humuleno (1,01% - 1,81%) y en menor proporción epiglobulol (0,69% - 0,62%), 1-terpinen-4-ol (0,65% - 1,21%) y acetato de geranilo (0,57% - 0,00%) en hojas adultas y juveniles, respectivamente.

## CAPITULO III

# CONTROL DE COLEOPTEROS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS

### INTRODUCCION

En la actualidad, la protección de los granos almacenados frente a las plagas insectiles se realiza exclusivamente mediante el uso de fumigantes. La fumigación de las instalaciones de almacenaje permite el control de un amplio espectro de plagas, debido a que los gases tienen la capacidad de impregnar áreas a las que otros tipos de control no podrían acceder (Zehler y Arthur, 2000; Shaaya *et al.*, 2003; Ducom *et al.*, 2006). Sin embargo la utilización de fumigantes sintéticos contribuye a la contaminación del ambiente, deja residuos en los alimentos y puede tener efectos carcinogénicos, sumados a los elevados costos. Sólo tres, el bromuro de metilo, (BM), el fluoruro de sulfidrilo (FS) y la fosfina (F), de los 16 usados previamente listados por Bond, 1984 quedaban vigentes a principios de 2005 (Navarro y Donahye, 2007), después de retirar el resto del mercado.

El bromuro de metilo, un fumigante de amplio espectro, es ampliamente utilizado para el control de los granos almacenados por su rápida acción y su bajo costo (Ducom *et al.*, 2006). Su uso ha decaído por considerarse que contribuye al agotamiento de la capa de ozono, ya que destruye sus moléculas a un ritmo 50 veces superior que los clorofluocarbonados (WMO, 1996, 2011; Shaaya *et al.*, 1997). En 1992, este producto fue incluido dentro de la lista de sustancias controladas por el protocolo de Montreal. En los países desarrollados se comenzó a limitar su uso a



partir de 2005 y se acordó su eliminación total en los países en vías de desarrollo para el año 2015 (UNEP, 2002).

El fluoruro de sulfidrilato es utilizado para la desinfección de los molinos en reemplazo del bromuro de metilo, pero su uso es más limitado por su elevado costo (Ducom *et al.*, 2006; Navarro, 2006). En lo que respecta a la fosfina es actualmente el único fumigante registrado en todo el mundo para la desinfección y protección de los granos y sus productos almacenados (Chaudhry, 1997; Horn *et al.*, 2005; Ducom *et al.*, 2006). Su continua utilización se ve amenazada por la generación de resistencia en las poblaciones de insectos, situación que ha sido registrada en varios países (Taylor, 1989; Hasan y Reichmuth, 2002; Cao *et al.*, 2003; Savvidou *et al.*, 2003; Jovanovic *et al.*, 2007; Braga Rodrigues *et al.*, 2008; Pimentel *et al.*, 2007, 2009; Sousa *et al.*, 2009).

En vista de los problemas planteados con los fumigantes sintéticos usados corrientemente existe un interés global en la utilización de estrategias alternativas (MBTOC, 2002).

Para el control de granos y productos almacenados resultan interesantes los productos de plantas, como los aceites esenciales y sus componentes, ya que estos compuestos tienen ventaja sobre los fumigantes convencionales en términos de baja toxicidad en mamíferos, rápida degradación y disponibilidad local. La fumigación con metabolitos secundarios de plantas aromáticas, sería potencialmente útil para la protección de granos almacenados, sustentado en su eficacia y valor económico (Weaver y Subramanyam, 2000; Carlini y Grossi-de-Sa, 2002; Mondal y Khalequzzaman, 2006, 2010).

El aceite esencial obtenido del eucalipto posee un amplio espectro de actividades biológicas contra diferentes hongos, bacterias, insectos, ácaros además de proveer una alternativa de control de plagas simple, económica y no contaminante para el medio ambiente. Dado que los aceites provenientes de las diferentes especies de eucalipto tienen una fuerte toxicidad en forma de vapor para una amplia variedad de microbios e insectos, podrían ser explotados comercialmente como fumigante para productos almacenados y también podrían ser impregnados los envases por lo que pueden utilizarse para la prevención de la infestación de insectos. Sin embargo el

efecto sobre otros organismos no-objetivo como los polinizadores (abejas, avispas, mariposas, polillas, entre otros) y enemigos naturales no han sido aún evaluados. Diferentes ensayos serán necesarios para evaluar los aspectos económicos y la actividad bajo condiciones de campo. Según algunos autores la volatibilidad y la insolubilidad en agua hace que la utilización de los aceites sea menos atractiva para el control de nematodos, patógenos del suelo y malezas bajo condiciones de campo, sin embargo pueden permear la fase aérea de las partículas de suelo, y de esta manera llegar a plagas del suelo y semillas (Batish *et al.*, 2008).

## **INSECTOS EN ESTUDIO**

### **Plagas de infestación primaria**

*Sitophilus oryzae* (Linneo, 1763) “gorgojo del arroz” (Familia: Curculionidae)

Se la considera plaga de infestación primaria, pues el adulto es capaz de dañar granos sanos al oviponer y las larvas se alimentan en su interior. Al emerger el adulto deja típicos orificios en los granos. Constituye una de las plagas más importantes por la gran capacidad destructiva tanto del adulto como de la larva, y por su amplia distribución mundial (FAO, 2008).

Es originario de la India. Si bien se ha difundido en todo el mundo prefiere las regiones cálidas y húmedas, donde se reproduce continuamente, desarrollándose a temperaturas entre los 17 °C y 34 °C, aunque es frecuente encontrarla en países más fríos como Lituania, Rusia, Ucrania (Ostrauskas y Taluntyté, 2004).

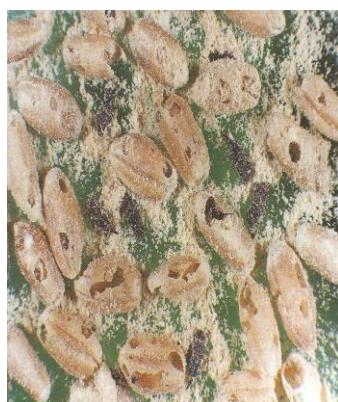
Los adultos miden de 2,1 a 3,2 mm, el cuerpo es de color castaño rojizo a negro, alargado, de lados paralelos, tegumento densamente cubierto por escamas. La cabeza prolongada en un rostro en cuyo extremo se ubican las piezas bucales. Las antenas son geniculadas ubicadas en escrobas. El protórax está densamente cubierto

de depresiones circulares. Los élitros con cuatro manchas con escamas amarillentas ó castaño rojizas (Serantes y de Haro, 1980; De Liñán, 1998). Las larvas son ápodas, curculioniformes, de color blanco perlado, alcanzan a medir de 2,5 a 3 mm. (Figura 8).



**Figura 8.** Adulto y larva de *Sitophilus oryzae*

La alimentación de las larvas es más restringida que la de los adultos; se las encuentra en semillas de trigo, arroz, maíz, avena, mijo, centeno, garbanzo. Los adultos, se pueden alimentar además de pasas de uvas, orejones de duraznos y manzanas, bizcochos, fideos, galletitas, harinas de trigo y arroz y pan blanco. Los granos atacados quedan totalmente perforados y no son aptos para el consumo, pierden peso y poder germinativo (Figura 9).



**Figura 9.** Daño de *Sitophilus oryzae* sobre trigo

Las hembras horadan el grano, eligiendo la región amilácea o el germen del grano para la oviposición. Allí excava con sus mandíbulas un agujero, alisa los bordes y deposita un huevo. Luego de oviponer descarga una sustancia traslúcida sobre el huevo y lo apisona hasta nivelarla con la superficie del grano, excepto en el maíz que deposita un mayor número de huevos. Cada hembra ovipone de 300 a 400 huevos, dependiendo entre otros factores, de la calidad del grano. Alcanza su máxima actividad de oviposición después de tres semanas de haber emergido. Luego de un breve período de incubación (3 a 5 días) nacen las larvas que se alimentan del contenido del grano durante 16 a 30 días y antes de empupar forma una cámara, donde permanece como pupa, de cinco a siete días. El adulto se mantiene dentro del grano hasta el total endurecimiento del tegumento y coloración; vive de tres a ocho meses (Descamps *et al.*, 2004). El ciclo completo se cumple en 26 a 35 días. Las condiciones óptimas que favorecen la actividad de los gorgojos son: temperaturas de 28 a 30 °C, humedad relativa ambiente, 75 a 90% y 13,5 a 17,6% de humedad del grano.

## **Plagas de infestación secundaria**

*Oryzaephilus surinamensis* (Linneo, 1758) “carcoma dentada”, “gorgojo dentado de los granos” (Familia: Cucujidae)

Se la considera plaga de menor importancia para granos de cereales enteros y sanos, aunque puede ser una plaga principal para los productos de la molienda y oleaginosas de endospermo más blando.

Es una especie cosmopolita, y asociada a las viviendas humanas. Su origen es posiblemente asiático, su denominación se debe a que Linneo la describió de ejemplares recolectados en Surinam.

Los adultos miden de 2,5 a 3,5 mm. El cuerpo es aplanado y angosto, la coloración varía de castaño rojizo a castaño oscuro. La cabeza es alargada, las antenas clavadas, con los dos últimos antenitos ligeramente engrosados. El tórax presenta tres

protuberancias longitudinales en el disco y seis grandes dientes en los márgenes laterales que lo hace fácilmente reconocible. Los élitros son estrechos, y estriados, si bien las alas membranosas están desarrolladas, rara vez vuela (Figura 10). Las larvas, oligópodos, son alargadas, escasamente pilosas, de color blanco amarillento, salvo la cabeza y las patas que son castaño claro. En su máximo desarrollo miden 2,5 a 2,8 mm, y adquiere un color amarillo pálido con bandas más oscuras sobre el dorso del tórax y del abdomen (Figura 10).



**Figura 10.** Larva y adulto de *Oryzaephilus surinamensis*

Las larvas y los adultos se alimentan fundamentalmente de granos de trigo, arroz, avena y cebada, también de almendras, fruta seca, harina y granos de oleaginosas, granos y derivados de granos, como galletas, fideos, pan y pastas; chocolates, dulces, levadura, tabaco, alimentos concentrados de animales y carne seca.

A los pocos días de emergidas, las hembras colocan de 45 a 375 huevos de color blanco, alargados, aislados o en grupos de cuatro a cinco dispersos en el alimento o en las grietas del germen del grano. A los 4 ó 5 días emergen pequeñas larvas subcilíndricas, el período larval dura 15 a 20 días. Antes de empupar construye un capullo, que fija a un elemento sólido por la parte caudal. Así permanece la pupa de 7 a 20 días, al cabo de los cuales emerge el imago. El ciclo completo se cumple en 22 a 108 días. Presenta dos a cinco generaciones por año. Los adultos viven,

generalmente, de tres a seis meses, en algunos casos sin embargo se ha registrado una longevidad de hasta tres años (Saini y Rodríguez, 2004).

***Cryptolestes pusillus*** (Schönherr, 1817) “carcoma achatada” (Familia: Cucujidae)

Generalmente está asociado con otros insectos como el gorgojo del arroz. Sin embargo, la larva puede alimentarse de grano entero, destruyendo sólo el germen.

Es una especie cosmopolita entre los insectos más pequeños que atacan productos almacenados. Los adultos miden de 1 a 1,8 mm, cuerpo oblongo, achatado, color castaño rojizo. Las antenas largas y filiformes, presentan dimorfismo sexual, en los machos son tan largas como el cuerpo, mientras que en las hembras alcanzan sólo la mitad de su longitud. El tórax cuadrangular, de bordes lisos, disco con una depresión central. Élitros con estrías longitudinales finas y paralelas (Figura 11).



**Figura 11.** Larva y adulto de *Cryptolestes pusillus*

Las larvas de coloración blanquecina, miden aproximadamente 3 mm, son aplanadas, alargadas, aguzadas hacia el extremo y están provistas con un par de procesos espinosos en el extremo posterior del cuerpo (Figura 11).

Larvas y adultos se encuentran en cereales y sus subproductos, en nueces, frutas desecadas, legumbres secas, cacao, y especias. También se alimentan de desechos y animales muertos.

La hembra coloca los huevos en cavidades de los granos o, libremente en las harinas. El período larval dura aproximadamente tres semanas. En su último estadio la larva construye un capullo, adhiriendo partículas de alimento mediante una sustancia gelatinosa donde empupa. El ciclo completo dura de cinco a nueve semanas. Los adultos viven aproximadamente de seis a 12 meses.

***Tribolium confusum*** Jacquelin du Val (1868) “tribolio confuso”  
(Familia Tenebrionidae).

Considerada como plaga principal para los productos de la molienda de cereales, legumbres y oleaginosas, es muy común en molinos de trigo y diversas fábricas que trabajan con cereales molidos.

Es una especie cosmopolita, de zonas cálidas, con generaciones superpuestas durante el año. El adulto mide de 3 a 4 mm, el cuerpo es alargado, ligeramente aplanado, de bordes laterales paralelos, coloración castaño rojizo brillante. Las antenas son clavadas, los últimos antenitos ensanchados gradualmente hacia el ápice. El protórax presenta punteado fino y denso. Los élitros estriados, interestrías con puntos escasos y difíciles de ver a simple vista, incapaces de volar (Figura 12). Se puede confundir con *Tribolium castaneum* de la que se diferencia por las antenas en maza con los tres últimos antenitos ampliamente ensanchados, en *T. confusum* el ensanchamiento de estos antenitos es gradual. Por otra parte *T. castaneum* presenta la capacidad de volar.

Las larvas son pequeñas, de 6 mm, delgadas y cilíndricas con apariencia de gusano alambre, de color blanco-amarillento (Figura 12). Pupa libre.



**Figura 12.** Larva y adulto de *Tribolium confusum*

Está presente en toda clase de granos partidos o dañados por otros insectos, harinas y levaduras. También atacan poroto, arveja y otras legumbres, polvo de hornear, jengibre, raíces vegetales secas, frutas desecadas, nueces, chocolate, drogas, pimienta roja, maní, arroz y castaña de Pará.

Las hembras oviponen en harinas o residuos de granos de 500 a 900 huevos, cubiertos por una secreción pegajosa, que permite que se adhieran a las superficies y faciliten la infestación. El período de incubación es de cinco a 12 días. Posee de seis a 11 estadios larvales. Empupa en el medio donde se encuentra sin protección alguna. El ciclo completo es de seis a ocho semanas. Los adultos viven generalmente de 12 a 18 meses, aunque algunos pueden vivir más de tres años.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad insecticida de los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y de 1,8-cineol en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum* mediante toxicidad por contacto y/o efecto fumigante en papeles de filtro impregnados.



## **Objetivos específicos**

Determinar concentraciones letales, tiempo de volteo e intervalos de confianza.

Relacionar la concentración y composición del aceite esencial con la actividad insecticida y poder de volteo de las especies motivo de estudio.

## **HIPOTESIS**

Los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* presentan actividad insecticida en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*.

El 1,8-cineol es el responsable de la actividad insecticida en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*.

La actividad insecticida de los aceites esenciales y el 1,8-cineol depende del tiempo de exposición, resultando mayor a medida que aumenta el tiempo de exposición a los mismos.

La respuesta biológica a los aceites esenciales probados y al 1,8-cineol presenta una correlación positiva con las dosis empleadas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Cría y mantenimiento de insectos en estudio**

Se utilizaron colonias de la cátedra de Zoología Agrícola de la Facultad de Agronomía (UBA), que se multiplicaron en una cámara de cría en condiciones controladas de temperatura ( $28 \pm 1$  °C) y humedad relativa (70%) y en oscuridad

(Sing y Moore, 1985). La temperatura fue mantenida mediante una estufa con termostato y la humedad con un humidificador (Winston y Bates, 1960).

Para la cría de *S. oryzae* se utilizó como alimento natural granos de trigo “*Triticum aestivum*” L., tratados con frío (-18 °C) durante 15 días y conservado, luego entre 2 °C y 5 °C. Se colocaron 200 individuos no sexados en recipientes de vidrio de 12 cm de diámetro de boca y 25 cm de alto con tapa de tela metálica de 0,5 mm para facilitar el intercambio gaseoso, durante 15 días, tiempo suficiente para la fecundación y oviposición, obteniéndose la primera generación (F1) de la cual se retiraron los adultos iniciales. Esto permitió tener en cada frasco larvas y adultos de edad conocida (Mareggiani, 1999). Todas las experiencias se desarrollaron a partir de esta primera generación (F1) (Figura 13).



**Figura 13.** Frascos de cría de insectos

Para la cría de las especies que producen infestación secundaria, se utilizó una dieta base de harina de trigo tipo 0000, levadura seca de cerveza (Virgen, CALSA Argentina) y fécula de maíz (Maicena Refinerías de Maíz, Argentina), en proporciones 10:1,5:10 (Casadío, 1994, 1996) (Figura 13).

## **Bioensayos**

### **Actividad Insecticida**

La acción fumigante de los aceites esenciales obtenidos a partir de hojas juveniles y adultas y del 1,8-cineol se evaluó utilizando discos de papel de filtro (S & S) de 9 cm de diámetro colocados en placas de Petri (Huang *et al.*, 1997). Los aceites esenciales fueron disueltos en acetona o etanol (*O. surinamensis*) dependiendo de la sensibilidad de la especie plaga a los posibles residuos del solvente y aplicados sobre el papel de filtro, permitiendo luego la evaporación del solvente. Se realizaron ensayos preliminares para evaluar el comportamiento de los insectos a prueba frente a los diferentes solventes (acetona y etanol). Se comprobó que se producía alta mortalidad en los tratamientos control utilizando acetona en *O. surinamensis*, que no afectó a los otros tres insectos probados.

En ensayos previos se probaron para todos los insectos a evaluar las concentraciones: 0,05-2  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* y 1,8-cineol. De acuerdo a la diferente susceptibilidad de las especies ensayadas frente a estas esencias las concentraciones utilizadas para cada especie fueron:

*Sitophilus oryzae*: 0,20, 0,40, 0,60 y 0,80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para 1,8-cineol y 0,40, 0,60 y 0,80 y 1  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas juveniles y adultas.

*Oryzaephilus surinamensis*: 0,5, 0,75, 1, 1,25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas juveniles y adultas y 1,8-cineol.

*Cryptolestes pusillus*: 0,4, 0,6, 0,8, 1  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para 1,8-cineol y 0,05, 0,15, 0,25, 0,35  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas juveniles y adultas.

*Tribolium confusum*: 0,5, 0,75, 1, 1,25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas juveniles y adultas y 1,8-cineol.

En cada placa de Petri se aplicaron sobre el papel de filtro 0,5 ml de la solución del aceite esencial, y se dejó evaporar 10 minutos cuando el solvente fue la acetona y una hora en el caso del etanol. Se colocaron 10 insectos adultos no sexados de tres a siete días de edad. Los tratamientos-ensayos se realizaron en oscuridad y en condiciones controladas de laboratorio a  $25 \pm 1$  °C de temperatura y 60-80% de H.R (Figura 14).



**Figura 14.** Preparación de cajas de petri para bioensayos

Para cada especie plaga se realizaron doce tratamientos con tres repeticiones, se utilizó un diseño completamente aleatorizado, siendo la unidad experimental la caja de Petri.

Se efectuó el recuento de individuos muertos a los 30 minutos, 2, 4, 6, 12 y 24 horas de efectuados los tratamientos. El porcentaje de mortalidad se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

**Mortalidad (%)**:  $N^{\circ}$  de individuos muertos/  $N^{\circ}$  de individuos totales X100.

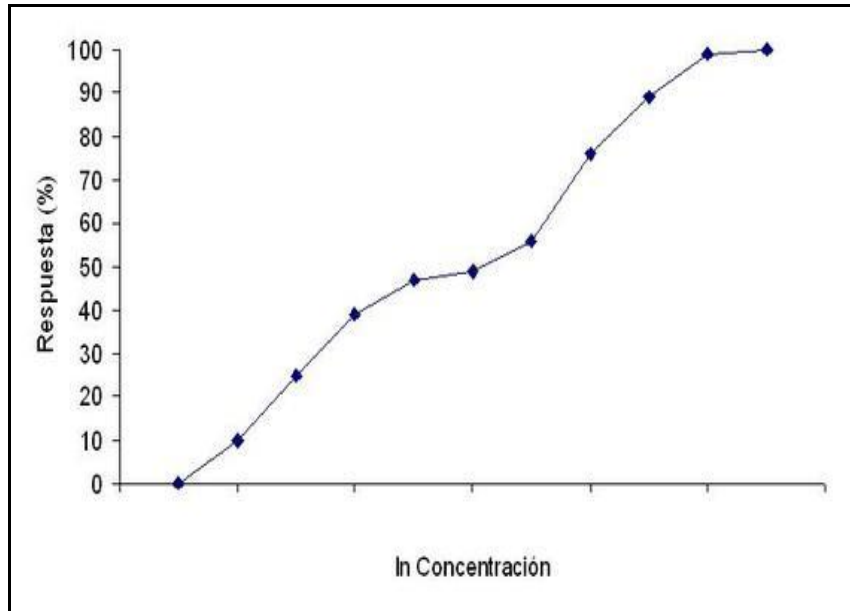
Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza factorial con arreglo de medidas repetidas para la variable de respuesta número de individuos muertos para un esquema de ensayos repetidos en el tiempo y para las comparaciones entre medias se aplicó el test deTukey ( $p \leq 0.05$ ) sobre la interacción triple.

Se calculó la Concentración Letal<sub>50</sub> (CL<sub>50</sub>) y sus intervalos de confianza por el método de Probit. Este análisis expresa la concentración o tiempo requerido para matar la mitad de los insectos ensayados (Thorne *et al.*, 1995). Los datos que se obtienen de este análisis estadístico son las concentraciones letales: CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub>, la pendiente y la ordenada en el origen de la recta y finalmente  $\lambda^2$ . Se determinó el Tiempo Efectivo Medio<sub>50</sub> (TE<sub>50</sub>) mediante el mismo método. Se entiende como

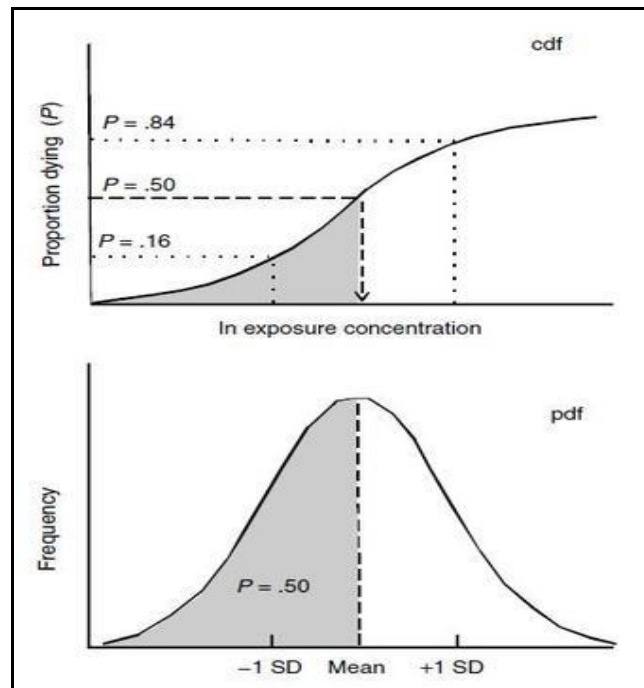
Tiempo Efectivo Medio el período que tarda en producir el volteo del 50% de la población (es una forma de evaluar la actividad sobre la capacidad motora de los insectos). Los insectos volteados puede corresponder al efecto de volteo de algunos productos (por ej. piretroides), que es un efecto reversible y subletal, es decir que estos insectos, luego pueden recuperarse y volver a movilizarse, o a un efecto letal e irreversible, siendo insectos que caen en forma permanente. Si la prueba es de una duración mayor a los 20 minutos, los efectos medidos se asumen como irreversibles, y en ese caso lo que estamos midiendo es cuánto tarda el producto en matar al 50% de los insectos, o sea tiempo de acción.

Existen varias maneras de cuantificar y comparar la toxicidad de diferentes químicos y concentraciones. Una medida común es la concentración letal 50, conocida como  $CL_{50}$ . Esta cifra significa que una concentración determinada es letal para un 50% de los animales experimentales expuestos. Mientras menor sea la  $CL_{50}$  mayor es la toxicidad (Andrews, 1989). Para analizar la efectividad de un insecticida, no es conveniente evaluar una sola dosis o concentración sino que, debe probarse un grupo de ellas en forma de progresión aritmética. Si se grafica la respuesta de estas concentraciones en función del estímulo, se obtendrá una línea sigmoide asimétrica con la curvatura inferior muy pequeña cuyos valores son de difícil interpretación (Figura 15). Al transformar la dosis a la función Log (dosis) la respuesta se vuelve una línea sigmoide simétrica. A pesar de ello, resulta complicado analizar estadísticamente líneas curvas; además, arriba del 95% de respuesta, no se sabe con certeza la dirección que tomará dicha curva (Figura 16). Para obtener una línea recta, además de realizar la transformación indicada, es menester que la respuesta se transforme a unidades Probit, Anglit o Logit y realizar un análisis paramétrico (Figura 17), de las cuales la más utilizada es la transformación Probit (Silva y Hepp, 2003). Probit es una palabra que viene de la contracción de probability unit, sin embargo, no son unidades de probabilidad, sino unidades de desviación estándar incrementadas a cinco con la finalidad de evitar el uso de números negativos. Esta transformación asume que la respuesta de los individuos se distribuye en forma normal, correspondiendo la curva de respuesta a una sigmoidea o función de

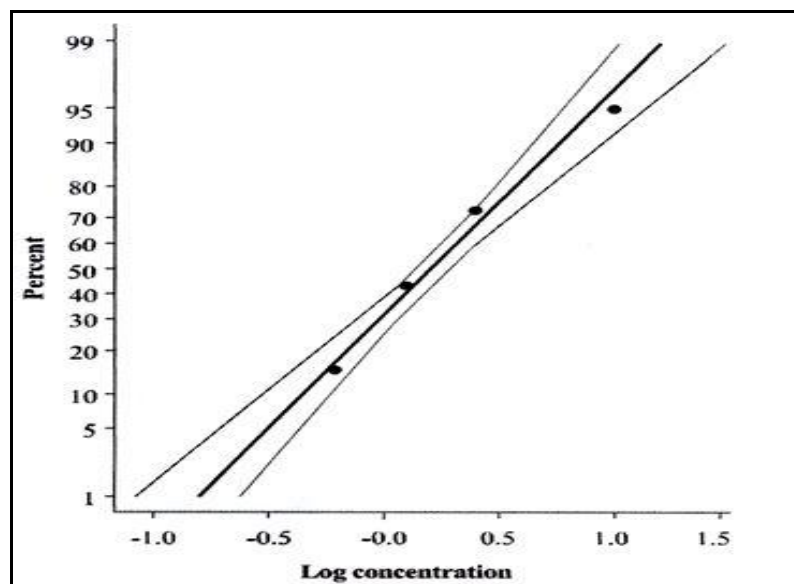
distribución normal acumulativa (Gil-Crado y Muñiz, 1978; Infante y Calderón, 1994).



**Figura 15.** Concentración-respuesta



**Figura 16.** Distribución Normal



**Figura 17.** Concentración-Respuesta con transformación Probit y logarítmica

## RESULTADOS

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza factorial con arreglo de medidas repetidas realizados para las cuatro especies de insectos probados se puede observar que los factores principales: tratamiento y concentración y su interacción, y el tiempo transcurrido desde la aplicación de los tratamientos hasta que se tomaron las mediciones, que constituyó las medidas repetidas (R1) con sus correspondientes interacciones dieron significativos. Para evaluar la diferencia entre medias se aplicó el test de Tukey ( $p < 0,05$ ) sobre la interacción triple (anexo I, Tablas I, II, III y IV).

La actividad biológica de los aceites esenciales obtenidos de hojas adultas (**Ad**) y juveniles (**Ju**) de *E. globulus* y 1,8-cineol (**E**) sobre los cuatro insectos probados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*, varió en función del tiempo y la concentración en forma positiva. Es decir que a medida que aumentó el tiempo de exposición y la concentración se observó un aumento de la mortalidad, no registrándose mortalidad en los tratamientos controles (Tablas 2, 3, 4 y 5).

A continuación se describen los resultados de los cuatro insectos ensayados.

## *Sitophilus oryzae* “gorgojo del arroz”

Se observan diferencias significativas entre el tratamiento control y los tratamientos ensayados (hojas adultas (**Ad**) y juveniles (**Ju**) de *E. globulus* y 1,8-cineol (**E**), así como también entre las cuatro concentraciones probadas: 0,20, 0,40, 0,60 y 0,80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para 1,8-cineol y 0,40, 0,60 y 0,80 y 1  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas juveniles y adultas para cada uno de los tiempos registrados (Tabla 2).

La susceptibilidad del gorgojo resultó máxima (mortalidad total) a las 24 hs de la aplicación de 1,8-cineol mediante impregnación de papel de filtro, con la concentración más alta (0,8  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) ensayada, mientras que la concentración más baja aplicada (0,2  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) produjo una alta mortalidad (76,67 %) (Figura 18).

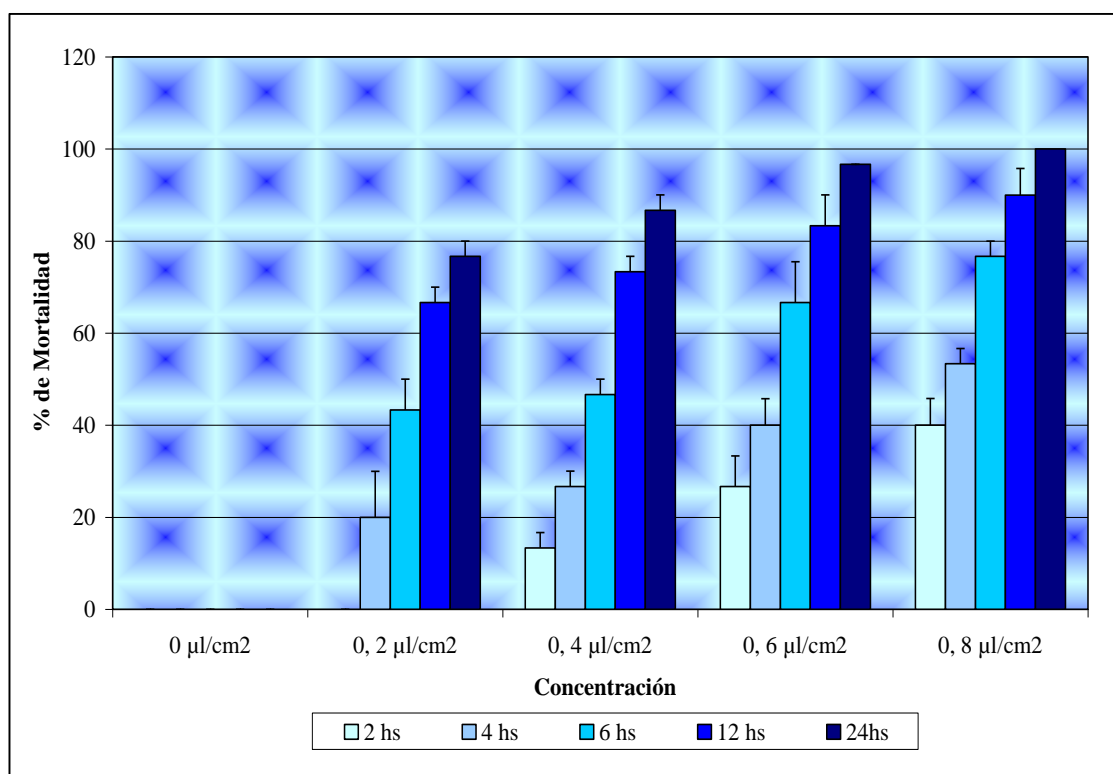
**Tabla 2.** Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de *Sitophilus oryzae* en función del tiempo de exposición

Trat/Tiempo	2 hs	4 hs	6 hs	12 hs	24 hs
<b>T 0 (control)</b>	0a	0a	0a	0a	0a
<b>E1 (0,2<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	0a	20abcd	43,33bcde	66,67efgh	76,67cd
<b>E2 (0,4<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	13,33ab	26,67abcd	46,67bc	73,33fghi	86,67def
<b>E3 (0,6<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	26,67bc	40bcde	66,67efgh	83,33hijk	96,67ijk
<b>E4 (0,8<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	40bcde	53,33defg	76,67ghij	90hijk	100j
<b>Ju1 (0,4<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	3,33a	6,67a	10a	16,67abc	23,33cd
<b>Ju2 (0,6<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	10a	13,33ab	16,67abc	56,67defg	73,33fghi
<b>Ju3 (0,8<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	20abc	26,67abcd	43,33bcde	66,67efgh	83,33hijk
<b>Ju4 (1<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	26,67abcd	43,33bcde	76,67ghij	86,67hijk	93,33hijk
<b>Ad1(0,4<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	0a	0a	3,33a	6,67a	10a
<b>Ad2(0,6<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	0a	6,67a	10a	13,33ab	16,67abc
<b>Ad3(0,8<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	3,33a	10a	13,33ab	33,33abcd	46,67cdef
<b>Ad4(1<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	20abcd	76,67ghij	83,33hijk	90hijk	100k

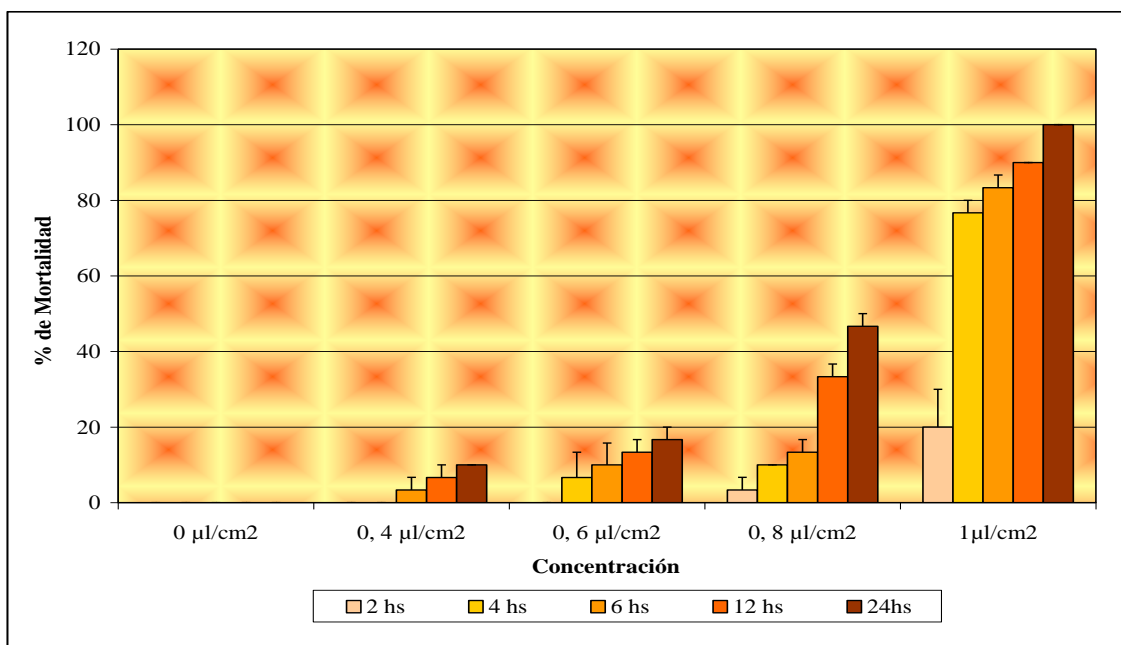
n=3 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey,  $p < 0,05$ ). T0: control; E1-E4: diferentes concentraciones de 1,8-cineol; Ju1-Ju4: diferentes concentraciones de hojas juveniles; Ad1-Ad4: diferentes concentraciones de hojas adultas.



