



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

Tesis Doctoral

Evaluación del efecto insecticida de
***Picrasma crenata* (Vell.) Engl.- Simaroubaceae-**
sobre coleópteros plaga de los granos almacenados

Ing. Agr. Silvia M. Rodríguez

Director: Dr. Marcelo L. Wagner

Codirectora: Dra. Nora Cabrera

-2015-

Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. La tesis contiene resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de la Cátedra de Zoología Agrícola del Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía y en el laboratorio de la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, ambos de la Universidad de Buenos Aires, bajo la dirección del Dr. Marcelo L. Wagner y bajo la codirección de la Dra. Nora Cabrera, docentes investigadores de la Universidad de Buenos Aires y de la Universidad de La Plata, respectivamente.

Silvia Marta Rodríguez

Universidad Nacional
de La Plata

Agradecimientos

Tengo la satisfacción de llegar a esta instancia de mi vida luego de recorrer un largo camino. En este sendero tuve la oportunidad de conocer hermosas y generosas personas que me han acompañado, no solamente me abrieron las puertas al conocimiento sino que me brindaron su amistad. Agradezco la buena predisposición, incondicional del director, Dr. Marcelo Wagner y a la codirectora Dra. Nora Cabrera, fueron muchas horas gratas de trabajo compartido.

No fue fácil coordinar docencia, tesis y familia por lo cual mi agradecimiento, en primer, lugar a aquellos que me apoyaron y ofrecieron su tiempo en los primeros pasos en la decisión de llevar a cabo un posgrado como el Dr. Teodoro Stadler y la Dra. Analía Lanteri. A los colaboradores de la Facultad de Agronomía, a la Ing. Agr. Dra. Virginia López, Ing. Agr. Rosana Giménez e Ing. Agr. Ms. Cs. Paola Carrizo. A mis colegas de la Cátedra de Zoología Agrícola, Ing. Agr. Dra. Ana Folcia, Ing. Agr. Dra. Serafina Russo, Ing. Norma Zamuner e Ing. Agr. Ms. Cs. Guillermo Heit, como así también a la incondicional Técnica, Heidi Fontana, todos ellos me acompañaron siempre con palabras de aliento. A la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo las experiencias para obtener los extractos. Al Dr. Rafael Ricco quien me brindó material bibliográfico y principalmente su amistad. Al ex titular de dicha Cátedra, Dr. Alberto Gurni y Dr. Marcelo Wagner, quienes como director y codirector, respectivamente, de proyectos UBACyT facilitaron los medios económicos para realizar esta tesis.

Por último, agradezco a mi familia que de una forma u otra estuvieron a mi lado. Mis amados hijos, Agustina y César y especialmente mi esposo, Mario, que un día partió para transformarse en un ángel que hoy, junto a mis padres cuidan y protegen nuestras vidas. Llegar a esta instancia es una gran satisfacción, es una meta cumplida pero, además, el camino recorrido me dejó enseñanzas, fue un crecimiento no sólo profesional sino también personal en donde tuve la oportunidad de cosechar amigos.

¡Muchas Gracias!

Índice General

| | |
|------------------------|------|
| Prefacio..... | I |
| Agradecimientos..... | II |
| Índice General..... | III |
| Índice de Figuras..... | VII |
| Índice de Tablas..... | XII |
| Resumen..... | XVII |
| Abstract..... | XX |

Capítulo I. Introducción

| | |
|---|----|
| 1- Caracterización de los factores que influyen en la poscosecha de granos..... | 1 |
| 2- Interacción Animal-Planta..... | 4 |
| 2.1- Metabolitos secundarios..... | 7 |
| 2.1.1- Compuestos terpénicos..... | 9 |
| 3- Resistencia de los insectos plaga a los insecticidas..... | 13 |
| 4 - Antecedentes en el uso de los extractos vegetales como insecticidas naturales..... | 18 |
| 4.1- Actividad biológica de los extractos vegetales en insectos del Orden Coleoptera..... | 23 |
| 5- Familia Simaroubaceae..... | 28 |
| 5.1- Generalidades..... | 28 |
| 5.2- <i>Picrasma crenata</i> | 29 |
| 6- Grupo químico: cuasinoides..... | 32 |
| 6.1- Generalidades..... | 32 |
| 6.2- Estructura química de los cuasinoides..... | 34 |
| 6.3- Importancia de los cuasinoides en el control de plagas..... | 36 |
| 7- Equiparación de la acción de los extractos de <i>Picrasma crenata</i> con los reguladores de crecimiento e inhibidores del desarrollo de los insectos..... | 38 |
| 8- Plagas de granos almacenados..... | 39 |
| 8.1- Generalidades..... | 39 |
| 8.2- Biología de las especies plagas de granos almacenados sobre las que se desarrollaron las experiencias..... | 39 |
| 9- Objetivos | 46 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 9.1- Objetivo General..... | 46 |
| 9.2- Objetivos Específicos..... | 46 |

Capítulo II. Materiales y Métodos

| | |
|--|----|
| 1- Materiales y su obtención..... | 49 |
| 1.1- Material Vegetal..... | 49 |
| 1.2- Extractos..... | 49 |
| 1.2.1- Procedimiento para la obtención de los extractos orgánicos..... | 49 |
| 1.3-.Obtención de los cuasinoides (cuasina y neocuasina)..... | 52 |
| 1.3.1-.Proceso de extracción para la obtención de extractos de cuasinoides..... | 52 |
| 1.3.2- Cuantificación de cuasinoides..... | 54 |
| 1.4- Cría de las plagas de granos almacenados en condiciones de laboratorio..... | 55 |
| 1.4.1-.Cría de <i>Sitophilus oryzae</i> (Gorgojo del arroz)..... | 56 |
| 1.4.2- Cría de <i>Tribolium castaneum</i> (Tribolio castaneo) y <i>Oryzaephilus surinamensis</i> (Carcoma dentada)..... | 56 |
| 1.4.3- Cría de <i>Ulomoides dermestoides</i> (Tenebrio brillante o Gorgojo del maní)..... | 57 |
| 1.5-.Insecticida organofosforado, Clorpirifós Metil, considerado en los bioensayos | 57 |
| 1.5.1-.Análisis de Variancia..... | 58 |
| 1.5.2-.Bioequivalencia..... | 58 |
| 2- Metodología de trabajo desarrollada en la investigación..... | 59 |
| 2.1-.Exposición al producto..... | 59 |
| 2.1.1- Método del film (contacto)..... | 59 |
| 2.1.1.1- Concentración Letal 50 y Tiempo Letal 50 | 61 |
| 2.1.2 - Exposición por ingestión de alimento tratado..... | 62 |
| 2.1.2.1- Experiencia 1: Mortalidad de individuos adultos de <i>Tribolium castaneum</i> por la ingesta de extractos de <i>Picrasma crenata</i> | 62 |
| 2.1.2.2- Experiencia 2: Duración de los estados juveniles de <i>Tribolium castaneum</i> , por efecto de los extractos de <i>Picrasma</i> <i>crenata</i> sobre la ingesta y su relación con los reguladores de crecimiento..... | 63 |
| 2.1.3- Mortalidad por topicación de los adultos de <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Sitophilus oryzae</i> y <i>Oryzaephilus surinamensis</i> con los extractos de <i>Picrasma crenata</i> | 64 |
| 2.2-.Bioequivalencia entre los extractos de <i>Picrasma crenata</i> y un insecticida convencional sobre <i>T. castaneum</i> | 66 |

| | |
|--|----|
| 2.3- Efecto de los cuasinoideos (cuasina y neocuasina) sobre <i>Sitophilus oryzae</i> , <i>Oryzaephilus surinamensis</i> , <i>Tribolium castaneum</i> y <i>U. dermestoides</i> | 67 |
|--|----|

Capítulo III. Resultados y Discusión

| | |
|--|-----|
| 1- Método del film..... | 71 |
| 1.1- <i>Sitophilus oryzae</i> (L.)..... | 71 |
| 1.1.1- Concentración letal media (CL50)..... | 76 |
| 1.1.2- Tiempo Letal medio (TL50)..... | 78 |
| 1.2- <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst) | 80 |
| 1.2.1- Concentración letal media (CL50)..... | 85 |
| 1.2.2- Tiempo Letal medio (TL50)..... | 87 |
| 1.3- <i>Oryzaephilus surinamensis</i> L..... | 89 |
| 1.3.1- Concentración letal media (CL50)..... | 95 |
| 1.3.2- Tiempo Letal medio (TL50)..... | 97 |
| 1.4- <i>Ulomoides dermestoides</i> (Fairm)..... | 99 |
| 1.4.1- Concentración letal media (CL50)..... | 105 |
| 1.4.2- Tiempo Letal medio (TL50)..... | 110 |
| 1.5- Discusión..... | 111 |
| 1.6- Conclusión..... | 114 |
| 2- Mortalidad de los adultos de <i>Tribolium castaneum</i> por efecto de los extractos de <i>Picrasma crenata</i> sobre la ingesta | 114 |
| 2.1- Extracto de etanol..... | 115 |
| 2.2- Extracto de acetato de etilo..... | 115 |
| 2.3- Extracto de acetona..... | 116 |
| 2.4- Discusión..... | 117 |
| 2.5- Conclusión..... | 119 |
| 3- Duración de los estados juveniles de <i>Tribolium castaneum</i> , por efecto de los extractos de <i>Picrasma crenata</i> sobre la ingesta y su relación con los reguladores de crecimiento..... | 119 |
| 3.1- Discusión..... | 121 |
| 3.2- Conclusión..... | 122 |
| 4- Mortalidad por topicación de los adultos de <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Sitophilus oryzae</i> y <i>Oryzaephilus surinamensis</i> con los extractos de <i>Picrasma crenata</i> | 123 |
| 4.1- Discusión..... | 125 |
| 4.2- Conclusión..... | 127 |
| 5- Mortalidad producida por los extractos de acetato de etilo, etanol y acetona de <i>Picrasma crenata</i> en relación con Clorpirifós metil sobre <i>T. castaneum</i> | 128 |
| 5.1- Acetato de etilo..... | 128 |

| | |
|--|------------|
| 5.2- Etanol..... | 129 |
| 5.3- Acetona..... | 130 |
| 5.4- Determinación de la Concentración Letal Media (CL50) y el Tiempo Letal Medio (TL50)..... | 130 |
| 5.5- Concentración letal media (CL50)..... | 130 |
| 5.6- Bioequivalencia..... | 131 |
| 5.6.1- Bioequivalencia entre Acetato de Etilo y Clorpirifós Metil..... | 131 |
| 5.6.2- Bioequivalencia entre Etanol y Clorpirifós Metil..... | 132 |
| | |
| 6- Efecto de los cuasinoides (cuasina y neocuasina) sobre <i>Sitophilus oryzae</i> , <i>Oryzaephilus surinamensis</i> , <i>Tribolium castaneum</i> y <i>Ulomoides dermestoides</i> | 134 |
| 6.1- Primera experiencia: Efecto de los cuasinoides a través del método por contacto..... | 134 |
| 6.1.1- Ensayo preliminar de las cuatro plagas (dosis 1 ml)..... | 134 |
| 6.1.2- Ensayo por contacto en <i>S. oryzae</i> (dosis 2 ml) | 136 |
| 6.2- Segunda experiencia: Observación del efecto de las bandas obtenidas del extracto de palo amargo adicionados a la dieta base de los adultos de <i>T. castaneum</i> | 137 |
| 6.3- Observación del efecto de las bandas obtenidas del extracto de palo amargo adicionados a la dieta base de larvas neonatas de <i>T. castaneum</i> | 138 |
| 6.4- Discusión y Conclusiones..... | 139 |
| | |
| Capítulo IV. Discusión y Conclusión Final..... | 142 |
| 4.1- Discusión..... | 142 |
| 4.2- Conclusión..... | 145 |
| | |
| Consideraciones Generales..... | 146 |
| | |
| Anexo..... | 147 |
| | |
| Bibliografía citada..... | 149 |

Índice de Figuras

| | | |
|-------|--|----|
| 1.1- | Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen..... | 10 |
| 1.2- | El esqueleto hidrocarbonado de los terpenos proviene del acetato, vía mevalonato..... | 12 |
| 1.3- | Planta adulta de <i>Picrasma crenata</i> | 30 |
| 1.4- | Distribución geográfica de <i>Picrasma crenata</i> en la República Argentina..... | 31 |
| 1.5- | Esqueleto básico de cuasinoides..... | 35 |
| 1.6- | Estructura de los cuasinoides..... | 35 |
| 1.7- | Porcentaje de cuasinoides en géneros de la familia Simaroubaceae..... | 36 |
| 1.8- | <i>Sitophilus oryzae</i> - a: adulto, b: larva y pupa, c: daño en granos de trigo (Fotos: Saini, E.)..... | 40 |
| 1.9- | <i>Oryzaephilus surinamensis</i> - a: adulto, b: larvas, c: daño en harina (Fotos: Saini, E.)..... | 42 |
| 1.10- | <i>T. castaneum</i> - a: adulto, b: larva, c: daño en harina (Fotos: Saini, E.)..... | 44 |
| 1.11- | <i>U. dermatoides</i> - a: adulto, b: larva (Fotos Saini, E. a y b), c: cría sobre pan integral (Foto:Fontana,H.)..... | 45 |
| 2.1- | Leño de <i>Picrasma crenata</i> | 50 |
| 2.2- | Leño de <i>Picrasma crenata</i> en contacto con éter de petróleo..... | 50 |
| 2.3- | a: evaporador rotatorio conectado a una trampa de vacío por agua y baño termostatzado, b: extractos de <i>Picrasma crenata</i> obtenidos con solventes polares y no polares..... | 51 |
| 2.4- | a: leño de <i>Picrasma crenata</i> , b: molino de cuchillas rotativas, c y d: maceración con diclorometano, e: método de partición..... | 53 |
| 2.5- | Método del film..... | 60 |
| 2.6- | Método de Ingesta..... | 63 |
| 2.7- | a y b: Método de Topicación..... | 65 |
| 3.1- | Mortalidad de los adultos de <i>T. castaneum</i> | |