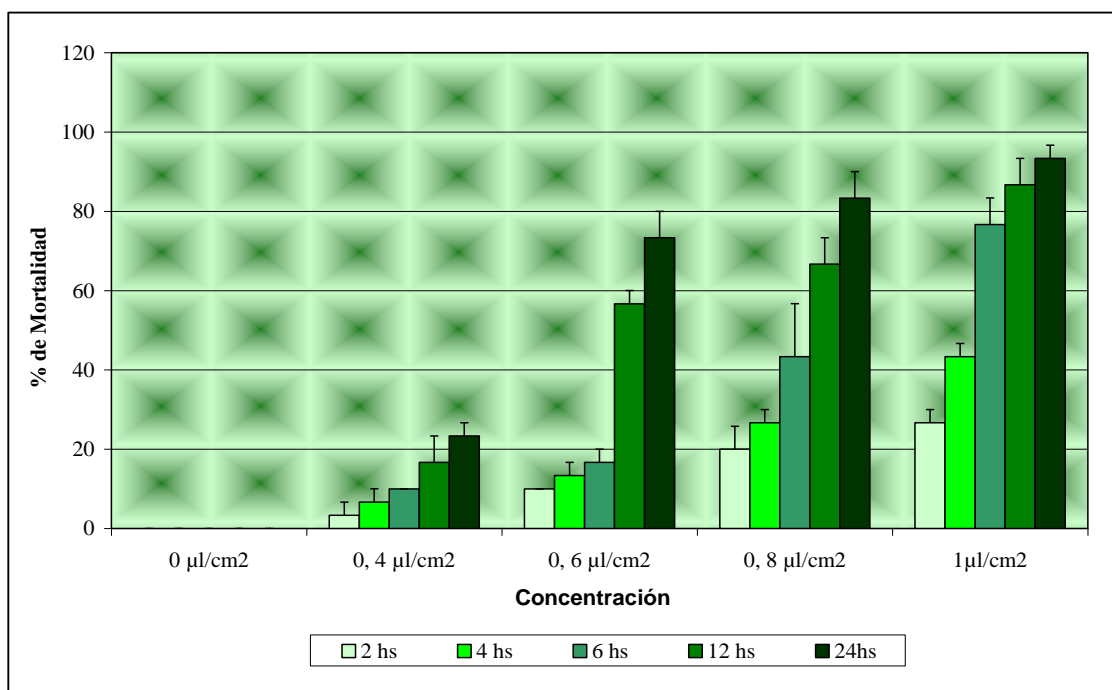
Al mismo tiempo de exposición (24 horas) las esencias obtenidas de hojas adultas y juveniles, con la concentración más alta probada ( $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) produjeron asimismo altos valores de mortalidad: 100% y 93.33%, respectivamente (Figuras 19 y 20). A las 2 horas de comenzados los ensayos, con las concentraciones más bajas los aceites esenciales de hojas juveniles, fueron los que produjeron una mortalidad mayor que la esencia de las hojas adultas. A partir de las 4 hs, a las concentraciones más altas ensayadas ( $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), las esencias de hojas adultas fueron las que ocasionaron una mayor mortalidad llegando al 100% a las 24 hs de comenzados los ensayos (Figuras 19 y 20).



**Figura 18.** Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* tratado con diluciones de 1,8-cineol (0,20, 0,40, 0,60 y 0,80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a determinadas horas



**Figura 19.** Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* (0,40, 0,60, 0,80 y 1 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas



**Figura 20.** Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* (0,40, 0,60, 0,80 y 1 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas

## *Oryzaephilus surinamensis* “Carcoma dentada”

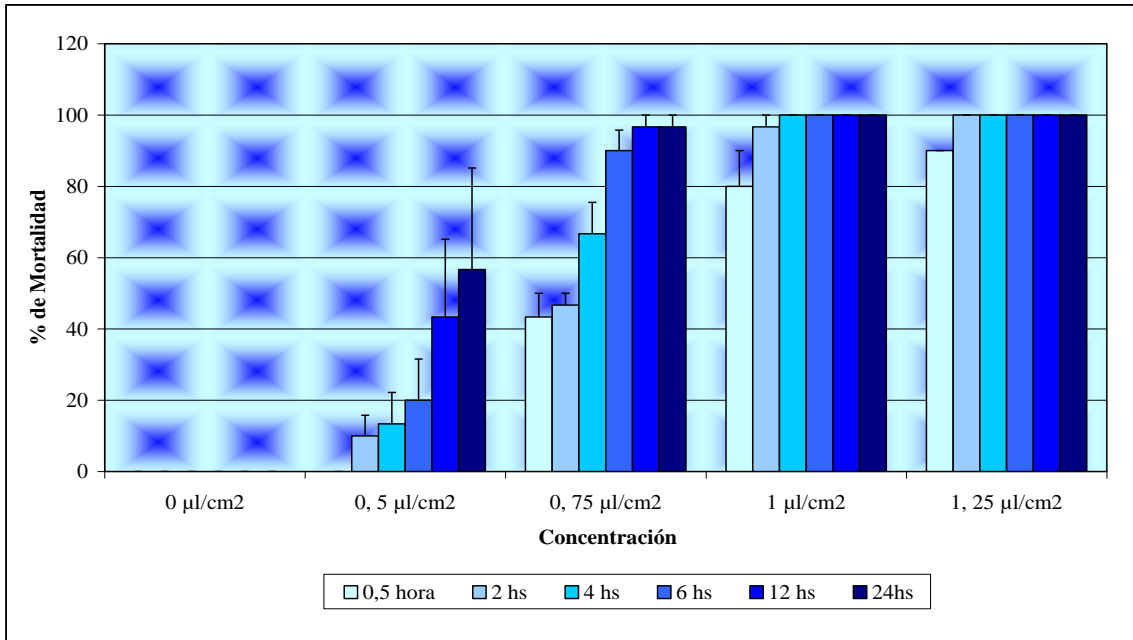
En el caso de esta especie, se puede observar en general que las diferencias significativas entre el tratamiento control y los tratamientos ensayados (1,8-cineol, hojas adultas y juveniles) sólo se mostraron a tiempos más cortos en las concentraciones más bajas (Tabla 3). A las 6 y 12 horas de comenzados los ensayos esas diferencias sólo se verifican en los tratamientos de hojas adultas y 1,8-cineol con las concentraciones más bajas utilizadas (0,50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ).

Con la concentración más alta ensayada (1,25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) la aplicación de 1,8-cineol y de aceites obtenidos de hojas juveniles y adultas produjeron sobre la carcoma dentada una mortalidad total a las dos horas de comenzados los ensayos. Con la concentración más baja probada (0,50  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) las esencias obtenidas de hojas juveniles causaron un 90% de mortalidad, seguidas por las hojas adultas y 1.8-cineol con una mortalidad de 73,33% y 56,66%, respectivamente (Figuras 21, 22 y 23), después de 24 horas de su aplicación.

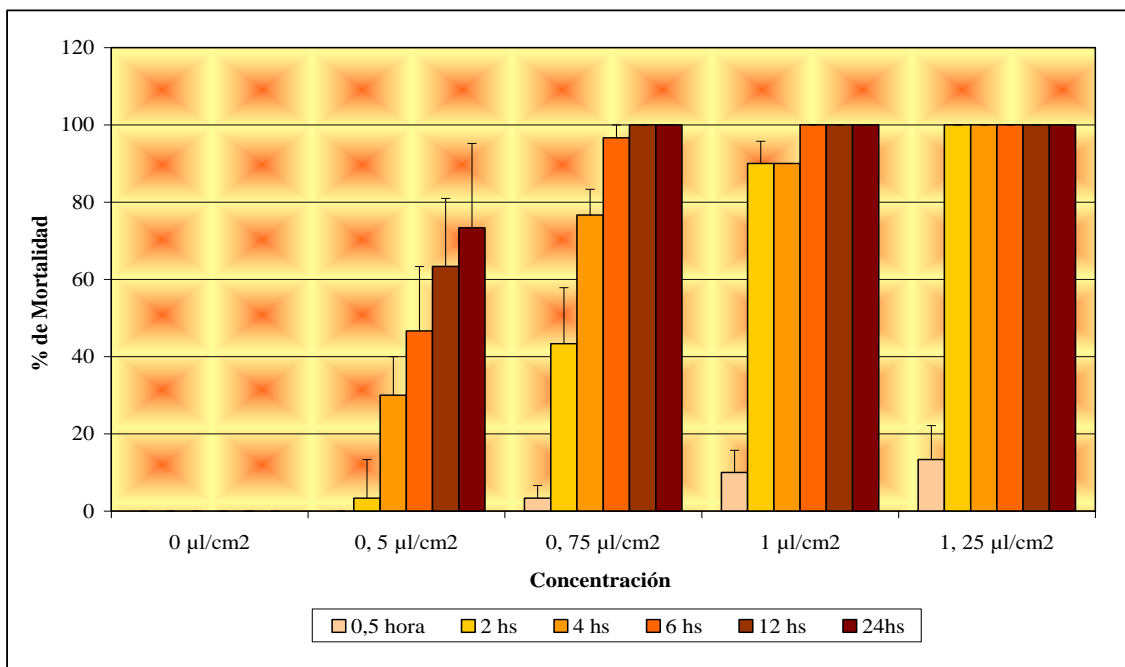
**Tabla 3.** Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición

Trat/Tiempo	0.5 hs	2 hs	4 hs	6 hs	12 hs	24 hs
<b>T0 (control)</b>	0a	0a	0a	0a	0a	0a
<b>E1 (0,50<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	0a	10abc	13,33abc	20abcd	43,33b	56,67b
<b>E2 (0,75<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	43,33defgh	46,67efghi	66,67hijk	90jkl	96,67k	96,67k
<b>E3 (1<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	80ijkl	96,67jkl	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl
<b>E4 (1,25<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	90jkl	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl
<b>Ju1(0,50<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	0a	23,33abcde	66,67hijk	86,67jkl	90jkl	90jkl
<b>Ju2(0,75<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	3,33a	66,67hijk	83,33ijkl	100jkl	100jkl	100jkl
<b>Ju3(1<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	6,67ab	93,33jkl	93,33jkl	100jkl	100jkl	100jkl
<b>Ju4(1,25<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	26,67abcde	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl
<b>Ad1(0,50<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	0a	6,67ab	30bcdef	46,67efghi	63,33hijk	73,33ijkl
<b>Ad2(0,75<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	3,33a	43,33cdefg	76,67ijkl	96,67jkl	100jkl	100jkl
<b>Ad3 (1<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	10abc	90jkl	90jkl	100jkl	100jkl	100jkl
<b>Ad4(1,25<math>\mu\text{l}/\text{cm}^2</math>)</b>	13,33abc	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl	100jkl

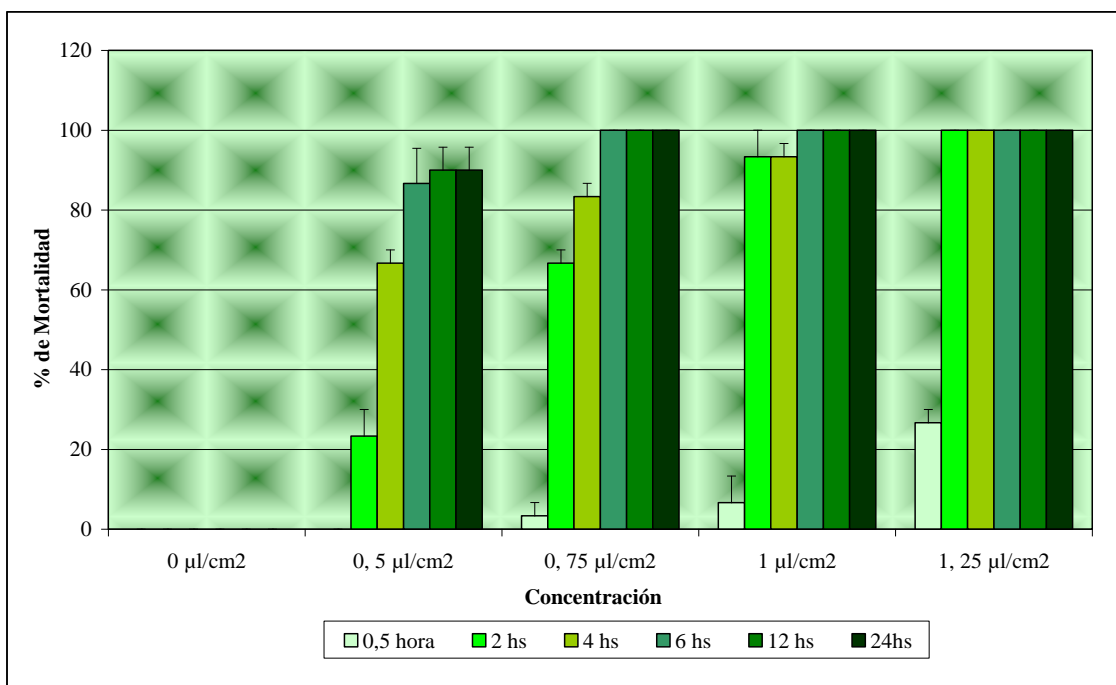
n=3 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey,  $p < 0,05$ ). T0: control; E1-E4: diferentes concentraciones de 1,8-cineol; Ju1-Ju4: diferentes concentraciones de hojas juveniles; Ad1-Ad4: diferentes concentraciones de hojas adultas.



**Figura 21.** Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* tratado con diluciones de 1,8-cineol (0,50, 0,75, 1 y 1,25 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas (p<0.05)



**Figura 22.** Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* (0.50, 0.75, 1 y 1.25 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas (p<0.05)



**F**

**figura 23.** Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* (0,50, 0,75, 1 y 1,25 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas (p<0.05)

### *Cryptolestes pusillus* “carcoma achatada”

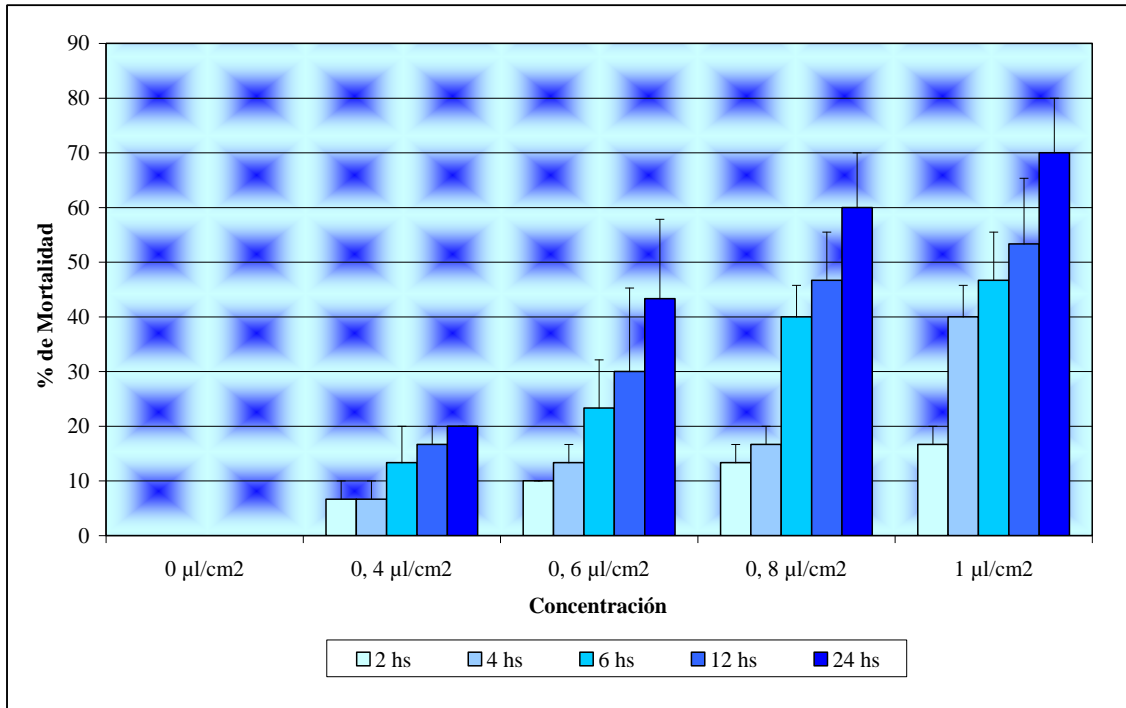
Como puede apreciarse en la Tabla 4 existen diferencias significativas entre el control y los tratamientos: hojas adultas (**Ad**) y juveniles (**Ju**) de *E. globulus* y 1,8-cineol (**E**), a su vez esas diferencias se verificaron entre las cuatro concentraciones probadas: 0,40, 0,60, 0,80 y 1 µl/cm<sup>2</sup> para 1,8-cineol y 0,05, 0,15 y 0,25 y 0,35 1 µl/cm<sup>2</sup> para hojas juveniles y adultas.

**Tabla 4.** Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición

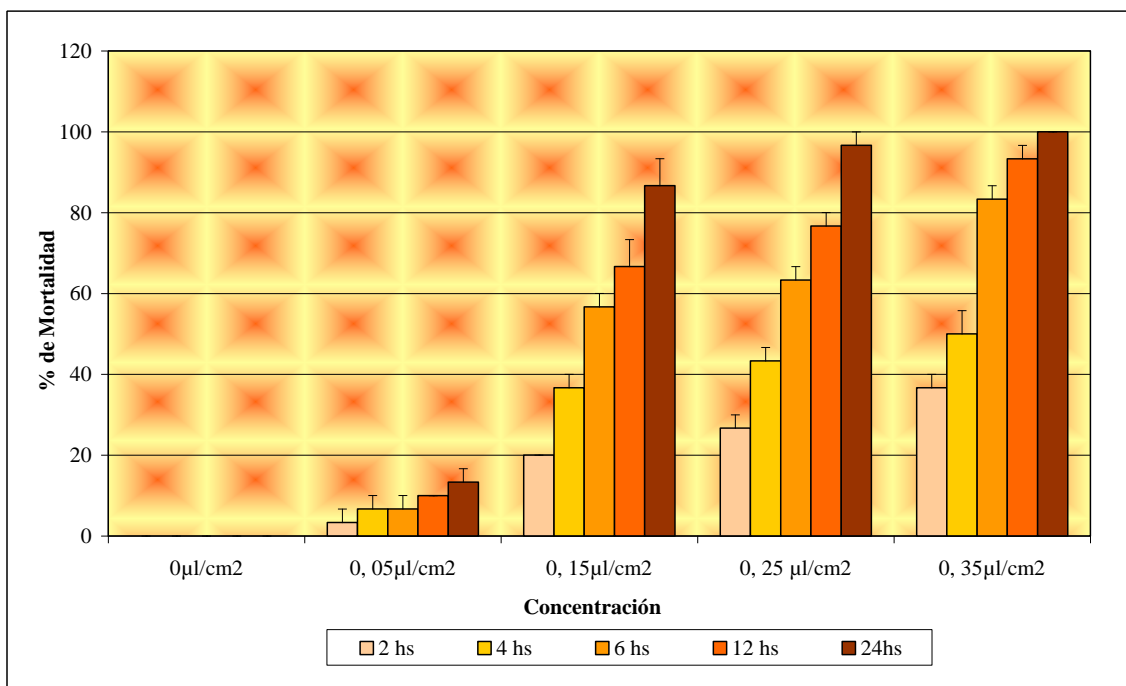
Trat/Tiempo	2 hs	4 hs	6 hs	12 hs	24 hs
<b>T 0 (control)</b>	0a	0a	0a	0a	0a
<b>E1 (0,40µl/cm<sup>2</sup>)</b>	6,67abc	6,67abc	13,33abcd	16,67a-f	20a-g
<b>E2 (0,60µl/cm<sup>2</sup>)</b>	10abcd	13,33abcde	23,33a-h	30b-j	43,33f-n
<b>E3 (0,80µl/cm<sup>2</sup>)</b>	13,33abcde	16,67a-f	40e-m	46,67g-o	60k-s
<b>E4 (1 µl/cm<sup>2</sup>)</b>	16,67a-f	40e-m	46,67g-o	53,33i-q	70n-v
<b>Ju1(0,05µl/cm<sup>2</sup>)</b>	0a	0ab	3,33ab	3,33ab	10abcd
<b>Ju2(0,15µl/cm<sup>2</sup>)</b>	10abcd	33,33c-k	53,33i-k	70n-v	93,33q-w
<b>Ju3(0,25µl/cm<sup>2</sup>)</b>	13,33abcde	73,33o-v	80p-w	86,67r-w	96,67q-w
<b>Ju4(0,35µl/cm<sup>2</sup>)</b>	70n-v	86,67r-w	96,67q-w	100w	100w
<b>Ad1(0,05µl/cm<sup>2</sup>)</b>	3,33ab	6,67abc	6,67abc	10abcd	13,33abcde
<b>Ad2(0,15µl/cm<sup>2</sup>)</b>	20a-g	36,67d-l	56,67j-r	66,67m-u	86,67r-w
<b>Ad3(0,25µl/cm<sup>2</sup>)</b>	26,67a-i	43,33f-n	63,33j-t	76,67p-w	96,67q-w
<b>Ad4(0,35µl/cm<sup>2</sup>)</b>	36,67d-l	50h-p	83,33p-w	93,33q-w	100w

n=3 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey,  $p < 0,05$ ). T0: control; E1-E4: diferentes concentraciones de 1,8-cineol; Ju1-Ju4: diferentes concentraciones de hojas juveniles; Ad1-Ad4: diferentes concentraciones de hojas adultas.

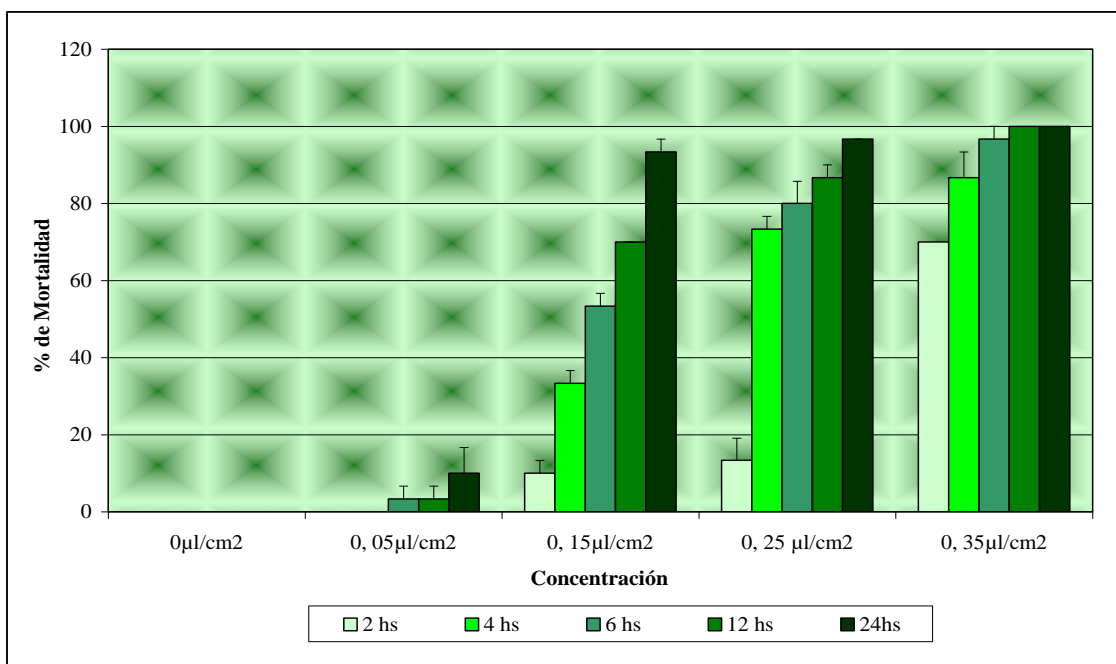
A las 24 hs de aplicado 1,8-cineol con la concentración más alta (1 µl/cm<sup>2</sup>) sólo se registró una mortalidad del 70%, mientras la mortalidad fue total con una concentración mucho menor (0,35µl/cm<sup>2</sup>) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles (Figuras 24, 25 y 26), a la cual el 1,8-cineol causó una mortalidad del 20% en el mismo lapso.



**Figura 24.** Mortalidad (%) de *Cryptolestes pusillus* tratado con diluciones de 1,8-cineol (0, 0,4, 0,6 y 0,8 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas (p<0.05)



**Figura 25.** Mortalidad (%) de *Cryptolestes pusillus* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* (0,05, 0,15, 0,25, 0,35 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas (p<0.05)



**Figura 26.** Mortalidad (%) de *Cryptolestes pusillus* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* (0,05, 0,15, 0,25, 0,35 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas (p<0.05)

### *Tribolium confusum* “Tribolio confuso”

En los ensayos realizados se verifica la existencia de diferencias significativas entre el tratamiento control y los efectuados con 1,8-cineol, hojas adultas y juveniles a las concentraciones más bajas ensayadas (0,5 µl/cm<sup>2</sup>) hasta la media hora de comenzados los ensayos. A partir de las 2 horas de exposición, no se observaron diferencias significativas principalmente en las concentraciones más altas evaluadas (1 y 1,25 µl/cm<sup>2</sup>) (Tabla 5).

El 1,8-cineol resultó ser el más efectivo de los aceites probados sobre *T. confusum* mostrando valores que oscilaron entre 90 y 100% de mortalidad entre la media hora y 12 hs de exposición a la máxima concentración ensayada (1,25 µl/cm<sup>2</sup>), mientras que los aceites esenciales de las hojas adultas mostraron valores entre 26,67



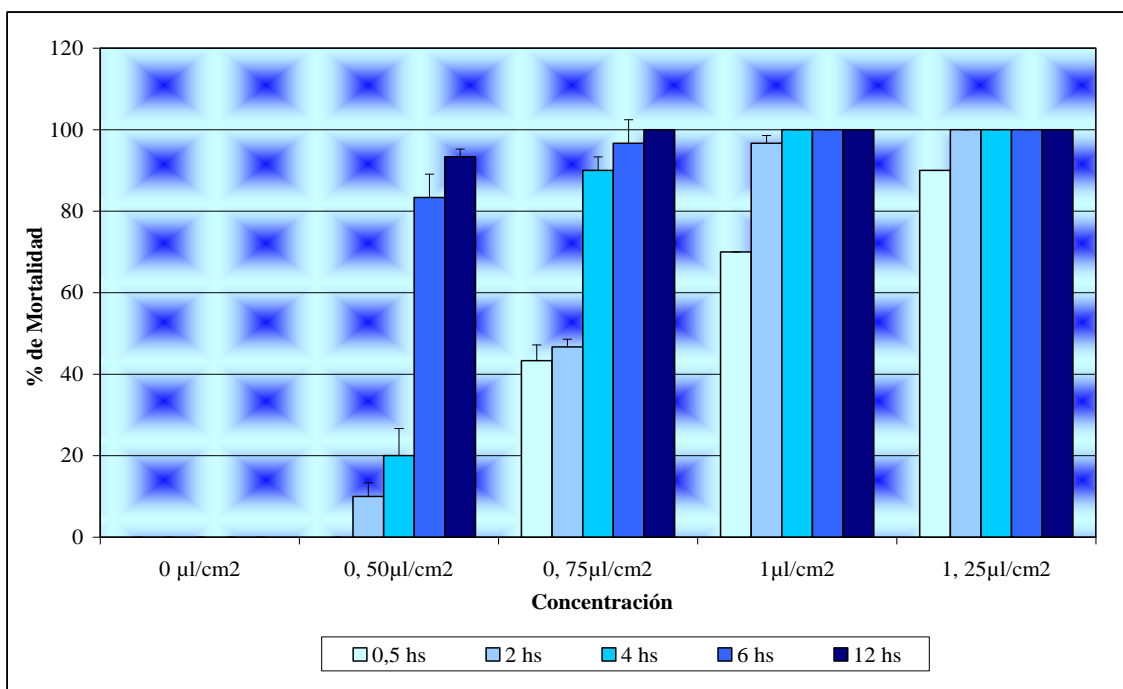
y 100% y las hojas juveniles valores de 13,33 y 100% de mortalidad en los mismos tiempos (Tabla 5 y Figuras 27, 28 y 29).

**Tabla 5.** Mortalidad Media Acumulada (%) de individuos adultos de *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición

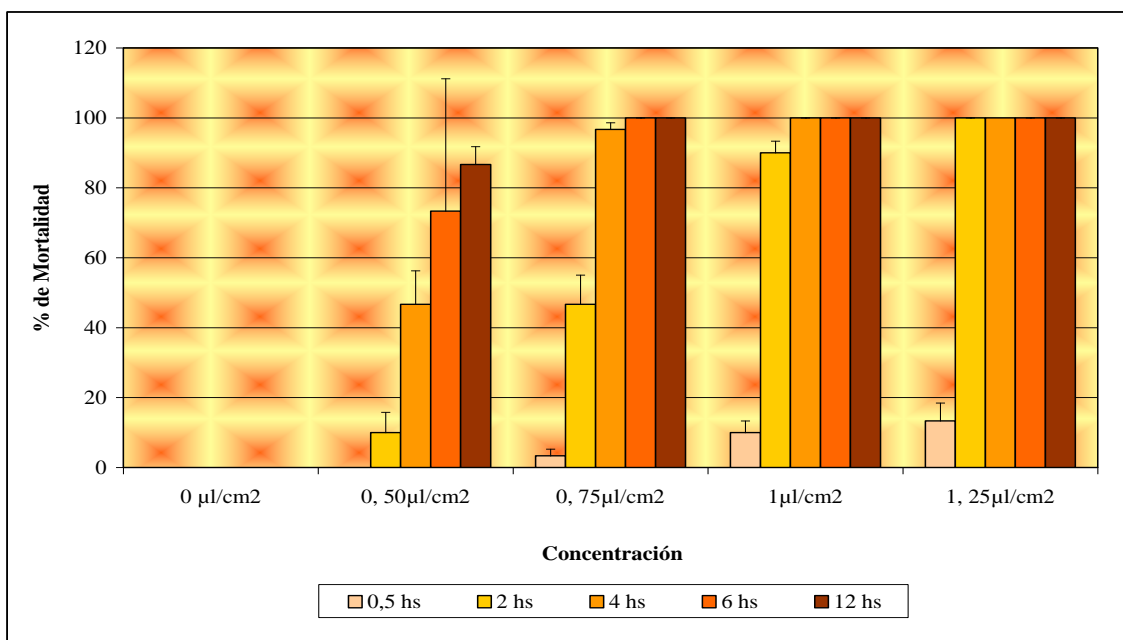
Trat/Tiempo	0.5 hs	2 hs	4 hs	6 hs	12 hs
<b>T 0 (control)</b>	0a	0a	0a	0a	0a
<b>E1 (0,50µl/cm<sup>2</sup>)</b>	0a	10abc	20abc	83,33fgh	93,33h
<b>E2 (0,75µl/cm<sup>2</sup>)</b>	43,33bcdef	46,67cdefg	90he	96,67h	100h
<b>E3 (1µl/cm<sup>2</sup>)</b>	70fgh	96,67h	100h	100h	100h
<b>E4 (1,25µl/cm<sup>2</sup>)</b>	90h	100h	100h	100h	100h
<b>Ju1 (0,50µl/cm<sup>2</sup>)</b>	0a	23,33abcd	63,33defgh	86.67gh	100h
<b>Ju2 (0,75µl/cm<sup>2</sup>)</b>	3,33ab	66,67efgh	100h	100h	100h
<b>Ju3 (1µl/cm<sup>2</sup>)</b>	6,67abcde	93,33h	100h	100h	100h
<b>Ju4 (1,25µl/cm<sup>2</sup>)</b>	26,67bc	100h	100h	100h	100h
<b>Ad1 (0,50µl/cm<sup>2</sup>)</b>	0a	10abc	6,67cdefg	73,33fgh	86.67gh
<b>Ad2 (0,75µl/cm<sup>2</sup>)</b>	3,33ab	46,67cdefg	96.67h	100h	100h
<b>Ad3 (1µl/cm<sup>2</sup>)</b>	10abc	90de	100h	100h	100h
<b>Ad4 (1,25µl/cm<sup>2</sup>)</b>	13.33abc	100e	100h	100h	100h

n=3 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey, p<0,05). T0: control; E1-E4: diferentes concentraciones de 1,8-cineol; Ju1-Ju4: diferentes concentraciones de hojas juveniles; Ad1-Ad4: diferentes concentraciones de hojas adultas.