| | |
|---|-----|
| por el efecto de los extractos de etanol de <i>P. crenata</i> | 115 |
| 3.2- Mortalidad de los adultos de <i>T. castaneum</i> por el efecto de los extractos de acetato de etilo de <i>P. crenata</i> | 116 |
| 3.3- Mortalidad de los adultos de <i>T. castaneum</i> por el efecto de los extractos de acetona de <i>P. crenata</i> | 117 |
| 3.4- Duración del período larval y pupal de <i>T. castaneum</i> en relación al efecto de los reguladores de crecimiento, Lufenurón y Novalurón | 120 |
| 3.5- Mortalidad de <i>S. oryzae</i> por efecto de la topicación con extractos de <i>P. crenata</i> | 124 |
| 3.6- Mortalidad de <i>T. castaneum</i> por efecto de la topicación con extractos de <i>P. crenata</i> | 124 |
| 3.7- Mortalidad de <i>O. surinamensis</i> por efecto de la topicación con extractos de <i>P. crenata</i> | 125 |
| 3.8- Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de <i>Picrasma crenata</i> sobre adultos de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por contacto a través del tiempo. | 135 |
| 3.9- Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de <i>Picrasma crenata</i> sobre adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> por contacto, por momento de observación. | 136 |
| 3.10- Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de <i>Picrasma crenata</i> sobre adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> por contacto, por momento de observación..... | 136 |
| 3.11- Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de <i>Picrasma crenata</i> sobre adultos de <i>Tribolium castaneum</i> por ingestión a través del tiempo. | 138 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| 3.1- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción éter de petróleo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 72 |
| 3.2. Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción diclorometano de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 73 |
| 3.3- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetato de etilo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 73 |
| 3.4- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetona de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación..... | 74 |
| 3.5- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción metanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación..... | 74 |
| 3.6- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción etanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 75 |
| 3.7- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por infusión de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 75 |
| 3.8- Mortalidad (%) de <i>Sitophilus oryzae</i> por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por cocimiento de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 76 |
| 3.9- Concentración Letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en <i>Sitophilus oryzae</i> | 77 |
| 3.9- Tiempo Letal medio (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de <i>P. crenata</i> en <i>Sitophilus oryzae</i> | 79 |
| 3.10- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción éter de petróleo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 81 |
| 3.11- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes | |

| | |
|---|----|
| concentraciones de la fracción diclorometano de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 81 |
| 3.13- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetato de etilo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 82 |
| 3.14- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetona de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 82 |
| 3.15- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción metanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 83 |
| 3.16- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción etanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 83 |
| 3.17- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por infusión de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 84 |
| 3.18- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por cocimiento de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 84 |
| 3.19- Concentración Letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en <i>T. castaneum</i> | 86 |
| 3.20- Tiempo Letal medio (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de <i>P. crenata</i> en <i>T. castaneum</i> | 88 |
| 3.21- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción éter de petróleo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 91 |
| 3.22- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción diclorometano de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 91 |
| 3.23- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetato de etilo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación..... | 92 |
| 3.24- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción | |

| | |
|---|-----|
| acetona de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 92 |
| 3.24- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción metanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 93 |
| 3.26- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción etanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 93 |
| 3.27- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción infusión de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación..... | 94 |
| 3.28- Mortalidad (%) de <i>Oryzaephilus surinamensis</i> por las diferentes concentraciones de la fracción cocimiento de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 94 |
| 3.29- Concentración Letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en <i>Oryzaephilus surinamensis</i> | 96 |
| 3.30- Tiempo Letal medio (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de <i>P. crenata</i> en <i>Oryzaephilus surinamensis</i> | 98 |
| 3.31- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción éter de petróleo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 101 |
| 3.32- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción diclorometano de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 101 |
| 3.33- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetato de etilo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 102 |
| 3.34- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetona de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 102 |
| 3.35- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> | |

| | |
|--|-----|
| por las diferentes concentraciones de la fracción metanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 103 |
| 3.36- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción etanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 103 |
| 3.37- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción infusión de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 104 |
| 3.38- Mortalidad (%) de <i>Ulomoides dermestoides</i> por las diferentes concentraciones de la fracción cocimiento de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 104 |
| 3.39- Concentración Letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en <i>Ulomoides dermestoides</i> | 106 |
| 3.40- Tiempo Letal medio (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de <i>P. crenata</i> en <i>Ulomoides dermestoides</i> | 110 |
| 3.41- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetato de etilo de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación | 128 |
| 3.42- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción etanol de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación. | 129 |
| 3.43- Mortalidad (%) de <i>Tribolium castaneum</i> por las diferentes concentraciones de la fracción acetona de <i>P. crenata</i> para cada momento de observación..... | 130 |
| 3.44- Concentración Letal media (g/ml) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de los extractos a las 6 horas de observación. | 130 |

3.45- Proporción promedio y desvío estandar de mortalidad de los tratamientos seleccionados acetato de etilo, etanol y clorpirifós meti.....131

Resumen

El manejo convencional de plagas que se desarrolla en la actualidad se basa principalmente en la aplicación de agroquímicos de síntesis pero el resultado del uso indiscriminado de estos insecticidas es la contaminación ambiental, el desequilibrio en los ecosistemas, la toxicidad para los animales superiores e incluso para el hombre. Esta situación nos lleva a evaluar métodos alternativos de control. En este trabajo se analizó la actividad insecticida de los extractos polares y no polares de *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. (Simaroubaceae), sobre las siguientes plagas de granos almacenados: *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera:Silvanidae), *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Ulomoides dermestoides* (Fairm) (Coleoptera: Tenebrionidae).

A través de distintas metodologías se observó su efecto por contacto e ingesta, se lo comparó con la acción de insecticidas convencionales y reguladores de crecimiento, como así también, se estudió la acción directa de los cuasinoideos (cuasina y neocuasina).

Se evaluó el efecto de los extractos de *P. crenata* por contacto mediante la técnica de impregnación de papel de filtro (método del film). En general, se observó un aumento de la efectividad al aumentar la polaridad de los solventes de extracción y al aumentar la concentración de cada uno de los extractos. De las cuatro especies bajo estudio, se pudo observar un mayor porcentaje de mortalidad sobre *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Los extractos de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol mostraron una alta mortalidad en todas las concentraciones. Los extractos obtenidos por cocimiento e infusión lograron una mortalidad, en promedio, de 72 % para *T. castaneum* y *S. oryzae*, mientras que sobre *U. dermestoides* y *O. surinamensis* fue baja. Se calculó la concentración letal del 50 % de la población (CL50) y el tiempo efectivo de mortalidad del 50 % de la población (TL50), los extractos más efectivos fueron en orden decreciente: acetona, acetato de etilo, etanol, metanol, diclorometano y éter de petróleo. Los valores de la CL50 disminuyeron con el aumento de la polaridad de los solventes.

En base a los resultados obtenidos en el método del film, por contacto, se llevó a cabo la experiencia de la observación de la mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por efecto de los extractos de acetona, acetato de etilo y etanol de *P. crenata* incorporados a la dieta. El extracto de etanol fue el más efectivo. En una segunda experiencia, se incorporaron los mismos extractos a la dieta de las larvas de *T. castaneum*, su acción se comparó con los reguladores de crecimiento Novalurón y Lufenurón. Se observó que el período larval se acortó en relación al control y los extractos de acetato de etilo y etanol tuvieron un comportamiento similar al de los reguladores de crecimiento. En el estado pupal la mortalidad fue alta, manifestándose a través del número de individuos que llegaron a adulto, la duración de este período fue similar al control para los extractos de etanol y acetona, mientras que para el acetato de etilo la concentración menor se comportó como los reguladores de crecimiento en los cuales las larvas no llegaron a empupar.

Con la finalidad de observar el efecto de los extractos en las primeras horas de observación, es decir, un efecto *knock out*, se realizó un análisis de la CL50 a las seis horas de comenzado el ensayo. Los extractos de acetato de etilo y etanol lograron la mortalidad del 50 % de la población con dosis menores. Por este motivo fueron considerados para un análisis de bioequivalencia con el insecticida convencional Clorpirifós metil. Los resultados demostraron que solamente el extracto de etanol presentó evidencias para poder considerarlo bioequivalente al Clorpirifós

Por otro lado, al someter las especies *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* a la acción por contacto de los extractos de *P. crenata*, a través de la metodología por topicación, se observó un bajo efecto, excepto la especie *S. oryzae* que difirió significativamente del testigo al alcanzar una mortalidad del 50 %.

Cuando se aislaron los cuasinoides, cuasina y neocuasina, pudo observarse que las cuasinas con el método del film presentaron efectividad sobre los adultos de *O. surinamensis* y *S. oryzae*. La respuesta de éste fue superior a la de *O. surinamensis* con la dosis de 1 ml, por lo que se llevó a cabo un segundo ensayo con una doble dosis de todos los tratamientos sobre *S. oryzae*, se confirmó la alta mortalidad producida por el tratamiento con mayor porcentaje de cuasinas. En la segunda experiencia, donde se puso a prueba la eficacia de los cuasinoides a través de la

ingesta sobre adultos y larvas de *T. castaneum*, se pudo observar que las larvas presentaron una mejor respuesta que los adultos. Con esta metodología, se evidenció la efectividad de las quasinoideas sobre adultos y larvas de estas plagas de granos almacenados.

Con estas experiencias se abre un camino que constituye un aporte interesante a estas nuevas líneas de investigación. *Picrasma crenata* es una buena alternativa en el control de las plagas de granos almacenados.

Abstract

Conventional pest management is mainly based on the application of synthetic agrochemicals. The indiscriminate use of these insecticides, though, may result on environmental pollution, ecosystem imbalance, and poisoning in animals and humans. For this reason, alternative methods of control are being considered. In this work we analyze the insecticidal activity of polar and non-polar extracts of *Picrasma crenata* (Vell.) Engl (Simaroubaceae) on the following stored grain pests: *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera:Silvanidae), *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Ulomoides dermestoides* (Fairm) (Coleoptera: Tenebrionidae). Its effect was observed by contact and ingestion, using various methods to compare it with the action of conventional insecticides and growth regulators, as well as direct action of quassinoids (quassine and neoquassine).

We evaluated the effect of extracts of *P. crenata* by contact, through impregnation technique using filter paper (film method). General increase in effectiveness was observed by increasing the polarity of the extraction solvent and by increasing the concentration of each of the extracts. Of the four species under study, a higher percentage of mortality was observed on *O. surinamensis* and on *T. castaneum*. Ethyl acetate, acetone, ethanol and methanol extracts showed high effectiveness in all concentrations. Extracts obtained by decoction and infusion achieved an average mortality of 72% on *T. castaneum* and *S. oryzae*, while the effectiveness on *U. dermestoides* and on *O. surinamensis* was low. CL50 and TE50 were calculated, being the most effective extracts in decreasing order: acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol, dichloromethane and petroleum ether. LC50 values decreased as the polarity of the solvent was increased.

Based on the results obtained in the method of the film, we studied the mortality effect on *T. castaneum* adults with the acetone, ethyl acetate and ethanol extracts of *P. crenata* incorporated in the diet. Ethanol extract was the most effective. In a second experiment, the same extracts were added to the diet of the larvae of *T. castaneum*, and the action of the extracts was compared with growth regulators: Lufenuron and Novaluron. The larval period was shorter in the control and the ethyl

acetate and ethanol extracts had a similar behavior to the growth regulators'. In the pupal state, mortality was high as shown by the number of individuals reaching to adult; the duration of this period was similar to the control for the ethanol and acetone extracts, while the lower ethyl acetate concentration behaved as in growth regulators where the larvae did not reach to pupate.

In order to study the effect of the extracts in the early hours of observation (knock out effect), an analysis of the lethal concentration 50 (LC50) was performed six hours after the beginning of the test. Ethyl acetate and ethanol extracts achieved 50% mortality of the population with the lowest dose. For this reason they were considered for the analysis of bioequivalence with the conventional insecticide Chlorpyrifos methyl. The results showed that the ethanol extract only presented evidence to consider bioequivalent to Chlorpyrifos methyl.

On the other hand, by submitting the species *S. oryzae*, *T. castaneum* and *O. surinamensis* to contact action of the extracts of *P. crenata*, through topical application method, little effect was observed, except for *S. oryzae* species that differs significantly from the control achieving a mortality of 50%.

When quassinoids, quassine and neoquassine were isolated, we observed that quassine, with the film method was effective on *O. surinamensis* and *S. oryzae* adults. Since the response of *S. oryzae* was greater than *O. surinamensis* with the dose of 1 ml, a second test with a double dose of all treatments on *S. oryzae* was carried out, confirming the high mortality caused by the treatment with the highest percentage of quassine. In the second experiment, where the effectiveness of quassinoids by intake of adults and larvae of *T. castaneum* was being tested, the larvae showed a better response than adults. With this method, the effectiveness of quassinoids on adults and larvae of these pests in stored grain was evident.

To sum up, these experiences contribute to new lines of research, showing that *Picrasma crenata* might be a good alternative in controlling stored grain pests.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1- Caracterización de los factores que influyen en la poscosecha de granos

El proceso de la producción de alimentos y de materia prima agropecuaria para la industria está sujeto a una serie de factores adversos, que hacen necesario implementar medidas de fitoprotección (Saini y Rodríguez, 2004). Sin embargo, los problemas comienzan antes del almacenamiento o de la elaboración de los subproductos. Uno de ellos es la postergación en la reposición de máquinas cosechadoras, principalmente por una recesión en la economía, que determinaron que a partir del 2002 se verificara una pérdida de cosecha valuada en millones de dólares (Bragachini *et al*, 2003). Casini y Santa Juliana (2005) señalan que las pérdidas en poscosecha registradas para los principales cultivos (soja, maíz, girasol, trigo y sorgo) en la Argentina son de 5 millones de toneladas. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2008) indica que las pérdidas en nuestro país oscilan alrededor del 8% y en dólares ascienden a 1.000 millones, según los datos de la campaña cerealera de ese año.

Los granos cosechados y llevados a depósito pasan a formar un nuevo ecosistema en el cual interactúan factores bióticos (hongos, bacterias, insectos, ácaros, roedores, entre otros) y abióticos (temperatura, humedad). Estos factores así como causas de índole técnica (estado del grano, condiciones de almacenamiento, duración, etc.) producen un deterioro del producto que se observa en una disminución de su valor comercial (Alonso *et al.*, 1996). Para evitar el efecto de estos factores deben cumplirse tres requisitos básicos: el grano se debe guardar seco, sano y limpio. Para lograrlo, la consigna para todo tipo de almacenamiento es mantener los granos vivos con el menor daño posible. Cuando éstos se almacenan sin alteraciones físicas y fisiológicas mantienen todos los sistemas de autodefensa y

se conservan por mayor tiempo durante el almacenamiento (Casini y Santa Juliana, 2005).

De los 15 millones de organismos vivos (animales y vegetales) los insectos representan el 50% (Speight *et al.*, 2008). El fósil más antiguo claramente atribuible al grupo de los insectos tiene una datación aproximada de 400 millones de años y cuando el hombre apareció sobre la tierra, los insectos ya ocupaban todos los hábitats terrestres y su espectro trófico incluía a todo tipo de plantas, animales y restos orgánicos (Scourelid, 1940).

Actualmente se han registrado aproximadamente 250 especies de insectos plagas de granos almacenados, de las cuales 25 son de importancia por los daños que ocasionan (FAO, 2001). Estas especies se caracterizan por su elevada tasa de reproducción y en condiciones ideales, pueden invadir completamente una bodega o un lugar de almacenamiento afectando los productos que allí se encuentran. Algunos adultos de estos insectos ingieren en una semana su peso en granos mientras que las larvas, en las tres o cuatro semanas de duración de este estado superan varias veces su peso (FAO, 2001). Las pérdidas debidas a estos daños oscilan entre 5 y 10% en países desarrollados mientras que en países en vías de desarrollo esta cifra es aproximadamente del 50% (Adam *et al.*, 2006).

Los insectos que atacan las semillas almacenadas pueden tener dos orígenes (Appert, 1993): a) provenir de los campos e infestar el producto antes de ser colocado en el depósito o durante el transporte de los granos; b) estar presente en los lugares de almacenamiento, donde sobreviven en aparatos de medición, embalajes, estructuras con falta de limpieza y sin desinsectizar. Los daños que producen estos insectos pueden ser directos o indirectos. Los primeros son derivados del consumo y la contaminación. Esta última se debe a la presencia de insectos así como a sus exoesqueletos, huevos, mudas de larvas, pupas, heces y telas. Los daños indirectos son aquellos que confieren a los productos atacados, olor y sabor desagradables que pueden causar afecciones digestivas a quienes los

ingieren. La actividad metabólica de los insectos plaga eleva la temperatura en la zona atacada de tal manera que provoca la condensación de la humedad lo cual favorece el desarrollo de los hongos que contaminan el producto con micotoxinas y lo convierte en no apto para el consumo humano (Lacey *et al.*, 1980).

La actividad de las plagas de granos almacenados, como gorgojos, escarabajos, polillas y ácaros se ve favorecida cuando la temperatura es superior a 15 °C, con un óptimo de 28 a 30 °C, la humedad relativa ambiente varía entre 75 y 90% y la humedad del grano, entre 12 y 17,6% (Serantes y de Haro, 1980; Ritacco, 2003; Saini y Rodríguez, 2004).

Sobre la base del daño que ocasionan, los insectos se han agrupado en especies de infestación primaria y especies de infestación secundarias: las primeras, aunque relativamente pocas, son capaces de dañar los granos enteros y tienen gran importancia económica mientras que las especies de infestación secundaria, atacan los granos partidos o los que previamente han sido dañados por las primeras, multiplicándose con facilidad en los productos obtenidos de la molienda de granos. Por último, las especies terciarias se multiplican en granos y productos en avanzado estado de deterioro causado por otros insectos o por microorganismos (Saini y Rodríguez, 2004).

Entre las diversas estrategias disponibles para el control de plagas, aquellas que incluyen el uso de insecticidas sintéticos son las más utilizadas. Sin embargo, su empleo en dosis inadecuadas suele causar fenómenos de resistencia y resurgencia de plagas y, además, provocar fitotoxicidad y contaminación del ambiente ya que al acumularse en los alimentos, los insecticidas pueden resultar tóxicos para el hombre y otros mamíferos e incluso eliminar insectos benéficos (Alonso *et al.*, 1996).

Como consecuencia de la utilización de los insecticidas sintéticos y en relación a una agricultura económica y ecológicamente sustentable, en el mediano y en el largo

plazo, resulta imprescindible buscar nuevas pautas de manejo de plagas durante el almacenamiento de la producción de granos (Silva *et al.*, 2002).

Algunos compuestos químicos de origen vegetal, como los metabolitos secundarios, resultan efectivos para controlar las poblaciones de aquellos insectos considerados plaga. Una ventaja del uso de estos metabolitos secundarios es que no dejan residuos tóxicos que puedan afectar sensiblemente tanto a la fauna como al hombre (Davidson, 1992). La acción de estos metabolitos varía de acuerdo con las especies de insectos y depende, en gran medida, de la capacidad que éstos posean para metabolizar el principio activo y hacer de éste una sustancia inocua (Hedin, 1982). Las plantas vasculares han evolucionado por más de 400 millones de años, desarrollando mecanismos de protección contra el ataque de insectos, como la repelencia y la acción insecticida (Silva *et al.*, 2002). Más de 60 años de investigación sobre el fenómeno de resistencia ha generado un volumen de información extremadamente valioso para entender cómo los artrópodos, en especial los insectos y ácaros, han desarrollado una extraordinaria habilidad para vivir y reproducirse en ambientes altamente contaminados con plaguicidas (Bisset, 2002).

Por las razones expuestas, la búsqueda de nuevas estructuras químicas derivadas de las plantas vasculares constituyen un campo propicio para el desarrollo de líneas de investigación emergentes, con bajos costos de impacto ambiental y con alto potencial para el control de plagas agrícolas.

2- Interacción animal-planta

Aproximadamente la mitad de las especies de cualquier clase, excluyendo a las algas, los hongos y los microorganismos, son insectos. De ellos casi la mitad son herbívoros que se alimentan de la biomasa principalmente de las plantas verdes. La capacidad de utilizar el material vegetal para alimentarse es uno de los logros evolutivos principales porque las plantas proporcionan, en general, sustancias alimenticias de menor valor nutritivo que las provenientes de presas animales. Por

esta razón los insectos fitófagos parecen ser menos eficientes que los insectos predadores para convertir su dieta en sustancias corporales propias (Begon, 1988).

La relación funcional entre las plagas y los cultivos depende de factores propios de cada uno de ellos, los cuales son modificados por el ambiente. Las plantas tienen efectos directos e indirectos, positivos y negativos no sólo sobre los herbívoros sino también sobre los enemigos de éstos. El conocimiento de la estructura y el funcionamiento de los tres niveles tróficos y sus interacciones, así como la forma en que el ambiente los modifica, ofrece la posibilidad de diseñar estrategias más eficaces para el manejo del sistema.

El ambiente actúa sobre las características bioquímicas, anatómicas y fisiológicas de los tejidos de las plantas. Los recursos adquiridos por la planta son particionados entre los diferentes órganos para que cumplan diversas funciones como el crecimiento, la defensa, la reparación, el mantenimiento, el almacenaje, la senescencia y la reproducción. Por otra parte, las características de las plantas son importantes en el comportamiento, el desarrollo, la supervivencia y la fecundidad del herbívoro. Estas características que actúan sobre los fitófagos incluyen el contenido de agua y de nitrógeno, la aspereza y el grosor de las hojas, la presencia de glándulas y pelos y la presencia de metabolitos secundarios (Bisset, 2002).

A nivel individual, Sadras *et al.* (2000) señalan que la planta posee un mecanismo de escape y defensa de tipo morfológico o químico, como ocurre, por ejemplo, con las distintas concentraciones de ácido hidroxicinámico en cereales de invierno y su acción repelente para los pulgones. Esta concentración es mayor en el trigo que en la cebada y cuanto más elevada, menor es la presencia de pulgones (Rodríguez, *et al.*, 2000). La planta presenta un mecanismo de tolerancia, pudiendo recuperarse total o parcialmente, por ejemplo, activando las yemas axilares y ramificarse como en el caso de la soja, el tomate o el algodón. Las reservas de C y N contribuyen al rebrote de algunas especies como la alfalfa y las gramíneas forrajeras. A nivel poblacional, la ecofisiología del cultivo también reacciona ante el ataque del herbívoro, pudiendo disminuir o no el rendimiento. Esto dependerá del período

fenológico afectado y de la capacidad del cultivo de compensar el perjuicio en algunas plantas con el mayor crecimiento de otras (Sadra *et al.*, 1999). Es así que, a través del tiempo, han tenido una fuerte presión de selección para evolucionar en la resistencia hacia los organismos que se alimentan de ellas. Por otro lado, estos organismos tratan de vencer esa defensa y, cuando lo logran, se los denominan plagas. El concepto de coevolución, donde los rasgos de un organismo sirve como presión de selección sobre otro organismo y viceversa, explica la interrelación genética entre la defensa de la planta y la evolución en los herbívoros y patógenos para vencer a ésta. Muchas de estas defensas han sido manipuladas por el hombre a través de cultivos resistentes los cuales interactúan en un nivel bioquímico con los organismos que viven a expensas de ellas (Norris *et al.*, 1997).

Las plantas producen en cantidad y en un orden diverso, compuestos orgánicos que pueden no tener una acción directa en su crecimiento y desarrollo. A estas sustancias se las denomina metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales los cuales pueden actuar como atrayentes o repelentes de insectos. Los diferentes metabolitos primarios, tales como la clorofila, los aminoácidos, los nucleótidos, los carbohidratos simples o los lípidos de la membrana tienen funciones importantes en procesos como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación y la asimilación de nutrientes; y se encuentran presentes en todas las plantas. Los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida respecto a los primarios ya que los encontramos, frecuentemente, en una sola especie vegetal o en grupos de especies relacionadas taxonómicamente.

Durante varios años se ignoró la verdadera función de los metabolitos secundarios creyéndose que eran productos finales del metabolismo o ceras metabólicas. Los primeros estudios sobre los metabolitos secundarios se llevaron a cabo a fines del siglo XIX y principios del XX, interesados en estas sustancias por su importancia como componentes de drogas medicinales, venenos, saborizantes y material industrial en general. Los metabolitos secundarios tienen importantes funciones ecológicas en relación a las plantas. Las principales son la protección contra la depredación de los herbívoros y la infestación de los patógenos; su acción como atrayentes para los

polinizadores y las aves que actúan en la dispersión de las semillas; y como agentes de competencia inter e intraespecífica entre las plantas. Por otro lado, los parasitoides utilizan la respuesta inducida de los herbívoros para evaluar las posibilidades que le brinda el ambiente para alimentarse (Tentelier y Fauvergue, 2007).

De acuerdo con la biología evolutiva, la defensa de las plantas tuvo su origen en mutaciones heredables, selección natural y cambios evolutivos (Taiz Zeiger, 1998). Los metabolitos secundarios pueden cambiar su función como consecuencia de cambios en la misma escala de organización biológica. Asimismo, las variaciones en la secuencia y/o la arquitectura genética, en general, constituyen la base de los cambios evolutivos de los metabolitos secundarios (Theis y Lerdau, 2003; Dicke *et al.*, 2003; Arimura *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 2006; Heil y Bueno, 2007; Ton *et al.*, 2007; Bruce *et al.*, 2005 y Maffei *et al.*, 2007).

2.1- Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios comprenden tres grupos químicamente diferentes: los compuestos fenólicos, los compuestos nitrogenados y los terpenos. Se sintetizan a partir del CO₂ asimilado por la planta, mediante diferentes rutas metabólicas. Los compuestos fenólicos son sustancias aromáticas formadas principalmente por el ácido siquímico. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno en su estructura, como los alcaloides, son biosintetizados a partir de los aminoácidos mientras que los terpenos son lípidos sintetizados a partir del acetil CoA o a partir de intermediarios básicos de la glicólisis (Leicach, 2006).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo químicamente muy heterogéneo, algunos de ellos actúan como sustancias de defensa contra los herbívoros y los patógenos, otros como soporte mecánico de los polinizadores y en la dispersión de los frutos. Pueden interceptar eficazmente la luz ultravioleta o reducir el crecimiento de las plantas cercanas por competencia (Waller, 1987; Leicach, 2006).

Entre los compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides, que incluyen un rango amplio de sustancias coloreadas como las antocianinas, responsables de la mayoría de los colores rojo, rosa, púrpura y azul, observados en diversas partes de las plantas. Las flores y los frutos coloreados por los flavonoides son atractivos para los animales que colaboran con la polinización y para aquellos que participan en la dispersión de las semillas (Vivanco, 2005).

Otro grupo son los compuestos nitrogenados, una gran variedad de metabolitos secundarios de las plantas tienen nitrógeno en su estructura. En esta categoría están incluidos aquellos que actúan como defensa contra los herbívoros como los alcaloides y los glicósidos cianogénicos. Estos grupos de compuestos son de considerable interés tanto por su toxicidad en humanos así como por sus propiedades medicinales (nicotina, cocaína, cafeína, atropina, reserpina, morfina, digitalina, entre otros). Los glicósidos cianogénicos forman parte de este grupo y actúan como depresores de la alimentación en los insectos y en otros herbívoros. Una segunda clase de glicósidos en las plantas son los glucosinolatos o los glicósidos del aceite de mostaza. Se encuentran principalmente en las crucíferas (Brassicaceae) y las familias relacionadas. Esos compuestos son los responsables del aroma y el gusto, característicos de los vegetales como el repollo, el brócoli y el rábano. Son sustancias tóxicas para los herbívoros, pudiendo actuar como repelentes. Los glicósidos cianogénicos y los glucosinolatos son almacenados en las plantas sanas separadamente de las enzimas que los hidrolizan y sólo entran en contacto con dichas enzimas cuando son molidas o machacadas (Ávalos García *et al.*, 2009). Como ocurre con otros metabolitos secundarios, ciertos herbívoros están adaptados a alimentarse de especies vegetales que contienen glucosinolatos. En condiciones de campo, se ha observado que al disminuir los niveles de glucosinolatos en ciertas variedades de *Brassica napus* L. (Brassicaceae) los cultivos son más vulnerables al ataque de las plagas. Sin embargo, en variedades logradas más recientemente, se ha disminuido el nivel de glucosinolatos en la semilla y se ha aumentado el nivel en las hojas (Ávalos García *et al.*, 2009).

Las plantas y los animales incorporan los mismos 20 aminoácidos en sus proteínas. Algunas plantas también contienen otros aminoácidos llamados no proteicos, los cuales no están incorporados en las proteínas sino que se hallan en forma libre y actúan como sustancias protectoras. Los insectos especialistas pueden adaptarse a las plantas que contienen aminoácidos no proteicos (Ávalos García *et al.*, 2009).

En la planta se generan inhibidores de proteasas denominadas “proteínas antidigestivas”, que bloquean la acción de las enzimas proteolíticas en el intestino de los herbívoros. Los insectos que se alimentan de las plantas que contienen estos inhibidores sufren reducción en la tasa de crecimiento y desarrollo, pudiendo provocar la muerte por ayuno. El rol defensivo de los inhibidores de proteasas se ha observado en experimentos realizados con tabaco transgénico. Estos inhibidores así como otras sustancias que actúan como defensa no están siempre presentes en las plantas, sino que son sintetizados una vez producido el ataque del herbívoro o del patógeno. En las plantas de tomate, la acumulación sistémica de inhibidores en las partes no heridas, decae con la edad y no se observa en las plantas maduras, sin embargo, la respuesta local persiste a lo largo de la vida de la planta. La producción sistémica de estos inhibidores es consecuencia de una compleja secuencia de eventos. Se observó en las hojas de tomate la producción de un oligopéptido (18 aminoácidos) llamado sistemina, que fue la primera hormona polipéptido descubierta en plantas que coordina la respuesta de defensa contra los insectos herbívoros (Pearse, 1991; Camarena Gutiérrez, 2002).

De los compuestos mencionados, los terpenoides adquieren relevancia porque todos los cuasinoides, principal grupo de la familia de las Simaroubaceae, son biosintetizados a través de la vía biogénica de los triterpenoides (Polonsky, 1973).