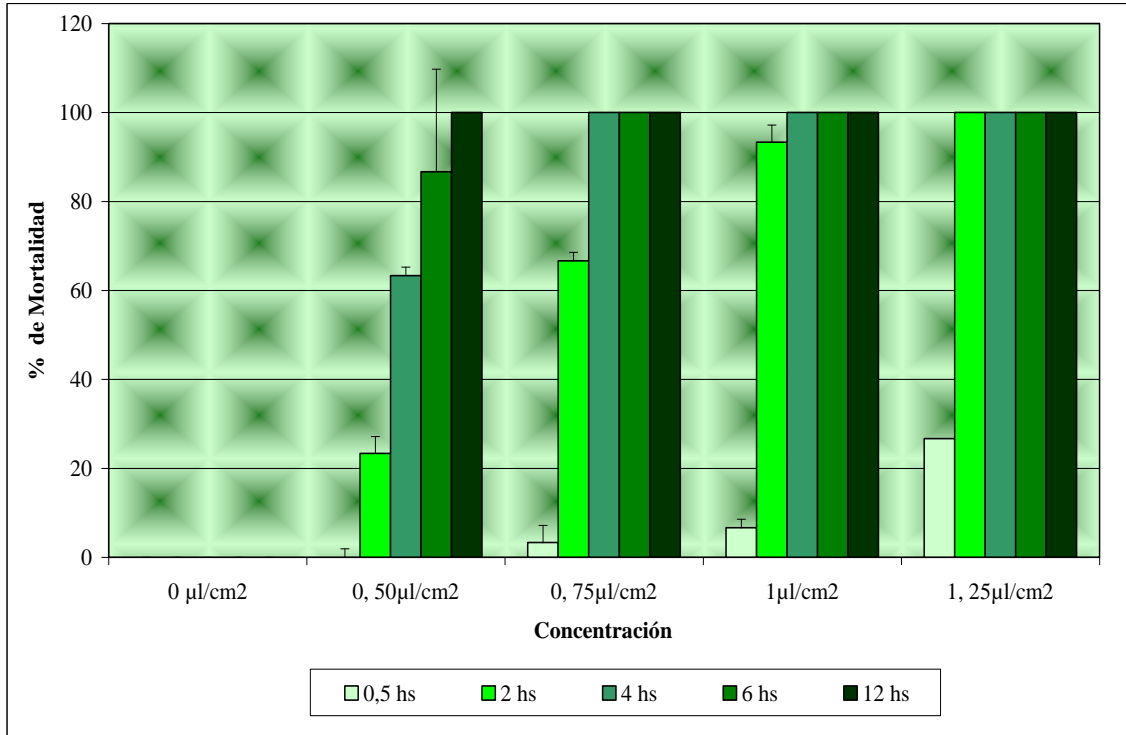
A las dos horas de iniciados los tratamientos con las concentraciones más altas probadas (1,25 µl/cm<sup>2</sup>), estos insectos ya demostraron la máxima susceptibilidad (100%) frente a la exposición a los aceites esenciales de hojas juveniles, adultas y 1,8-cineol. A las 12 hs de iniciados los ensayos fue notable la total mortalidad obtenida por los aceites esenciales de hojas juveniles, siguiéndole el 1,8-cineol (93,33%) y las hojas adultas (86,67%) (Figuras 27, 28 y 29) con la concentración más baja evaluada (0,50 µl/cm<sup>2</sup>).



**Figura 27.** Mortalidad (%) de *Tribolium confusum* tratado con diluciones de 1,8-cineol (0,50, 0,75, 1 y 1,25 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas



**Figura 28.** Mortalidad (%) de *Tribolium confusum* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* (0,50, 0,75, 1 y 1,25 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas



**Figura 29.** Mortalidad (%) de *Tribolium confusum* tratado con diluciones de aceites esenciales de hojas juveniles (0,50, 0,75, 1 y 1,25 µl/cm<sup>2</sup>) a determinadas horas

### **Determinación de la Concentración Letal (CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub>) y el Tiempo efectivo de volteo (TE<sub>50</sub> y TE<sub>95</sub>)**

Con los datos obtenidos de Mortalidad Acumulada (%) se realizó el cálculo de la concentración letal (CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub>) y el tiempo efectivo medio (TE<sub>50</sub> y TE<sub>95</sub>) para todos los insectos ensayados.

A continuación se describen los resultados para cada uno de los insectos aquí estudiados.

## *Sitophilus oryzae* “gorgojo del arroz”

Los datos que se presentan en la Tabla 6, corroboran que estos insectos son más susceptibles al 1,8-cineol, que les provoca una mortalidad del 50% de la población con una concentración de 0,91  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , mientras que para las hojas adultas y juveniles son necesarias concentraciones de 1,19 y 1,52  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  respectivamente, a las dos horas de comenzados los ensayos. En los tres tratamientos realizados no se verifican diferencias significativas.

**Tabla 6.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Sitophilus oryzae* calculada con 2 horas de exposición expresada como  $\text{CL}_{50}$  y  $\text{CL}_{95}$  y los límites de confianza

Tratamiento	$\text{CL}_{50}$ ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	$\text{CL}_{95}$ ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
Hojas juveniles	<b>1,52a</b> (1,22-2,45)	<b>5,03a</b> (2,92-17,21)	3,17 $\pm$ 0,63	0,187
Hojas adultas	<b>1,19a</b> (1,09-1,49)	<b>1,67b</b> (1,38-2,89)	11,04 $\pm$ 2,73	0,063
<b>1,8-cineol</b>	<b>0,91a</b> (0,79-1,12)	<b>2,66ab</b> (1,87-5,00)	3,52 $\pm$ 0,52	1,967

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).  $\text{CL}_{50}$ : Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ );  $\text{CL}_{95}$ : Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ); IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

Los cálculos de  $\text{TE}_{50}$  mostraron valores de 3,39 horas, 7,21 horas y 25,02 horas para 1,8-cineol, hojas juveniles y adultas, respectivamente, para producir la muerte del 50 % de la población. La misma tendencia se repitió cuando se realizó el cálculo de  $\text{TE}_{95}$ , pero con diferencias notables en los tres tratamientos con valores de 16,13, 61,27 y 241,29 horas para 1,8-cineol, hojas juveniles y adultas

respectivamente. En ambos casos se muestran diferencias significativas en los tres tratamientos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol calculada para la Concentración de (0,8  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  sobre *Sitophilus oryzae* expresada como  $\text{TE}_{50}$  y  $\text{TE}_{95}$  y los límites de confianza

Tratamiento	$\text{TE}_{50}$	$\text{TE}_{95}$	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
	(horas) (95% IC)	(horas) (95% IC)		
Hojas juveniles	<b>7,21a</b> (6,18-8,47)	<b>61,27a</b> (41,85-106,05)	1,77 $\pm$ 0,17	2,70
Hojas adultas	<b>25,02b</b> (19,47-36,05)	<b>240,89b</b> (127,30-664,50)	1,67 $\pm$ 0,20	1,08
<b>1,8-cineol</b>	<b>3,39c</b> (2,50-3,46)	<b>15,73c</b> (12,50-21,69)	2,28 $\pm$ 0,22	6,70

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).  $\text{CL}_{50}$ : Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ );  $\text{CL}_{95}$ : Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

### *Oryzaephilus surinamensis* “carcoma dentada”

A la media hora de iniciados los ensayos, estos insectos resultaron ser más susceptibles al 1,8-cineol, necesitando sólo 0,82  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de producto para alcanzar una mortalidad del 50% de la población, en cambio se precisaron concentraciones de 1,59  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  y 2,29  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  del aceite obtenido de hojas juveniles y adultas respectivamente para suprimir al 50% de la población (Tabla 8).

Transcurridas dos horas, el comportamiento fue bastante similar en los tres tratamientos ensayados, con valores más favorables para aceites obtenidos de hojas juveniles (0,64  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ), mientras que para el 1,8-cineol, y hojas adultas se necesitaron concentraciones de 0,71 y 0,75  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  respectivamente (Tabla 9).

En los dos momentos de observación analizados se observaron diferencias significativas entre el tratamiento 1,8-cineol y las hojas adultas y juveniles, pero no entre estos últimos (Tablas 8 y 9).

**Tabla 8.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis* calculada con media hora de exposición expresada como CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> y los límites de confianza

Tratamiento	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	CL <sub>95</sub> ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
Hojas juveniles	<b>1,59a</b> (1,40-2,06)	<b>2,87a</b> (2,17-5,38)	6,41 $\pm$ 1,28	1,913
Hojas adultas	<b>2,29a</b> (1,72-5,30)	<b>6,00a</b> (3,29-36,70)	3,94 $\pm$ 1	1,4
<b>1,8-cineol</b>	<b>0,82b</b> (0,58-1,04)	<b>1,27b</b> (1,01-4,16)	8,63 $\pm$ 1,48	8,77

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ); CL<sub>95</sub>: Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

**Tabla 9.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis* calculada con 2 horas de exposición expresada como CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> y los límites de confianza

Tratamiento	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	CL <sub>95</sub> ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
Hojas juveniles	<b>0,64a</b> (0,60-0,67)	<b>1,04a</b> (0,97-1,15)	7,67 $\pm$ 0,66	2,168
Hojas adultas	<b>0,75b</b> (0,72-0,78)	<b>1,10a</b> (1,04-1,19)	9,80 $\pm$ 0,79	5,46
<b>1,8-cineol</b>	<b>0,71a</b> (0,40-0,96)	<b>1,04a</b> (0,82-6,40)	10,06 $\pm$ 1,97	11,55

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ); CL<sub>95</sub>: Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

En la Tabla 10, se presentan los resultados obtenidos del tiempo efectivo medio (TE<sub>50</sub>) observándose que para el 1,8-cineol el valor resultó ser el menor de los tres ensayos realizados, logrando una mortalidad del 50% de la población a los 12,32

minutos, mientras que para los aceites de hojas juveniles y adultas se obtuvo la misma mortalidad (50%) aproximadamente a los 67 minutos cuando se probó la concentración de  $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , con diferencias significativas entre el 1,8-cineol y las hojas adultas y juveniles, pero no entre ambas.

**Tabla 10.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis* calculada para la Concentración de  $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$  expresada como  $\text{TE}_{50}$  y  $\text{TE}_{95}$  y los límites de confianza

<b>Tratamiento</b>	<b><math>\text{TE}_{50}</math> (minutos) (95% IC)</b>	<b><math>\text{TE}_{95}</math> (minutos) (95% IC)</b>	<b>Pendiente <math>\pm</math> ES</b>	<b><math>\lambda^2</math></b>
<b>Hojas juveniles</b>	<b>66,32a</b> (36,48-103)	<b>182,76a</b> (115,33-535,29)	3,73 $\pm$ 0,70	22,80
<b>Hojas adultas</b>	<b>66,67a</b> (36,38-102,09)	<b>212,34a</b> (133,55-593,16)	3,26 $\pm$ 0,578	20,80
<b>1,8-cineol</b>	<b>11,92b</b> (5,15-18,27)	<b>75,52b</b> (56,93-117,18)	2,05 $\pm$ 0,38	1,06

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).  $\text{CL}_{50}$ : Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ );  $\text{CL}_{95}$ : Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

### *Cryptolestes pusillus* “carcoma achatada”

Se observa en estos insectos que transcurridas 12 horas de exposición a estos productos (Tabla 11) requieren una concentración casi diez veces mayor de 1,8-cineol en relación a la necesaria de los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas para producir una mortalidad del 50% de la población. Así para 1,8-cineol son necesarios  $1,16\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , mientras que para hojas adultas y juveniles es suficiente la concentración de  $0,12\mu\text{l}/\text{cm}^2$  en ambos casos para alcanzar el mismo resultado.

**Tabla 11.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus* calculada con 12 horas de exposición expresada como CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> y los límites de confianza

<b>Tratamiento</b>	<b>CL<sub>50</sub></b> <b>(μl/cm<sup>2</sup>)</b> <b>(95% IC)</b>	<b>CL<sub>95</sub></b> <b>(μl/cm<sup>2</sup>)</b> <b>(95% IC)</b>	<b>Pendiente ± ES</b>	<b>λ<sup>2</sup></b>
<b>Hojas juveniles</b>	<b>0,12a</b> (0,06-0,18)	<b>0,28a</b> (0,19-0,93)	4,60 ± 0,686	6,64
<b>Hojas adultas</b>	<b>0,12a</b> (0,11-0,14)	<b>0,42a</b> (0,36-0,53)	3,06 ± 0,260	4,544
<b>1,8-cineol</b>	<b>1,16b</b> (0,90-1,80)	<b>14,05b</b> (6,09-75,56)	1,517 ± 0,264	0,149

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 (μl/cm<sup>2</sup>); Concentración Letal 50 (μl/cm<sup>2</sup>); IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

Cuando el tiempo de exposición se duplicó (24 horas) el comportamiento de la carcoma dentada, siguió la misma tendencia, como se puede apreciar en la Tabla 12. Es así que para 1,8-cineol es necesaria una concentración de 0,90 μl/cm<sup>2</sup>, mientras que para aceites de hojas adultas y juveniles se precisan concentraciones de 0,09 μl/cm<sup>2</sup> en ambos casos.

Al realizar los cálculos de TE<sub>50</sub>, se observa claramente que el 1,8-cineol produce la muerte del 50% de la población en tiempos notablemente mayores (14 horas) a diferencia de las hojas juveniles y adultas con tiempos de 1,35 y 3,07 minutos respectivamente. La misma tendencia se repitió con el cálculo de TE<sub>95</sub> con valores de 5,34 y 13,08 para hojas adultas y juveniles respectivamente y para 1,8-cineol 37,31 horas (Tabla 13).



**Tabla 12.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus* calculada con 24 horas de exposición expresada como CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> y los límites de confianza

Tratamiento	CL <sub>50</sub> (µl/cm <sup>2</sup> ) (95% IC)	CL <sub>95</sub> (µl/cm <sup>2</sup> ) (95% IC)	Pendiente ± ES	λ <sup>2</sup>
Hojas juveniles	<b>0,09a</b> (0,05-0,14)	<b>0,18a</b> (0,12-0,66)	5,11 ± 0,76	6,68
Hojas adultas	<b>0,09a</b> (0,08-0,10)	<b>0,20a</b> (0,18-0,24)	4,56 ± 0,36	1,13
<b>1,8-cineol</b>	<b>0,90b</b> (0,72-1,27)	<b>11,70b</b> (5,32-55,82)	1,47 ± 0,25	0,007

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 (µl/cm<sup>2</sup>); CL<sub>95</sub>: Concentración Letal 95 (µl/cm<sup>2</sup>) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

**Tabla 13.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol calculada para la Concentración de 0,40 µl/cm<sup>2</sup> sobre *Cryptolestes pusillus* expresada como TE<sub>50</sub> y TE<sub>95</sub> y los límites de confianza

Tratamiento	TE <sub>50</sub> (minutos) (95% IC)	TE <sub>95</sub> (minutos) (95% IC)	Pendiente ± ES	λ <sup>2</sup>
Hojas juveniles	<b>1,35a</b> (0,91-1,71)	<b>5,34a</b> (4,44-7,14)	2,75±0,41	2,03
Hojas adultas	<b>3,07a</b> (1,55-4,40)	<b>13,08b</b> (8,03-54,95)	2,61±0,45	10,17
<b>1,8-cineol</b>	<b>14b*</b> (3,15-3213,83)	<b>37,31c*</b> (41,32-76,45)	0,63±0,18	0,55

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 (µl/cm<sup>2</sup>); CL<sub>95</sub>: Concentración Letal 95 (µl/cm<sup>2</sup>) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar. \*Valor expresado en horas

### *Tribolium confusum* “tribolio confuso”

Se observó una mayor susceptibilidad al 1,8-cineol siendo necesarias dosis de 0,84  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  para alcanzar una mortalidad del 50%, mientras para los aceites obtenidos de hojas adultas se requieren concentraciones de 1,61  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , mostrando diferencias notables con las hojas juveniles (2,29  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a la media hora de exposición al producto utilizado (Tabla 14).

**Tabla 14.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum* calculada con 0,5 horas de exposición (desde el comienzo del ensayo) expresada como  $\text{CL}_{50}$  y  $\text{CL}_{95}$  y los límites de confianza

Tratamiento	$\text{CL}_{50}$ ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	$\text{CL}_{95}$ ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
Hojas juveniles	<b>2,29a</b> (1,72-5,30)	<b>6,00</b> (3,29-36,70)	3,93 $\pm$ 1,01	1,47
Hojas adultas	<b>1,61a</b> (1,42-2,12)	<b>2,97</b> 2,12-5,77	6,19 $\pm$ 1,24	2,43
<b>1,8-cineol</b>	<b>0,84b</b> (0,62-1,07)	<b>1,34</b> (1,06-4,08)	8,14 $\pm$ 1,34	7,84

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).  $\text{CL}_{50}$ : Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ );  $\text{CL}_{95}$ : Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

A las dos horas de exposición este insecto mostró una susceptibilidad bastante similar en los tres tratamientos probados, sin diferencias significativas donde se resalta el comportamiento de los aceites esenciales de hojas juveniles que produjo una mortalidad del 50% de la población con una concentración de 0,64  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (Tabla 15).

**Tabla 15.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum* calculada con 2 horas de exposición (desde el comienzo del ensayo) expresada como CL<sub>50</sub> y CL<sub>95</sub> y los límites de confianza

Tratamiento	CL <sub>50</sub> ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	CL <sub>95</sub> ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (95% IC)	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
Hojas juveniles	<b>0,64a</b> (0,60- 0,67)	<b>1,04</b> (0,97-1,14)	7,67 $\pm$ 0,66	2,16
Hojas adultas	<b>0,73a</b> (0,70-0,76)	<b>1,11</b> (1,04-1,20)	9,07 $\pm$ 0,73	5,44
<b>1,8-cineol</b>	<b>0,71a</b> (0,40-0,96)	<b>1,04</b> (0,83-6,40)	10,06 $\pm$ 1,97	11,55

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ); CL<sub>95</sub>: Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

**Tabla 16.** Actividad de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol contra *Tribolium confusum*, calculada para la Concentración de  $1\mu\text{l}/\text{cm}^2$  expresada como TE<sub>50</sub> y TE<sub>95</sub> y los límites de confianza

Tratamiento	TE <sub>50</sub> (minutos) (95% IC)	TE <sub>95</sub> (minutos) (95% IC)	Pendiente $\pm$ ES	$\lambda^2$
Hojas juveniles	<b>59,77a</b> (52,75-67,57)	<b>128,24a</b> (109,80-156,27)	4,96 $\pm$ 0,42	0,16
Hojas adultas	<b>59,41a</b> (52,28-67,22)	<b>140,86a</b> (119,96-172,76)	4,38 $\pm$ 0,36	0,55
<b>1,8-cineol</b>	<b>18,64b</b> (11,85-24,49)	<b>85,83a</b> (66,63-128,76)	2,48 $\pm$ 0,39	0,64

Números en la misma columna seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). CL<sub>50</sub>: Concentración Letal 50 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ); CL<sub>95</sub>: Concentración Letal 95 ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ); IC 95%: Intervalo de Confianza 95 %; ES: Error estandar

El Tiempo efectivo medio (TE<sub>50</sub>) calculado para una concentración de 1µl/cm<sup>2</sup> correspondiente a 1,8-cineol es menor, logrando una mortalidad del 50% de la población a los 19 minutos de exposición. No sucede lo mismo con los aceites de hojas juveniles y adultas que lograron el 50% de mortalidad aproximadamente a la hora del inicio de los ensayos (Tabla 16).

## DISCUSION

En estas investigaciones se evaluó la acción fumigante de *E. globulus* sobre cuatro importantes especies-plaga que producen daño sobre los granos almacenados y sus subproductos.

Numerosos autores han informado sobre la actividad insecticida de aceites esenciales extraídos de diferentes especies de plantas (Saaya *et al.*, 1997; Isman, 2000; Tapandjou *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006). Dichas sustancias pueden actuar como tóxicas penetrando a través de la cutícula (efecto por contacto), de la vía respiratoria (efecto fumigante) o del aparato digestivo (por ingestión).

En los ensayos realizados el 1,8-cineol, componente principal de los aceites esenciales extraídos de las hojas adultas y juveniles de *E. globulus* demostró poseer una mayor actividad biológica en correspondencia con lo reportado por otros investigadores que corroboraron que los aceites esenciales y sus componentes, en especial los monoterpenos, tienen efectos tóxicos comparables a los del bromuro de metilo sobre insectos-plaga de granos almacenados (Isman, 2000; Tunc *et al.*, 2000; Weaver y Subramanyam, 2000; Lee *et al.*, 2001b; Shaaya *et al.*, 2003; Rajendran y Sriranjini, 2008). Estas propiedades son bien conocidas debido a componentes como 1,8-cineol, citronelal, citronelol, acetato de citronelilo, *p*-cymeno, eucamalol, limoneno, entre otros (Barton, 2000; Cimanga *et al.*, 2002; Batish *et al.*, 2006; Brooker y Kleinig, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Se comprobó la mayor susceptibilidad de tres de las cuatro especies aquí ensayadas a la aplicación de 1,8-cineol. Resultando valores de 90% de mortalidad

para *O. surinamensis* y *T. confusum* y 40% para *S. oryzae* a la mayor concentración probada ( $1,25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) y al menor tiempo de exposición (media hora).

Tapandjou *et al.* (2005) demostraron que los aceites esenciales de *E. saligna* produjeron una alta mortalidad (100%) sobre *T. confusum* cuando se realizaron ensayos de toxicidad por contacto mediante impregnación en papeles de filtro con valores de  $\text{CL}_{50}=0,48 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En los ensayos realizados con *E. globulus* utilizando el mismo método para la misma especie se obtuvieron valores de  $\text{CL}_{50}=0,73 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  y  $0,64 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas adultas y juveniles respectivamente. Los mismos autores lograron para *S. oryzae* valores de  $\text{CL}_{50}=0,36 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  mientras que en los ensayos aquí realizados los valores de  $\text{CL}_{50}$  fueron:  $1,52$  y  $1,19 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  para hojas juveniles y adultas respectivamente. Estos resultados corroboran una vez más las diferencias debidas a dos especies del género *Eucalyptus*.

A las dos horas de comenzados los ensayos se obtuvo la máxima mortalidad (100%) en *T. confusum* y *O. surinamensis* con una concentración de  $1,25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , mientras que a las 24 hs con una menor concentración ( $0,8 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) se produjo en *S. oryzae* igual mortalidad (100%), esto demuestra que la acción fumigante de los aceites esenciales y sus principales constituyentes varía con la especie de insecto, la concentración del aceite y el tiempo de exposición, por lo que muestran una alta toxicidad específica, siendo altamente dependientes de la dosis y del tiempo de exposición, conclusiones que confirmaron otros autores (Ogendo *et al.*, 2008).

## CAPITULO IV

# ACTIVIDAD REPELENTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* SOBRE *TRIBOLIUM CONFUSUM*, *ORYZAEPHILUS SURINAMENSIS*, *CRYPTOLESTES PUSILLUS* Y *SITOPHILUS ORYZAE*

### INTRODUCCION

La selección de la planta hospedera es un factor crítico para la supervivencia y dinámica poblacional de las especies. Comienza con la recepción de estímulos ambientales (visuales, táctiles y olfativos), que puede atraer o repeler al organismo receptor, limitando las posibilidades de encontrar alimento.

Dentro de los factores visuales para elegir una planta están el color, la forma y el tamaño; otros factores pueden ser la química superficial de las hojas y quizás sus características físicas (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

El factor que quizás influya más en la selección son los compuestos volátiles emitidos por las plantas. El reconocimiento del hospedero por sus compuestos volátiles puede deberse a un solo compuesto o bien a una mezcla específica, que son percibidos por los órganos receptores de los insectos y procesados por el sistema nervioso central. Hay diversas teorías acerca de la localización de hospederos mediante volátiles (Finch y Collier, 2000); una de las que tiene mayor aceptación indica que la localización se da por el reconocimiento de mezclas de compuestos en diferentes proporciones, más que por el reconocimiento de un compuesto específico (Bruce *et al.*, 2005).

Los insectos pueden localizar las plantas apropiadas a través de la detección de la señal en un rango de concentraciones, a una distancia dada y la diferenciación de tal señal en un fondo olfativo ruidoso (otras emisiones), y por la codificación y recuperación de la información para confirmar que la planta sea la correcta (Ragusso, 2001). Por la importancia de las señales olfativas, más que un único factor determinante, la elección de la planta se debe a la combinación de varios factores (Bernays y Chapman, 1994).

Los insectos poseen un sistema químico-sensorial que detecta una amplia gama de productos químicos volátiles y solubles que son importantes para encontrar y evaluar la calidad del alimento, además de identificar compañeros de apareamiento y sitios de oviposición (Navarro-Silva *et al.*, 2009). Los receptores de las neuronas químico-sensoriales están presentes en pelos sensoriales especializados llamados sensilas. En muchos insectos estas sensilas están presentes de a pares en órganos olfativos en la cabeza, las antenas y los palpos maxilares (Dethier *et al.*, 1960; Koul y Dhaliwal, 2001; Mordue Luntz, 2003; Dahanukar *et al.*, 2005; Gillot, 2005; Hallem *et al.*, 2006).

Se consideran repelentes a una extensa variedad de sustancias químicas, desde compuestos volátiles activos en la fase gaseosa hasta compuestos químicos persistentes (Alzogaray *et al.*, 2000). Están presentes en las plantas previniendo el daño ocasionado por los insectos al volverlas poco atractivas, de mal sabor o repulsivas (Boeke *et al.*, 2004).

Estas sustancias que, en su contexto natural, llevan señales de información o químicos para una determinada interacción entre organismos, desencadenan un comportamiento o una respuesta fisiológica en el individuo receptor, lo que provoca que los insectos se dirijan en sentido contrario a las fuentes de alimentación (Fields *et al.*, 2001; Vilela y Della Lucía, 2001).

Entre 1952 y 1962 se testearon más de 11.000 compuestos de los cuales sólo unos pocos resultaron efectivos contra un amplio rango de insectos. Entre ellos se puede mencionar al DEET (N,N-dietil-*meta* toluamida), que permanece actualmente como el más efectivo y a pesar de sus efectos adversos sobre la salud del hombre no

se ha encontrado aún un sustituto que otorgue el mismo grado de protección y la efectividad repelente frente a artrópodos hematófagos (Nerio *et al.*, 2009).

Durante los últimos años ha aumentado notablemente el uso de sustancias repelentes en los sitios donde se almacenan los granos. Estos productos se emplean como bandas protectoras rodeando los silos a fin de evitar una invasión de insectos (Fields *et al.*, 2001), o como preventivos tratando las estructuras de almacenaje antes de guardar el grano fresco (Cox, 2004). Los serios inconvenientes relacionados con la salud del hombre y del planeta generados por el uso intensivo y extensivo de estos productos (Nerio *et al.*, 2010) han evidenciado la necesidad de encontrar sustancias repelentes efectivas y persistentes, más amigables con el hombre y su medioambiente.

Se intenta obtener repelentes naturales que pueden ser comparables con los sintéticos, éstos generalmente son más duraderos en un plazo mayor que los naturales los cuales dependen exclusivamente de su volatibilidad (Fradin y Day, 2002; Nerio *et al.*, 2010), sin embargo han crecido debido al mal uso de los insecticidas sintéticos y a los residuos tóxicos que quedan en los alimentos (Cox, 2004).

Los aceites esenciales y sus constituyentes son conocidos por ejercer repelencia sobre plagas de granos almacenados, sin embargo la utilización del material activo en fase de vapor resulta menos eficaz, ya que parte se puede perder por volatilización. Esta situación es particularmente crítica en el caso de granos almacenados que están bajo amenaza continua de infestación de insectos, que necesitan períodos más largos de protección, con lo que debería aplicarse material adicional.

Numerosos autores en los últimos años han estudiado las propiedades repelentes de los aceites esenciales extraídos de plantas y sus componentes principales sobre plagas de granos almacenados (Obeng-Ofori *et al.*, 1998; Adler *et al.*, 2000; Padín *et al.*, 2000; Pascual-Villalobos *et al.*, 2004; Sahaf y Moharramipour, 2007; Ishii, *et al.*, 2010; Mondal y Khalequzzaman, 2010; Nerio *et al.*, 2010).

García *et al.* (2005a, b) registraron repelencia de aceites esenciales de *Baccharis salicifolia* (Ruiz y Pavon) Pers (Asteraceae), sobre *T. castaneum* y *C. sempervirens* (Linneo) (Cupressaceae) y de *E. saligna* Sm. (Myrtaceae) sobre *T.*



*confusum* y *S. oryzae*. Un año más tarde, Stefanazzi *et al.* (2006) comprobaron actividad repelente de aceites esenciales de *Tagetes terniflora* Linneo (Asteraceae) en *T. castaneum*, mientras que *Artemisia vulgaris* Linneo (Asteraceae) mostró una total repelencia (100%) sobre individuos adultos de la misma especie en una concentración de 0,6 µl/ml (v/v) (Wang *et al.*, 2006).

Descamps (2007) describió el efecto repelente de aceites esenciales de hojas de *Schinus molle* var. *Areira* (Linneo) (Anacardiaceae) sobre larvas de *T. castaneum*. Los individuos adultos de la misma especie fueron afectados por el efecto repelente de esencias de *Trachyspermum ammi* (Linneo) (Apiaceae), *Anethum graveolens* (Linneo) (Apiaceae) y *Nigella sativa* (Linneo) (Ranunculaceae) (Ngamo *et al.*, 2007).

Los aceites esenciales de hojas de *Ocimum grattissimum* mostraron moderada repelencia frente a *S. zeamais* (Asawalam *et al.*, 2008). Sin embargo la misma especie (Ogendo *et al.*, 2008), demostró repelencia sobre *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *R. dominica* y *Callosobruchus chinensis* (Linneo) (Bruchidae).

Benzi *et al.* (2009) que también trabajaron con *S. molle* (Linneo) comprobaron actividad repelente de los aceites esenciales obtenidos de sus hojas sobre *S. oryzae*, pero no de los frutos. En el mismo año, Ko Ko *et al.* (2009), registró una fuerte repelencia de los frutos de *Litsea cubeba* (Lours.) Pers. (Lauraceae) sobre *S. zeamais* y *T. castaneum* incluso a bajas concentraciones.

Kheradmand *et al.* (2010) verificó actividad repelente de *Simmnondansia chinensis* (Simmnondansiaceae) sobre *O. surinamensis* y *C. maculatus* (Fabricius) (Bruchidae).

*Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle (Simaroubaceae) mostró una significativa repelencia sobre individuos adultos de *T. castaneum*, *O. surinamensis*, *S. oryzae* y *Liposcelis paeta* (Pearman) (Psocoptera: Liposcelididae) (Lu y Wu, 2010). Los aceites esenciales de *T. terniflora* (Linneo) (Asteraceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapfy (Poaceae), *Elyonorus muticus* (Humb. & Bonpl & Wild.) (Poaceae) en individuos adultos y larvas de *T. castaneum* y *S. oryzae* a diferentes concentraciones mostraron repelencia con valores de IR (Índice de Repelencia) que oscilaron entre 66% y 96% (Stefanazzi *et al.*, 2010). En el mismo año, (Zapata y Smagghe, 2010) demostraron actividad repelente de los aceites esenciales extraídos de hojas de

*Laurellia sempervirens* (Ruiz & Pavon) Tul (Atherospermataceae) y *Drimys winteri* (Forster & Forster) (Winteraceae) con IR de 93,34% y 96,67% respectivamente, con una concentración de 0,032  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) a las 4 hs de aplicado el producto sobre *T. castaneum*.