2.1.1- Compuestos terpénicos

Los terpenoides son a menudo llamados isoprenoides porque son productos derivados de la repetición de una unidad diénica de cinco átomos de carbonos denominada isopreno, por lo cual las fórmulas moleculares tienen un número de

átomos de carbonos que es múltiplo de cinco, por ejemplo, mono (10 C), sesqui (15 C), di (20 C), tri (30 C), tetraterpenos (40 C). Los productos que provienen del metabolismo del isopreno abarcan a los terpenos, los carotenos, las vitaminas, los esteroides, entre otros. Respecto de su biosíntesis, la marcación isotópica ha permitido demostrar que el esqueleto hidrocarbonado de los terpenos proviene del acetato, vía mevalonato (Leicach, 2006) (Figura 1.1 y 1.2)

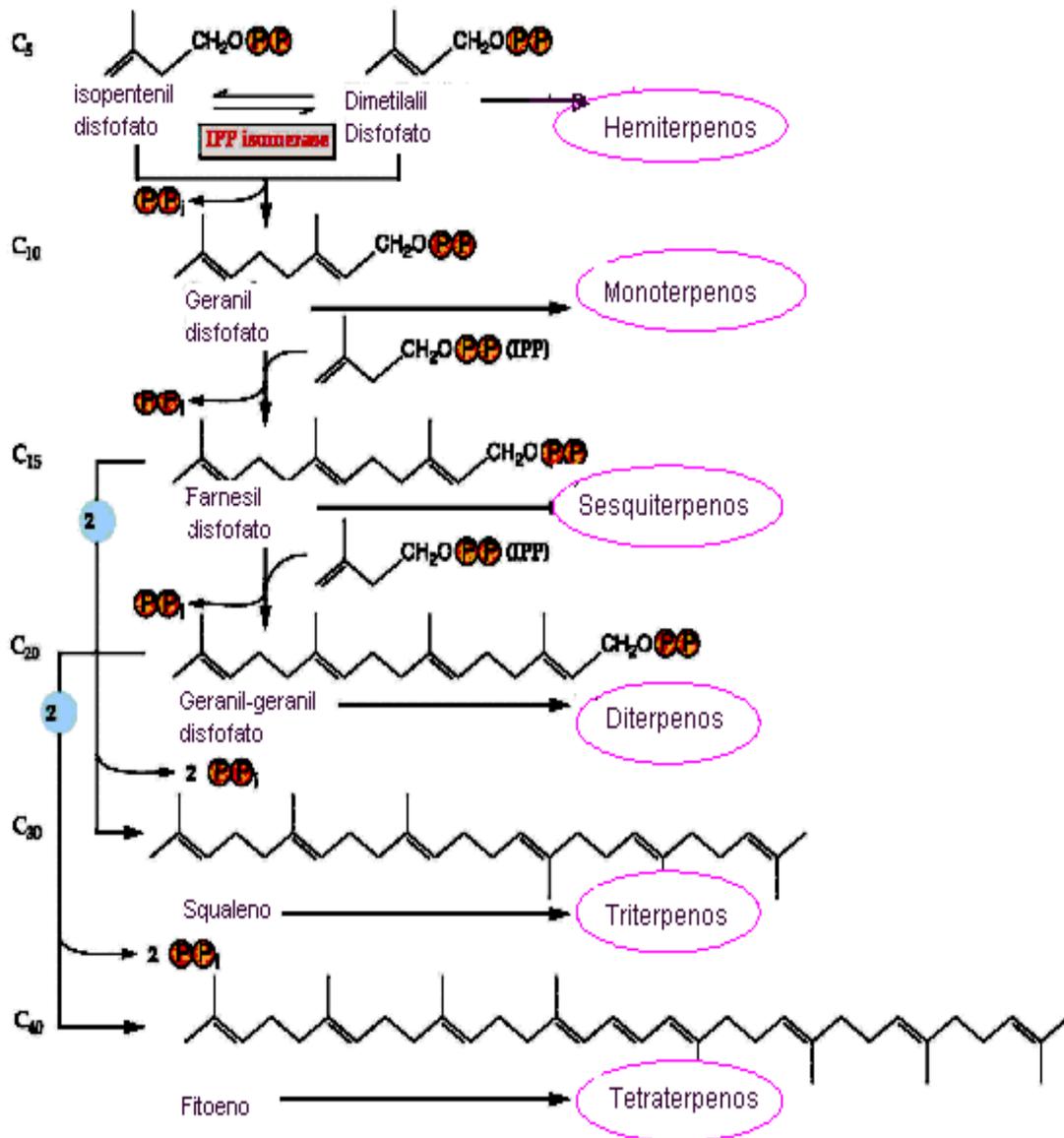


Figura 1.1- Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen

Ciertos terpenos tienen acción sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas considerándolos metabolitos primarios como, por ejemplo, las giberelinas que son diterpenos y constituyen un importante grupo de hormonas de las plantas. Los fitoesteroles son derivados triterpenos, componentes esenciales de las membranas celulares. Los carotenoides rojos, naranjas y amarillos son tetraterpenos que actúan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis y protege al tejido fotosintético de la fotooxidación (Taiz Zeiger, 1998). Los terpenos tienen una función importante como metabolitos primarios y secundarios, son tóxicos y disuasivos de la alimentación en un gran número de insectos fitófagos y mamíferos, pero también pueden actuar como atractivos de otros insectos (Theis y Lerda, 2003). Algunos monoterpenos y sus derivados son importantes agentes tóxicos contra los insectos, por ejemplo, los ésteres monoterpenos llamados piretroides, que se encuentran en las hojas y las flores de *Crysanthemum* sp., presentan una fuerte actividad insecticida. Además, son conocidos los insecticidas comerciales en base a piretroides naturales y sintéticos, caracterizados por su baja persistencia en el ambiente y la baja toxicidad en los mamíferos. En coníferas, como los pinos y los abetos, los monoterpenos se acumulan en los conductos resiníferos de las acículas, las ramas pequeñas y los troncos. Los principales compuestos de esta resina son: α -pineno, β -pineno, limoneno y mirceno (Leicach, 2006), los cuales son tóxicos para insectos de la familia Scolytidae (Coleoptera), importantes plaga de coníferas a nivel mundial. Algunas plantas contienen una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos volátiles llamados aceites esenciales (menta, peperina, limón, albahaca y salvia, entre otros) que otorgan un olor característico al follaje y son conocidos por sus propiedades de repelencia a los insectos. Se los encuentran en los pelos glandulares, los terpenos son almacenados en espacios extracelulares dentro de la pared celular. En el maíz y el algodón, entre otras especies, ciertos monoterpenos y sesquiterpenos son producidos y segregados sólo después de que el insecto ha comenzado a alimentarse de aquellas; las sustancias producidas atraen a los predadores y los parasitoides que se alimentarán de los herbívoros, disminuyendo el daño de éstos (Ferry et al., 2004, Leicach, 2006).

Los sesquiterpenos son un amplio grupo de terpenoides que presentan más de 200 estructuras cíclicas diferentes; la ciclación del farnesil pirofosfat (FPP) ocurre por el mismo mecanismo que la del geranil pirofosfato (GPP); los cinco carbonos y el doble enlace adicional permiten un aumento de la flexibilidad de la cadena y la formación de un mayor número de estructuras esqueléticas; muchos de estos sesquiterpenos tienen funciones de defensa en las plantas.

Los sesquiterpenos pueden actuar como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microorganismos, como inhibidores de la alimentación de los herbívoros oportunistas y también como fitohormonas como el ácido abscísico.

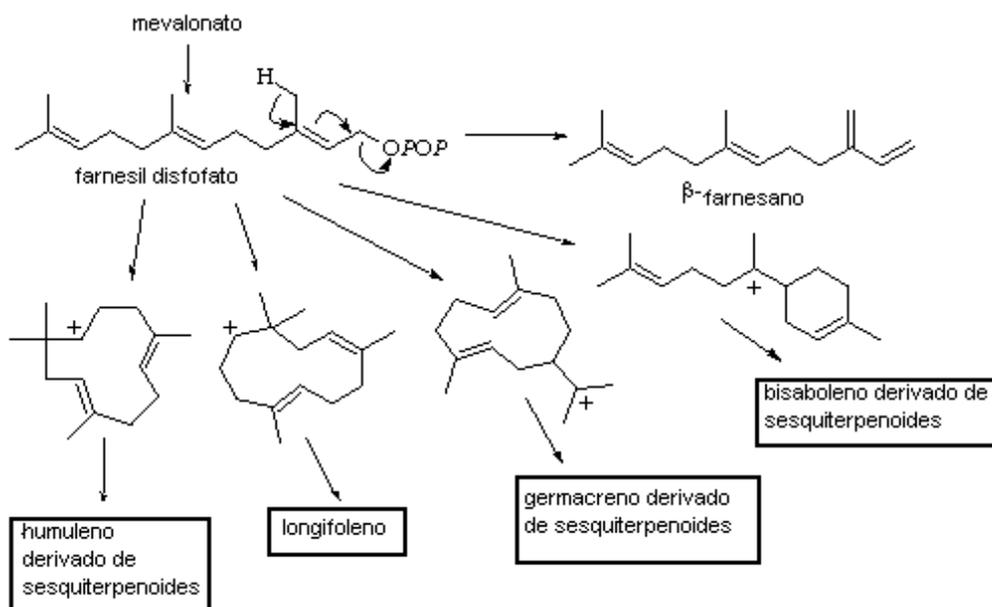


Figura 1.2- El esqueleto hidrocarbonado de los terpenos proviene del acetato, vía mevalonato

Los esqueletos más frecuentes de los sesquiterpenos que se obtienen son: farneseno (cadena abierta), humuleno, longifoleno, germacreno y bisaboleno. Los sesquiterpenos como el cariofileno y el bisaboleno y las sesquiterpenolactonas como la achilina y la partenina, han demostrado ser inhibidoras del crecimiento. Estudios recientes sobre la actividad bactericida y antifúngica de los aceites esenciales de *Stachys scardica* (Griseb.) Hayek (Lamiaceae) señalaron dos sesquiterpenoides, el

germacreno D y un óxido del cariofileno como los principios activos (Skaltsa *et al.*, 2003).

Un alcohol sesquiterpeno, [11R]-eudesm- 4 (14)-en-5a, 11-12-triol, obtenido de la parte aérea de *Jasonia glutinosa* (L.) DC. (Asteraceae) demostró tener actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum* (Villaescusa-Castillo *et al.*, 2000).

3- Resistencia de los insectos plaga a los insecticidas

Las medidas de control, en la actualidad, se basan en la aplicación de productos químicos, debido a su eficacia y bajo costo (Dal Bello y Padín, 2006; Sahaf *et al.*, 2008). Los métodos químicos incluyen a los insecticidas sintéticos convencionales, los fumigantes, los reguladores de crecimiento y los insecticidas de origen vegetal (Daglish *et al.*, 1995; Broussalis *et al.*, 1999; Procopio *et al.*, 2003; Kljajic y Peric, 2006; Lorini y Beckel, 2006; Kljajic y Peric, 2007; Nukenine *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2008; de Lima *et al.*, 2008; Ogendo *et al.*, 2008). Los más utilizados son los insecticidas químicos convencionales como los organofosforados (diclorvos, malatión, metil-clorpirifós, metilpirimifós), los piretroides (deltametrina), las piretrinas obtenidas a partir de los extractos de *Tanacetum* sp. (Asteraceae) (CASAFE, 2005; Alleoni y Ferreira, 2006; Fields, 2006; dos Santos Veloso *et al.*, 2008) y los fumigantes que incluyen el bromuro de metilo, la fosfina y el bromuro de sulfhidrilo (Ducom *et al.*, 2002; Navarro, 2006).

El incremento del uso de los plaguicidas ha ocasionado efectos perjudiciales sobre el agroecosistema tales como la adquisición de resistencia, resurgimiento de las plagas secundarias y contaminación del medio afectando la vida silvestre, los animales domésticos y a la salud humana (Pacheco *et al.*, 1990; Correa *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2006; dos Santos Veloso *et al.*, 2008; Soares Correa *et al.*, 2008; Braga Rodrigues *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2009; Stefanazzi, 2010).

La habilidad del hombre para controlar las plagas se ve seriamente amenazada por la amplia distribución de aquellos insectos resistentes a los insecticidas, particularmente en las regiones cálidas del mundo. El fenómeno de resistencia de las plagas a los pesticidas se observa donde quiera que se utilicen estos productos en forma rutinaria y en la actualidad los especialistas lo aceptan como una consecuencia natural del proceso evolutivo. Las plagas que inicialmente fueron susceptibles a dosis bajas de un producto, después de un tiempo de sucesivas aplicaciones, requieren dosis mayores y eventualmente, no son afectadas por éstos (Sosa, 1989). Aunque unos pocos casos de resistencia han sido registrados para productos inorgánicos, los más notables y de mayor importancia económica son los casos de resistencia a los insecticidas orgánicos modernos, fosforados, clorados, carbamatos y piretroides, así como a los diversos grupos de acaricidas. En la Argentina, el primer caso de resistencia fue detectado en poblaciones de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) en 1985 (Picollo de Villar *et al.*, 1985). En el año 1989, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) había registrado 504 casos de resistencia especialmente en los insectos de los órdenes Diptera, Lepidoptera, Coleoptera y Acarina.

En principio, el desarrollo de la resistencia, en una población de insectos, se basa en la variabilidad natural que presentan los individuos de esa población a los efectos de un producto. Normalmente unos pocos individuos son capaces de tolerar las dosis que producen la muerte de la gran mayoría de la población. Si se ejerce una presión de selección por medio de sucesivas aplicaciones los individuos susceptibles son eliminados y la población se torna resistente. Hay que distinguir el concepto de **resistencia** que es la pérdida de susceptibilidad de una población como consecuencia de las aplicaciones de insecticidas de **tolerancia** que es la ausencia de susceptibilidad de una población de insectos a un producto como una característica natural (Hussain *et al.*, 1996).

La resistencia no se desarrolla al mismo ritmo en todas las poblaciones sometidas a similares presiones de selección. En unos casos la resistencia se desarrolla

rápidamente, en otros ocurre en forma progresiva o no se llega a desarrollar. Aún dentro de una misma especie se pueden presentar diferencias entre poblaciones aisladas. Esto se debe a los múltiples factores genéticos, biológicos y ecológicos involucrados en el fenómeno. Según Georghiou (1990) hay factores genéticos, como la frecuencia de los alelos de resistencia, el número de alelos involucrados y su condición de dominancia; también intervienen las interacciones entre los alelos de resistencia por otros pesticidas, el efecto de selecciones previas. Hay factores biológicos y ecológicos, como el número de generaciones por año, el tamaño de la descendencia por generación y las condiciones de monogamia, poligamia y partenogénesis. Pimentel *et al.* (2010) señala que la resistencia a insecticidas fumigantes de las plagas de granos almacenados se debe a dos factores, la frecuencia de aplicación y la migración de las poblaciones resistentes. Es conocida la resistencia de *T. castaneum* al insecticida malathion (Subramanyam y Hagstrum, 1996).

Andrić *et al.* (2010) estudiaron la toxicidad de los insecticidas diclorvos, malation, metil clorpirifós, metil pirimifós, deltametrina y bifentrina por aplicación tópica sobre adultos de *T. castaneum* perteneciente a distintas poblaciones de este insecto. A través de la DL50 se determinó que el más tóxico fue deltametrina y el menos tóxico malatión. Estos resultados fueron relacionados con la mayor o menor resistencia de la plaga a estos insecticidas.