Se observó alta actividad repelente de los aceites esenciales de *Schzygium aromaticum* (Linneo) (Myrtaceae) sobre *T. castaneum* (90%) y *S. oryzae* (90%), mientras que *Citrus reticulata* var. *chrysocarpa* Tanaka (Rutaceae) mostró valores que oscilaron entre 78 y 80% sobre los dos insectos mencionados (Mishra y Tripathi, 2011).

## **OBJETIVO**

Evaluar la actividad repelente y/o atractante de los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum*, *Oryzaephilus surinamensis* y *Cryptolestes pusillus*

## **HIPOTESIS**

Los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y su principal componente: 1,8-cineol producen efectos repelentes sobre individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum*, *Oryzaephilus surinamensis* y *Cryptolestes pusillus*

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Actividad repelente**

La repelencia se evaluó siguiendo el método descrito por Xie *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se utilizó un dispositivo de vidrio de forma rectangular

(7 x 7 x 40 cm), la tapa superior presenta tres aberturas (7 x 7 cm) dispuestas una en la parte central y las otras dos en cada extremo (Figura 30).



**Figura 30.** Dispositivo utilizado para evaluar actividad repelente

En cada uno de estos extremos se colocó un cuadrado de papel de filtro de 16 cm<sup>2</sup>, en uno de ellos se le agregó diluciones de cada una de las esencias a ensayar y en el otro se utilizó solvente (acetona) como control. Se probaron: 5, 10 y 20 µl. Se colocaron 20 insectos adultos en la abertura central. Cada 10 minutos, se procedió al conteo de individuos hallados en el área tratada y en el control. Los recuentos se efectuaron durante 50 minutos, aquellos individuos encontrados en el sector medio del recipiente, es decir fuera del control y del tratamiento, no se tomaron en cuenta. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento. Se calculó el Porcentaje de Repelencia (%) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Repelencia (\%)} = \text{PR} = [(N_c - N_t) / (N_c + N_t)] \times 100$$

donde N<sub>c</sub> y N<sub>t</sub> son el número de insectos en el área control y área tratada respectivamente (Hassanali *et al.*, 1990). Valores positivos de PR indican repelencia y valores negativos atracción (Pascual Villalobos *et al.*, 2004).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) factorial con arreglo de medidas repetidas y para las comparaciones entre medias se aplicó el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) con interacción triple. Al valor medio

obtenido para cada concentración y tiempo analizado se le asignó una clase de repelencia cuyos valores varían de 0 a V (Juliana y Su, 1983). Así:

Clase 0 (PR < 0.1%)

Clase I (PR = 0.1-20%)

Clase II (PR = 20.1-40%)

Clase III (PR = 40.1-60%)

Clase IV (PR =60.1-80%)

Clase V (PR =80.1-100%)

## RESULTADOS

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza factorial con arreglo de medidas repetidas realizados para los cuatro insectos probados se verificaron diferencias significativas en uno o los dos factores principales tratamiento y concentración, y el tiempo de observación (R1), y sólo resultó significativa la interacción entre los dos factores principales para la especie *C. pusillus* (anexo II, Tablas V, VI, VII y VIII). Para la comparación entre medias se aplicó el test de Tukey (<0,05), a los factores o interacción que resultaron significativos en cada caso.

Los resultados obtenidos de la actividad repelente de los aceites esenciales extraídos de hojas adultas (**Ad**) y juveniles (**Ju**) de *E. globulus* y 1,8-cineol (**E**) sobre los cuatro insectos probados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*, se describen a continuación:

### ***Sitophilus oryzae* “gorgojo del arroz”**

Los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza factorial con arreglo de medidas repetidas para la variable repelencia (%) (PR) mostraron diferencias significativas entre los factores: cantidad (5, 10 y 20 µl) y tiempo (R1), pero no

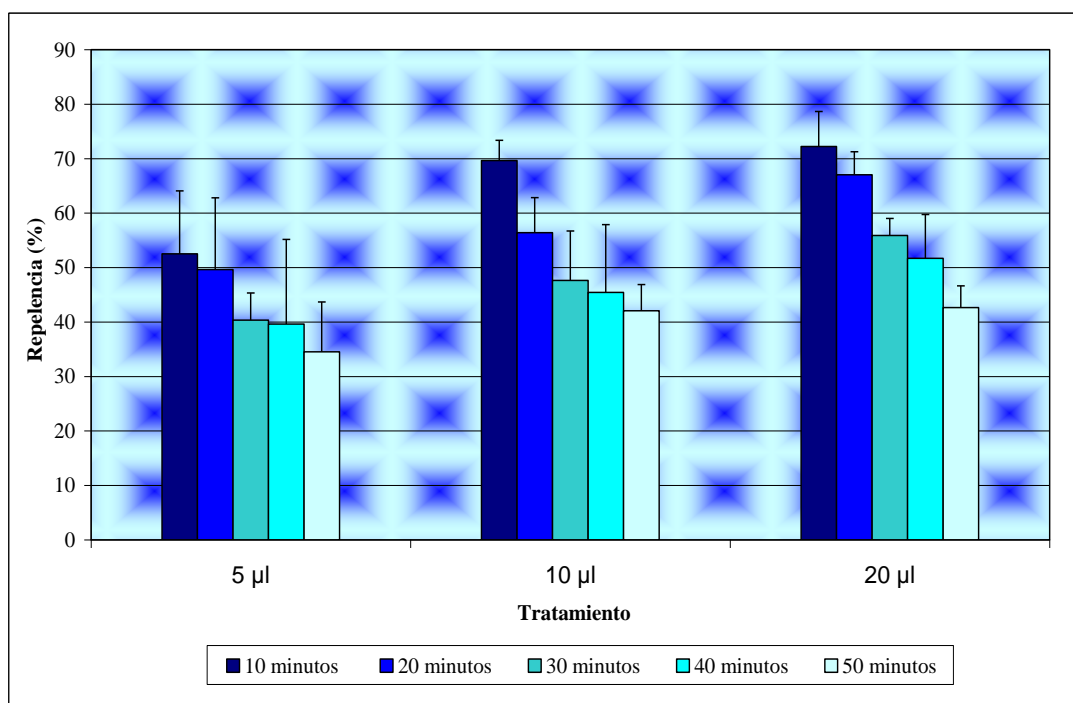
difirió entre los tratamientos (hojas juveniles, adultas y 1,8-cineol) y sus respectivas interacciones (anexo II, Tabla V). Para evaluar la diferencia entre medias de los factores que resultaron significativos se aplicó el test de Tukey (<0,05) (anexo II, Tablas IX y X).

Los valores de repelencia obtenidos presentaron una relación directa con el incremento de la cantidad utilizada, con valores de 61%, 45% y 37% para 20, 10 y 5  $\mu$ l, respectivamente, con diferencias significativas entre la mayor cantidad de esencia ensayada (20  $\mu$ l) y las dos más bajas (5 y 10  $\mu$ l) (anexo II, Tabla IX). La repelencia media (%) disminuye a medida que el tiempo de exposición a las esencias y 1,8-cineol aumentan, resultando máxima a los 10 minutos y mínima a los 50 minutos con PR (%) de 58% y 34% respectivamente, con diferencias significativas entre estos tiempos (anexo II, Tabla X).

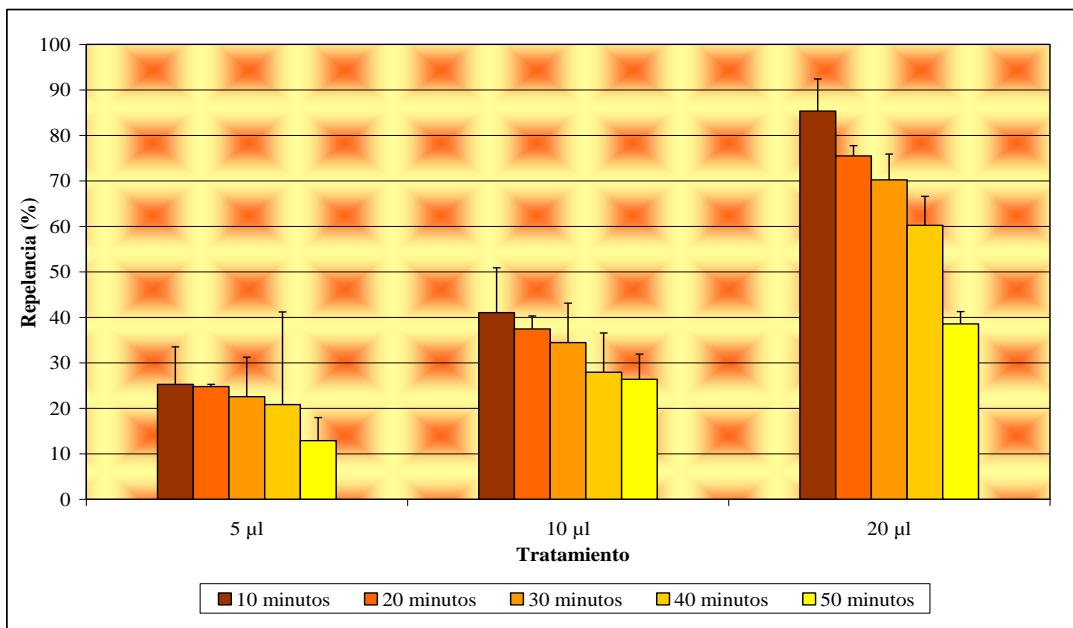
**Tabla 17.** Actividad Repelente (%) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Sitophilus oryzae* en función del tiempo de exposición

<b>Trat./Cant.</b> <b>(<math>\mu</math>l)</b>	<b>10 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>30 minutos</b>	<b>40 minutos</b>	<b>50 minutos</b>
<b>1,8-cineol</b>					
<b>5</b>	53	50	40	40	35
<b>10</b>	70	57	48	45	42
<b>20</b>	72	67	56	52	43
<b>H. adultas</b>					
<b>5</b>	25	34	23	21	13
<b>10</b>	41	37	34	37	26
<b>20</b>	85	75	70	60	39
<b>H. juveniles</b>					
<b>5</b>	52	50	47	39	30
<b>10</b>	56	52	51	46	31
<b>20</b>	66	63	63	56	46

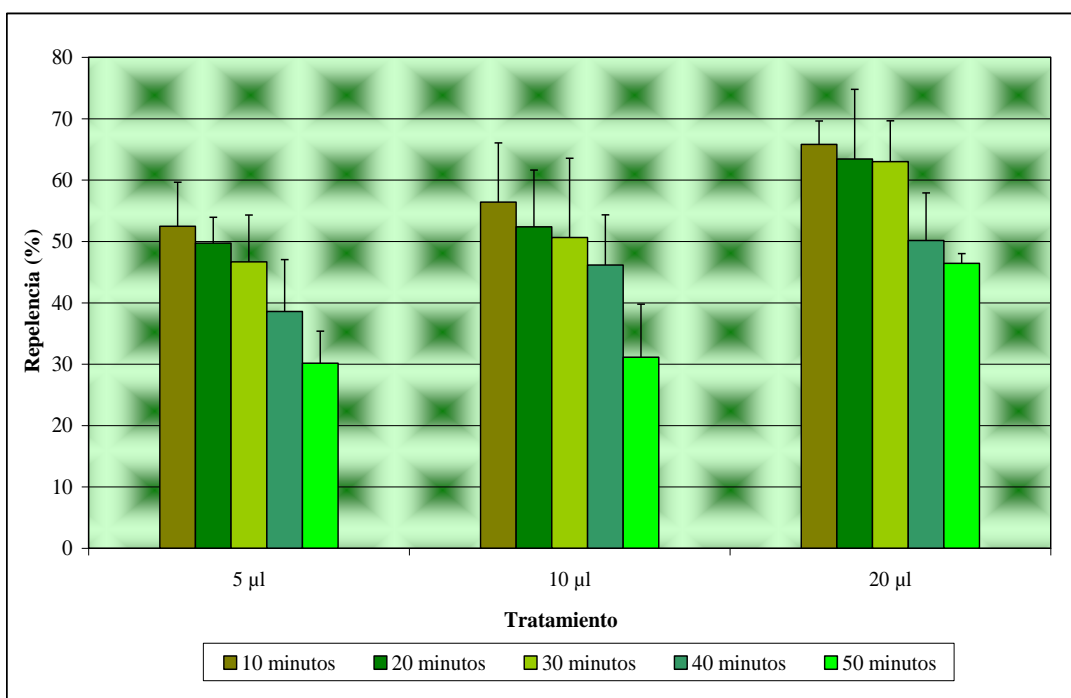
Los resultados de cada uno de los tratamientos evaluados con sus respectivas cantidades en función del tiempo de exposición, se resumen en la Tabla 17 y Figuras 31, 32 y 33, así a los 10 minutos de comenzados los ensayos se lograron los valores de repelencia (%) más altos con las cantidades más altas probadas (20  $\mu$ l), con valores de 85, 72 y 66% para las hojas adultas, 1,8-cineol y hojas juveniles respectivamente. Luego de ese lapso los valores de repelencia (%) fueron disminuyendo con valores mínimos de 46, 43 y 39% para las hojas juveniles, 1,8-cineol y hojas adultas respectivamente a los 50 minutos de comenzados los ensayos con 20  $\mu$ l de esencia aplicada.



**Figura 31.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Sitophilus oryzae* en función del tiempo de exposición



**Figura 32.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Sitophilus oryzae* en función del tiempo de exposición



**Figura 33.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Sitophilus oryzae* en función del tiempo de exposición

## ***Oryzaephilus surinamensis* “carcoma dentada”**

En la Tabla VI, anexo II se exponen los resultados del ANOVA con arreglo de medidas repetidas, en la misma se pueden observar diferencias significativas entre los factores principales: tratamiento (hojas juveniles y adultas y 1,8-cineol), cantidad (5, 10 y 20  $\mu$ l) y tiempo (R1), no así entre las respectivas interacciones. En la comparación entre medias de los PR (%) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos realizados con hojas juveniles y 1,8-cineol, pero ambas sí difieren con las hojas adultas (anexo II, Tabla XI), con valores de 48, 34 y 33% para 1,8-cineol, hojas juveniles y adultas. Las diferentes cantidades ensayadas exhibieron diferencias significativas entre las cantidades más altas utilizadas (10 y 20  $\mu$ l) y la más baja (5  $\mu$ l), como se puede observar en la Tabla XII, anexo II).

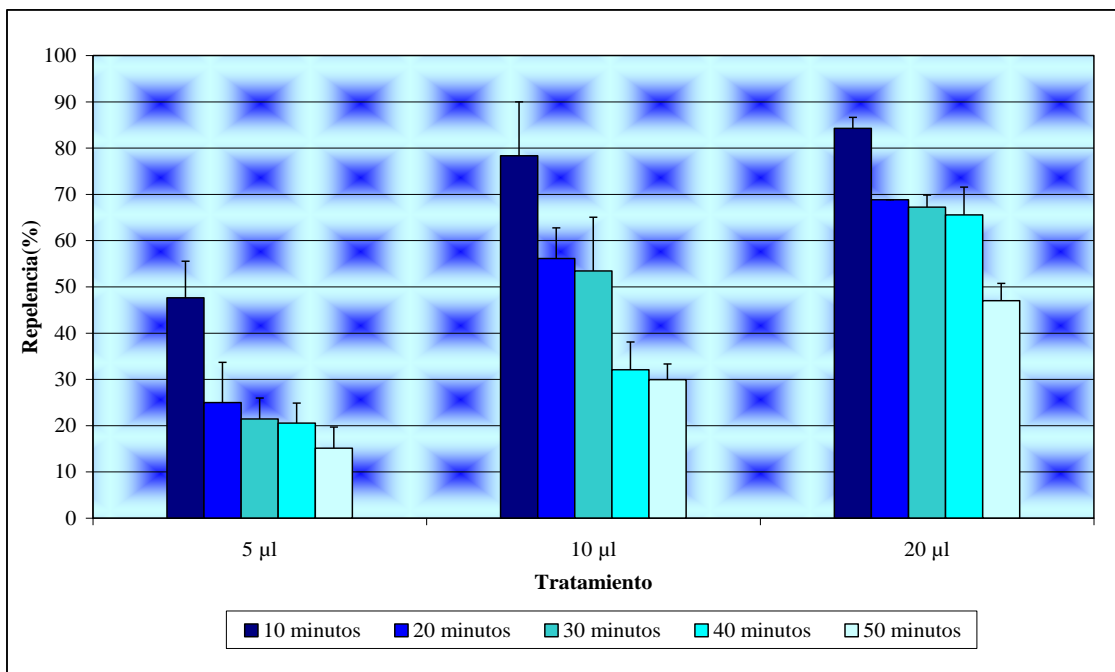
En la Tabla XIII, anexo II se advierte que los valores medios de repelencia disminuyen con el tiempo de exposición con valores máximos (54%) a los 10 minutos y mínimos a los 50 minutos (30%), mostrando diferencias significativas entre la primera observación (10 minutos) y el resto de las observaciones realizadas.

Cada uno de los tratamientos ensayados con sus respectivas cantidades a través del tiempo de exposición se exponen en la Tabla 18 y Figuras 31, 32 y 33, el máximo índice de repelencia (84%) se alcanzó a los 10 minutos con 1,8-cineol con la cantidad de esencia más alta probada (20  $\mu$ l), le siguieron las esencias obtenidas de hojas adultas con un PR de 80% al mismo tiempo y con la misma concentración.

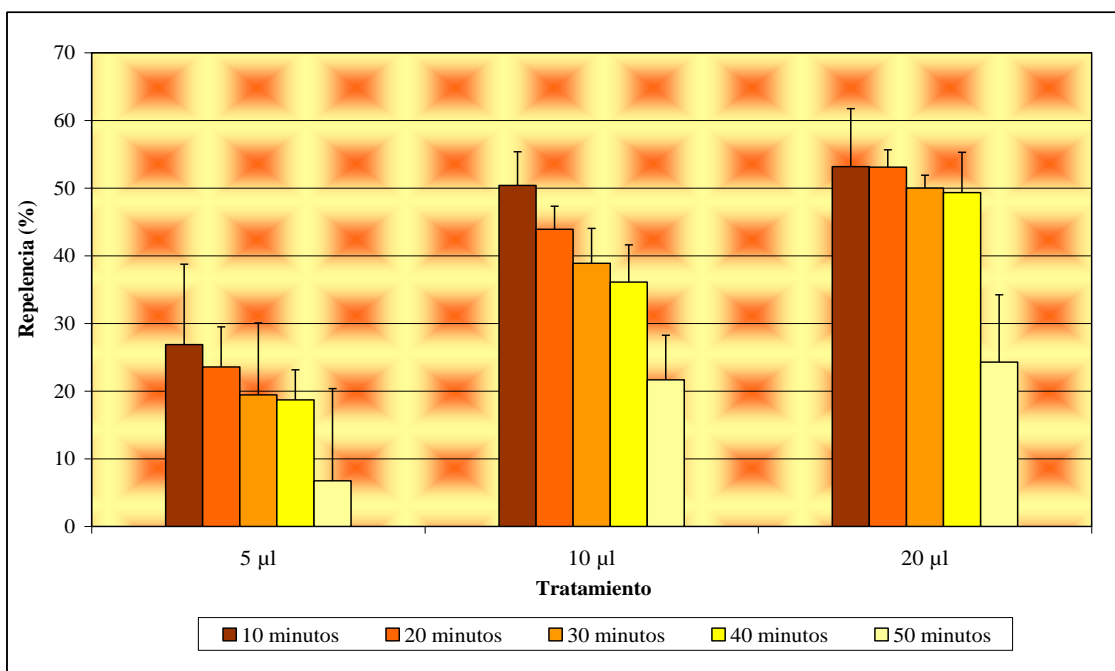


**Tabla 18.** Actividad Repelente (%) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus glubulus* y 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición

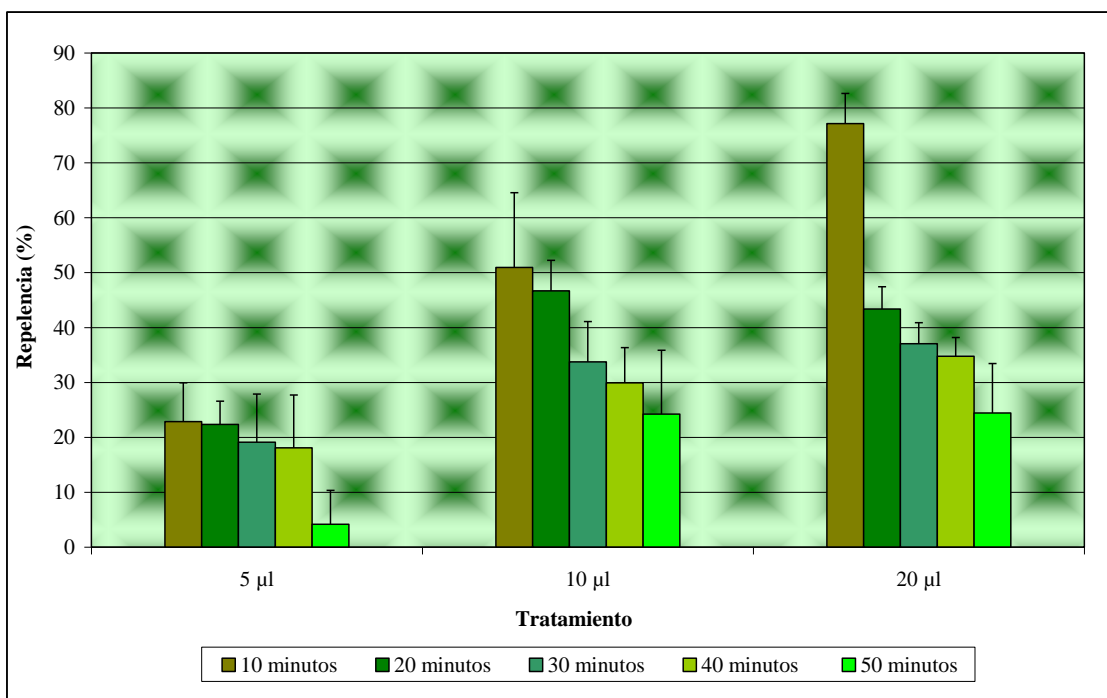
<b>Trat. /Cant.</b> <b>(<math>\mu</math>l)</b>	<b>10 minutos</b>	<b>20 minutos</b>	<b>30 minutos</b>	<b>40 minutos</b>	<b>50 minutos</b>
<b>1,8-cineol</b>					
<b>5</b>	48	25	21	21	15
<b>10</b>	78	56	53	47	32
<b>20</b>	84	69	67	66	47
<b>H. adultas</b>					
<b>5</b>	23	21	19	18	4
<b>10</b>	51	34	33	30	24
<b>20</b>	80	77	43	35	24
<b>H. juveniles</b>					
<b>5</b>	27	24	20	19	7
<b>10</b>	50	45	39	36	33
<b>20</b>	53	53	51	50	49



**Figura 34.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición



**Figura 35.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición



**Figura 36.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Oryzaephilus surinamensis* en función del tiempo de exposición

### *Cryptolestes pusillus* “carcoma achatada”

El análisis de varianza factorial con arreglo de medidas repetidas realizado para esta especie para la variable repelencia (%) (PR) presentaron diferencias significativas entre los factores principales: tratamiento (hojas adultas, juveniles y 1,8-cineol) y cantidad (5, 10 y 20 µl) y la interacción entre ambos, y las medidas repetidas (R1), no así con las correspondientes interacciones (anexo II, Tabla VII).

En la Tabla XIV (ver anexo II) se muestran los resultados de la comparación entre medias de la Repelencia (PR%) en los tiempos de observación, se puede observar que los valores medios disminuyen con el tiempo con valores máximos (70%) a los 10 minutos y mínimos a los 50 minutos (43%), con diferencias significativas entre estos tiempos. Los valores más altos de repelencia se lograron con el incremento de la cantidad de producto utilizado en todos los tratamientos ensayados (hojas juveniles y adultas y 1,8-cineol). Para la cantidad más alta de

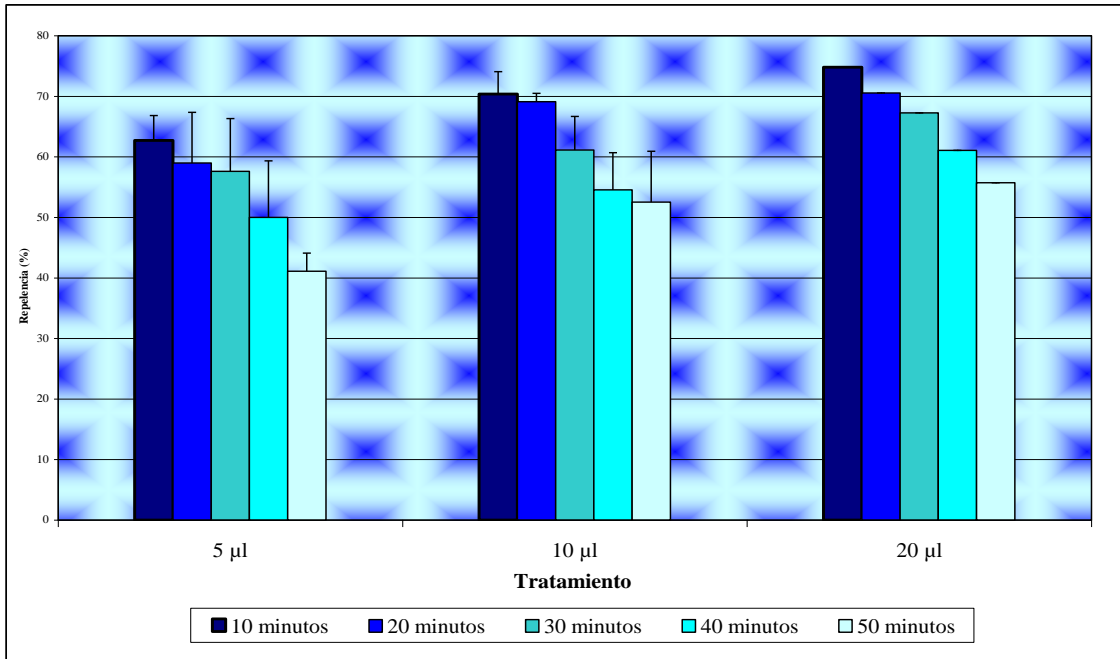
producto utilizado (20µl) se obtuvieron valores promedios de 76, 67 y 66% para las hojas adultas, juveniles y 1,8-cineol, respectivamente. Sólo se verificaron diferencias significativas para el tratamiento de hojas juveniles con 5 µl y hojas adultas con 20µl (Tabla XV, anexo II).

En la Tabla 19 y Figuras 37, 38 y 39) se muestra la actividad repelente de esta especie en función del tiempo de exposición. La carcoma achatada se comportó de manera diferente a los dos insectos anteriores con valores de índice de repelencia más elevados: 93, 80 y 75% para los aceites esenciales de hojas adultas, juveniles y 1,8-cineol respectivamente a los 10 minutos de comenzado el ensayo con 20 µl.

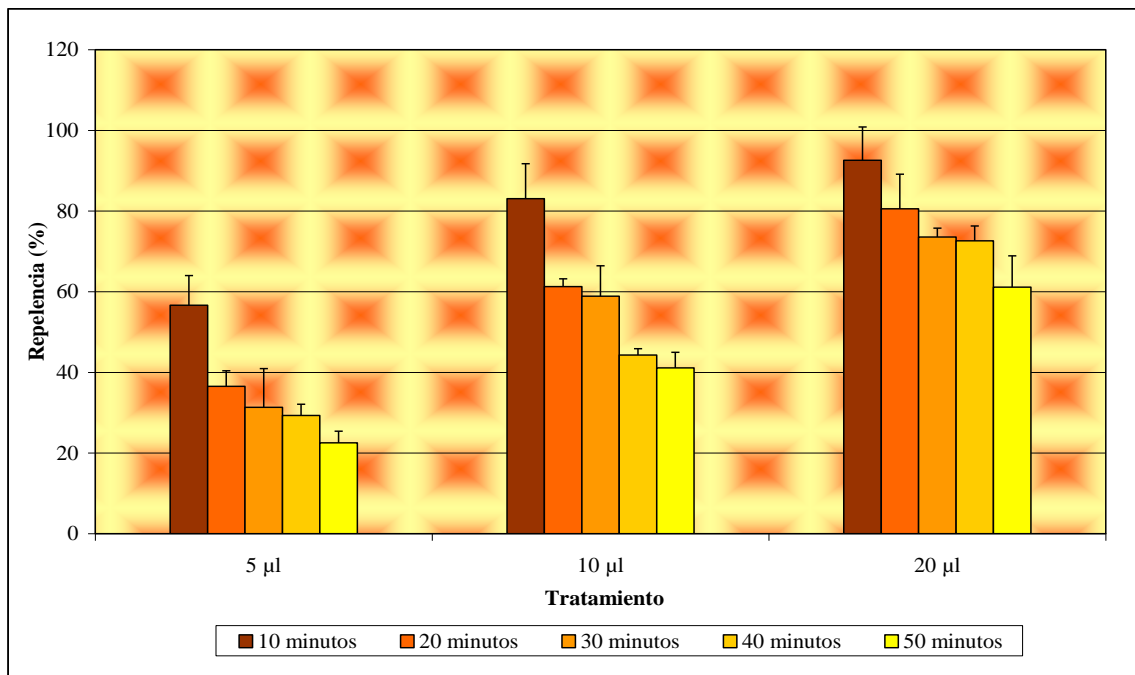
Estos índices de repelencia disminuyeron con el tiempo mostrando valores de 61, 56, y 58%, para hojas adultas, 1,8-cineol, y juveniles respectivamente con la misma cantidad (20 µl) a los 50 minutos de comenzados los ensayos.

**Tabla 19.** Actividad Repelente (%) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus glubulus* y 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición

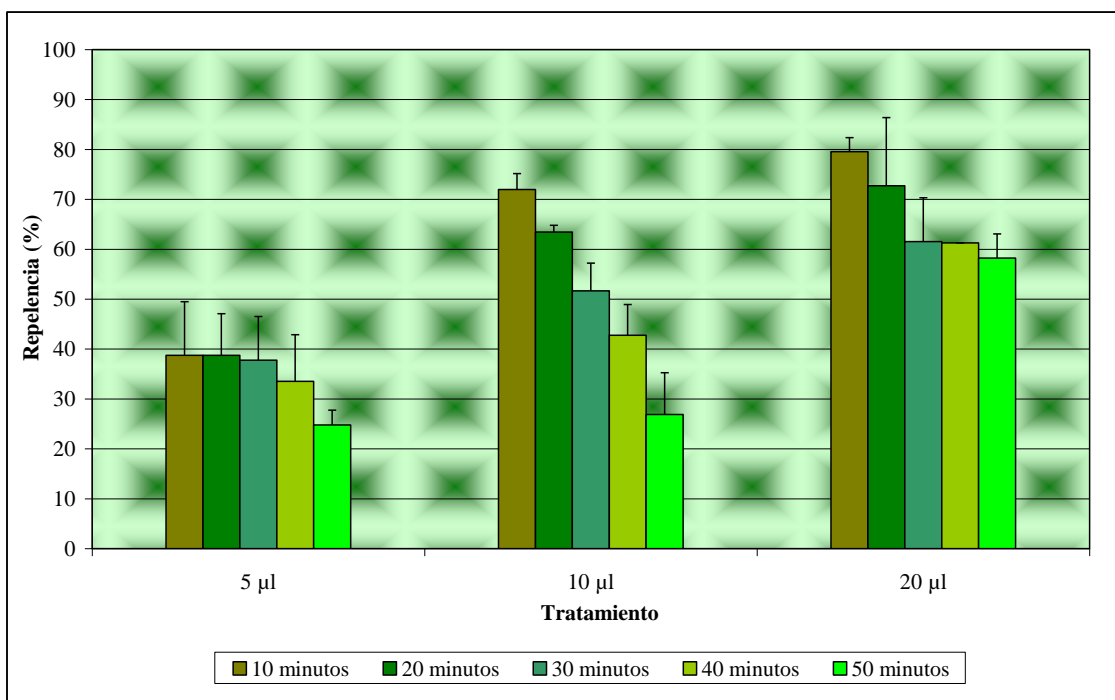
Trat. /Cant. (µl)	10 minutos	20 minutos	30 minutos	40 minutos	50 minutos
<b>1,8-cineol</b>					
5	63	59	58	50	41
10	70	69	61	55	53
20	75	71	67	61	56
<b>H. adultas</b>					
5	57	37	31	30	23
10	83	61	59	44	41
20	93	81	74	73	61
<b>H. juveniles</b>					
5	39	39	38	34	25
10	72	63	52	43	27
20	80	73	62	61	58



**Figura 37.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición



**Figura 38.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición



**Figura 39.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Cryptolestes pusillus* en función del tiempo de exposición

### ***Tribolium confusum* “Tribolio confuso”**

En la Tabla VIII, anexo II se exponen los resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas, de la misma surge que existen diferencias significativas entre los factores principales: tratamiento (hojas juveniles y adultas y 1,8-cineol), cantidad de esencia probada (5,10 y 20 µl) y tiempo de observación (R1), no así entre las respectivas interacciones.

La comparación entre medias de la Repelencia (PR%) en los tratamientos ensayados no difieren significativamente entre las esencias de hojas juveniles y 1,8-cineol, pero se observan diferencias entre las hojas adultas y los otros dos tratamientos (anexo II, Tabla XVI), resultando valores de repelencia de 56, 46 y 40% para las hojas juveniles, adultas y 1,8-cineol, respectivamente. En el caso de la cantidad de producto utilizado se observó que existen diferencias significativas entre

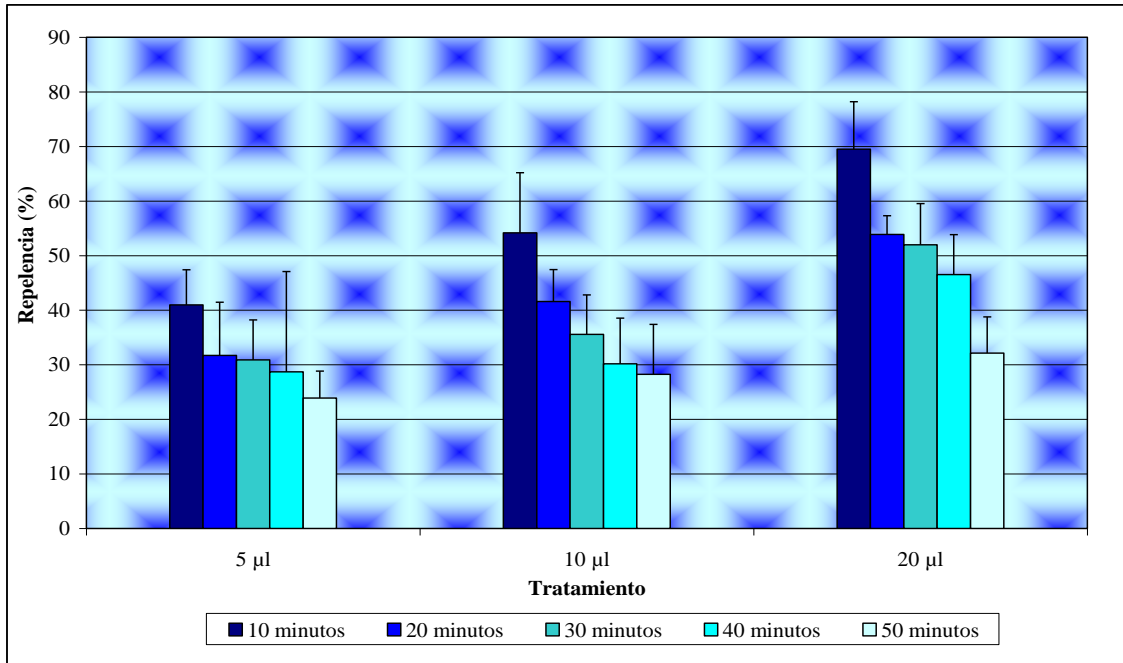
las tres cantidades probadas con valores de repelencia de 58%, 48% y 36% para 20, 10 y 5  $\mu$ l, respectivamente (anexo II, Tabla XVII).

En la Tabla XVIII, anexo II se advierte que los valores medios de repelencia disminuyen con el tiempo de exposición con diferencias significativas a los 10, 20 y 50 minutos de comenzados los ensayos. Los valores de PR (%) resultaron 64, 53, 47, 42 y 31% a los 10, 20, 30, 40 y 50 minutos respectivamente.

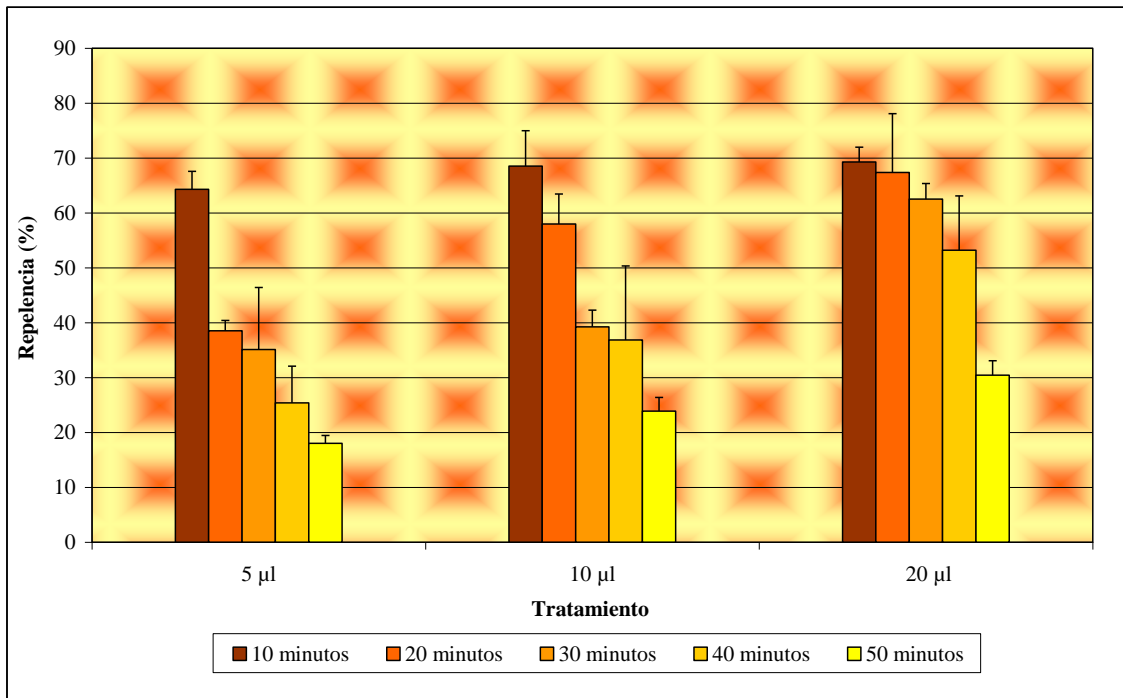
Este insecto mostró los índices de repelencia más altos a los 10 minutos con valores relativamente más bajos que los insectos anteriormente analizados. Así para las cantidades más altas utilizadas (20  $\mu$ l) se obtuvieron valores de 78, 70 y 69% para hojas juveniles, 1,8-cineol y hojas adultas respectivamente a los 10 minutos de comenzados los ensayos. Las cantidades más bajas (5  $\mu$ l) mostraron una inclinación diferente con valores de 64, 58 y 41% de índices de repelencia para hojas adultas, juveniles y 1,8-cineol respectivamente (Tabla 20 y Figuras 40, 41 y 42) en el mismo tiempo.

**Tabla 20.** Actividad Repelente (%) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *Eucalyptus glubulus* y 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición

Trat./Cant. ( $\mu$ l)	10 minutos	20 minutos	30 minutos	40 minutos	50 minutos
<b>1,8-cineol</b>					
5	41	32	58	29	24
10	54	42	61	30	28
20	70	54	67	47	32
<b>H. adultas</b>					
5	64	39	31	25	18
10	69	58	59	37	24
20	69	68	73	53	30
<b>H. juveniles</b>					
5	58	42	38	34	24
10	67	65	52	60	50
20	78	76	62	61	52

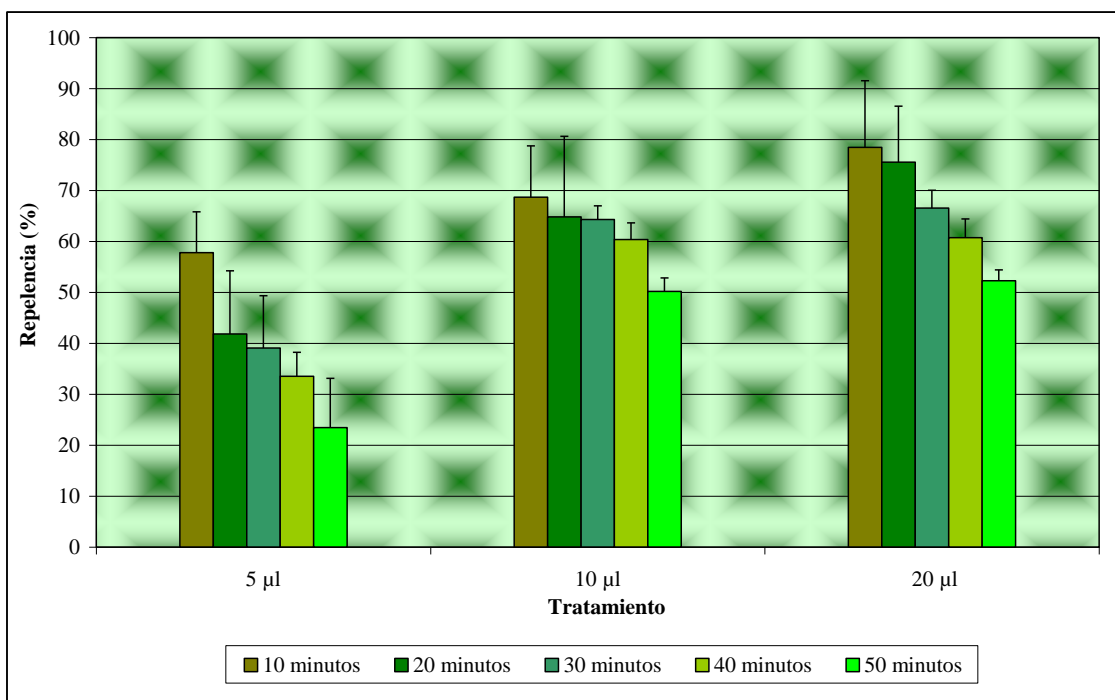


**Figura 40.** Actividad Repelente (%) de 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición



**Figura 41.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición





**Figura 42.** Actividad Repelente (%) de esencias de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* sobre *Tribolium confusum* en función del tiempo de exposición

## DISCUSIÓN

En los métodos utilizados para los ensayos de repelencia se ha encontrado una notable variabilidad en la bibliografía consultada, donde cada autor usa diversas condiciones, variables y parámetros para cuantificar la actividad repelente resultando dificultosa la comparación entre diferentes investigaciones a nivel mundial, en consecuencia los resultados sólo son comparables con otros estudios utilizando la misma metodología de evaluación (Nerio *et al.*, 2010).

En los bioensayos realizados para evaluar la efectividad de los aceites esenciales como repelentes se han utilizado diferentes dispositivos u olfatómetros basados en el principio de la libre elección de los insectos para dirigirse hacia la fuente aromática del semioquímico o al control. Algunos aparatos diseñados para esta

finalidad son muy costosos, o de complejo armado y manipulación (Cerdeira *et al.*, 1995; 1996; Ramos Rodríguez, 2001; Nakamura *et al.*, 2005). En nuestro trabajo se utilizó un dispositivo, teniendo en cuenta el criterio de la libre elección de los insectos hacia la esencia a probar y el control utilizados en trabajos anteriores (Hassanali *et al.*, 1990; Ojimelewe y Adler, 1999; Papachristos y Stamopoulos, 2002a; Tunc y Erler, 2003; Dal Bello y Padín, 2006) con las características descriptas en el capítulo respectivo.

Nuestros estudios coinciden con lo reportado por varios autores, quienes han corroborado la actividad repelente de aceites esenciales, entre ellos de especies de *Eucalyptus*, sobre insectos potencialmente plagas de granos almacenados (Tolosa *et al.*, 2006; Nerio *et al.*, 2009, 2010).

En este trabajo pudimos comprobar que la actividad repelente de los aceites esenciales obtenidos de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* y 1,8-cineol sobre los cuatro insectos probados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*, varió en forma positiva al aumentar la concentración. Así también lo señalaron otros autores en sus ensayos con aceites extraídos de las hojas y corteza de *Laurellia sempervirens* (Ruiz & Pavon) Tul (Atherospermataceae) y *Drimys winteri* (Forster & Forster) (Winteraceae) sobre *T. castaneum* (Zapata y Smagghe, 2010).

De acuerdo a los resultados se comprobó que a la cantidad más alta probada (20µl), los insectos más susceptibles ante la presencia de 1,8-cineol fueron *O. surinamensis* y *C. pusillus* con un PR, clase IV. La aplicación de aceites esenciales de hojas adultas registró la mayor susceptibilidad de las especies: *S. oryzae* y *C. pusillus*. Con la aplicación de esencias de hojas juveniles *C. pusillus* y *T. confusum* mostraron una alta susceptibilidad con una clase de repelencia IV (Tabla 21). Demostrando que los efectos tóxicos y repelentes de fitoquímicos dependen básicamente de la composición química de los aceites y la susceptibilidad del insecto, así también lo corroboró Casida (1990) en sus investigaciones con *S. oryzae* y *T. confusum*.

En nuestros ensayos evaluando 1,8-cineol sobre *T. confusum* se obtuvieron valores de porcentaje de repelencia de 70% y 41% con las cantidades de 20µl y 5µl respectivamente a los 10 minutos de comenzados los experimentos, demostrando la dependencia con la concentración. De la misma forma lo comprobaron Tunc y Erler

(2003) quienes constataron la alta actividad repelente (82,2%) de 1,8-cineol sobre *T. confusum* con la concentración más alta (184,8 mg/l aire), utilizando un método diferente de evaluación.

**Tabla 21.** Clases de Indices de Repelencia para *Sitophilus Oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis* *Cryptolestes pusillus*, *Tribolium confusum*

<b>Trat/ Dosis (<math>\mu</math>l)</b>	<b><i>Sitophilus Oryzae</i> “gorgojo del arroz”</b>	<b><i>Oryzaephilus surinamensis</i> “carcoma dentada”</b>	<b><i>Cryptolestes pusillus</i> “carcoma achatada”</b>	<b><i>Tribolium confusum</i> “tribolio confuso”</b>
<b>1,8-cineol</b>				
<b>5</b>	Clase III	Clase II	Clase III	Clase II
<b>10</b>	Clase III	Clase III	Clase IV	Clase III
<b>20</b>	Clase III	Clase IV	Clase IV	Clase III
<b>H. adultas</b>				
<b>5</b>	Clase II	Clase I	Clase II	Clase II
<b>10</b>	Clase II	Clase II	Clase III	Clase III
<b>20</b>	Clase IV	Clase III	Clase IV	Clase III
<b>H. juveniles</b>				
<b>5</b>	Clase III	Clase III	Clase II	Clase II
<b>10</b>	Clase III	Clase III	Clase III	Clase III
<b>20</b>	Clase III	Clase III	Clase IV	Clase IV

El 1,8-cineol es altamente tóxico y tiene propiedades repelentes como lo hemos comprobado en nuestras investigaciones con *O. surinamensis* y *T. confusum* con valores de IR de 84 y 70% respectivamente con 20  $\mu$ l a los 10 minutos de comenzados los ensayos, resultados que también fueron corroborados por Obeng-Ofori *et al.* (1997) sobre *S. oryzae*, *T. confusum* y *Prostephanus truncatus* (Horn).

*S. oryzae* con los aceites esenciales extraídos de hojas adultas de *E. globulus* mostró PR mayor (85%), debido probablemente a una mayor proporción de compuestos oxigenados en estas esencias, además del 1,8-cineol. Nerio *et al.* (2010) confirmó estos resultados en sus investigaciones. Sin embargo en el caso de *C.*

*pusillus* los Porcentajes de Repelencia resultaron mayores (93%) con los aceites de hojas juveniles, coincidiendo con otros autores quienes afirmaron que además del 1,8-cineol otros compuestos pueden ejercer potente actividad repelente (Ojimelukwe y Adler, 1999; Tapondjou *et al.*, 2005).

En estos ensayos se comprobó la reducción de los Índices de Repelencia con el incremento del tiempo, por lo que se verificó que a medida que pasa el tiempo los índices de repelencia son menores en los cuatro insectos probados y en las tres concentraciones ensayadas. Situación debida probablemente a la inestabilidad de los componentes de los aceites utilizados. Conclusión que coincidió con otros autores (Tunc y Releer, 2003).

## CAPITULO V

### ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* Y 1,8- CINEOL SOBRE *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus* *surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium* *confusum*

#### INTRODUCCION

Los insectos fitófagos se clasifican de acuerdo a su alimentación en monófagos u oligófagos (se alimentan de una o de especies de igual familia respectivamente) y en los generalistas (aquellos que se alimentan de un amplio rango de especies vegetales). Cada insecto tiene la capacidad de discernir entre la planta hospedera y la que no lo es. La selección de un hospedero involucra escoger una planta dentro de un grupo de especies, apropiada para alimentarse, desarrollarse y cumplir su ciclo de vida (Marin-Loaiza y Céspedes, 2007). En este proceso intervienen distintos fenómenos que se pueden diferenciar en varias etapas, como la búsqueda y localización del hábitat del hospedero, su reconocimiento y su aceptación (Dethier, 1982; Metcalf, 1994; Mareggiani, 2001).

Los insectos hacen uso de una gran variedad de modalidades sensoriales y la integración de señales visuales, olfatorias y gustativas, les permiten orientarse y encontrar los hospederos apropiados.

Dentro de los factores visuales para elegir una planta están el color, la forma y el tamaño. Entre las señales olfatorias los compuestos volátiles emitidos por la planta son quizás los que más influyen en la selección del hospedero (Bernays y Chapman, 1994; Finch y Collier, 2000; Raguso, 2001; Bruce *et al.*, 2005).

Una vez seleccionado el hospedero, el insecto responde a otros estímulos, químicos y/o morfológicos. Mediante receptores gustativos lo prueba reconociendo la fuente, y determina si continúa alimentándose o no. Las defensas físicas de las plantas está dada por la presencia de pelos, espinas, tricomas, ceras, etc. que implican una modificación morfológica de las plantas y constituyen una barrera al insecto en su intento de llegar a éstas (Serna y Correa, 2003). Los metabolitos secundarios juegan un rol esencial entre los estímulos químicos, que son captados por quimiosensilas presentes en la superficie interna de las piezas bucales y de la cavidad pre-oral (Nation, 2002; Gillot, 2005). Estas poseen receptores gustativos selectivos para sustancias inductoras (fagoestimulantes) o inhibidoras de la alimentación (fagodisuasivas) que al ser activados envían la señal al sistema nervioso central y así generan la respuesta en el insecto (Isman, 2002; Cornell y Hawkins, 2003).

Al categorizar un producto químico en fagoestimulante o fagodisuasivo, tal como un aceite esencial o alguno de sus componentes, es importante tener en cuenta que sus efectos dependerán de variables, tales como el tipo de metodología utilizada para la extracción del aceite, las concentraciones, las condiciones del bioensayo y/o la especie seleccionada para evaluar dicho efecto, entre otras. Dependiendo de ellas un mismo producto puede presentarse como fagodisuasivo, fagoestimulante o no poseer ningún efecto (Giordano *et al.*, 2000).

El término “antialimentario” puede ser aplicado a todas las sustancias químicas que de alguna forma afectan el comportamiento de los insectos inhibiendo su alimentación sin matarlos. Muchos compuestos de origen vegetal impiden o reducen la alimentación en insectos como resultado de efectos pre-ingestivos (disuasorios de la alimentación) o pos-ingestivos (tóxicos) (Liu y Ho, 1999; Jbilou *et al.*, 2006)

Estas sustancias intervienen afectando las variables fisiológicas actuando sobre el sistema nervioso o el proceso digestivo (Giordano *et al.*, 2000; Cornell y Hawkins, 2003; Descamps, 2007).

Resulta interesante estudiar los efectos de compuestos aleloquímicos sobre la fisiología nutricional de insectos (Beck y Reese, 1975), en vista de la importancia que presenta el balance nutricional en los mismos. Se ha demostrado que algunos insectos tienen la capacidad de seleccionar determinados componentes tanto de alimento natural como de dietas artificiales suministradas en laboratorio mediante cambios en la sensibilidad en los quimiorreceptores del gusto (Nation, 2002, Defagó *et al.*, 2012). Por medio de bioensayos se pueden evaluar los efectos sobre la fisiología nutricional de un insecto a través de los Índices Nutricionales. La tasa de crecimiento relativo (TCR) es uno de los más utilizados ya que permite determinar la calidad de la dieta suministrada (Nation, 2002). Otros parámetros como la tasa relativa de consumo (TRC) y la eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECAI) completan el análisis. Además la comparación de los índices permite determinar si la actividad antialimentaria se debe al efecto fagodisuasivo del compuesto evaluado o es consecuencia de su acción tóxica (Bowers *et al.*, 1991; Gols y Messchendorp, 1996; Stefanazzi, 2010).

Varios autores han investigado acerca de las alteraciones fisiológicas en insectos plagas al exponerlos a diferentes compuestos de origen vegetal (Rodríguez-Hernandez y Vedramim, 1998; Descamps, 2007; Stefanazzi *et al.*, 2010). Saxena (1989) describió los efectos antialimentarios del neem (*A. indica*) en plagas de granos almacenados.

Mientras que Liu y Ho (1999), en un ensayo realizado con pequeños discos de harina utilizando aceite esencial de *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. (Rutaceae), comprobaron efectos antialimentarios en larvas de *T. castaneum* y adultos de *S. zeamais*. Padín *et al.* (2008) evaluaron el índice fagodisuasivo (IF), la tasa de crecimiento relativo (TCR) y la tasa relativa de consumo (TRC) con el aceite esencial de cinco poblaciones de *Lippia alba* (Mill.) (Verbenaceae): “salvia morada” sobre adultos de *S. oryzae*. Se observaron diferencias altamente significativas en el IF y la TCR en los quimiotipos carvona (origen Perú y origen Costa Rica) y linanol (origen

Uruguay). Además Stefanazzi (2010) comprobó que los aceites esenciales de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) produjeron alteraciones en la fisiología nutricional de larvas y adultos de *S. oryzae*, con un I.F. de 53,22%.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el Índice Fagodisuasivo (IF) y los posibles efectos sobre la fisiología nutricional a través de la medición de los Índices Nutricionales de los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum* mediante ensayos de “no preferencia”.

### **Objetivos específicos**

Evaluar el Índice Fagodisuasivo (IF) de los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum* mediante ensayos de “no preferencia”.

Evaluar posibles efectos sobre la fisiología nutricional a través de la medición de los Índices Nutricionales como la tasa de crecimiento relativo (TCR), la tasa relativa de consumo (TRC) y la eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECAI).

## **HIPOTESIS**

Los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol producen efectos fagodisuasivos y alteraciones en la fisiología nutricional en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*.



Los aceites esenciales de hojas juveniles y adultas de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol producen toxicidad post-ingesta en individuos adultos de *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*.

## MATERIALES Y METODOS

Para determinar el efecto antialimentario de los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* y 1,8-cineol, se evaluaron el efecto fagodisuasivo y las alteraciones fisiológicas en individuos adultos de *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*. Se prepararon discos de harina (Huang *et al.*, 2002; Descamps, 2007; Stefanazzi, 2010) tomando partes alícuotas de 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión de harina en agua (10 g. 50  $\text{ml}^{-1}$ ). Se colocaron en placas de plástico para formar los discos que se dejaron secar en una cámara a 25 °C de temperatura y 60/70% de humedad relativa durante toda la noche. Se prepararon soluciones en acetona con las distintas esencias y un grupo control incorporando sólo acetona, con las que se trataron discos de harina, que fueron pesados y colocados en recipientes separados. La elección de las cuatro concentraciones a probar en cada uno de los insectos estudiados se determinó en ensayos previos. Así las concentraciones probadas fueron, para *S. oryzae* y *C. pusillus*: 0,40, 0,60, 0,80 y 1,00  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  y para *O. surinamensis* y *T. confusum*: 0,5, 0,75, 1,00 y 1,25  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

En cada recipiente se colocaron 10 insectos previamente pesados con una balanza analítica Mettler H10 “®” (160g +/- 0.1 mg). A las 72, 120 y 240 horas, en condiciones controladas, se registró el peso de los discos, la mortalidad y el peso de los insectos vivos. Se realizaron 4 repeticiones. Debido a la gran variabilidad de estos parámetros a las 120 y 240 horas se decidió tomar sólo los datos a las 72 hs de comenzados los ensayos. Se calcularon los siguientes Indices Nutricionales:

**Tasa de Crecimiento Relativa (TCR)** =  $(A-B)/(B \times \text{día})$

donde A= peso de insectos al tercer día, B= peso original de los insectos/Nº de insectos vivos

**Tasa Relativa de Consumo (TRC)** =  $D/(B \times \text{día})$

donde D=biomasa ingerida(mg)/N° de insectos vivos al tercer día

### **Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido**

$$(ECAI) (\%) = (TCR/TRC) \times 100$$

$$\text{Indice Fagodisuasivo (IF) (\%)} = (C-T)/C \times 100$$

donde C= consumo de los discos en el control (mg) y T= consumo de los discos tratados (mg).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y para las comparaciones entre tratamientos se utilizó Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## **RESULTADOS**

Los aceites esenciales de hojas adultas (**Ad**) y juveniles (**Ju**) de *E. globulus* y 1,8-cineol (**E**) modificaron los índices nutricionales sobre los cuatro insectos probados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*. Se observó una disminución de las tasas de crecimiento relativo (TCR), Tasa relativa de consumo (TRC) y la Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido (ECAI) con el aumento de la concentración de 1,8-cineol y de los aceites probados. La mortalidad, también resultó mayor a medida que aumentaba la concentración (Tablas 21, 22, 23 y 24).

Al realizar los análisis estadísticos de los resultados obtenidos sobre *S. oryzae* se verificó que no existían diferencias significativas entre los tratamientos y el control, aún cuando hubo diferencias numéricas entre los distintos índices calculados, así la Tasa de Crecimiento Relativa (TCR) a la concentración más alta probada ( $1 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) disminuyó en un 85% en hojas adultas y juveniles y en 70% en 1,8-cineol respecto del control. Mientras que la Tasa Relativa de Consumo (TRC) se redujeron en un 84%, 69% y 66% en 1,8-cineol, hojas juveniles y adultas respectivamente. A su vez la Eficiencia de Conversión del alimento Ingerido (ECAI) mostró reducciones del 81%, 73% y 61% con respecto al control en 1,8-cineol, hojas adultas y juveniles respectivamente (Tabla 22).

**Tabla 22.** Índices Nutricionales y Actividad Fagodisuasiva de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Sitophilus oryzae*

Tratamiento	Conc. ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ )	TCR	TRC	ECAI	IF	M (%)
<b>CONTROL</b>	0,00	0,065a	0,295d	60,55a		6a
<b>1,8-CINEOL</b>	0,40	0,05a	0,14abcd	40,32a	57,67ab	23ab
	0,60	0,05a	0,11abcd	32,89a	70,09ab	40bc
	0,80	0,03a	0,10ab	20,76a	79,45ab	47bcd
	1,00	0,02a	0,05a	11,43a	94,86b	77de
<b>ADULTAS</b>	0,40	0,05a	0,16abcd	45,53a	45,17a	27abc
	0,60	0,04a	0,12abcd	35,06a	60,57ab	30abc
	0,80	0,03a	0,12abcd	22,32a	90,33ab	77de
	1,00	0,01a	0,10abc	16,16a	94,51b	87e
<b>JUVENILES</b>	0,40	0,07a	0,18abcd	50,55a	42,96a	23ab
	0,60	0,05a	0,17abcd	48,99a	54,51ab	30abc
	0,80	0,02a	0,11abcd	31,36a	77,25ab	53bcd
	1,00	0,01a	0,09a	23,285a	85,38ab	57cde
<b>ANOVA</b>		F=0,37 p<0,941 gl=9	F=0,38 p<0,938 gl=9	F=0,56 p<0,818 gl=9	F=0,32 p<0,920 gl=6	F=5,45 p<0,00 gl=9

n=4 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ); M (%): Porcentaje de Mortalidad; TCR: Tasa de Crecimiento Relativo; TRC: Tasa Relativa de Consumo; ECAI: Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido; IF: Índice Fagodisuasivo

En la Tabla 23 se observa que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control, pero si se comprobaron diferencias numéricas al analizar los resultados de los índices calculados en *O. surinamensis*. Para la Tasa de Crecimiento Relativo se observaron disminuciones del orden del 70% para los tratamientos 1,8-cineol y hojas adultas, y de 60% para hojas juveniles con respecto al control. Al analizar la Tasa Relativa de Consumo estas mermas fueron de 78%, 72%

y 69% para hojas adultas, 1,8-cineol y hojas juveniles respectivamente. En el caso de la Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido los resultados mostraron reducciones de 77%, 45% y 35% para 1,8-cineol, hojas adultas y juveniles respectivamente.

**Tabla 23.** Índices Nutricionales y Actividad Fagodisuasiva de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis*

Tratamiento	Conc. ( $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ )	TCR	TRC	ECAI	IF	M (%)
<b>CONTROL</b>	0,00	0,10a	0,32c	45,55a		3a
<b>1,8-CINEOL</b>	0,50	0,05a	0,21ab	33,19a	58,65a	23abcde
	0,75	0,05a	0,18ab	30,83a	63,84a	33cde
	1,00	0,03a	0,09a	16,21a	77,88a	47ef
	1,25	0,03a	0,09a	10,44a	83,32a	60f
<b>ADULTAS</b>	0,50	0,06a	0,19ab	37,98a	55,02a	13abc
	0,75	0,06a	0,20ab	36,48a	59,82a	27bcde
	1,00	0,04a	0,08a	28,42a	70,57a	37cdef
	1,25	0,03a	0,07a	25,25a	76,23a	47ef
<b>JUVENILES</b>	0,50	0,06a	0,24abc	39,18a	40,56a	7ab
	0,75	0,06a	0,21ab	37,35a	43,29a	17abcd
	1,00	0,04a	0,11a	31,25a	61,45a	27abcd
	1,25	0,04a	0,10a	29,45a	68,02a	40def
<b>ANOVA</b>		F=0,09 p<0,999 gl=9	F=0,41 p<0,918 gl=9	F=0,21 p<0,991 gl=9	F=0,04 p<0,999 gl=6	F=1,90 p<0,09 gl=9

n=4 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey,  $p \leq 0,05$ ); M (%): Porcentaje de Mortalidad; TCR: Tasa de Crecimiento Relativo; TRC: Tasa Relativa de Consumo; ECAI: Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido; IF: Índice Fagodisuasivo

En *C. pusillus* “carcoma achatada” la Tasa de Crecimiento Relativa (TCR) a la concentración más alta probada (1µl/cm<sup>2</sup>) se redujo en un 92% en 1,8-cineol y hojas adultas y en 85% en hojas juveniles respecto del control. En la Tasa Relativa de consumo (TRC) las disminuciones fueron de 82% para 1,8-cineol y hojas adultas, y 71% para hojas juveniles. En la Eficiencia de Conversión del alimento Ingerido resultaron reducciones de 77% para 1,8-cineol y hojas adultas y 73% para juveniles (Tabla 24).

**Tabla 24.** Índices Nutricionales y Actividad Fagodisuasiva de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus*

Tratamiento	Conc. (µl/cm <sup>2</sup> )	TCR	TRC	ECAI	IF	M (%)
<b>CONTROL</b>	0,00	0,13a	0,385c	49,48abc		3a
<b>1,8-CINEOL</b>	0,40	0,02a	0,15a	17,51bc	75,33a	23cde
	0,60	0,02a	0,13a	16,02abc	77,71a	33def
	0,80	0,01a	0,07a	14,49ab	86,83a	47efg
	1,00	0,01a	0,07a	11,25ab	90,83a	60h
<b>ADULTAS</b>	0,40	0,03a	0,19ab	20,36ab	68,41a	13bcd
	0,60	0,02a	0,17ab	16,52ab	69,52a	27def
	0,80	0,02a	0,10a	14,00ab	74,86a	37defg
	1,00	0,01a	0,07a	13,50a	86,06a	47fgh
<b>JUVENILES</b>	0,40	0,03a	0,21ab	23,34ab	58,81a	7abcd
	0,60	0,03a	0,20ab	18,68c	64,88a	17def
	0,80	0,02a	0,13a	14,17ab	68,42a	27efgh
	1,00	0,02a	0,11a	13,53ab	80,75a	47gh
<b>ANOVA</b>		F=0,25 p<0,982 gl=9	F=0,87 p<0,5 63 gl=9	F=2,70 p<0,018 gl=9	F=0,06 p<0,99 gl=6	F=2,43 p<0,03 gl=9

n=4 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey, p≤0,05); M (%): Porcentaje de Mortalidad; TCR: Tasa de Crecimiento Relativo; TRC: Tasa Relativa de consumo; ECAI: Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido; IF: Índice Fagodisuasivo.

En *T. confusum* la Tasa de Crecimiento Relativa (TCR) a la concentración más alta probada (1µl/cm<sup>2</sup>) se redujo un 61%, 54% y 46% para 1,8-cineol, hojas adultas y juveniles, respectivamente en comparación con el control. Las reducciones en la Tasa Relativa de consumo (TRC) fueron de 67%, 58% y 54% para 1,8-cineol, hojas adultas y juveniles respectivamente (Tabla 25).