Arnaud y Haubruge (2002) aparearon machos resistentes con hembras fértiles susceptibles de *T. castaneum*. La hembra tiene la capacidad de almacenar esperma de machos resistentes por un largo período y generar individuos resistentes. Esto es particularmente importante si la resistencia al insecticida se hereda como un rasgo dominante, que es el caso de lo que sucede en numerosas especies que presentan genes resistentes a insecticidas. La hembra puede ser fecundada una o varias veces, la segunda opción es la más frecuente. Los autores observaron que las hembras de *T. castaneum* que se aparearon primero con machos resistentes y luego con uno susceptible produjeron progenie con ambos fenotipos. Los machos susceptibles produjeron el 70% de la progenie, demostrando la procedencia del

último tipo de esperma; los individuos resistentes fueron producidos por la hembra durante un período mayor a los tres meses. Por consiguiente, cuando una hembra coloniza un nuevo ambiente, los problemas de resistencia a los insecticidas pueden aparecer, incluso, en ausencia de adultos resistentes. La difusión de los genes resistentes a través del esperma almacenado, será más importante en las especies de mayor distribución tales como los insectos plaga de granos almacenados, los que se propagan a través del comercio de granos y sus subproductos.

Thié (2005) realizó un estudio sobre la detección e incidencia de resistencia a la fosfina en las plagas de grano almacenado, y demuestra que el uso de dosis inadecuadas promueve la selección de insectos resistentes. En su trabajo presenta las dosis necesarias para controlar las poblaciones resistentes de *S. oryzae* y *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae) y proporciona datos sobre la genética de la resistencia. Llevó a cabo pruebas con *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera:Bostrichidae) y *T. castaneum*, sobre las poblaciones recolectadas en San Pablo entre 1986, 1988 y 1998. Los resultados sugieren que las frecuencias de resistencia se han mantenido constantes durante este período. Hubo evidencia de dos genes que controlan la resistencia a la fosfina, uno es un gen semidominante principal, heterocigoto, que muestra una menor resistencia que los homocigotos resistentes. Concluye, por consiguiente, que las dosis deben adaptarse a especies susceptibles, heterocigotos u homocigotos resistentes.

Pimentel *et al.* (2010) demostraron que la supervivencia de *T. castaneum*, *R. dominica* y *S. oryzae* a la aplicación de concentraciones comerciales de fosfina depende, en mayor o menor medida, del grado de dispersión de la plaga, si es una especie que puede desarrollarse en el campo antes de la cosecha y continuar su desarrollo en el silo o si la infestación ocurre en el transporte o en el almacenamiento de los granos bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad.

Lorini y Galley (2001) realizaron estudios de resistencia cruzada de *R. dominica* a tres insecticidas utilizados en el grano almacenado: permetrina (piretroide), pirimifosmetil y clorpirifos- metilo (organofosfatos). Inicialmente todas las cepas fueron evaluadas en su susceptibilidad al insecticida deltametrina durante tres

generaciones. Algunas cepas mostraron resistencia cruzada a la permetrina, mientras que ésta no se observó para los organofosforados, pirimifos-metilo y el clorpirifos-metil.

Lee (2002) realizó ensayos de toxicidad con aceites esenciales de lavanda [(*Lavandula officinalis* Chaix. (Lamiaceae)] e ilang-ilang [(*Caranga odorata* Hook Fil. et Thomson (Anonaceae)] sobre dos biotipos de *O. surinamensis*, uno resistente y el otro susceptible a un insecticida convencional como el clorpirifós metil. Los resultados demostraron que los individuos pertenecientes al biotipo resistente tienen una tolerancia mayor a la lavanda y al ilang-ilang, que aquellos susceptibles. Se evaluó el tiempo letal 50 (LT50) a dos concentraciones diferentes. La mortalidad del 50% de la población se logró en un tiempo más prolongado en el biotipo resistente en ambas concentraciones. Al estudiar los mecanismos bioquímicos que operaban en estos insectos, se observó que el butóxido de piperonilo, un potencial inhibidor del citocromo P450-monooxigenasa dependiente, aumentó la toxicidad de los aceites esenciales en el caso del biotipo resistente al insecticida convencional. El aumento de la tolerancia a estos aceites puede deberse al incremento de enzimas detoxificantes asociadas con resistencia a insecticidas. Otros autores informaron casos de resistencia a insecticidas en insectos plaga de granos almacenados (Ferrero, 1988; Picollo de Villar *et al.*, 1992; Descamps, 2002; Stadler *et al.*, 2003). Algunos fumigantes han tenido que ser discontinuados o retirados del mercado debido a efectos adversos en el ambiente, en la salud del hombre o por sus elevados costos (Rodríguez-Hernández y Vedramim, 1998; Rajendran y Sriranjini, 2008). Restricciones severas regulan el uso de insecticidas y el patentamiento de nuevos productos para la aplicación de estos compuestos a los granos destinados a la alimentación. Es por ello que los gobiernos de EE. UU y Europa han creado políticas tendientes a reemplazar los productos químicos de uso corriente por productos menos agresivos para la salud del hombre y el ambiente (Arthur y Rogers, 2002; Isman, 2006; Navarro, 2006).

La problemática planteada refleja claramente la necesidad de un manejo integrado y racional de las plagas, donde el control no esté dado por una única alternativa sino

por el uso combinado de diferentes métodos (Sosa y Tonn, 2006). Estos deben cumplimentar tres requisitos básicos: el mantenimiento de la rentabilidad, la protección del ambiente y la menor utilización de los insecticidas de síntesis, que es una de las mayores demandas generadas por los consumidores. Dentro de este marco, el manejo integrado de plagas se impone como una excelente estrategia de control, teniendo como premisa el mantenimiento de las poblaciones de insectos por debajo de los niveles de daño económico dentro de un marco de protección del ambiente (Dent, 2000). El manejo integrado de plagas (MIP) propone el uso combinado de métodos preventivos, biológicos, físicos y químicos. Los métodos preventivos son la pieza clave de cualquier programa de lucha y deben cumplirse de manera rigurosa para garantizar una adecuada conservación del producto.

Es de vital importancia el uso de las Buenas Prácticas Agrícolas para producir alimentos sanos e inocuos y el cumplimiento de los estándares ISO, particularmente las normas ISO 9.000 y 14.000. Estas normas sugieren la necesidad actual de incorporar nuevos conceptos de calidad en el manejo de los granos almacenados. Además, es fundamental el cuidado de las instalaciones, la higiene y el aislamiento para evitar el ingreso de plagas a los sitios de almacenaje (Campos, 2006; Cosenzo, 2009).

4- Antecedentes en el uso de los extractos vegetales como insecticidas naturales

La concentración de metabolitos secundarios varía según la especie vegetal. Aún cuando no hay un patrón de máxima producción, ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, lo común es que las mayores concentraciones de este tipo de compuestos se encuentren en las hojas, las flores y las semillas (Silva Aguayo, 2001; Descamps, 2007). Hacia 1970 se estableció que el metabolismo secundario se produce en la especialización celular y que su generación durante ciertas fases del desarrollo del organismo productor es debido a la expresión genética diferencial (Mareggiani, 2000).

Desde la época de los antiguos romanos se sabe que muchas plantas exhiben propiedades insecticidas y han sido utilizadas para el control de insectos. La antigua práctica consistía en mezclar materiales de plantas nativas con granos almacenados con el fin de disminuir los daños ocasionados por las plagas de almacenaje (Adityachayhury *et al.*, 1985; Powell, 1989; Schmutter, 1990; Descamps, 2007).

Antes del año 1850, veinte especies de plantas procedentes de dieciséis familias eran utilizadas para el control de plagas en la agricultura y en la horticultura en el Oeste de Europa y en China (Ibrahim *et al.*, 2001). Se llevaron a cabo diferentes estudios y en 1937 se determinó que las hojas de *Azadirachta indica* Juss (Meliaceae) prevenían a los cultivos del ataque de *Schistocerca gregaria* Forsk (Orthoptera: Acrididae) (Nawrot *et al.*, 1986; Descamps, 2007).

Los insecticidas derivados de los productos vegetales fueron muy utilizados hasta 1940, especialmente el alcaloide nicotina extraído de las hojas de *Nicotiana tabacum* L. y de *N. rustica* L (Solanaceae). El piretro conocido como compuesto de Persia fue utilizado en el siglo XVII, siendo extraído de las flores de varias especies del género *Chrysanthemum* (Asteraceae). Este compuesto ha sido utilizado hasta nuestros días con la gran ventaja de la baja toxicidad que poseen las piretrinas para los mamíferos. Los rotenoides representados por la rotenona fueron utilizados por primera vez en Malasia en 1848. La rotenona se encuentra presente en las leguminosas del género *Derris* en Malasia e Indonesia y en los géneros *Lonchocarpus*, *Tephrosia* y *Mundula* encontrados en África y América del Sur (Ferreira *et al.*, 2001; Descamps, 2007).

En la actualidad, los aceites esenciales y los extractos vegetales son los compuestos más ensayados para el control de insectos (Papachristos y Stamopoulos, 2002b; Umoetok y Gerard, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Tapondjou *et al.*, 2005; Ferrero *et al.*, 2006; Sánchez Chopa *et al.*, 2007; Stefanazzi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Se han aislado e identificado aproximadamente 20.000 compuestos fitoquímicos de origen vegetal, aunque se estima que existen alrededor de 500.000 (Wysoki, 1996).

Estos compuestos pueden actuar como fumigantes, insecticidas de contacto, repelentes, antialimentarios, esterilizantes o afectando diferentes parámetros biológicos como la oviposición, la tasa de desarrollo y la duración del ciclo de vida (Talukder y Howse, 2000; Papachristos y Stamopoulos, 2002a, 2004; Tripathi *et al.*, 2003; Pérez Pacheco *et al.*, 2004; Taponjoui *et al.*, 2005; Descamps, 2007). Ko Ko *et al.* (2010) observaron que los frutos de *Litsea salicifolia* (J. Roxb. Ex Ness) Hook. f. (Lauraceae) tienen un efecto de repelencia a dosis bajas ($0,16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y de toxicidad por contacto sobre *S. zeamais* y *T. castaneum*, actuando como antialimentario sobre *T. castaneum*.

El estudio de la interacción entre el insecto-plaga y los compuestos presentes en las plantas ofrecen un potencial importante para mejorar a futuro el control de las plagas en muchos cultivos (Descamps, 2007).

En América Central, México y América del Sur, como en la Argentina, Brasil, Ecuador y Chile, están desarrollando líneas de investigación dedicadas a la búsqueda de compuestos químicos con menor impacto ambiental y potencialmente eficaces para el control de plagas agrícolas. En América del Norte, en particular en Estados Unidos de Norteamérica, ya se han registrado varios productos de origen vegetal para el control de plagas como piretro (piretrinas, cinerinas), rotenona (rotenoides), riania, sabadilla (alcaloides) y neem (limonoides) (Ferreira *et al.*, 2001). En la Argentina los productos naturales registrados son: Abamectin (avermectina), *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis* var. *Kurstaki*), Carpovirus Plus (virus de granulosis de *Cydia pomonella*), Spinosad (Spinosyn A y D) (CASAFE, 2005).

Por otro lado, fueron extraídos aceites esenciales del orégano, *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae), cuyos principales constituyentes son el carvacrol y el timol. El efecto insecticida de estos aceites se han probado sobre *Drosophila melanogaster* Maengi (Diptera). La mezcla de estos dos fenoles causa el fenómeno de antagonismo, disminuyendo el efecto del carvacrol en presencia del timol (Karpouhtsis *et al.*, 1998). Cirigliano *et al.* (2008) observó el efecto de los extractos crudos de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae) y su principal whitanólido (whitanolide E y β -

hydroxywithanolide E) sobre larvas y adultos de la mosca de los frutos (*Ceratitis capitata* Wied. (Diptera)). Las altas concentraciones de los extractos (10.000 ppm y 35.000 ppm) produjeron la mortalidad de larvas y adultos de *C. capitata*; una concentración menor (1.000 ppm), ocasionó mortalidad de las larvas, retraso en el crecimiento y la duración del período larval mientras que cuando la concentración era de 500 ppm hubo una significativa mortalidad de las larvas.

Se observó la actividad insecticida de 1,8-cineol extraído de *Lavanda spica* L. (Lamiaceae) diluído en etanol y por aplicación tópica sobre larvas de mosca de los frutos, *C. capitata* (50, 500 y 5000 ppm) con alto porcentaje de mortalidad (Clemente *et al.*, 2007). Se evaluó el efecto insecticida del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill (Mirtaceae), obtenido de hojas adultas que contiene 1,8-cineol, sobre *C. capitata* en distintas concentraciones (0,5 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, 0,8 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, 1 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ y 1,5 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) y se lo comparó con el 1,8-cineol puro, el estudio demostró que no hubo diferencia significativa y la mortalidad fue del 90 al 100% (Rodríguez *et al.*, 2010).

Vilariño *et al.* (2005) compararon la respuesta inducida a herbívoros en variedades dulces y amargas de *Lupinus albus* L. y *Lupinus angustifolius* L. (Fabaceae). Las especies de lupino se caracterizan por poseer alcaloides quinolizidinos, las variedades dulces (bajo contenido de alcaloides) son más palatables por lo cual son más susceptibles a la herbivoría. Se llevaron a cabo dos experiencias, en la primera se introdujeron en un cultivo de lupino, larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae) durante tres días. En la segunda, se recogieron las hojas de lupino de las diferentes variedades, consumidas y sanas, se las ofreció a otro grupo de *A. gemmatalis*, el nivel de alcaloides fue superior en aquellas dañadas, lo que fue suficiente para disuadir al herbívoro.

Popich *et al.* (2005) evaluaron la actividad de las lactonas sesquiterpénicas, específicamente hirsutinólidos y germacranólidos de *Cyrtocymura cincta* (Griseb.) H. Robinson (Asteraceae) sobre *Spodoptera latifascia* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) demostraron que las lactonas afectan el crecimiento larval. Rosetti *et al.* (2005) comprobaron el efecto disuasivo de *Melia azedarach* L. (Meliaceae) en la

alimentación de larvas de *Spodoptera eridania* Stoll (Lepidoptera: Noctuidae). Sánchez Chopa *et al.* (2005) obtuvieron actividad repelente en adultos de *Blattella germanica* L. (Blattaria: Blattellidae) con los extractos clorofórmicos de los frutos de *Chuquiraga erinacea* Don (Asteraceae) y de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae).

Caballero García (2004), determinó la actividad antialimentaria de tres grupos de terpenoides (diterpenos neo-clerodánicos, sesquiterpenos y limonoides), frente al “escarabajo de la patata”, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) y la “oruga militar de la remolacha”, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Los resultados ponen de manifiesto cómo mínimos cambios en la estructura de las moléculas son responsables de cambios, tanto del tipo de actividad antialimentaria (disuasoria y/o antiapetitiva) como de su especificidad por alguna de las dos especies.