**Tabla 25.** Índices Nutricionales y Actividad Fagodisuasiva de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum*

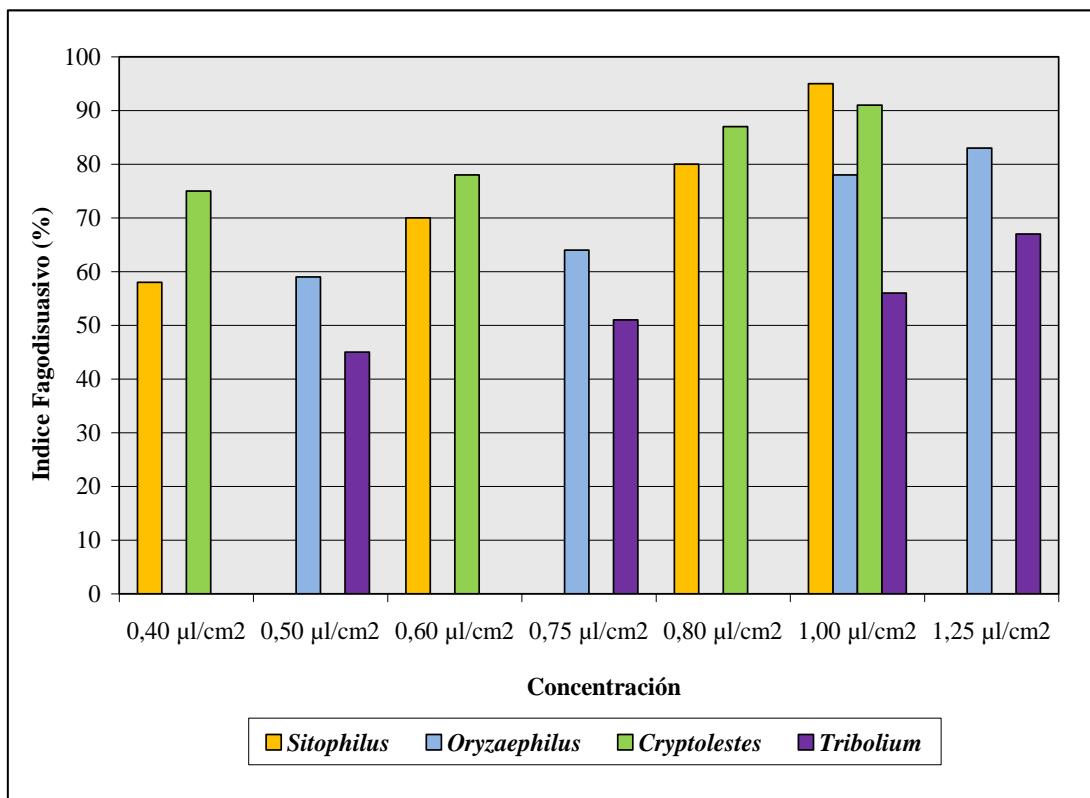
Tratamiento	Conc. (µl/cm <sup>2</sup> )	TCR	TRC	ECAI	IF	M (%)
<b>CONTROL</b>	0.00	0,28f	0,24e	53,96a		3a
<b>1,8-CINEOL</b>	0.5	0,19abcde	0,13abcde	42,08a	45,13ab	20cde
	0.75	0,16abc	0,13abcde	34,33a	51,05ab	30cdef
	1.00	0,14ab	0,09a	22,25a	56,38ab	38def
	1.25	0,11a	0,08a	12,11a	67,48b	42def
<b>ADULTAS</b>	0.5	0,20abcdef	0,16abcde	47,47a	32,89ab	16bcd
	0.75	0,20abcdef	0,14abcde	31,17a	34,80ab	25bcd
	1.00	0,15abc	0,12abcd	30,36a	43,67ab	33cdef
	1.25	0,13ab	0,10ab	17,58a	49,77ab	45def
<b>JUVENILES</b>	0.5	0,22bcdef	0,19abcde	49,22a	19,82a	15bcd
	0.75	0,21bcdef	0,17abcde	47,18a	25,95ab	23bcd
	1.00	0,17abcd	0,14abcde	37,89a	35,38ab	29cdef
	1.25	0,15abc	0,11abc	21,56a	50,43ab	41def
<b>ANOVA</b>		F=1,27; p<0,29 gl=9	F=0,59 p<0,80 gl=9	F=0,08 p<1 gl=9	F=0,12 p<0,99 gl=6	F=2,08 p<0,05 gl=9

n=4 réplicas de 10 insectos cada una. Valores seguidos por la misma letra no difieren significativamente (Tukey, p≤0,05); M (%): Porcentaje de Mortalidad; TCR: Tasa de Crecimiento Relativo; TRC: Tasa Relativa de Consumo; ECAI: Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido; IF: Índice Fagodisuasivo.

En la Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido se observaron mermas de 78%, 67% y 60% para 1,8-cineol, hojas adultas y juveniles respectivamente (Tabla 25).

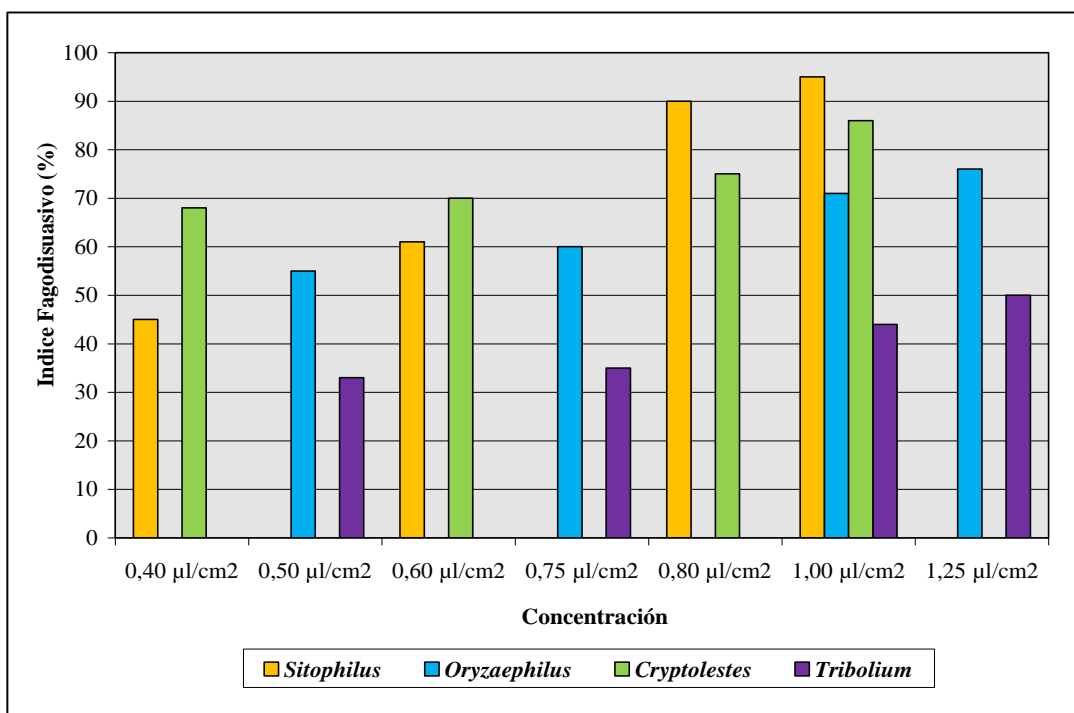
En todos los tratamientos e insectos ensayados se observó actividad fagodisuasiva, pero no se verificó diferencias significativas entre los tratamientos probados. Se comprobó un aumento de los porcentajes de los Índice Fagodisuasivo (IF) con el incremento de la concentración (Tablas 22, 23, 24 y 25).

En los ensayos realizados con 1,8-cineol los mayores valores obtenidos fueron 94,86, 90,83, 83,32 y 67,48 para *S. oryzae*, *C. pusillus*, *O. surinamensis* y *T. confusum* respectivamente con las concentraciones más altas analizadas (Figura 42).



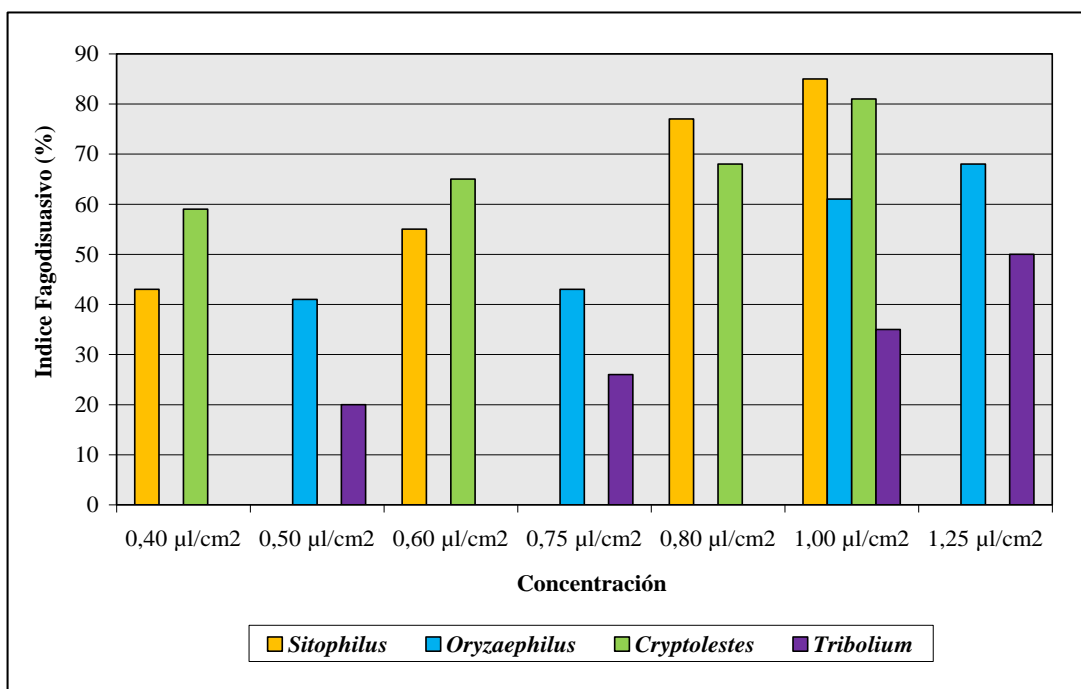
**Figura 42** Índice Fagodisuasivo de 1,8-cineol en función de la concentración sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*

Con los aceites esenciales de hojas adultas también se lograron altos valores: 94,51; 76,23; 86,06 y 49,77, mientras que para las hojas juveniles los valores fueron 85,38; 68,02; 80,75 y 50,43 para *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus*, y *T. confusum* respectivamente con las concentraciones más altas ensayadas (Figuras 43 y 44).



**Figura 43.** Índice fagodisuasivo de aceites esenciales de hojas adultas de *Eucalyptus globulus* en función de la concentración sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*





**Figura 44.** Índice fagodisuasivo de aceites esenciales de hojas juveniles de *Eucalyptus globulus* en función de la concentración sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Cryptolestes pusillus* y *Tribolium confusum*

## DISCUSION

Las sustancias disuasivas son compuestos no volátiles que son percibidos por el insecto cuando éste se alimenta, pero no lo matan inmediatamente sino que reprimen su alimentación de manera gradual hasta que muere por inanición (Warthen y Morgan, 1990).

Algunos autores han estudiado estos efectos en distintos insectos-plaga (Alonso Amelot *et al.*, 1994; Pungitore *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Omar *et al.*, 2007, Stefanazzi *et al.*, 2010).

La evaluación de la actividad fagodisuasiva de una sustancia vegetal mediante bioensayos de no preferencia en laboratorio, constituyen una prueba rápida y

económica (Schoonhove, 1982; Isman, 2002). En nuestro caso hemos realizado pruebas de laboratorio para verificar si las esencias de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* y 1,8-cineol, su principal componente poseen actividad fagodisuasiva o estimulante sobre cuatro importantes plagas potenciales de granos almacenados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum* mediante discos de harina (Huang *et al.*, 2002).

De acuerdo a los resultados, se ha corroborado que las esencias de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* poseen actividad fagodisuasiva sobre los cuatro insectos ensayados. Así los valores más altos obtenidos de Índice fagodisuasivo fueron de 94,51% y 85,38% para hojas adultas y juveniles respectivamente para *S. oryzae* (Tabla 22).

Estos valores resultaron significativamente menores para las otras tres especies ensayadas, así para *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum* fueron 76,23%, 86,06% y 49,77% respectivamente con la evaluación de hojas adultas, mientras que para las hojas juveniles resultaron: 68,02%, 80,75% y 50,43% para las mismas especies respectivamente (Tablas 23, 24 y 25). Se sugiere que estas diferencias podrían deberse a que estas especies evaluadas presentan estrategias bien diferenciadas con respecto a su modo de alimentación. Así, el gorgojo del arroz comienza a alimentarse sólo cuando el pericarpio y mesocarpio han sido perforados, en cambio las otras 3 especies se alimentan cuando ya han sido dañadas por las plagas de infestación primaria como *S. oryzae*. Valera *et al.* (2003) en sus investigaciones avalan dicha hipótesis. Por otro lado, Dasniewski *et al.* (1988) experimentando con otros aceites esenciales concluyeron que ciertos constituyentes de *Reichardia tingitana* L. Roth. (Compositae) poseían una importante actividad antialimentaria tanto en adultos de *T. confusum* como en larvas de *Trogoderma granarium* Ev, pero dicha actividad fue significativamente menor en *S. oryzae* debido probablemente, a variaciones en el número de receptores gustativos ya que esta especie posee solo un par de sensilas en la base de la cavidad bucal. Se verificó en nuestros ensayos, una actividad significativamente mayor en *S. oryzae*, en contraposición con las conclusiones de ambos autores, por lo que no se tienen elementos para conocer la causa en nuestras investigaciones.

En estos experimentos se evaluó además el IF (Índice fagodisuasivo) de 1,8-cineol, principal componente de los aceites esenciales extraídos de *E. globulus* (Yang *et al.*, 2004; Ebadollahi, 2010b). Se lograron altos valores de IF (Índice fagodisuasivo): 94,86 %, 90,83 %, 83,32 %, y 67,48 % para *S. oryzae*, *C. pusillus*, *O. surinamensis* y *T. confusum* respectivamente, coincidiendo con lo demostrado por Tripathi *et al.* (2001) sobre *T. castaneum*, respecto de la actividad antialimentaria de este compuesto.

Los efectos de compuestos aleloquímicos sobre la fisiología nutricional de insectos involucran investigaciones de los índices nutricionales (Beck y Reese, 1975), entre los que se encuentran la tasa de consumo relativo (TRC), la tasa relativa de crecimiento (TCR) y la eficiencia de conversión del alimento ingerido a biomasa (ECAI) (Waldbauer, 1968; Descamps, 2007; Stefanazzi, 2010), investigaciones que hemos llevado a cabo en nuestros ensayos.

Del análisis de estos índices podemos afirmar que en todas las especies evaluadas se observó una declinación con el aumento de la concentración (Tablas 21, 22, 23 y 24), por lo que se verifica una dependencia con la concentración disminuyendo con el incremento de la misma. Resultados que coincidieron con otros autores que investigaron las propiedades antialimentarias de *E. globulus* sobre *T. castaneum* (Ebadollahi, 2011).

Los aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y el 1,8-cineol produjeron toxicidad post-ingesta en las especies estudiadas a considerar por los valores de mortalidad. Los valores de mortalidad (%) en las distintas especies tratadas con 1,8-cineol a las concentraciones más altas mostraron valores de 77, 60, 60 y 42% para *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum* respectivamente.

Los aceites esenciales de hojas adultas mostraron valores de 87, 47, 47 y 45%, mientras que para las hojas juveniles resultaron de 57, 40, 47 y 41% para las mismas especies. La mortalidad (%) en los ensayos sin tratar sólo llegó a valores de 3% para *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*, incrementándose a 6% para *S. oryzae*. Estos incrementos de la tasa de mortalidad comparados con los ensayos control nos sugiere una menor ingesta alimentaria, un menor peso y una menor eficiencia del alimento ingerido en los insectos ensayados que los correspondientes controles,

sugiriendo que el incremento en la mortalidad podría estar determinado, en gran medida, por el mencionado efecto antialimentario. Estos resultados fueron coincidentes con otros autores que evaluaron la actividad antialimentaria de extractos de hojas senescentes de *Melia azedarach* Linneo (Meliaceae) sobre individuos adultos y larvas de *E. paenulata* (Valladares *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en nuestras investigaciones nos conduce a afirmar que la actividad tóxica de estos metabolitos secundarios pueden actuar a diferentes niveles sobre la fisiología del insecto, actuando sobre el proceso digestivo, reduciendo la digestibilidad o inhibiendo la actividad de enzimas hidrolíticas, conclusiones a las que llegaron otros autores (Koul *et al.*, 1996; Caballero García, 2004; Chown y Nicholson, 2004; Stefanazzi, 2010).

## CONCLUSIONES

El manejo integrado de plagas es una excelente estrategia de control para las plagas de granos almacenados, teniendo como objetivo el mantenimiento de los insectos por debajo de los niveles de daño económico dentro de un marco de protección del ambiente. En este contexto se propone el uso combinado de métodos preventivos, biológicos, físicos y químicos.

Los compuestos químicos que forman parte de plantas y microorganismos ofrecen una amplia gama de estructuras alternativas para ser utilizadas y/o modificadas (semisintéticos), más fácilmente biodegradables y por ende menos tóxicos, con la ventaja de producir efectos inhibitorios más específicos.

Hemos seleccionado a *E. globulus*, especie de reconocidas propiedades insecticidas para desarrollar esta investigación sobre la bioactividad de los aceites esenciales extraídos de sus hojas adultas y juveniles y de 1,8-cineol, su principal constituyente sobre cuatro importantes plagas potenciales de granos almacenados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *C. pusillus* y *T. confusum*.

Los altos valores de mortalidad obtenidos, que superaron el 50% con las concentraciones más altas ensayadas, confirman el potencial de estos aceites esenciales como productos bioinsecticidas, y los señalan como alternativa para el reemplazo parcial de dos de los fumigantes más utilizados, la fosfina y el bromuro de metilo, evitando así los riesgos asociados a estos plaguicidas. Este trabajo proporciona información sobre la extracción de aceites esenciales y sobre la evaluación de su bioactividad mediante técnicas fácilmente reproducibles en laboratorio. Estos resultados obtenidos sobre individuos adultos proveen una base firme y clara sobre la diferente susceptibilidad de las especies ensayadas. Posteriores evaluaciones de los aceites esenciales de especies congéneres a largo plazo, permitirán garantizar la regulación de las poblaciones de plagas bajo condiciones de almacenamiento reducido y predecir si la erradicación de una especie más susceptible podría dar lugar al desarrollo de otras más resistentes.

La acción repelente de las esencias de hojas adultas y juveniles de *E. globulus* y el 1,8-cineol comprobada en este trabajo, los acredita como bioplaguicidas

preventivos, ya que pueden impedir la entrada de estos insectos a los lugares de almacenamiento, si se los utiliza en estas estructuras antes de guardar el grano fresco. Sin embargo la naturaleza volátil de los aceites esenciales ocasiona que algunos de sus compuestos se disipen rápidamente en función de sus propiedades y condiciones físicas y/o ambientales de las estructuras de almacenaje, por lo que sería conveniente realizar estimaciones en lapsos de tiempo mayores de los aquí planteados, de manera tal que pueda determinarse su comportamiento en el tiempo. Será necesario además tener en cuenta posibles efectos sinérgicos de los compuestos activos de los aceites esenciales.

Se han logrado resultados altamente positivos en los bioensayos realizados sobre la actividad fagodisuasiva bajo las condiciones y métodos aquí planteados. Mediante técnicas sencillas se han obtenido datos sobre el ritmo de crecimiento de los insectos estudiados, y el consumo del alimento que nos permitieron conocer cómo actúan estos productos sobre la nutrición de estas especies. De todos modos no debemos dejar de lado la habilidad que presentan los insectos de habituarse rápidamente a una alimentación disuasiva por lo que serían necesarios realizar estimaciones a largo plazo con una exposición continua que permita asegurar la posibilidad de la utilización de estos productos como sustancias disuasivas de la alimentación.

Sí bien los resultados obtenidos han demostrado la viabilidad de la utilización de las hojas adultas y juveniles de *E. globulus* para el control de plagas de granos almacenados, la formulación y la factibilidad de la aplicación de estos compuestos necesitan ser investigados más profundamente. Estudios más específicos sobre el modo de acción pueden contribuir a un mejor entendimiento de sus formas de interferencia sobre los insectos más comunes.

Como consideración final debería contemplarse la necesidad de realizar estas investigaciones en los lugares de almacenaje que conduzcan a evaluar la relación costo-beneficio. Su posterior aplicación comercial sólo podría ser considerada con la realización de experimentos toxicológicos que incluyan requisitos como selectividad, inocuidad para los enemigos naturales y baja toxicidad en mamíferos.

## REFERENCIAS

- Abad, M.J., Ansuategui, M. & Bermejo, P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc* (7): 116-145.
- Abraham, V.A., Faleiro, J.R., Al-Shuabi, M.A. & Kumar, T.P. 2000. A strategy to manage red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv on date palm, *Phoenix dactylifera* its successful implementation in Al-Hassa, Kingdom of Saudi Arabia. *Pestology* 24: 23-30.
- Adam, B., Phillips, P. & Flinn, P. 2006. The economics of IMP in stored grain: Whydon't more grain handlers use IMP. *En: 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 1. Stored Grain Losses.* pp. 3-12.
- Adams, R.P. 2007. Identification of Essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Carol Stream (Illinois): Allured Publishing Corporation, pp. 469.
- Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P. & Zuker, C.S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693-702.
- Ahmadouch, A., Bellakdar, J., Berrada, M., Denier, C., & Pinel, R. 1985. Analyse chimique des huiles essentielles de cinq espèces d'*Eucalyptus* acclimatées au Maroc. *Fitoterapia* 56: 209-220.
- Aguirre Yela, V. & Delgado, V. Pesticidas naturales y sintéticos. 2010. *Revista Ciencia.* 13 (1): 43-53.

- Alder, C., Corinth, H. & Reichmuth, C. 2000. Modified atmospheres. *En: Subramanyam, Bh. Y Hagstrum, D.W. (Eds.). Alternatives to pesticides in Stored-Product IPM.*, pp: 105-146.
- Alleoni, B. & Ferreira, W. 2006. Control of *Sitophilus zeamais* Mots., 1958 and *Sitophilus oryzae* (L., 1763) weevils (Coleoptera, Curculionidae) in stored corn grain (*Zea mays* L.) with insecticide pirimiphos methyl (Actellic 500 CE). *En: 9th International Working Conference on Stored Product Protection. General Session on Stored Grain Protection*, pp. 1218-1225.
- Al-Jabr A.M. 2006. Toxicity and repellency of seven plant essential oils to *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific J. King Faisal Uni.* 7(1): 49-60.
- Alonso-Amelot, M.E., Avila, J.L., Otero, L.D., Mora, F. & Wolff, B. 1994. A new bioassay for testing plant extracts and pure compounds using red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst. *J. Chem. Ecol.* 20: 1161-1177.
- Alvarez Colom, O, Popich, S.B. & Bardón, A. 2005. Toxicidad de extractos de Annonaceas americana sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina. Resúmenes 275.
- Alzogaray, R., Fontan, A. & Zerba, E. 2000. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Med. Vet. Entomol.* 14: 6-10.
- Andrade, A. M., & Gomes, S.S. 2000. Influencia de alguns fatores nao genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citridiora* Hook, floresta e Ambiente, *Seropédica* 7 (1): 181-189.



- Andrews, K. L., & Quezada, J. R. 1989. Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura: Estado actual y futuro. El Zamorano, Tegucigalpa, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana.
- Arregui, M.C. & Puricelli, E. 2008. Mecanismos de acción de plaguicidas. Ed. Dow AgroSciences, Bs. As. 208 pp.
- Asawalam, E.F., Emosairue, S.O. & Hassanali, A. 2008. Essential oil of *Ocimum grattissimum* (Labiatae) as *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) protectant. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3771-3776.
- Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. G., Vayias, B.J., Dimizas, C.B., Papagregoriou, A.S. & Buchelos, C.Th. 2004. Residual toxicity of beta cyfluthrin, alpha cypermethrin and deltamethrin against *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) on stored wheat. *Appl. Entomol. Zool.* 39: 195-202.
- Athanassiou, C.G., Vayias, B.J., Dimizas, C.B., Kavallieratos, N.G., Papagregoriou, A.S. & Buchelos, C.T. 2005. Insecticidal efficacy of diatomaceous earth against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored wheat: influence of dose rate, temperature and exposure interval. *J. Stored Prod. Res.* 41: 47-55.
- Azcón, J., & Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal 1ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, 261 pp.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils. A review. *J. Agric. Food Chem.* 46 (2): 446-475.
- Bandoni, A. (Ed). 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores.

Argentina: Red de Editoriales Universitarias, pp. 29-43, 94-96, 149-171, 197-232.

Barbosa de Azevedo, A., da Silva, L., Cabral da Cunha, L., de Assis Cardoso Almeida, F. & de Almeida, R. P. 2008. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim armazenado. XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Graos Armazenados. Resumo ID:1720-4. Uberlandia, MG.

Baricevic, D., Milevoj, L. & Borstnik, L. 2001. Insecticidal efecto of oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *Hirtum* Ietswaart) on bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say). *Int. J. Hort. Sci.* 7: 84-88.

Barquero Quirós, M. 2006. Editorial Universidad de Costa Rica. Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases pp. 28.

Barton, A.F.M., 2000. The oil mallee project, a multifaceted industrial ecology case study. *J. Ind. Ecol.* 3: 161-176.

Batallán, P.G., Torre, R.A., Flores, F.S., Douthat, C.B., Tonn, C., Ludeña Almeida, F., Contigiani, M. & Almiron, W.R. 2008. Actividad larvicida de extractos de *Larrea cuneifolia* (Zygophyllales: Zygophyllaceae) sobre *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) VII Congreso Argentino de Entomología. Huerta Grande. Córdoba. Resúmenes 338.

Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kaur, S. & Kohli, R.K., 2006. Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oils from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Z. Naturforsch.* 61c: 465-471.

- Batish, D.R., Setia, N., Singh, H.P. & Kohli, R.K., 2004. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Prot.* 23: 1209-1214.
- Batish D.R, Singh H.P, Kohli, R.K, Kaur, S., Saxena, D.B. & Yadav, S. 2007. Assessment of parthenin against some weeds. *Z. Naturforsch.* 62c: 367-372.
- Batish, D.R., Singh, H. P., Kohli, R.K., S., K. 2008. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *For. Ecol. Manage.* 256: 2166-2174.
- Beck, S. D. & Reese, J. C. 1975. Insect-plant interactions: nutrition and metabolism, pp: 41-75. *En: Wallace, J. W. y R. L. Mansell (Eds.). Biochemical interaction between plants and insects. Rec. Adv. Phytochem.* 10.
- Benhalima, H., Chaudhry, M.Q., Mills, A. & Price, N.R. 2004. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Marocco. *J. Stored Prod. Res.* 40: 241-249.
- Bentancourt, C. M. & Scatoni, I. B. 1999. Guía de Insectos y Ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Universidad de la República, Fac. de Agronomía, Montevideo. 207 pp.
- Benzi, V., Stefanazzi, N. & Ferrero, A. 2009. Biological activity of essential oils from leaves and fruits of pepper tree (*Schinus molle* L.) to control rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chilean J. Agric. Res.* 69(2):154-159.
- Benzon, G.L. & Apperson, C.S. Apperson. 1988. Reexamination of chemically mediated oviposition behavior in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 25: 158-164.

- Bernays, E.A. 2000. Plant Insect Interactions: a synthesis. Abstract International Congress of Entomology. Vol I pp 8-13.
- Bernays, E. A., & R. F. Chapman. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York. 312 pp.
- Bertoni, A. & Palacios, S. 2009. Sinergismo de la acción insecticida entre los aceites esenciales de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling, *Citrus sinensis* L. y *Eucalyptus cinerea* F.V. Muell y sus componentes mayoritarios, contra *Musca domestica* L. VXII Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza. Resúmenes 19.
- Betts R. A. 2001. Biogeophysical impacts of land use on present-day climate: near-surface temperature change and radiative forcing, *Atmos. Sci. Lett.* 2: 39-51.
- Boeke, S.J.C., Barnaud, J.A., van Loon, J. A., Kossou, D.K., van Huis, A. & Dicke, M. 2004. Efficacy of plant extracts against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Int. J. Pest Manage.* 50(4): 251-258.
- Bogliaccini, A. 2001. Almacenamiento hermético. *Revista Granos*, 6(27). 110 pp.
- Boland, D.J., Brophy, J.J. & House, A.P.N. 1991. Eucalyptus Leaf Oils: Use, Chemistry, Distillation and Marketing. ACIAR/CSIRO Inkata Press, Melbourne, Australia. 252 pp.
- Bonino, M.A., Zigaldo, J.A. & Gleiser, R.M. 2008. Repelencia de aceites de *Aloysia* contra *Aedes aegypti*. VII Congreso Argentino de Entomología. Huerta Grande. Córdoba. Argentina. Resúmenes 172 pp.
- Bouda; H., Tapondjou, L.A., Fontem, D.A. & Gumedzoe, M.Y.D. 2001. Effect of Essentials oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 37: 103-109.

- Bowers, M.D., Stamp, N.E. & Fajer, E.D. 1991. Factors affecting calculation of nutritional indices for foliage feeding insects: an experimental approach. *Entomol. Exp. Appl.* 61: 101-116.
- Braga Rodrigues, J., Guerra Pimentel, M., D'Antonino Faroni, L., Sousa, A. & Magalhaes de Souza, A. 2008. Dispersao da resistencia a fosfina em insetos-praga de produtos armazenados. XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Area: Pragas de Graos Armazenados. Resumo ID:1193-3. Uberlandia, MG.
- Brooker, M.I.H. & Kleinig, D.A., 2006. Field Guide to *Eucalyptus*. Vol.1. South-eastern Australia, Third edition. Bloomings, Melbourne.
- Bruce, T.J.A., Wadhams, L.J., & Woodcock, C.M. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.* 10: 269-274.
- Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants, Ed. Lavoisier, Paris, pp 406-466.
- Bughio, F.M. & Wilkins, R.M. 2004. Influence of malathion resistance status on survival and growth of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), when fed on flour from insect-resistant and susceptible grain rice cultivars. *J. Stored Prod. Res.* 40: 65-75.
- Caballero García, C. Inédita. 2004. Efectos de terpenoides naturales hemisintéticos sobre *Leptinotarse decemlineata* (Say) y *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Nocturnae). Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid 2004, 107 pp.
- Cao, Y., Song, Y. & Sun, G. 2003. A survey of psocid species infesting stored grain in China and resistance to phosphine in field populations of *Liposcelis entomophila*, pp: 622-667. *En*: Credland, P.F.; Armitage, D.M.; Bell, C.H.;

Cogan, P.M. y Highley, E. (Eds.). Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-product Protection, York, CAB International, Oxon, UK.

Carlini, C.R. & Grossi-de-Sa, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.

Casadío, A. Inédita. Toxicidad y resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Tribolium castaneum* de la República Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires: Facultad de Ciencias Exactas Naturales, Bs. As. 1994, 68p.

Casadío, A.A. & Zerba, E.N. 1996. Desarrollo poblacional de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), en diferentes dietas y su influencia sobre la toxicidad y resistencia a malatión. *Bol. San. Veg. Plagas* 22: 511-520.

CASAFE. 2005. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. II. Tomo II. Ed. CASAFE. Bs.As. Argentina. 2080 pp.

CASAFE. 2006. <http://www.casafe.org/sobrelaindustria.htm>

Casida, J.H. Pesticide mode of action, evidence for implications of a finite number of biochemical targets. En: Casida, J.H., 1990 (Ed.), *Pesticides and Alternatives. Innovative Chemical and Biological Approaches to Pest Control*, Elsevier, Amsterdam, pp. 11-22.

Casida, J. & Quistad, G. 1995. Pyrethrum ethers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 356 pp.

- Casida, J.E. & Quistad GB. 1998. Golden age of insecticide research: Past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43: 1-16.
- Ceferino Toloza, A., Zygadlo, J., Mougabure-Cueto, G., Zerba, E., Faillaci, S. & Picollo, M. I. 2006. The fumigant and repellent activity of aliphatic lactones against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 101(1): 55-56.
- Cerda, H., López, A., Sanoja, O., Sánchez, P. & Jaff, K. 1995. Atracción olfativa de *Cosmopolites sordidus* Germar (1824) (Coleoptera: Curculionidae) estimulado por volátiles originados en musáceas de distintas edades y variedades genómicas. *Agron. Trop.* 46: 413-429.
- Cerda, H., Fernández, G., López, A. & Vargas, J. 1996. Estudio de la atracción del gorgojo rayado *Metamasius hemiptenis* (Coleoptera: Curculionidae) a olores de su planta huésped y su feromona de agregación. *Caña de Azúcar* 14: 53-70.
- Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T, Leitem, R.C., Furlong, J., & Fortes, L.C.P. 2002. Acaricide effect of *Eucalyptus* spp. essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 39: 247-253.
- Chalchat J.C., Kundakovic T. & Gorunovic, M.S. 2001. Essential oil from the leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Myrtaceae from Jerusalem. *J. Essent. Oil Res.* 13(2): 105-107.
- Chaudhry, M.Q. 1997. A review of the mechanism involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pest. Sci.* 49: 213-228.
- Chaudhry M. Q. 2000. Phosphine resistance. *Pesticide Outlook* 3: 88-91.