Los monoterpenoides (terpenos y fenoles relacionados biogenéticamente) presentes en aceites esenciales de algunas plantas fueron testeados para comprobar su toxicidad aguda, por aplicación tópica sobre larvas de *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). De los diez compuestos probados el timol aislado de *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) fue el más efectivos. A dosis bajas se observó un efecto subletal, disminución del 20% del crecimiento de larvas y disuasión de la alimentación. Aquellas sustancias presentes en menor proporción, como el trans-anetol, en el aceite esencial de *T. vulgaris* mostraron un buen efecto sinérgico sobre el timol al producir toxicidad aguda y como disuasivo de la alimentación (Hummelbrunner y Isman, 2001).

Se observó el efecto de tres extractos (agua, metanol y éter etílico) de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) sobre *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) una plaga importante en las Meliaceae, *Cedrela* sp. y *Swietenia* sp. Se produjo un efecto fago disuasivo. El extracto con metanol fue el más efectivo aún en bajas concentraciones.

En forma general, los insecticidas naturales se degradan con mayor velocidad que los sintéticos y no dejan residuos en el ambiente. Para que un insecticida natural sea comercialmente viable debe cumplir con una serie de requisitos como son la selectividad, la protección de los enemigos naturales, la baja toxicidad en mamíferos, ser biodegradable y no fitotóxico (Vieira *et al.*, 2001).

Algunas Universidades Nacionales como la de Tucumán, San Luis, Córdoba, del Sur y Buenos Aires están desarrollando sus investigaciones sobre la acción de diferentes metabolitos secundarios y sobre diversos órdenes de insectos como Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera y Diptera, principalmente.

4.1- Actividad biológica de los extractos vegetales en insectos del Orden Coleoptera

La mayoría de las especies vegetales estudiadas que se utilizan en la protección de las plantas exhiben un efecto insectistático más que insecticida, es decir, inhiben el desarrollo normal de los insectos. Sin embargo, algunas sustancias vegetales provocan un efecto insecticida como sucede con las piretrinas, la nicotina y la rotenona (Rodríguez y López, 1999). Según Coats, (1994; citado por Aguayo, 2006 y García y Donadei, 2005) los compuestos naturales tienen un efecto protector de las plantas que lo producen que, principalmente, se debe a la repelencia, disuasivo de la alimentación u oviposición y regulador del crecimiento. Cabe señalar que el uso de las sustancias vegetales para el control de las plagas no debe considerar la erradicación total del organismo-plaga, sino que debe procurar la restauración, la preservación y la consolidación del balance de los ecosistemas (Aguayo, 2006).

Se aislaron tres whitanólidos de tres especies de Solanaceae, *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn., *Salpichroa organifolia* (Lam.) Baill. y *Datura ferox* L. Una solución acetónica de los compuestos fue incorporada a la dieta de las larvas de *Tribolium castaneum*, en una concentración de 500 ppm. Los tres produjeron retraso en el crecimiento (Mareggiani *et al*, 2000).

Bado y Mareggiani (2001) observaron la acción de dos whitanólidos (jaborosalactone P y jaborosalactone 10) de *Jaborosa odonelliana* Hunz. (Solanaceae), adicionados a la dieta de larvas de *T. castaneum*. Se contabilizaron, cada 10 días, las larvas que llegaron al estado de adulto. El primero demostró actividad antialimentaria, no así el segundo.

Por otro lado, se observó la acción de los whitanólidos extraídos de *Salpichroa origanifolia* (Lam.) Baill. (Solanaceae), se incorporaron a la dieta de las larvas de *T. castaneum* en concentraciones de 500 ppm y 2000 ppm. Estos compuestos actuaron como inhibidores de la alimentación, en las concentraciones más altas se produjo retraso en el desarrollo de las larvas y en ambas concentraciones se observó un efecto letal (Mareggiani *et al.*, 2002).

Asimismo, el aceite de alcarabea, cuyo principal compuesto es la carbona y los aceites de algunas poblaciones de albahaca que contienen metil chavicol tuvieron cierta toxicidad por contacto sobre *S. oryzae* (Pascual-Villalobos *et al.*, 2004).

Stevani *et al.* (2005) analizaron los efectos de los aceites esenciales de *Tanacetum balsamita* L. (Asteraceae) y su compuesto más importante, carvona, en *T. castaneum* y en *Ulomoides dermestoides* Fairm. (Coleoptera: Tenebrionidae) produciendo toxicidad y repelencia en ambos insectos y una reducción en la supervivencia durante un período de 90 días en *T. castaneum*. El aceite esencial de las hojas de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) afectó la ingesta y la nutrición en adultos de *T. castaneum* (Steffanazzi *et al.*, 2005).

Stefanazzi *et al.* (2011) observaron la toxicidad de los aceites esenciales extraídos de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae), *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poaceae) y *Elyonurus muticus* (Spreng) Kuntz (Poaceae) sobre *T. castaneum* y *S. oryzae*, los extractos actuaron por contacto sobre los adultos, como repelentes en las larvas y los adultos de ambas plagas. El extracto de *C. citratus* actuó como regulador del crecimiento en las larvas de *T. castaneum* mientras que García Darderes *et al.* (2005) determinaron que los metabolitos secundarios de *Senecio madagascariensis*

Poir (Asteraceae) carecen de efecto insecticida sobre esta especie. Leicach *et al.* (2005) evaluaron la efectividad en el control de *T. castaneum* del extracto etéreo y del aceite esencial de las partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* L (Chenopodiaceae). A mayor dosis mayor efectividad para ambos tratamientos; el extracto etéreo resultó más eficaz que el aceite esencial. Se evaluó también el efecto insecticida de los extractos metanólicos de esta especie, sobre los adultos de *O. surinamensis*. Se testearon dos dosis (0,66 mg/ml y 1,32 mg/ml) de dos extractos, obtenido uno de semillas y el otro de los tallos y hojas. En ambos casos, a mayor dosis se produjo mayor mortalidad de adultos y se observó un alto porcentaje de larvas y pupas deformadas (Rodríguez *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005). El polvo de la raíz de *Senecio salignus* DC (Asteraceae) al 1% mezclado con las semillas, causó 100% de muertes de adultos del “gorgojo mejicano” *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) (Rodríguez y López, 1999). Además, las cenizas de *S. salignus* y el polvo de diatomeas fueron efectivos para controlar los daños causados por este coleóptero (Ríos *et al.*, 2000).

Se realizaron experiencias con *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) sobre el “gorgojo del arroz” *Sitophilus oryzae* y el gorgojo castaño de las harinas *Tribolium castaneum*; en los estudios se encontraron efectos de repelencia por contacto como inhibidores alimentarios y modificadores de la eficacia de la conversión del material ingerido. Los metabolitos secundarios de distintas partes del vegetal fueron extraídos con diversos solventes como hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, además, se llevaron a cabo extracciones con agua y se obtuvo el aceite esencial de las hojas. La principal actividad se encontró en los extractos de baja polaridad y en aquellos extractos provenientes exclusivamente de las hojas (Alonso Amelot *et al.*, 2003).

Otros compuestos son efectivos insecticidas para controlar *T. castaneum* como, por ejemplo, los presentes en *Thymus vulgaris paracymeniferum* Herbs (Lamiaceae) (Tapondjou *et al.*, 2005) y *Cestrum parqui* Lam. (Solanaceae) (Rafael *et al.*, 2000). Además, se comprobó que los monoterpenos, como el eucaliptol y el limoneno, actúan sobre *T. castaneum* por ingesta (Prates *et al.*, 1998). Se observó la acción por

ingesta de los extractos metanólicos de dos especies de Lamiaceae (*Mentha rotundifolia* L, *Origanum vulgare* L ssp. *vulgare*) sobre larvas de *T. castaneum*, con un bajo efecto letal (Clemente *et al.*, 2002).

Las especies de la familia Lamiaceae *Ocimum basilicum* L, *Mentha rotundifolia* L, *Origanum vulgare* L ssp. *vulgare*, *Rosmarinus officinalis* L y *Thymus vulgaris* L, fueron seleccionadas para ser testeada su actividad biológica por ingesta sobre larvas de *T. castaneum*. Se obtuvieron extractos por infusión y por maceración con diclorometano. Los extractos obtenidos por maceración produjeron mayor mortalidad que la infusión, en especial, la maceración de la menta (Clemente *et al.*, 2003).

Cinnamomum aromaticum Ness (Papilionaceae) contiene compuestos fenólicos, entre ellos cinamaldehído, se evaluó la toxicidad de estos compuestos fenólicos mediante dos métodos de aplicación, contacto y fumigación. Se probó sobre los adultos y las larvas de *T. castaneum* y sobre los adultos de *S. oryzae*. La respuesta por contacto sobre los adultos de ambas especies no fue significativamente diferente, sin embargo, con la fumigación el efecto fue mayor sobre *T. castaneum* que sobre *S. oryzae*. Asimismo, los adultos de *T. castaneum* fueron más susceptibles que las larvas, frente a ambas metodologías. Además, se analizó la acción antialimentaria y se comprobó que aumentó con las dosis y es más intensa la acción sobre las larvas (Huang y Ho, 1998).

Giordano *et al.* (2000) evaluaron la bioactividad de los metabolitos secundarios de algunas plantas sobre *Tribolium molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) y determinaron relaciones entre las estructuras de las moléculas y la actividad antialimentaria. Los autores informaron que ciertos grupos funcionales y rasgos estructurales de la molécula son fundamentales para generar el efecto inhibitorio de la alimentación en los insectos.

Kanvil *et al.* (2006) probaron el efecto de los extractos orgánicos de *Saussurea lappa* Clarke (Asteraceae), *Peganum harmala* L. (Zigofilaceae) y *Valeriana officinalis* L.

(Valerianaceae) sobre *T. castaneum* en relación a la inhibición de su crecimiento. *P. harmala* fue el más efectivo inhibidor del crecimiento, principalmente como disuasivo de la oviposición u ovidia. Los extractos de acetona y éter de petróleo fueron los mejores disuasivos de la oviposición.

Pungitore *et al.* (2005), estudiaron el efecto letal y subletal de los triterpenos de *Junellia aspera* (Gillies & Hook.) Moldenke (Verbenaceae) sobre *T. castaneum*, se demostró que estos compuestos actúan como tóxicos agudos cuando se aplican por topicación y son incorporados en el alimento.

Viglianco *et al.* (2006) evaluaron las propiedades repelentes y antialimentarias de los extractos crudos de etanol, cloroformo y hexano de las hojas, los tallos y los frutos de *Larrea divaricata* Cav. (Zygophyllaceae) y *Capparis atamisquea* Kuntze (Capparaceae) sobre *S. oryzae*. Se observó mayor efecto antialimentario de los extractos etanólicos de los tallos de *C. atamisquea*, seguido por el etanólico y el clorofórmico de las hojas de la misma especie. Por el otro lado, ambas especies presentaron un moderado efecto de repelencia sobre *S. oryzae*, destacándose el extracto hexánico de las hojas de *C. atamisquea*.

Popich *et al.* (2005) evaluaron la actividad de los extractos metanólicos y clorofórmicos de *Funastrum graciles* Decne. (Asclepiadaceae) para el control del "brucho del poroto", *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae); se registró la mortalidad total de las larvas, las pupas y los adultos de los brúquidos.

En relación al control de *A. obtectus* en semilla, donde se han usado compuestos orgánicos, se sabe que *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) inhibe el daño en un 90%, *Hypericum perforatum* L. (Guttiferae) redujo el daño en 80% y *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) lo hace en 96% (Ecobici *et al.*, 2004). La separación de las fracciones de la oleorresina de la semilla de *Pachyrhizus erosus* (L) Urb. (Fabaceae) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), comprobó la existencia de rotenona (0,68%). El índice de mortalidad del gorgojo del poroto fue entre 75 y 100% con 4×10^{-2} , 5×10^{-2} y 6×10^{-2} g x ml⁻² de oleorresina; con ésta última se logró disminuir la

población de gorgojo entre 24 y 48 h de exposición al bioinsecticida. La oleorresina de semilla de *P. erosus* redujo la resistencia y limitó la sobrepoblación de gorgojo en la semilla del poroto almacenado (Fernández Andrés *et al.*, 2009).

Es conocido el efecto de los reguladores de crecimiento como el S-methoprene registrada su acción en el año 2002, con un efecto del 100% sobre la F1 de adultos de *Rhyzopertha dominica* (Edde, 2012). En otra experiencia se ha observado el efecto de pulverizar sobre harina de trigo y diferentes superficies de embalaje (cartón, plástico de bolsa de harina, de papel, muselina, etc), con 1% de principio activo de piretrina (sinergizado con butóxido de piperonilo) más 33,6% de methoprene por un lado y, por otro, 3% de piretrinas más 33,6% methoprene sobre *T.castaneum* y *T. confusum* Jacqueline duVal. El primero mostró mayor susceptibilidad a ambas dosis [1% y 3% de piretrinas (Sutton *et al.*, 2011)].

5- Familia Simaroubaceae

5.1- Generalidades

La familia Simaroubaceae fue estudiada según distintas perspectivas. Entre los aspectos observados se han comprobado sus propiedades medicinales y antifúngicas. Sus especies se caracterizan por la presencia de principios activos de sabor amargo en su leño decortezado conocidos como cuasinoides. Estos compuestos son de naturaleza terpenoide y, entre ellos, el principal responsable del sabor amargo es la cuasina (C₂₂ H₂₈ O₆), que es la sustancia más amarga encontrada en la naturaleza (50 veces más que la quinina) (Theis, 2003).

Los extractos de algunas especies de Simaroubaceae como *Quassia amara* L. o *Picrasma excelsa* (Sw.) Planch. son utilizados como aditivos para bebidas amargas.

En la década de 1970, el Instituto Nacional del Cáncer descubrió que algunos cuasinoides poseían actividad antileucémica y, años más tarde, también se comprobó que desempeñan actividad antitumoral (Guo *et al.*, 2005). Se observó, además, actividad sedante y antidematogénica del extracto no polar (compuestos

particionados por el solvente hexano) de la corteza de *Q. amara*. Estos resultados indican que las especies de la familia Simaroubaceae son una fuente potencial de drogas para el tratamiento del dolor (Toma *et al.*, 2003). Numerosos compuestos han sido patentados y han cumplido con los ensayos farmacodinámicos y clínicos, lo que renovó el interés en estas antiguas drogas (Rosella *et al.*, 1991).

Varias especies de la familia Simaroubaceae han demostrado tener actividad insecticida como los aceites esenciales de *Ailanthus altissima* sobre *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) que actúa como repelente y, además, tiene una alta actividad fumigante sobre esta plaga (Lu y Shi, 2012). La especie más estudiada por sus propiedades insecticidas es *Quassia amara*, nativa de las Guayanas Francesas y, según la literatura, fue citada por primera vez en el año 1835 (Beserra Almeida, 2007). Los compuestos aislados del leño de *Q. amara* fueron: cuasina, cuasinol, cuasimarina, cuasinasina, 18-hidroxicuasina, neocuasina, dihidronorneocuasina, y simalikalactonas A, B, C y D (Alonso, 2004).

Por otro lado, se observó el efecto de la cuasina sobre el pulgón del lúpulo [*Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae)] (Rosella *et al.*, 1991), el efecto fagodisuasivo sobre el gusano masticador [*Spodoptera eridania* Stoll. (Lepidoptera: Noctuidae)] (Guo *et al.*, 2005) y sobre el escarabajo mexicano del frijol [(*Epilachna varivestis* Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae)] (Leskinen *et al.*, 1984). Por otra parte, Guo *et al.* (2005) comprobaron que a una concentración de 0,05% la quassina no es fitotóxica.

5.2- *Picrasma crenata*

Orden: Sapindales

Familia: Simaroubaceae

Género: *Picrasma*

Especie: *Picrasma crenata* (Vell.) Engl.

El género *Picrasma* está representado por árboles o arbustos que alcanzan una altura máxima de 20 metros y se caracterizan por poseer tanto la corteza como la madera muy amargas. Las hojas son muy grandes, imparipinadas. Las flores son unisexuadas o polígamas, de color verde amarillento, pequeñas, agrupadas en cimas axilares largas, sueltas y pedunculadas. El cáliz presenta 4-5 sépalos lobulados, muy pequeños, los pétalos en número de 4-5 a 6 son valvados, los estambres entre 4 y 5, los carpelos entre 3 y 7, estilos unidos sólo en el medio, estigmas libres, el fruto es una drupa.

En la Argentina, algunas Simaroubaceae nativas son utilizadas para el control biológico, por ejemplo, *Picrasma crenata*, especie citada para el noreste del país, en la provincia de Misiones (Vitagliano y Comin, 1971) (Figura 1.3 y 1.4). Esta especie se encuentra estrechamente emparentada con otras especies de esta familia como *P. excelsa* (Sw) Planch., *Picrasma quassioides* Benn, *Picramnia pentandra* Sw, *Simarouba glauca* DC y *Simarouba tulae* Urban (Woodbury et al., 1974).



Figura 1.3 *Planta adulta de Picrasma crenata*

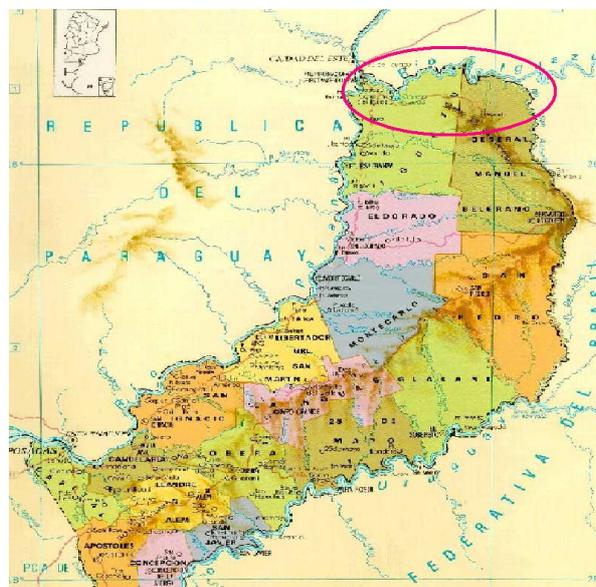


Figura 1.4- Distribución geográfica de *Picrasma crenata* en la República Argentina

El leño de *P. crenata* se utiliza en medicina tradicional para tratar trastornos gastrointestinales, como agente vermífugo y también como insecticida. Del tallo secundario del árbol se han aislado varios cuasinoídeos: cuasina, neocuasina, isoparina, paraina, 12-norcuasina y picrasmina (Vitagliano y Comin, 1971) y dos alcaloides: crenatina y crenatidina (Sánchez y Comin, 1971; Yoshikawa *et al.*, 1995), algunos de los cuales mostraron cierta actividad antifúngica (Ishii *et al.*, 1991). La cuasina, neocuasina y picrasmina se utilizan como insecticidas naturales. Estos compuestos tienen acción insecticida sobre varias especies de Hemiptera, Lepidoptera y Coleoptera (Stoll, 1989, Mambelli *et al.*, 1994).

Rodríguez *et al.* (2006), realizaron experiencias con extractos de *P. crenata*, obtenidos mediante extracción del leño con acetato de etilo y por infusión sobre hormigas podadoras [*Acromyrmex lundii lundii* Guérin Méneville (Hymenoptera: Formicidae)], si bien hubo diferencias significativas con el testigo la mortalidad fue baja, de 40% y 20%, respectivamente, con una CL₅₀ (concentración letal 50) de 4,37 mg/cm².

Estudios realizados con extractos no polares (éter de petróleo y diclorometano) de *P. crenata* sobre *Caliothrips phaseoli* Hood (Thysanoptera: Thripidae), podujeron una mortalidad de 40% para el primero, pero no se registró mortalidad para el segundo (Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, se testearon los extractos de éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo de *P. crenata* sobre *M. persicae* con promisorios resultados, obteniéndose una mortalidad del 75%, 90% y 100%, respectivamente al cabo de 48 horas (Rodríguez *et al.*, 2011).

6- Grupo químico: cuasinoides

6.1- Generalidades

La cuasina pertenece a un grupo de compuestos conocidos, actualmente, como cuasinoides que son triterpenos biodegradados con un alto nivel de oxigenación y cuyos compuestos han sido aislados e identificados de un cierto número de plantas de la familia Simaroubaceae. Muchas especies de esta familia han sido utilizadas en medicina tradicional contra diversas enfermedades como disentería, fiebres y amebiasis. Los cuasinoides han demostrado poseer propiedades como antineoplásicos, antivirales y antialimentarios (Dion *et al.*, 2005, Beserra Almeida *et al.*, 2007).

La cuasina fue la primera de este grupo en ser estudiada a comienzos del siglo XIX, cuando fue aislada una sustancia amarga del leño de *Q. amara*. En el año 1937, Clark ideó un método práctico para su purificación y determinó, además, que el material crudo estaba constituido por dos compuestos que llamó cuasina y neocuasina. La naturaleza química y estructural de éstas fueron estudiadas con mayor detalle por Robertson *et al.*, 1950, citado en Grieco *et al.*, 1980) quienes llegaron a la conclusión que derivaban de dos compuestos, una lactona y el correspondiente hemiacetal. Valenta *et al.* (1960) determinaron la estructura de la cuasina por técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) combinadas con las de Robertson, posteriormente en 1962, el mismo grupo de

investigadores informó su estereoquímica. La síntesis química de la cuasina fue difícil de obtener como lo demuestra el escaso número de síntesis de éxito (menos de 20) que fueron registrados desde el descubrimiento de su estructura primaria (Valenta *et al.*, 1960).

La primera síntesis total de la cuasina fue obtenida por Grieco (1980), quien empleó una estrategia Diels-Alder para ensamblar un esqueleto tricíclico funcional, creado para la cuasina. Este investigador sintetizó, además, los hemiacetales chaparrinona, glaucarubolona y glaucacarbinona. En 1960, Valenta publicó su síntesis total, ésta reflejaba un sistema rígido complejo que, luego, sería la base para dilucidar la funcionalidad del esqueleto de la cuasina. Novello *et al.* (2003) realizaron estudios espectroscópicos y pruebas químicas y determinaron un nuevo estereoisómero dihidronorneocuasina junto con otros conocidos dihidronorneocuasina, paraina, α -neocuasina, β -neocuasina y cuasina.

El leño de *Q. amara* contiene neocuasina, 18-hidroxicuasina y escopoletina y, además, alcaloides del tipo de la catin-6-ona. (Polonsky *et al.*, 1985 en Spohna *et al.*, 1987).

Las cuasinas han sido valoradas tradicionalmente por medios sensoriales, pero Wagner (1980) ha descrito tres métodos igualmente eficaces para la determinación cuantitativa de los cuasinoides individualizados. Se basan en la separación por cromatografía en capa delgada, cromatografía líquida en alta resolución y cromatografía circular, seguido de medidas de absorción.

Se llevaron a cabo estudios sobre la relación de la edad de las plantas y su mayor o menor exposición a la luz solar y la concentración de cuasinoides. Los resultados demostraron que éstos aumentaban con la edad de las plantas. Aquellas desarrolladas a la sombra presentaban mayor concentración de cuasinas, mientras que las neocuasinas eran levemente superior en muestras procedentes de áreas expuestas al sol (Díaz *et al.*, 2006).

Villalobos *et al.* (1999) observaron que la concentración de cuasina no difería en distintas poblaciones de *Q. amara* de cinco regiones diferentes de Costa Rica, sin embargo, el contenido de neocuasina varió entre 0,09% y 0,17% y fue más elevado en los individuos desarrollados en los bosques con un alto contenido de humedad. La hipótesis que proponen es que los cuasinoides se acumulan en el xilema del árbol en pleno crecimiento y que bajo condiciones menos favorables, como las que se encuentran en los bosques húmedos y muy húmedos donde la luz disponible es limitada, aumentan los compuestos químicos. El estudio de la distribución de la especie en Costa Rica muestra las poblaciones más densas en las zonas con menos de 450 m sobre el nivel del mar, con suministro permanente de agua, buen drenaje y altos niveles de luz. En las zonas con menos de 2.500 mm de precipitación anual, el árbol se encuentra sólo en los bosques de ribera. En los bosques húmedos y muy húmedos (con un máximo de 5.500 mm de precipitación) es más frecuente su presencia en áreas con niveles de luz más altos. Este estudio permite deducir las condiciones más favorables para la utilización sostenible de las especies en una población natural en Costa Rica.

6.2- Estructura química de los cuasinoides

Estructuralmente, los cuasinoides se pueden clasificar en diferentes grupos en función de su esqueleto básico: C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₂ y C₂₅, la gran mayoría se presenta con esqueleto básico del tipo C₂₀, que incluye cuasinas. Estas sustancias derivan de la serie de triterpenos eufol/tirucalol, en su mayoría altamente oxigenados que contienen lactonas en su esqueleto básico, y rara vez se presenta con más de un doble enlace. Se caracteriza por poseer diferentes grupos funcionales oxigenados en sus esqueletos, excepto para los C-5, C-9 y de los grupos metilo en las posiciones C-4 y C-10 (Guo *et al.*, 2005; Beserra Almeida *et al.*, 2007) (Figuras 1.5 y 1.6).

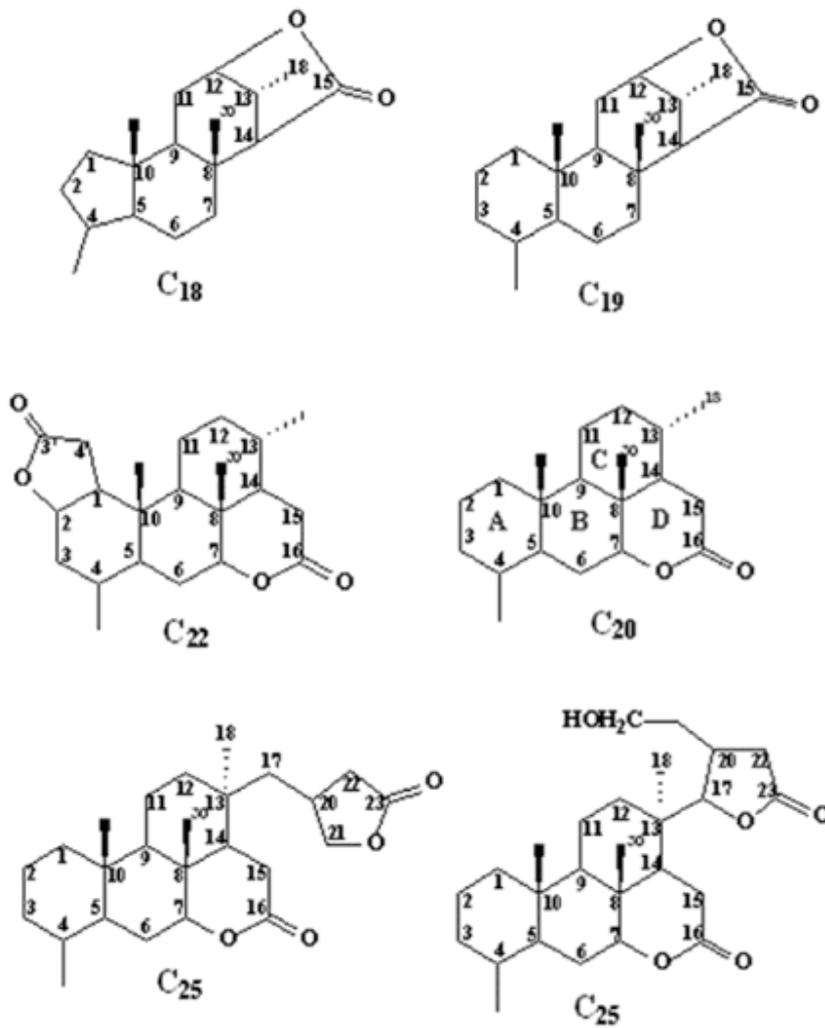


Figura 1.5- Esqueleto básico de cuasinoides

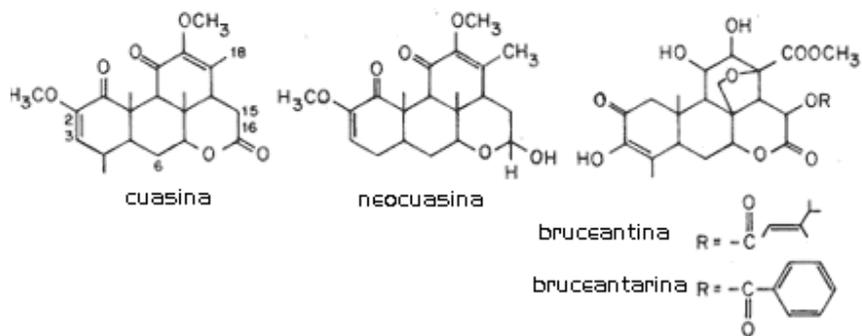


Figura 1.6- Estructura de los cuasinoides

Se determinaron los porcentajes de cuasinoides en nueve géneros de Simaroubaceae: *Brucea* con el 20,8%, seguida de *Ailanthus* (18,8%), *Eurycoma* (13,5%), *Quassia* (12,5%), *Castilla* y *Picrasma* (10,4%), *Simaba* (7,3%), *Simarouba* (4,2%) y *Picrolemma* (2,1%) (Beserra Almeida, 2007) (Figura 1.7).