- Chennoufi, R., Morizur, J., Richard, H. & Sandret, F. 1980. Study of *Eucalyptus globulus* essential oils from Morocco (young and adult leaves). *Riv. Ital. EPPOS*, 62: 353-357.
- Chludil, H., Russo, S., Sztarker, N. & Leicach S. R. 2007. Diferencias en la actividad biológica y composición química de aceites esenciales de hojas maduras y de rebrote de *Eucalyptus camaldulensis* Den. 30° Congreso Argentino de Horticultura. 1° Simposio Internacional sobre Cultivos Protegidos. La Plata. Buenos Aires. Argentina, Resúmenes 35.
- Choi, W., Lee, E., Choi, B., Park, H. & Ahn, Y. 2003. Toxicity of Plant Essential Oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 96(5): 1479-1484.
- Chown, S.L., & Nicholson, S.W., 2004. Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns. Oxford University Press, Oxford, pp. 115-153.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L. & Vlietinck, A.J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79: 213-220.
- Clark G. & Cameron, S. 2000. Eucalyptol. *Perfumer & Flavorist.* 25: 6-16.
- Collins, P.J., Darglish, G.J., Pavic, H., Lambkin, T.M. & Kapittke, R. 2002. Combating strong resistance to phosphine in stored grain pests in Australia. *En: Wright, E.J., Banks, H.J., Highley, E. (Eds.), Stored Grain in Australia 2000. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, Adelaide, 1-4 August 2000. CSIRO Stored Grain Research Laboratory, Canberra, Australia, pp. 109-112.*



- Collins, P. 2006. Resistance to chemicals treatments in insect pests of stored grain and its management. 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 4. Pest resistance to Pesticides and Control Measures. Keynotes, pp. 277-282.
- Consejo de Europa, 1992. Flavouring substances and natural sources of Àavourings. I, 4th Edition: Chemically-De ned Flavouring Substances.
- Coppen, J. & Hone, G.A. 1992. *Eucalyptus* oils: a review of production and markets. *N.R.I. Bulletin* 56: 45-75.
- Cornell, H. V. & Hawkins, B.A. 2003. Patterns of herbivorous insect response to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *The American Naturalist* 161: 507-522.
- Correa, A., Santos, J., Cordeiro, E. & Guedes, R. 2006. Fluctuating asymmetry in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 4. Pest resistance to Pesticides and Control Measures. Conference Papers, pp 285-291.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P.L. & Canale, A. 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 45(2): 125-132.
- Cozzo, D. 1976. Tecnología de la forestación en Argentina y América Latina. Bs. As. 76 pp.

- Cox, P. 2002. Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. *J. Stored Prod. Res.* 38: 95-115.
- Cox, P. 2004. Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. *J. Stored Prod. Res.* 40(1): 1-25.
- Croteau, R. 2000. Natural products (Secondary metabolites). Chapter 24. *En: Biochemistry and Molecular Biology of plants*. Buchanan, B.; Grissem, W. & Jones, R. (eds.) American Society of Plants Physiologists. 69 pp.
- Dahanukar, A., Hallem, E. A. & Carlson, J. R. 2005. Insect chemoreception. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15: 423-430.
- Dakora, F.D. & Phillips, D.A. 1996. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 1-20.
- Dal Bello, G. & Padín, S. 2006. Olfatómetro simple para evaluar la Actividad Biológica de aleloquímicos vegetales en *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Agrociencia* 10(2): 23-26.
- Daniewski W. M., Skibicki P., Gumulka M., Drozd B., Grabarczyk H. & Błoszyk E., 1988. Sesquiterpene lactones. XXXV. Constituents of *Reichardia tingitana* L. Roth. and their antifeedant activity. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 57: 539-545.
- Defagó, M.T.; Diván, S.; Díaz Napal, G., Palacios, S.M. & Valladares, G. 2012. Distribución de estructuras sensoriales que detectan antialimentarios en larvas y adultos de Coleoptera. VIII Congreso Argentino de Entomología. San Carlos de Bariloche, Argentina, Resúmenes 102.

- De Liñán, C. 1998. Entomología Agroforestal. Ed. Agrotécnicas S.L. Madrid. 1029-1175.
- De los Mozos Pascual, M. 1997. Plagas de productos almacenados. *Bol. S.E.A.* 20: 93-109.
- Dellacassa, E., Menéndez, P. & Moyna P. 1990. Chemical Composition of *Eucalyptus* Essential Oils Grown in Uruguay. *Flav. Frag. J.* 5: 91-95.
- Dellacassa, E., Menéndez, P., Cerdeiras, P. & Moyna P. 1989. Antimicrobial activity of *Eucalyptus* essential oils. *Fitoterapia* 60: 6-8.
- Dell`Orto Trivelli, H. & Arias Velazquez, C. 1985. Insectos que dañan granos y productos almacenados. Ed. Oficina Reg. de la FAO para América Latina y El Caribe. Santiago, Chile, 142 pp.
- Dent, D. 2000. Insect Pest Management. CABI, 2nd edición.
- Derwirsch, E., Benziane, Z. & Boukir, A. 2009. GC/MS analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in atlas median from Morocco. *Advanced in Natural and Applied Sciences*.
- Descamps, L. R., Reviriego. M. E., Suarez A.A. & Ferrero, A. A. 2004. Reproducción de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) y de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) en cultivares de trigo argentinos. *Bol. San. Veg. Plagas* 30: 171-175.
- Descamps, L. Inédita. Factores que afectan el control de las plagas de los granos almacenados en el área de influencia del Puerto de Ingeniero White, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Tesis Magíster, Universidad Nacional del Sur: Dpto. de Agronomía. Bs. As. 2002, 103 pp.

- Descamps, L. Inédita. Actividad biológica de extractos vegetales y aceites esenciales de *Schinus molle* var. *areira* (Anacardiaceae) en *Tribolium castaneum* Herbst. (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae), plaga de grano almacenado. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur: Dpto de Agronomía. Bahía Blanca, Bs. As. 2007, 147 pp.
- Descamps, L., Stefanazzi, N. & Ferrero, A.A. 2006. Actividad fumigante de aceites esenciales de hoja y fruto de *Schinus molle*, var: *areira* (Anacardiaceae) en larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Catamarca Argentina, Resúmenes 401.
- Dethier, V.G. 1982. Mechanism of host plant recognition. *Ent. Exp. Appl.* 31: 49-56.
- Dethier, V., Barton Browne, L. & Smith, C. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* 53: 134-136.
- Deverall, B. J. 1977. Defence mechanisms of plants New York: Cambridge University Press. Cambridge, London, **New York**, and Melbourne, pp. 110.
- Dharmagadda, V., Naik, S., Mittal, P. & Vasudevan, P. 2004. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technol.* 96(11): 1235-1240.
- Doran, J. & Bell, R. 1994. Influence of non-genetic factors on yield of monoterpenes in leaf oils of *Eucalyptus camaldulensis*. *New Forests* 8: 363-379.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils Aromatic and Medicinal Plant Group. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.

dos Santos Veloso, M., R., Barboza Silva, L., Carvalho Guedes, R., Evangelista Visotto, L., Fernandes Moreira, L., Pilon, A., de Oliveira, J. & da Paixao, G. 2008. Taxa respiratoria e comportamento de populacoes resistentes e susceptvel do caruncho do milho expostas á cipermetrina. XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Granos Armazenados. Resumo ID:1915-2. Uberlandia, MG.

Ducom, P. 2006. The Return of the Fumigants. Fumigation and Control Atmosphere. 9<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection., pp 510-516.

Ducom, P., Dupuis, S., Stefanini, V. & Guichard, A. 2002. Sulfuryluoride as a new fumigant for the desinfestation of our mills in France. *Advances in Stored Product Protection* 8<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection., pp. 900-903.

Duke, J.A., 2004. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases. Disponible online at <http://www.ars-grin.gov/duke/> (Consultado el 3 de Nov, 2010).

Ebadollahi, A., Safaralizadeh, M.H., Pourmirza, A.A. & Ghosta, Y. 2010. Contact and fumigant toxicity of essential oils of *Lavandula stoechas* L. and *Eucalyptus globulus* Labill grown in Iran against *Lasioderma serricorne* F. *J. Biharean Biol.* 4(1): 31-36.

Ebadollahi, A. 2011. Antifeedant activity of essential oils from *Eucalyptus globulus* Labill and *Lavandula stoechas* L. on *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Biharean Biol.* 5(1): 8-10.

- Einhellig FA. 1995. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. En: *Allelopathy, Organisms, Processes and Applications*. (M. Inderjit, M. Dakshini y F.A.Einhellig, Eds.). ACS Symposium Series 582: Washington, D.C., pp. 96-116.
- Enan, E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem. Physiol. C* (130): 325-337.
- Enan, E. 2005. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from american cockroach and fruit y in response to plant essential oils. *Arch. Biochem. Physiol.* 59:161-171.
- FAO (U.N. Food and Agriculture organization), Forestry Department, 1995. In *Flavours and fragrances of plant origin*, chapter 5 Eucalyptus oils. <http://www.fao.org/documents/showcdr.asp?urlfile=docrep/V5350E/V5350E00.htm> 111 pp.; consulta octubre 2006.
- FAO (U.N. Food and Agriculture Organization). 2008. Insectos que dañan granos almacenados. <http://www.fao.org/documents/showcdr.asp?urlfile=docrep/V5350E/V5350E00.htm> 212 pp.; consulta mayo 2009.
- Ferreira González, V.1997. *Cromatografía: fundamentos y Práctica*. pp. 227.
- Ferreira, J.T.B., Correa, A.G. & Vieira, P.C. 2001. *Produtos naturais no controle de insetos*. Ed. Da UFSCar. São Carlos, SP, Brasil, 176 pp.
- Ferrero, A. Inédita. Determinación de los factores de resistencia a malatión en una cepa de *Tribolium castaneum*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur: Dpto. de Biología, Bahía Blanca, Bs. As. 1988, 96 pp.

- Ferrero, A., Werdin Gonzalez, J. & Sanchez Chopa, C. 2006. Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia* 77: 381-383.
- Fields, P., Xie, Y. & Hou, X. 2001. Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 37: 359-370.
- Fields, P. 2006. Effect of *Pisum sativum* fractions on the mortality and progeny production of nine stored-grain beetles. *J. Stored Prod. Res.* 42: 86-96.
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L.G. & Scheffer, J.J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flav. Frag. J.* 23(4): 213-226.
- Finch, S. & Collier, R.H. 2000. Host-plant selection by insects a theory based on 'appropriate/inappropriate landings' by pest insects of cruciferous plants. *Entomol. Exp. A ppl.* 96: 91-102.
- Folcia, A.M., Regonat, M., Romero, A.M., Menéndez, A. & Martinez-Ghersa, M.A. 2008. Control de *Myzus persicae* mediado por el sistema de defensa de las plantas. VII Congreso Argentino de Entomología. Huerta Grande. Córdoba. Argentina, Resúmenes 351.
- Folcia, A. M., Collavino, M., Russo, S., Regonat, M. & Caffarini, P. 2010. Control alternativo de áfidos (*Myzus persicae*) en rúcula (*Eruca sativa*) con inductores de la resistencia vegetal. XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Ciudad de Rosario. Santa Fé. Argentina, Resúmenes 350.
- Folcia, A.M., Russo, S. & Chludil, H. 2009. Control de *Mysus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) en repollo (*Brassica oleracea var capitata*) con aceites esenciales de eucalipto blanco. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas.

Protección Vegetal. Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina, Resúmenes 120.

Fradin, M.S. & Day, J.F. 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N. Engl. J. Med.* 347:13-18.

Gamarra, K., Quiroga, Y., Artola, S. & van Baren, C. 2009. Búsqueda de actividad repelente en paico (*Chenopodium multifidum* Linné). XVII Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza, Argentina, Resúmenes 35.

García M., Donadel, O.J., Ardanaz, C.E., Tonn, C.E. & Sosa, M.E. 2005a. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest. Manag. Sci.* 61: 612-618.

García M., Gonzalez Coloma, A., Tonn, C.E. & Sosa, M.E. 2005b. Efectos letales del aceite esencial de *Fluorensia oolepis* Blake (Asteraceae) frente a cuatro especies plagas. VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, Resúmenes 312.

Garcia Correia Tavares, M. Inédita. Bioatividade da Erva-de-Santa Maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em Relacao a *Sitophilus zeamais* MOTS, 1855 (Coleoptera: Curculionidae). Proyecto Fin de Carrera, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de Sao Paulo. 2002, 152 pp.

Gardulf, A., Wohlfart, I. & Gustafson R. 2004. A prospective cross-over Weld trial shows protection of lemon eucalyptus extract against tick bites. *J. Med. Entomol.* 41: 1064-1067.

Gil-Grado, A. & Muñiz, M. 1978: Nuevas transformaciones en experimentos biológicos basadas en la respuesta cuantitativa. *Bol. Serv. Plagas* 4: 89-229.



- Gillott, C. 2005. Entomology. Springer. Third edition. 831 pp.
- Giordano, O., Sosa, M. & Tonn, C. 2000. Actividad Biológica de Metabolitos Secundarios de Plantas frente a *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Anales Acad. Nac. de Cs. Exactas Fisicas y Naturales* 52: 13-17.
- Golfari, L. 1985. Distribución regional y condiciones ecológicas de los eucaliptos cultivados en la Argentina. Problemas inherentes. Bs.As. 32 pp.
- Gols, G. J., van Loon, J. & Messchendorp, L. 1996. Antifeedant and toxic effects of drimanes on colorado potato beetle larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 69-76.
- Grayson, D. H. 2000. Monoterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 17: 385-419.
- Green, C. 2002. Export development of essential oils and Spices by Cambodia. C. L. GreenConsultancyServices, Kent, UK. [http://www.moc.gov.kh/intergrated\\_framework/CambodiaITC\\_Final\\_report.pdf](http://www.moc.gov.kh/intergrated_framework/CambodiaITC_Final_report.pdf) (Último acceso: marzo 2011).
- Gupta, A.K., Behal, S.R., Awasthi, B.K. & Verma, R.A. 2000. Efficacy of different vegetable oils against *Sitophilus oryzae* in maize grain. *Indian J. Entomol.* 62: 301-303.
- Guedes, A.P, Cardoso, V.N., de Mattos, J.C., Dantas, F.J., Matos, V.C., Silva, J.C., Bezerra, R.J. & Caldeira-de-Araújo, A. 2006. Cytotoxic and genotoxic effects induced by stannous chloride associated to nuclear medicine kits. *Nucl. Méd. Biol.* 33(7): 915-921.
- Hallem, E.A., Dahanukar, A. & Carlson J.R. 2006. Insect odor and taste receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 113-135.

- Han, M.K., Kim, S.I. & Ahn, Y.J. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). *J. Stored Prod. Res.* 42: 15-22.
- Hammerschmidt, R. & Schultz, J.C. 1996. Multiple defenses and signals in plant defense against pathogens and herbivores. *Recent Adv. Phytochem.* 30: 121-154.
- Harborne, J.B. 1982. *Introduction to Ecological Biochemistry*. Academic Press, New York. 105 pp.
- Harbone, J.B. 1989. Biosynthesis and function of antinutritional factors in plants. *En: Association of Applied Biologists (Ed.), Aspects of Applied Biology 19. Antinutritional factors, potentially toxic substances in plants* pp: 21-28. Institute of Horticultural Research, Wellesbourne, Warwick CV35 9EF, U.K.
- Harbone, J.B. 1998. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis, essential oils*, third edition, Chapman y hall (Eds), London.
- Hasan, M. & Reichmuth, C. 2002. Phosphine tolerance in two bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *C. maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Advances in stored product protection. Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored Product Protection.* pp. 656-661.
- Hassanali, A., Lwande, W., Ole-Sitayo, N., Moreka, L., Nokoe, S. & Chapy A.1990. Weevil repellent constituents of *Ocimum suave* leaves and *Eugenia caryophylla* cloves used as grain protectant in parts of East Africa. *Discov. Innovat.* 2: 91-95.
- Horn, F., Horn, P. & Sullivan, J. 2005. Current practice in fresh fruit fumigation with phosphine in Chile. *En: Proc. Annual International Research Conference on*

Methyl Bromide Alternative and Emissions Reductions. *October 30-November 1st. San Diego. California.*

- Houghton, P.J., Ren, Y. & Howes, M.J. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23: 181-199.
- Huang, Y., Ho, S. H., Lee, H.C. & Yap, Y.L. 2002. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* 38: 403-412.
- Huang, Y. & Ho, S.H. 1998. Toxicity and antifeedant activity of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.* 34: 11-17.
- Huang, Y., Ho, S.H. & Kini, R.M. 1999. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 92: 676-683.
- Huang, Y., Tan, J.M.W., Kini, R.M. & Ho, S.H. 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.* 33: 289-298.
- Huang, Y., Lam, S.L. & Ho, S.H. 2000. Bioactivities of essential oil from *Elettaria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 36: 107-117.
- Ibrahim, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tillikkala, K. & Holopainen, J.K. 2001. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special referente to limonene and its suitable for control of insect pests. *Agric. Food Sci.* 10: 243-259.

- Ibrahim, S.K., Traboulsi, A.F. & El-Haj, S. 2006. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathol. Mediterr.* 45: 238-246.
- Infante, G. S. & Calderón, Al C. 1994. Manual de Análisis Probit. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 108 pp.
- INTA. 2008. Eficiencia de poscosecha: generación, desarrollo y difusión de tecnologías para aumentar la ciencia de acondicionamiento, secado y almacenaje de cereales, oleaginosas y cultivos industriales del país. Disponible en: [http://www.inta.gov.ar/balcarce/precop/2008/e\\_c.htm](http://www.inta.gov.ar/balcarce/precop/2008/e_c.htm).
- INTA-SOPORCEL. 2000. Primer Seminario Internacional del *Eucalyptus globulus* en Argentina. Mar del Plata. Argentina. 129 pp. y Anexo.
- Ishii, T., Matsuzawa, H. & Vairappan, C.S. 2010. Repellent activity of common spices against the rice weevil, *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera, Curculionidae). *J. Trop. Biol. Conserv.* 7: 75-80.
- Isman, M. 2002. Insect antifeedants. *Pesticide Outlook* 2: 152-157.
- Isman, M. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Isman, M. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19: 603-608.
- Isman, M.B. & Machial, C.M., 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *En: Rai, M., Carpinella, M.C. (Eds.), Naturally Occurring Bioactive Compounds. Advances in Phytomedicine* 3. Elsevier, pp. 29-44.

- Jayas, D., White, N. & Muir, W. 2006. Stored grain Ecosystems. *En*: Jayas, D; N. White y W. Muir (Eds), *Stored Grain Ecosystems*. Marcel Dekker Inc. New York. University of Manitoba. Department of Agricultural Engineering. Winnipeg. Manitoba. Canada, pp. 353-409.
- Jbilou, R., Ennabili, A. & Sayah, F. 2006. Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *African J. Biotech.* 5(10): 936-940.
- Jovanovic, Z., Kosti, M. & Popovic, Z. 2007. Grain-protective properties of herbal extract against the bean weevil *Acanthoscelides obtectus* Say. *Ind. Crop. Prod.* 26: 100-104.
- Juliana, G. & Su, H.C.F. 1983. Laboratory studies on several plant materials as insect repellents for protection of cereal grains. *J. Econ. Entomol.* 76: 154-157.
- Kahan, A., Padín, S., Ricci, M., Ringuelet, J., Cerimeli, E., Ré, M., Henning, C. & Basso, I. 2007. Biocontrol de *Brevicoryne brassicae* L. con aleloquímicos en repollo. 30 ° Congreso Argentino de Horticultura. 1° Simposio Internacional sobre Cultivos Protegidos. La Plata. Buenos Aires. Argentina, Resúmenes 32.
- Kalinović, I., Rozman, V., Guberac, V. & Marić, S. 2002. Insecticidal activity of some aromatic plants from Croatia against lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* f.) on stored wheat. *Advances in Stored Product Protection. En*: 8th International Working Conference on Stored Product Protection. Chemical and Physical Control, pp.768-775.
- Keita, S., Vincent, C., Schmita, J. P., John Thor Arnason, J.T. & Belanger, A. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant. and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* 37: 339-349.

- Ketoh, G.K., Glitho, A.I. & Huignard, J. 2002. Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (F) development with essential oil extracted from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. (Poaceae), and the wasp *Dinarmus basalis* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Stored Prod. Res.* 41: 363-371.
- Kheradmandk, A., Sadat, N.S.A. & Sabahi G. 2010. Repellent effects of essential oil from *Simmondansia chinensis* (Link) against *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus and *Callosobruchus maculates* Fabricius. *Res. L. Agri. Sci.* 1(2): 66-68.
- Kim, S.I., Park, C., Ohh, M.H., Chan-Cho, H. & Ahn, Y.J. 2003a. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobidae). *J. Stored Prod. Res.* 39: 11-19.
- Kim, S.I., Roh, J.Y., Kim, D.H., Lee H.S. & Ahn, Y.J. 2003b. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *J. Stored Prod. Res.* 39: 293-303.
- Kobaisy, M., Tellez, M.R., Webber, C.L., Dayan, F.E., Schrader, K.K. & Wedge, D.E. 2001. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *J. Agr. Food Chem.* 49: 3768-3771.
- Ko Ko, K., Juntarajumnong, W. & Chandrapatya, A. 2009. Repellency, Fumigant and Contact Toxicities of *Melaleuca cajuputi* Powell against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* Herbst. *Thai J. Agricul. Science* 42(1): 27-33.

- Kordali, S., Aslan, I., Almasur, O. & Cakir, A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three artemisia species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Ind. Crop Prod.* 23(2): 162-170.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., & Saaya, E., 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.* 58: 1101-1106.
- Koul, O. 1996. Neem research and development: present and future scenario. *En: S.S. Handa and M.K.Koul (eds.), Supplement to Cultivation and Utilization of Medicinal Plants*, PID, CSIR, New Delhi, pp. 583-611.
- Koul, O. & Dhaliwal, G. 2001. *Phytochemical Biopesticides*. Amsterdam: Harwood Academic. 223 pp.
- Kováts, E. 1958. "Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone". *Helv. Chim. Acta* 41 (7): 1915-1932.
- Kováts, E. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* 1: 229-247.
- Kuehn, B.M. 2005. C.D: new repellents for West Nile fight. *JAMA* 293 (21): 2583.
- Langenheim, J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280.

- Lee, B.H., Annis, P.C., Tumaalii, F., & Cho, 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.
- Lee, B.H., Choi, W.S., Lee, S.E. & Park, B.S. 2001a. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Crop Prot.* 20: 317-320.
- Lee, S.E., Lee, B.H., Choi, W.S., Park, B.S., Kim, J.G. & Campbell, B.C. 2001b. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Pest Manag. Sci.* 57: 548-553.
- Lee, S., Peterson, C.J. & Coats, J.R. 2002. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J Stored Prod. Res.* 39(1): 77-85.
- Leicach, S.R., Russo, S., Schindler, V., Regonat, A. & Yaber Grass, M. 2005. Bioactividad de extractos de etéreos y aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides* (L.) en la alimentación de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). VI Congreso Argentino de Entomología, San Miguel de Tucumán, Argentina, Resúmenes 244.
- Leicach, S.R. 2006. Alelopatía. Interacciones químicas en la comunicación y defensa de las plantas. Editorial Eudeba, 202 pp.
- Leicach, S.R., Garau, A.M., Guarnaschelli, A.B., Yaber Grass, M.A., Sztarker, N.D. & Dato, A. 2010. Changes in *Eucalyptus camaldulensis* essential oil composition as response to drought preconditioning. *J. Plant Inter.* 5(3): 205-210.



- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., & Chory, J. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science* 272: 398-401.
- Li, H., Madden, J.L. & Potts, B.M., 1995. Variation in volatile leaf oils of the Tasmanian *Eucalyptus* species-1, Subgenus *Monocalyptus*. *Biochem. Syst. Ecol.* 23: 299-318.
- Liu, X., Chen, Q., Wang, Z., Xie, L. & Xu, Z., 2008. Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. *Front. Forestry China* 3: 232-236.
- Liu, Z. & Ho, S. 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.
- López, M., Jordán, M. & Pascual-Villalobos, M. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pest. *J. Stored Prod. Res.* 44: 273-278.
- Lu, J. & Wu, S. 2010. Bioactivity of essential oil from *Ailanthus altissima* bark against 4 major stored-grain insects. *Afr. J. Micro. Res.* 4: 154-157.
- Lucía, A., Audino, P.G., Seccacini, E., Licastro, S., Zerba, E. & Masuh, H., 2007. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23: 299-303.
- Maggi, M.E., Carpinella, M.C., Ferrayolic, C. & Palacios, S.M. 2005. Evaluación de la actividad insecticida de extracto de *Artemisia annua* (Asteraceae) y del compuesto activo artemisin en siete especies de insectos plagas. VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, Resúmenes 344.

- Mandal, S., Dwivedi, P.D., Singh, A., Naqvi, A.A. & Bagchi, G.D. 2001. Capillary gas chromatographic analysis of *Eucalyptus globulus* from different geoclimatic zones in India. *J. Essent. Oil Res.* 13(3): 196-197.
- Mantero, C., García, C., Rodríguez, P., Escudero, R., Priore, E. & Menéndez, P. 2007. Potencialidad para producción de aceites esenciales en especies de *Eucalyptus* cultivadas en Uruguay. *Agrociencia.* XI (2):17-23
- Mareggiani, G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 60: 22-30.
- Mareggiani, G. Inédito. Efecto biológico de withanólidos de *Salpichroa origanifolia* y *Datura ferox* (Solanaceae) sobre *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) y *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. F.C.E.N. Bs. As. 1999, 172 pp.
- Mareggiani, G., Zamuner, N. & Cortez, D. 2007. Control de *Cyclocephala signaticollis* (Coleoptera, Melolonthidae, Dynastinae) mediante extractos de paraíso. 30 ° Congreso Argentino de Horticultura. 1° Simposio Internacional sobre Cultivos Protegidos. La Plata. Buenos Aires. Argentina, Resúmenes 358.
- Marín-Loaiza, J. & Céspedes, C. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Rev. Fitotec. Mex.* 30: 327-351.
- MBTOC, 2002. Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee (MBTOC) 2002 Assessment. UNEP, Nairobi, Kenya.
- Metcalf, C. & Flint, W. 1974. *Insectos destructivos e insectos útiles: sus costumbres y su control*, 4nd Edition. Cía. Continental S.A. México, 1208 pp.

- Metcalf, R. 1994. Insecticides in pest management, pp: 245-314. *En*: Metcalf, R.L. y Luckmann, W.H. Introduction to insect pest management. 3 Ed. Wiley, Nueva York. 650 pp.
- Mishra, B.B. & Tripathi, S.P. 2011. Repellent activity of plant derived essential oils against *Sitophilous oryzae* (Linnaeus) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Singapore J. Scientific Res.* 1: 173-178.
- Mordue Luntz, A.J. 2003. Arthropod semiochemicals: mosquitoes, midges and sealice. *Biochem. Soc. T.* 31: 128-133.
- Mondal, M. & Khalequzzaman, M. 2006. Toxicity of essential oils against red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Bio. Sci.* 14: 43-48.
- Mondal, M. & Khalequzzaman, M. 2010. Toxicity of naturally occurring compounds of plant essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Bio. Sci.* 10: 10-17.
- Nakama, V., Alfieri, A., Rodriguez Traverso, J., Moschini, R. & Conti, H. 2000. Aptitud de las tierras para eucaliptos con fines de planeamiento regional en la provincia de Buenos Aires. *SAGPyA Forestal* 16: 2-11.
- Nakamuta, K., van Tol, R.W. & Visser, J.H. 2005. An olfactometer for analyzing olfactory responses of death-feigning insects. *Appl. Entomol. Zool.* 40: 173-175.
- Nari, A. & Hansen, J.W. 1999. Resistance of ecto and endo-parasites: Current and future solutions. OIE. Paris.

- Nathan, S.S. 2007. The use of *Eucaliptus tereticornis* Sn (Myrtaceae) oil (leaf extract) as natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Biores. Tech.* 98: 1856-1860.
- Nation J. L. 2002. Insect Physiology and Biochemistry. *CRC Press* 301-310.
- Navarro, S. 2006. New global challenges to the use of gaseous treatments in stored product. *En: 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 6. Fumigation and Control Atmosphere. Keynotes*, pp. 495-509.
- Navarro, S. & Donahye, J. 2007. Restrictions to the use of fumigants and opportunities for substitution with non-chemicals treatments. *En: Conference of IOBC WPRS (OILBSROP) working group on Integrated Protection of Stored Products, Poznan, Poland*, pp. 19.
- Navarro-Silva, M.A., Marques, F.A., Duque, E. & Jonny, E. 2009. Review of semiochemicals that mediate the oviposition of mosquitoes: a possible sustainable tool for the control and monitoring of Culicidae. *Rev. Bras. Entomol.* 53(1): 1-6.
- Negahban, M. & Moharramipour, S. 2007. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 43:123-128.
- Negahban, M., Moharramipour, S. & Sefidkon, F. 2006. Chemical composition and insecticidal activity of *Artemisia scoperte* essential oil against three coleopteran stored product insects. *J. Asia-Pacific Entomol.* 9(4): 381-388.

- Nerio, L., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grow in Colombia against *Sitophilus zeamais* Mostschulsky (Coleoptera). *J. Stored Prod. Res.* 45: 212-214.
- Nerio, L.S., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technol.* 101: 372-378.
- Ngamo, T.S.L., Ngatanko, I., Ngassoum, M.B, Mapongmestsem, P.M. & Hance T. 2007. Insecticidal efficiency of essential oils of 5 aromatic plants tested both alone and in combination towards *S. oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Res. J. Biol. Sci.* 2(1): 75-80.
- Nordlung, D.A.1981. Semiochemicals: a review of the terminology. *En:* Nordlung, D.A.; Jones, R.L.; Lewis, W.J. (Ed.), *Semiochemicals: their role in pest controls*. Ed. London, Wiley, pp.13-28.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H., Bekele, A.J. & Hassanali, A. 1998. Toxicity and protectant potencial of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum*, against four stored product beetles. *Int. J. Pest Manag.* 44: 203-209.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H., Bekele, J. & Hassanali A. 1997. Biological activity of 1,8 cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *J. Appl. Entomol.* 121: 237-243.
- Ogendo, O., Kostyukovsky, M., Ravid, U., Matasyoh, J., Deng, A., Omolo, E., Kariuki, S. & Shaaya, E. 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. *J. Stored Prod. Res.* 44: 328-334.

- Ojmelukwe, P.C. & Adler, C. 1999. Potencial of zimmtaldehyde, 4-allyl-anisol, linalool, terpineol and other phytochemicals for the control of the confused flour beetle (*Tribolium confusum* J. d. V.) (Coleoptera-Tenebrionidae). *J. Pest Sci.* 72: 81-86.
- Omar, S., Marcotte, M., Fields, P., Sanchez, P.E., Poveda, L., Mata, R., Jiménez, A., Durst; T., Zhang, J., Mackinnon, S., Leaman, D., Arnason, J.T. & Philogene, B.J.R. 2007. Antifeedant activities of terpenoids isolated from tropical Rutales. *J. Stored Prod. Res.* 43: 92-96.
- Ostrauskas H. & Taluntyté L. 2004. Insects of stored plant products in Lithuania. *Ekologija* 4: 50-57.
- Padín, S., Ringuelet, J., Fusé, C., Henning C., Imaz, J., & DalBello, G. 2008. Bioactividad del aceite esencial de *Lippia alba* sobre *Sitophilus oryzae*. VII Congreso Argentino de Entomología, Huerta Grande, Córdoba, Argentina, Resúmenes 369.
- Padín, S., Ringuelet, J.A., Dal Bello, G., Cerimele, E.L., Re, M.S. & Henning, C.P. 2000. Toxicology and Repellent Activity of essential Oils on *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* Herbst. *J. Herb. Spic. Med. Plant.* 7(4): 67-73.
- Pagula, F.P., Baser, K.H.C., & Kürkçüolu, M. 2000. Essential oil composition of *E. camaldulensis* Dehn. from Mozambique. *J. Essent. Oil Res.* 12: 333-335.
- Pandey, R., Kalra, A., Tandon, S., Mehrotra, N., Singh, H.N. & Kumar, S. 2000. Essential oils as potent source of nematicidal compounds. *J. Phytopathol.* 148: 501-502.

- Papachristos, D.P. & Stamopoulos, D.C. 2002a. Repellent, Toxic and Reproduction Inhibitory Effects of Essential Oil Vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae), *J. Stored Prod. Res.* 38 (2): 117-128.
- Papachristos, D.P. & Stamopoulos, D.C. 2002b. Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) *J. Stored Prod. Res.* 44: 126-135.
- Papachristos D.P. & Stamopoulos, D.C. 2004. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* 40: 517-525.
- Papachristos, D.P. & Stamopoulos, D.C. 2003. Selection of *Acanthoscelides obtectus* (Say) for resistance to lavender essential oil vapours. *J. Stored Prod. Res.* 39: 433-441.
- Pappas, R. & Sheppard-Hanger, S. 2000. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from South Florida: a high crytone/low 1,8-cineole eucalyptus. *J. Essent. Oil Res.* 12: 383-384.
- Park, J.D., Habeebu, S.S.M. & Klaassen CD. 2002. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 171: 105-115.
- Pascual-Villalobos, M. 2002. Volatile activity of plant essential oils against stored-product beetle pest. *Advances in Stored Product Protection. En: 8<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection. Chemical and Physical Control.*, pp. 648-650.
- Pascual-Villalobos, M. 2006. Occurrence of coleoptera and lepidoptera species in rice stores at Calasparra (Murcia, Spain). *En: 9<sup>th</sup> International Working*

Conference on Stored Product Protection. Plenary session 5. Biology, Behavior, and Pest Detection on Stored Grain, pp. 387-391.

Pascual-Villalobos, M., Ballesta-Acosta, M. & Soler, A. 2004. Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Bol. San. Veg. Plagas* 30: 279-286.

Pawar, V.C. & Thaker, V.S. 2006. In vitro efficacy of oils against *Aspergillus niger*. *Mycosis* 49(4): 316-323.

Perez, M. & Pascual-Villalobos, M. 1999. Efectos del aceite esencial de Inflorescencias de *Chrysanthemum coronarium* L. en mosca blanca y plagas de almacén. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 14(1-2): 249-258.

Pichersky, E., Noel, J.P. & Dudareva, N. 2006. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. *Science* 311: 808-811.

Piccolo de Villar, M., Ferrero, A., Seccacini, E. & Zerba, E. 1992. Perfil de toxicidad de insecticidas en cepas susceptibles y resistentes al malatión en *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 51: 71-78.

Piccolo de Villar, M., Seccacini, E. & Zerba, E. 1985. Resistencia a malatión en insectos plaga de grano almacenado de la República Argentina. *IDIA* 441-444: 59-63.

Piccolo, M., Toloza, A., Mougabure Cueto, G., Zygadlo, J. & Zerba, E. 2008. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia* 79: 271-278.



- Pimentel, M., Faroni, L., Guedes, R., Sousa, A. & Tótola, M. 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 45(1): 71-74.
- Pimentel, M., Faroni, L., Totola, M. & Guedes, R. 2007. Phosphine resistance, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. *Pest Managem. Sci.* 63(9): 876-881.
- Popich, S., Trimarco, J. & Riscalá, E. 2005. Efectos tóxicos de extractos de lactonas sequiterpénicas sobre *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, Resúmenes 363.
- Porter, J.W. & Spurgeon, S.L. 1981. Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Wiley-Interscience Publication. Vol. I, New York.
- Price, D. & Berry, M. 2006. Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *J. Insect. Physiol.* 52: 309-319.
- Pungitore, C.R., García, M.J., Gianello, C., Sosa, M.E. & Tonn, C.E. 2005. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* 41: 433-443.
- Quintanilla, R.H. & Córdoba, O.G. 1978. *Acaros fitófagos*. 2º Ed. Hemisferio Sur. Bs. As. 74 pp.
- Raguso R A. 2001. Floral scent. Olfaction, and scent-driven foraging behaviour. *En: Chittka, L. & Thomson, J.D. (eds.), Cognitive Ecology of Pollination, Animal Behavior and Floral Evolution*. Cambridge University Press. UK. pp. 83-105.

- Rahman, M., Taleb, M. & Biswas, M. 2003. Evaluation of Botanical Product as Grain Protectant Against Grain Weevil, *Sitophilus granarius* (L.) on Wheat. *Asian J. Plant Sci.* 2(6): 501-504.
- Rajendran, S., 2002. Postharvest pest losses. *En: Pimentel, D. (eds.), Encyclopedia of Pest Management.* Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 654-656.
- Rajendran, S. & Sriranjini, V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.* 44: 126-135
- Ramos Rodríguez, O. Inédita. *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. (Asteraceae) como repelente de *Bemisia argentifolii* Bellows y Perrig (Homoptera: Aleyrodidae) y de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). Proyecto Fin de Carrera, Universidad de Puerto Rico recinto Universidad de Mayagüez. 2001.
- Rees, D. 2004. *Insects of Stored products.* CSIRO. Australia. 181pp.
- Regnault-Roger, C., Philogene, B.J.R., C. & Vincent, C. 2004. *Biopesticidas de origen vegetal.* Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Barcelona. Mexico. 337 pp.
- Rittaco, M. 2003. Radioinsectación de Cereales Almacenados. *Rev. Argent. Nuclear.* Edición 86 (Enero-Marzo).
- Riudavets, J., Lucas, E. & Pons, M.J. 2002. Insect and mites of stored products in the northeast of Spain. Integrated protection in stored products. *IOBC WPRS Bulletin* 25: 41-44.
- Rodríguez, S.M., Michetti, M.H., Giménez, R.A. & Warner, M.L. 2005. Acción insecticida de extractos de *Picrasma crenata* (Vell) Engl. (Simaroubaceae) sobre *Ulomoides dermestoides* (Fairm.)(Coleoptera: Tenebrionidae).VI

Congreso Argentino de Entomología, San Miguel de Tucumán, Argentina, Resúmenes 263.

Rodríguez, S.M., Dehecchi, E., Carrizo, P.I., Russo, S., Wagner, M.L. & Gurni, A.A. 2012. Acción repelente de los extractos no polares de *Picrasma crenata* sobre *Schizaphis graminum* (Rond.) y *Metopolophium dirhodum* (Walk.) (Hemiptera: Aphididae) en comparación con un insecticida convencional y un insecticida biológico en *Hordeum vulgare* L. VIII Congreso Argentino de Entomología, San Carlos de Bariloche, Argentina, Resúmenes 197.

Rodríguez-Hernández, C. & Vedramim, J. 1998. Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistático de extractos de Meliaceas sobre *Spodoptera frugiperda*. *Manejo Integrado de Plagas* 48:11-18.

Romagni J.G., Allen, S.N. & Dayan, F.E. 2000. Allelopathic effects of volatile cineoles on two weedy plant species. *J. Chem. Ecology* 26:303-313.

Rosario, C.R., Hernández, O.R. 2001. Evolución química de la resistencia a acaricidas. *En: Memorias del Curso-Taller, diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas Boophilus microplus*. Jiutepec, Morelos, México, pp. 23-30.

Roy, B.; Amin, R., Uddin, M., Islam, A., Islam, M. & Halder, B. 2005. Leaf Extracts of Shiyalmutra (*Blumea lacera* (Dc.) as Botanical Insecticides Against Lesser Grain Borer and Rice weevil. *J. Biol. Sci.* 5(2): 201-204.

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.

- Russo, S., Leicach, S.R., Schindler, V. Regonat, M.E. & Yaber Grass, M. 2005. Actividad de extractos de *Chenopodium ambrosioides* (L.) sobre el ciclo biológico de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). VI Congreso Argentino de Entomología, San Miguel de Tucumán, Argentina, Resúmenes 266.
- Russo, S., Yaber Grass, M., Beighau, M.C. & Leicach, S.R. 2006. Efecto de la incorporación de extractos de *Senecio grisebachii* Burker (Compositae: Asteraceae) en la alimentación de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae). XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Catamarca Argentina, Resúmenes 383.
- Russo, S., Yaber Grass, M. & Leicach, S.R. 2011. Efecto de extractos de *Chenopodium album* L. sobre los estados larval y adulto de *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae). *IDESIA* 29: 51-57.
- Ruther, J., Meiners, T. & Steidle, J.L.M. 2002. Rich in phenomena lacking in terms - A classification of kairomones. *Chemoecology* 12: 161-167.
- Saad, E.Z., Hussien, R., Saher, F. & Ahmed, Z. 2006. Acaricidal activities of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 7: 957-962.
- Shaaya, E., Kostjukovki, M., Eliberg, J. & Sukpra, A. 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 33(1): 7-15.
- Shaaya, E.; Kostyukovsky, M. & Demchenko, N. 2003. Alternative fumigants for the control of stored-product insects, pp:556-560. En: Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. (Eds.). *Advances in Stored*

Product, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored - product Protection, York, CAB International, Oxon, UK.

Shaaya, E. & Rafaeli, A. 2007. Essential oils as a Biorational Insecticides-Potency and Mode of Action, pp: 249-261. En: Ishaaya, I.; Nauen, R. y Horowitz, R. (Eds.). *Insecticides Desing Using Advanced Technologies*. Springer, 314pp.

Sahaf, B., Moharramipour, S. & Meshkatalasadat, M. 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.

Sahaf, B. & Moharramipour, S. 2007. Repellent activity and persistence of the essential oils from *Carum copticum* and *Vitex pseudo-negundo* on *Tribolium castaneum*. En: Conference of IOBC WPRS (OILB SROP) working group on Integrated Protection of Stored Products. Poznan, Poland, pp. 98.

Saini, E.D. & Rodríguez, S.M. 2004. Insectos perjudiciales a los productos almacenados. Publicación del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola-Nº17. CICVYA-INTA Nacional de Tecnología Agropecuaria. 56 pp.

Sartorelli P., Marquioreto, A.D., Amaral-Baroli, A., Lima, M.E. & Moreno, P.R. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother. Res.* 21: 231-233.

Savvidou, N., Mills, K. & Pennington, A. 2003. Phosphine resistance in *Lasioderma serricornis* (F.) (Coleoptera: Anobiidae). En: Credland, P.F., Armitage, D.M., Bell, C.H., Cogan, P.M. & Highley, E. (eds.). *Advances in Stored Product, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored -product Protection*, York, CAB International, Oxon, UK, pp. 702-712.

- Saxena, R.C., Jilani, G. & Abdul Kareem, A. 1989. Effects of neem on stored grain insects. *En: M. Jacobson (eds.), Focus on Phytochemical Pesticides. Vol. I, The Neem Tree.* CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 97-111.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2009. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/nuevositio/agricultura> (Último acceso: febrero 2010).
- Serantes, H.F. & de Haro, A.M. 1980. *Insectos y ácaros del grano almacenado. Biología. Daños. Control.* 2ª Ed. Ed. Nuestra Acción S.R.L., Bs As, 35 pp.
- Serna C. & Correa, F.J. 2003. Extractos químicos de *Lycopersicon esculentum*, como fagoINHIBIDORES de *Atta cephalotes*. *Rev. Agron. Colombiana* 21 (3): 33-41.
- Seyoum, A., Killeen, G.F., Kabiru, E.W., Knols, B.G.J. & Hassanali, A. 2003. Field efficacy of thermally expelled or live potted repellent plants against African malaria vectors in western Kenya. *Trop. Med. Int. Health* 8: 1005-1011.
- Seyoum, A., Palsson, K., Kung'a, S., Kabiru, S., Lwande, W., Killeen, G., Hassanali, A. & Knots, B. 2002. Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* 96(3): 225-231.
- Shaaya, E., Kostjukovki, M., Eliberg, J. & Sukpra, C. 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 33(1): 7-15.
- Shaaya, E., Kostyukovsky, M. & Demchenko, N. 2003. Alternative fumigants for the control of stored-product insects. *En: Credland, P.F., Armitage, D.M., 99 Bell, C.H., Cogan, P.M., Highley, E. (eds.). Advances in Stored Product,*

*Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-product Protection*, York, CAB International, Oxon, UK, pp. 556-560.

Shaaya, E. & Rafaeli, A. 2007. Essential oils as a Biorational Insecticides-Potency and Mode of Action. *En: Ishaaya, I., Nauen, R. & Horowitz, R. (eds.). Insecticides Desing Using Advanced Technologies*. Springer, pp. 249-261.

Schoonhoven, L.M. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* 31: 57-69.

Silva Aguayo, G.A. 2001. Insecticidas vegetales. <http://ipmworld.umn.edu/cacelado/Spchapters/GsilvaSp.htm>. (Último acceso: marzo 2010).

Silva G. & Hepp, R. 2003. Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Fundación para la Innovación Agraria. Chillán. Chile

Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J.C. & Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales; una vieja y nueva alternativa en el manejo de insectos. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 4-12.

Silvestre, A. D., Cavaleiro, J.A.S., Delmond, B., Filliatre, C. & Bourgeois, G. 1997. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. From Portugal using multivariate statistical analysis. *Ind. Crop. Prod.* 6: 27-33.

Simões, C.M.O. & Spitzer, V. 1999. Óleos voláteis. *En: C.M.O. Simões (eds), Farmacognosia da planta ao medicamento*. UFRS/UFSC, Porto Alegre, Florianópolis, 416 pp.

- Singh, H.P., Batish, D.R. & Kohli, R.K. 2003. Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 239-311.
- Sing, P. & Moore, R.F. 1985. *Handbook of insect rearing*. Elsevier. Amsterdam. 514 pp.
- Smagghe, G. & Díaz, I. 2012. Arthropod-Plant Interactions-Novel Insights and Approaches for IPM. Springer-Verlag, Dordrecht, the Netherlands, in press.
- Soares Corrêa, A., Albinati Oliveira, P., Góes Cordeiro, E., Guedes Pereira, E. & Carvalho Guedes, R. 2008. Resistência a permetrina em populações brasileiras de caruncho do milho *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Grãos Armazenados. Uberlandia, MG, pp.118-120.
- Sosa, M.E. & Tonn, C.E. 2008. Plant secondary metabolites from argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochem. Rev.* 7: 3-24.
- Sosa, M.E., Lancelle, H., Gonzalez Colma, C.A. & Tonn, C.E. 2009. Evaluación de aceites esenciales con propiedades plaguicidas. XVII Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza, Argentina, Resúmenes 32.
- Sousa, A., Faroni, L., Pimentel, M. & Guedes, R. 2009. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and susceptible populations of stored product insect pests. *J. Stored Prod. Res.* 45: 241-246.
- Stadler, T., Subramanjam, B. & Ferrero, A. 2003. Monitoring for insecticide resistance in major stored product pests in Argentina: a review. *Agriscientia* XX: 99-110.



- Stefanazzi, N., Gutierrez, M.M. & Stadler, T. 2005. Efecto del aceite esencial de *Tagetes terniflora* (Asteraceae) sobre la ingesta y nutrición de adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). VI Congreso Argentino de Entomología, Tucumán, Argentina, Resúmenes 273.
- Stefanazzi, N., Gutiérrez, M.M., Stadler, T., Bonini N.A. & Ferrero, A.A. 2006. Biological activity of essential oil of *Tagetes ternifolia* Kunth (Asteraceae) against *Tribolium castaneum* (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). *Bol. Sanidad Veg. Plagas* 32(3): 439-447.
- Stefanazzi, N. Inédita. Aceites esenciales, una herramienta alternativa en el manejo integrado de plagas de grano almacenado. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur: Dpto. de Agronomía. Bs. As. 2010, 104 pp.
- Stevani, E.; García, M., Ardanaz, C., Tonn, C.E. & Sosa, M.E. 2005. Actividad del aceite esencial de *Tanacetum balsamita* L. sobre dos especies plagas de cereales. VI Congreso Argentino de Entomología, Tucumán, Argentina, Resúmenes 390.
- Su, Y.C., Ho, C.L., Wang, I.C. & Chang, S.T. 2006. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan J. For. Sci.* 21: 49-61.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, capítulo 13.
- Tapondjou, A., Adler, C., Fontem, D., Bouda, H. & Reichmuth, C. 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J. Stored Prod. Res.* 41: 91-102.

- Taylor, R.W.D. 1989. Phosphine: a major fumigant at risk. *Int. Pest Control* 31: 10-14.
- Tesevici, V., Milosavljevic, S., Vajs, V., Dordevic, I., Sokovic, M., Lavadinovic, V. & Novakovic, M. 2009. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) from Serbia. *J. Ser. Chem. Soc.* 74(10): 1035-1040.
- Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. & Schnitzler, J. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J.* 45: 540-560.
- Throne, E., Weaver, D., Chew, V. & Baker, E. 1995. Probit analysis of correlated data: Multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* 88: 1510-1512.
- Tinkeu, L., Goudoum, S.N., Ngassoum, A., Mapongmetsem, M.B., Kouninki, P.M. & Hance, T. 2004. Persistence of the insecticidal activity of five essential oils on the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae). *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.* 69: 145-147.
- Toral Ibañez, M. & Salgado, E. 1987. Algunos factores ambientales que intervienen en la productividad del monte bajo de *Eucalyptus globulus*. Simposio de Silvicultura y Mejoramiento Genético de especies forestales. Tomo IV: 63-72.
- Tremantera, P., Sciarretta, A. & Manzini, M. 1999. Insect pests in traditional cereal warehouses. *Técnica Molitoria* 50: 980-989.
- Tripathi, A. K., Prajapati, V., Aggarwal, K.K. & Kumar, S. 2001. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1, 8-cineol from *Artemisia annua* on progeny of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 94: 979-983.

- Tripathi, A., Prajapati, V., Preet, S., Khanuja, S. & Kumar, S. 2003. Effect of *d*-limonene on three stored-product beetles. *J. Econ. Entomol.* 96 (3): 990-995.
- Tripathi, A., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. & Bhattacharya, P. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharm. Phytot.* 1(5): 52-63.
- Tunc, I., Berger, B.M., Erler, F. & Daly, F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *J. Stored Prod. Res.* 36:161-168.
- Tunç, W. & Erler, F. 2003. Repellency and repellent stability of essential oil constituents against *Tribolium confusum*. *J. Plant Dis. Prot.* 110 (4): 394-400.
- Ukeh, D., Birkett, M., Pickett, J., Bowman, A. & Mordue Luntz, A. 2009. Repellent activity of alligator pepper, *Aframomum melegueta*, and ginger, *Zingiber officinale*, against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Phytochemistry* 70: 751-758.
- Umoetok, S.B.A. & Gerard, M.B. 2003. Comparative efficacy of *Acorus calamarus* powder and two synthetic insecticides for control of three major insect pests of stored cereal grains. *Global J. Agric. Sci.* 2: 94-97.
- UNEP. 2002. United nations environment programme. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer, 2002 Assessment, Methyl Bromide Technical Options Committee. Nairobi, Kenya.
- USEPA (United States Environment Protection Agency), 1993. R.E.D. FACTS Flower and Vegetable Oils Disponible online at <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/4097fact.pdf> (Último acceso: noviembre 2010).

- Valera, D., Rivas, R., Avila, J.L., Auber, L., Alonso-Amelot, M. & Usubillaga, A. 2003. The essential oil of *Coleus amboinicus* Loureiro chemical composition and evaluation of insect anti-feedant effects. *Ciencia* 11(2): 113-118.
- Valladares, G., Garbin, L., Defagó, M., Carpinella, C. & Palacios, S. 2003. Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 62(1-2): 53-61.
- Vieira, P.C., Mafezoli, J. & Biavatti, M.W. 2001. Insecticidas de origen vegetal. *En: Ferreira, J.T.B., Correa, A.G. & Vieira, P.C. (eds.). Productos Naturais no controle de insetos.* Ed. Da UFSCar. Sao Carlos, S.p, Brasil, pp. 23-46
- Viglianco, A., Novo, R., Cragolini, C., Nassetta, M. & Cavallo, E. 2008. Antifeedant and Repellent Effects of Extracts of Three Plants from Córdoba (Argentina) Against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *BioAssay* 3(4): 1-6.
- Vilela, E.F. & Della Lucia, T.M.C. 2001. *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas.* 2ª ed. Ribeirão Preto: FAPESP-Holos, pp. 13-25.
- Vitti, A.M.S. & Brito, J.O. 2003. Óleo essencial de eucalipto. Documentos Florestais N° 17, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Sao Paulo. 26 pp.
- Vitturo, C.I., Molina, A.C. & Heit, C.I. 2003. Volatile components of *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *bicostata* from Jujuy, Argentina. *J. Essent. Oil Res.* 15(3): 206-208.
- Vituro, C., Alemán, S., Heit, C. & Molina, A. 2009. Aceites esenciales de *Origanum* sp: composición, actividad y efecto repelente frente a *V. destructor*. XVII

Simposio Nacional de Química Orgánica. Mendoza, Argentina, Resúmenes 27.

Wallach, O. 1887. Zur kenntnis der terpepe und ätherischen öle. Liebigs Annalen der Chemie. 239: 1-54.

Waldbauer, G.P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Advances in Insect Physiology* 5: 229-288.

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.

Warthen, J.D. & Morgan, E.D. 1990. Insect feeding deterrents. *En* E.D. Morgan & N.V. Mandava (eds.). CRC handbook of natural pesticides. Vol. 6: Insect attractants and repellents. CRC Press. Boca Raton, Florida.

Weaver, D. & Subramanyam, B. 2000. Botanicals. *En*: Subramanyam, B.H. & Hagstrum, D.W. (eds.). *Alternatives to pesticides in Stored-Product IPM*. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, pp. 303-320.

Wildy, D., Pate, J. & Bartle, J. 2000. Variations in composition and yield of leaf oils from alley-farmed oil mallees (*Eucalyptus* spp) at a range of contrasting sites in the Western Australian wheatbelt. *Forest Ecol. Manag.* 134: 205-217.

Whittaker, R.H. & Feeny, P.P. 1971. Allelochemicals: Chemical Interactions between Species. *Science* 171: 757-770.

Winckler, C., Gambini, J. & Cendoya, J. 2005. Producción forestal. *Eucalyptus*, 5/1. Cátedra Dasonomía. Centro de impresiones CIFA. 60 pp.

- Winston, P.W. & Bates, D.H. 1960. Saturated Solutions For the Control of Humidity in Biological Research. *Ecology* 41(1): 232-237.
- WMO (World Meteorological Organization). 1996. Report of the Third Meeting of the Ozone Research Managers of Parties to the Vienna Convention for the Protection of the Ozone Layer (Geneva, 19-21 March 1996).
- World Meteorological Organization. 2011. Report of the eighth meeting of the ozone research managers of the parties to the Vienna convention for the protection of the ozone layer (Geneva, 2 - 4 may 2011). WMO Global Ozone Research and Monitoring Project Report No. 53. 530 pp.
- Xie, Y.S., Fields, P.C., Isman, M.B., Chem, W.K. & Zhang, X. 1995. Insecticidal activities of Mehatoosendan extracts and toosendanin against three stored-products. *Insect. J. Stored Prod. Res.* 31: 259-265.
- Yang, Y.C., Choi, H.C., Choi, W.S., Clark, J.M. & Ahn, Y.J. 2004. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Agric. Food Chem.* 52: 2507-2511.
- Yanucci, D., Lazzari, F. & Coto, H. 2001. Control Integrado. Insectos, ácaros, hongos y roedores en poscosecha de granos y semillas. Granos y Postcosecha Latinoamericana. De la Semilla al Consumo. Buenos Aires, 214 pp.
- Yu, A.J. & Dayan, P. 2005. Uncertainty, neuromodulation, and attention. *Neuron* 46: 681-692.
- Zapata, N. & Smagghe, G. 2010. Repellency and toxicity off essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Ind. Crop. Prod.* 32: 405-410.

- Zehler, J. & Arthur, F. 2000. Chemical Control of Stored Product Insects With Fumigants and Residual Treatments. *Crop Prot.* 19: 577-582.
- Zhang M.X., Ling, B., Chen, S.Y., Liang, G.W. & Pang, X.F. 2004. Repellent and oviposition deterrent activities of the essential oil from *Mikania micrantha* and its compounds on *Plutella xylostella*. *Entomol. Sinica* II: 37-45.
- Zrira, S.S. & Benjilali B.B. 1996. Seasonal changes in the volatile oil and cineole contents of five *Eucalyptus* Species growing in Morocco. *J. Essent. Oil Res.* 8: 19-24.

## ANEXO I. CAPITULO III. CONTROL DE COLEOPTEROS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS

**Tabla I.** Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de *Sitophilus oryzae*

F.V.	SC	g.l.-	MS	F	p-valor
Modelo	193801,67	1	193801,67	1189,58	<0,0001
TRAT	86581,67	3	28860,56	177,15	<0,0001
CONCENT	51138,33	3	17046,11	104,63	<0,0001
TRAT*CONCENT	27785	9	3087,22	18,95	<0,0001
Error	5213,33	32	162,92		
R1	42848,33	4	10712,1	327,50	<0,0001
R1*TRAT	19835	12	1652,92	50,54	<0,0001
R1*CONCENT	4511,67	12	375,97	11,49	<0,0001
<b>R1*TRAT*CONCENT</b>	8098,33	36	224,95	6,88	<b>&lt;0,0001</b>
Error	4186,67	128	32,71		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

**Tabla II.** Resultados del ANOVA factorial con arreglos de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de *Oryzaephilus surinamensis*

F.V.	SC	g. l.	MS	F	p-valor
Modelo	852600,35	1	852600,37	2404,98	<0,0001
TRAT	286392,71	3	95464,23	269,28	<0,0001
CONCENT_	64117,71	3	21372,57	60,29	<0,0001
TRAT*CONCENT_	35228,13	9	3914,24	11,04	<0,0001
Error	11344,44	32	354,5139		
R1	94289,24	5	18857,84	286,75	<0,0001
R1*TRAT	51792,71	15	3452,85	52,50	<0,0001
R1*CONCENT_	13367,71	15	891,18	13,55	<0,0001
<b>R1*TRAT*CONCENT_</b>	10044,80	45	223,22	3,39	<b>&lt;0,0001</b>
Error	10522,22	160	65,76		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.



**Tabla III:** Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de *Cryptolestes pusillus*

F.V	SC	g.l.	CM	F	p-valor
Modelo	262020,42	1	262020,42	1459,05	<0,0001
TRAT	107647,92	3	35882,64	199,81	<0,0001
CONCENT_	70314,58	3	23438,19	130,51	<0,0001
TRAT*CONCENT_	37410,42	9	4156,71	23,15	<0,0001
Error	5746,67	32	179,58		
R1	35881,67	4	8970,42	243,27	<0,0001
R1*TRAT	14025	12	1168,75	31,69	<0,0001
R1*CONCENT_	8008,33	12	667,36	18,09	<0,0001
<b>R1*TRAT*CONCENT_</b>	8125	36	225,69	6,12	<b>&lt;0,0001</b>
Error	4720	128	36,87		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

**Tabla IV:** Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para la mortalidad acumulada de *Tribolium confusum*

F. V.	SC	g.l.	CM	F	p-valor
Modelo	726000	1	726000	6071,08	<0,0001
TRAT	244063,33	3	81354,44	680,32	<0,0001
CONCENT_	34923,33	3	11641,11	97,35	<0,0001
TRAT*CONCENT_	15946,67	9	1771,85	14,82	<0,0001
Error	3826,67	32	119,58		
R1	106670,83	4	26667,71	494,23	<0,0001
R1*TRAT	50282,5	12	4190,21	77,66	<0,0001
R1*CONCENT_	20522,5	12	1710,21	31,69	<0,0001
<b>R1*TRAT*CONCENT_</b>	12257,5	36	340,49	6,31	<b>&lt;0,0001</b>
Error	6906,67	128	53,958		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

**ANEXO II. CAPITULO IV: ACTIVIDAD REPELENTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* SOBRE *TRIBOLIUM CONFUSUM*, *ORYZAEPHILUS SURINAMENSIS*, *CRYPTOLESTES PUSILLUS* Y *SITOPHILUS ORYZAE***

**Tabla V.** Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre *Sitophilus oryzae*

F.V.	SC	g.l.	CM	F	p-valor
Modelo	302974,23	1	302974,23	569,52	<0,0001
TRAT	2444,92	2	1222,46	2,29	0,1292
CONCENT_	13239,37	2	6619,69	12,44	<b>0,0004</b>
TRAT*CONCENT_	4651,64	4	1162,91	2,19	0,1117
Error	9575,72	18	531,98		
R1	9534,05	4	2383,51	7,27	<b>&lt;0,0001</b>
R1*TRAT	510,28	8	63,78	0,19	0,9908
R1*CONCENT_	749,66	8	93,71	0,29	0,9686
R1*TRAT*CONCENT_	989,97	16	61,87	0,19	0,9997
Error	23598,47	72	327,76		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

**Tabla VI.** Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre *Oryzaephilus surinamensis*

F.V.	SC	g.l.	CM	F	p-valor
Modelo	196639,0	1	196639,0	361,53	0,0001
<b>TRAT</b>	5951,81	2	2975,91	5,47	<b>0,0139</b>
<b>CONCENT_</b>	22760,55	2	11380,39	20,92	<b>&lt;0,0001</b>
TRAT*CONCENT_	1052,67	4	263,21	0,48	0,7473
Error	9790,40	18	543,91		
<b>R1</b>	9722,32	4	2430,66	8,49	<b>&lt;0,0001</b>
R1*TRAT	4712,88	8	564,12	1,97	0,0625
R1*CONCENT_	2442,93	8	305,45	0,07	0,3961
R1*TRAT*CONCENT_	3027,48	16	189,28	0,66	0,8219
Error	20614,90	72	266,39		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

**Tabla VII:** Resultados del ANOVA factorial con arreglo de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre *Cryptolestes pusillus*

F.V.	SC	g.l.	CM	F	p-valor
Modelo	422083,08	1	422083,08	1866,07	0
<b>TRAT</b>	2086,45	2	1043,23	4,61	<b>0,0241</b>
<b>CONCENT_</b>	17943,18	2	8971,59	39,66	<b>&lt;0,001</b>
<b>TRAT*CONCENT_</b>	3328,56	4	832,14	3,68	<b>0,0233</b>
Error	4071,39	18	226,19		
<b>R1</b>	11889,09	4	2972,27	24,00	<b>&lt;0,001</b>
R1*TRAT	971,12	8	121,39	0,98	0,4584
R1*CONCENT_	721,01	8	90,13	0,73	0,6664
R1*TRAT*CONCENT_	894,26	16	55,89	0,45	0,9615
Error	8915,54	72	123,83		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

**Tabla VIII:** Resultados del ANOVA de medidas repetidas para el PR (Porcentaje de repelencia) de aceites esenciales de hojas adultas y juveniles y 1,8-cineol sobre *Tribolium confusum*

F.V.	SC	g.l.	CM	F	p-valor
Modelo	301936,61	1	301936,61	1655,16	0
<b>TRAT</b>	5754,41	2	2877,20	15,77	<b>0,0001</b>
<b>CONCENT_</b>	11435,46	2	5717,73	31,34	<b>&lt;0,0001</b>
TRAT*CONCENT_	1096,26	4	274,06	1,50	0,2433
Error	3283,59	18	182,42		
<b>R1</b>	15526,72	4	3881,68	20,93	<b>&lt;0,0001</b>
R1*TRAT	1124,93	8	140,61	0,76	0,6401
R1*CONCENT_	562,51	8	70,31	0,38	0,9283
R1*TRAT*CONCENT_	1171,04	16	73,19	0,39	0,9797
Error	13349,62	72	185,41		

F.V.: Fuente de Variación; SC: Suma de Cuadrados; g.l.: Grados de libertad; CM: cuadrados medios.

### *Sitophilus oryzae*

**Tabla IX.** Comparación de las medias del PR (%) para cada una de las cantidades utilizadas para *Sitophilus oryzae* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

CANTIDAD ( $\mu$ )	PR (%)
5	37a
10	45a
20	61b

**Tabla X.** Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para *Sitophilus oryzae* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TIEMPO (minutos)	PR (%)
50	34a
40	43ab
30	48bc
20	54bc
10	58c

### *Oryzaephilus surinamensis*

**Tabla XI.** Comparación de las medias del PR (%) para cada uno de los tratamientos ensayados para *Oryzaephilus surinamensis* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TRATAMIENTO	PR (%)
1,8-cineol	47,49a
Hojas juveniles	34,41a
Hojas adultas	32,58b

**Tabla XII.** Comparación de las medias del PR (%) para cada una de las cantidades utilizadas para *Oryzaephilus surinamensis* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

CANTIDAD ( $\mu$ )	PR (%)
5	20,77b
10	41,75a
20	51,96a

**Tabla XIII.** Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para *Oryzaephilus surinamensis* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TIEMPO(minutos)	PR (%)
50	29,87a
40	32,84a
30	36,18a
20	37,66a
10	54,25b

### *Cryptolestes pusillus*

**Tabla XIV.** Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para *Cryptolestes pusillus* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TIEMPO(minutos)	PR (%)
50	42,66a
40	49,93ab
30	55,62bc
20	61,31c
10	70,04d

**Tabla XV.** Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los tratamientos y cantidades ensayadas para *Cryptolestes pusillus* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TRATAMIENTO	CANTIDAD ( $\mu\text{l}$ )	PR (%)
H. Juveniles	5	34,70a
H. Adultas	5	35,25ab
H. Juveniles	10	51,33abc
1,8-cineol	5	54,07bc
H. Adultas	10	57,72cd
1,8-cineol	10	61,52cd
1,8-cineol	20	65,88cd
H. Juveniles	20	66,64cd
H. Adultas	20	76,08d

### *Tribolium confusum*

**Tabla XVI.** Comparación de las medias del PR (%) para cada uno de los tratamientos ensayados para *Tribolium confusum* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TRATAMIENTO	PR (%)
1,8-cineol	39,99a
Hojas juveniles	55,83a
Hojas adultas	46,04b

**Tabla XVII.** Comparación de las medias del PR (%) para cada una de las cantidades utilizadas para *Tribolium confusum* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

CANTIDAD ( $\mu$ )	PR (%)
5	35,55a
10	48,30b
20	58,02c

**Tabla XVIII.** Comparación de las medias del PR (%) en cada uno de los momentos de observación para *Tribolium confusum* (los valores de la misma columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente Tukey,  $p < 0,05$ ).

TIEMPO(minutos)	PR (%)
50	31,39a
40	41,72ab
30	47,25bc
20	52,59c
10	63,51d