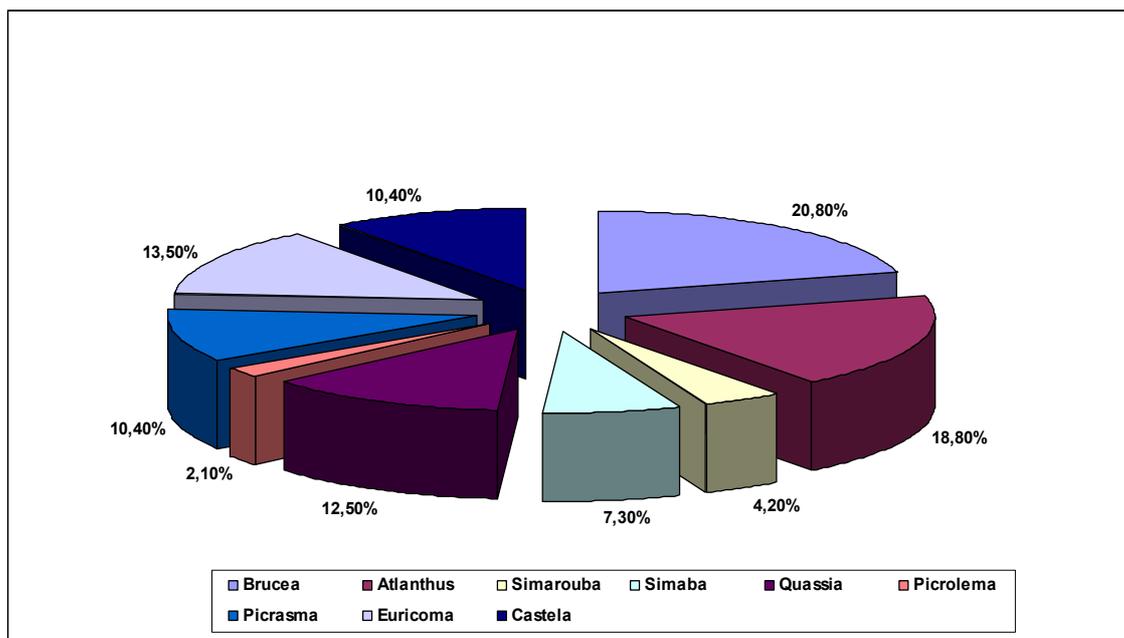


Figura 1.7- Porcentaje de cuasinoides en géneros de la familia Simaroubaceae

6.3- Importancia de los cuasinoides en el control de plagas

Los cuasinoides presentan un amplio rango de actividad biológica, que ha suscitado un gran interés en la comunidad científica. Algunas Simaroubaceae se han utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional, para diversos fines, corroborado por estudios científicos han demostrado que la mayoría de estas actividades se debe a la presencia de estas sustancias (Beserra Almeida, 2007). Algunos cuasinoides poseen acción insecticida y otros antialimentarias. Desde fines del siglo XVII, las cuasinas comenzaron a ser utilizadas como insecticidas, para lo cual se utilizaron extractos de tallos y cortezas de diferentes especies de *Quassia*.

Samadera. bidwillii (Hook .f.) Oliv. es una especie del noreste de Nueva Gales del Sur, Australia. Las partes aéreas fueron estudiadas por su contenido fitoquímico y por su actividad insecticida. Se observó el efecto letal de los extractos metanólicos sobre la arañuela roja [*Tetranychus urticae* Koch (Acarina: Tetranychidae)], el pulgón verde del duraznero [*Myzus persicae* (Sulz) (Hemiptera: Aphididae)] y el nematodo *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood (Nemata: Heteroderidae). Por cromatografía en gel de filtración y por HPLC en fase reversa se purificó el compuesto activo, que fue identificado como chapparinona. Los valores obtenidos de LC50 fueron de 47,0 y 14,9 ppm para la arañuela roja y el pulgón verde del duraznero, respectivamente (Latif *et al.*, 2000).

Se observó su acción antialimentaria contra el “gusano del algodón” [*Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae)], la “oruga militar” [*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)] y el “escarabajo mexicano del frijol” [*Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Cooccinellidae)]. Es conocida la actividad de disuasión de la alimentación sobre la oruga del tabaco *Spodoptera litura* por cuatro cuasinoides: indacuassina C y samaderina A, B y C aislados de *Samadera indica* Gaertn (Simaroubaceae). Estos compuestos fueron más activos a una concentración de 0,5 g/cm², en comparación con la conocida acción antialimentaria de azadiractina A (Govindachari *et al.*, 2001; Beserra Almeida *et al.*, 2007).

La glaucarubolona glucosilada, aislada de *Castela emoryi* (Gray) Moran et Felger mostró actividad de disuasión de la alimentación de las termitas subterráneas [*Reticulitermes flavipes* (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae)]. Se ha estudiado la actividad antialimentaria e insecticida de 16 cuasinósidos de *Picrasma ailanthoides* Planch sobre larvas de tercer estadio de desarrollo de *Plutella xylostela* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), una plaga primaria en plantas de la familia Brassicaceae. De todos los cuasinósidos aislados, se destacaron tres compuestos: cuasina, picrasina B y D por su elevado potencial antialimentario e insecticida y la picrasina G, que mostró moderada actividad antialimentaria en altas concentraciones. Daido *et al.* (1995) realizaron estudios de la estructura de los cuasinósidos para determinar su actividad insecticida y antialimentaria; demostró que se requiere un grupo carbonilo

en el anillo A; un carbonilo α , β insaturado o un metilen dióxido en el anillo C y una δ lactona en el anillo D.

7- Equiparación de la acción de los extractos de *Picrasma crenata* con los reguladores de crecimiento e inhibidores del desarrollo de los insectos

Los reguladores de crecimiento de insectos (IGRs) son una nueva clase de insecticida, actúan interrumpiendo la muda, el ciclo de madurez que resulta en el adulto o en otros procesos vitales de los insectos. Los inhibidores del desarrollo de los insectos (IDIs) interfieren con la formación de una nueva cutícula, ocasionando rompimiento o mal formaciones durante la muda. Los (IGRs) son hormonas que interfieren con los procesos naturales enzimático y hormonal de la muda de los insectos y que influyen en su crecimiento y desarrollo causándoles deformidades y la muerte (Marinoff *et al.*, 2001).

Novalurón es un inhibidor del desarrollo de los insectos, perteneciente al grupo de las benzoilfenilureas que actúa principalmente por ingestión. Presenta un novedoso modo de acción debido a que inhibe la síntesis de quitina, componente básico del exoesqueleto de los insectos, en las larvas de diversos órdenes que incluye a Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera y Diptera. De esta forma provoca una deposición anormal de la endocutícula y la consecuente muerte del insecto al momento de producirse la muda (Kostyukovsky y Trostanetsky, 2006).

Asimismo, *Lufenuron* es un insecticida regulador del crecimiento de los insectos, que interfiere con la síntesis de la quitina. Este modo de acción, es específico para los artrópodos. Inhibe el crecimiento de las larvas, especialmente de los órdenes Lepidoptera y de Coleoptera. Debido a que sólo los estados inmaduros (larvas, ninfas) forman quitina, no afecta a los adultos. En algunos insectos actúa, además, como ovicida. Muestra un excelente grado de selectividad hacia los insectos benéficos, ya que no afecta a los adultos. Los insectos resistentes a productos

organofosforados y piretroides son bien controlados por *Lufenuron* (Kostyukovsky y Trostanetsky, 2006).

8- Plagas de granos almacenados

8.1- Generalidades

De los numerosos órdenes de insectos, solamente tres, Coleoptera (gorgojos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Psocoptera (piojos de los libros), contienen especies consideradas plagas de granos almacenados. Los órdenes Hemiptera (chinchas) e Hymenoptera (avispidas) actúan como predadores y parasitoides de las plagas pertenecientes a los grupos mencionados. Miembros de otros órdenes como Thysanura (pececitos de plata), Blattaria (cucarachas), Diptera (moscas) e Isoptera (termitas) pueden encontrarse accidentalmente contaminando los granos (Riudavets *et al.*, 2002; Rees, 2004; Dal Bello y Padín, 2006; Nerio *et al.*, 2009).

8.2- Biología de las especies plagas de granos almacenados sobre las que se desarrollaron las experiencias

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

Especie: *Sitophilus oryzae* (Linnaeus 1763)

Nombre común: “Gorgojo del arroz”

Los integrantes de la familia Curculionidae viven en diferentes hábitat como barrenadores o minadores de las plantas (tallos, raíces, semillas, granos que han sido cosechados, madera, entre otros). Se han encontrado unas 30 especies sobre granos y productos almacenados y de éstas, las especies del género *Sitophilus* constituyen plagas severas por su gran capacidad destructiva, tanto en el estado adulto como en el estado larval así como por su amplia distribución mundial (Figura 1.8).

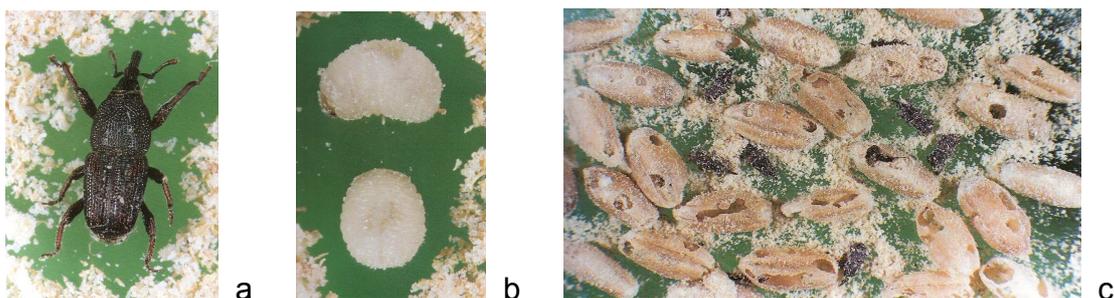


Figura 1.8- *Sitophilus oryzae*

a: adulto, b: larva y pupa, c: daño en granos de trigo (Fotos: Saini, E.)

Morfológicamente se las identifica por su cabeza provista de un rostro largo, ojos oblongos y antenas geniculadas. *Sitophilus oryzae* se caracteriza por presentar el protórax densamente cubierto de depresiones circulares y los élitros con cuatro manchas de color amarillento. Los adultos miden de 2,4 a 4,0 mm de longitud y el color varía de café a negro. Son buenos voladores y pueden infestar el grano en el campo. El rostro del macho es más corto y rugoso, mientras que, el de la hembra es ligeramente más largo, delgado y con menos rugosidades (Saini y Rodríguez, 2004).

Las hembras horadan los granos con el rostro y depositan en cada diminuta perforación un huevo, que posteriormente es cubierto por una secreción, por lo que su presencia pasa inadvertida. Cumple su ciclo de vida (larva y pupa) dentro del grano, emergiendo el adulto al final del estadio pupal, al cabo de 4 a 6 semanas dependiendo de la temperatura. La hembra coloca entre 300 a 400 huevos. Los adultos de *S. oryzae* viven de 4 a 5 meses.

La temperatura óptima de desarrollo es de 26 a 30 °C y la humedad relativa (HR) de 70%. En estas condiciones, su ciclo biológico puede durar de 26 a 30 días.

El efecto de la humedad relativa sobre los diferentes estadios durante la incubación es variable (Eastman y Segrove, 1947, citado por Stadler, 1988; Evans, 1982). La humedad del alimento y del ambiente afectan sensiblemente el desarrollo de las larvas y, en menor escala, al de los embriones y las pupas. La temperatura y el tipo de alimento influyen sobre el valor de la tasa intrínseca de aumento natural-semenal de una población (r) (Tabla 2.1) (Stadler, 1988).

| Temperatura (°C) | <i>r</i> | Alimento | Autor |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| 15 °C | 0,0718 | trigo | Evans, 1982 |
| 18 °C | 0,2685 | trigo | Evans, 1982 |
| 21 °C | 0,4498 | trigo | Evans, 1982 |
| 20 °C | 0,1759 | arroz pulido | Ryoo, 1986 |
| 25 °C | 0,3242 | arroz pulido | Ryoo, 1986 |
| 30 °C | 0,4789 | arroz pulido | Ryoo, 1986 |
| 30 °C | 0,7620 | trigo | Birch, 1948 |
| 30 °C | 0,5750 | trigo | Singh y col., 1973 |

Tabla 2.1- Valor de la tasa intrínseca de aumento natural-semanal de una población (*r*)
(Singh *et al.*, 1973)

Ataca primordialmente granos de cereales. Se la considera una plaga de infestación primaria porque el adulto es capaz de dañar los granos sanos y las larvas se alimentan en su interior. Al emerger, los adultos dejan típicos orificios en los granos. Los adultos y las larvas se alimentan de granos de trigo, maíz, arroz, sorgo, cebada, avena y centeno. Además, se los ha encontrado en granos de leguminosas como en garbanzos, maní y productos industriales de consistencia dura como galletas y fideos.

Este gorgojo se encuentra distribuido en todo el mundo. *S. oryzae* predomina en las regiones subtropicales y tropicales (Dell'orto Trivelli *et al.*, 1985; Saini y Rodríguez, 2004).

Orden: Coleoptera

Familia: Cucujidae

Especie: *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus 1758)

Nombre común: "Carcoma dentada"

El adulto presenta el cuerpo alargado, plano, de color castaño oscuro y de unos 2,5 a 3,5 mm de longitud. La cabeza es más ancha en la base y está bien diferenciada del protórax; los ojos son pequeños y presentan antenas con 11 segmentos, terminadas en una masa. El protórax tiene seis dientes claramente visibles en sus bordes laterales y tres protuberancias en forma de lomo en la parte central. Los élitros cubren todo el abdomen, del cual son visibles ventralmente 5 segmentos. El macho se diferencia de la hembra porque tiene un diente en el fémur de las patas posteriores (Figura 1.9).

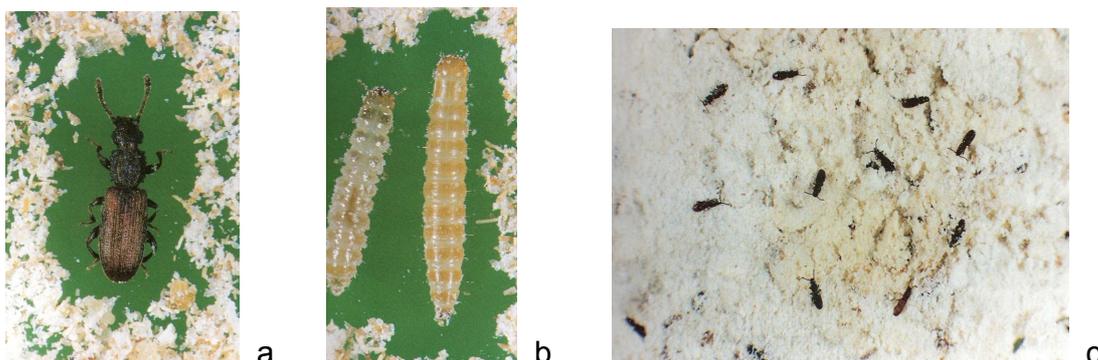


Figura 1.9- *Oryzaephilus surinamensis*
a: adulto, b: larvas, c: daño en harina (Fotos: Saini, E.)

Tanto la larva como el adulto son capaces de dañar los productos almacenados con muy bajo contenido de humedad, especialmente aquellos que han permanecido mucho tiempo almacenados, incluyendo los que se encuentran en las despensas de las casas. Se alimenta de los granos de cereales y sus productos como trigo, maíz, arroz, cebada, sorgo, además de frutas secas, dátiles, higos, uvas, ciruelas, pasas, cacao, nueces, alimento para ganado y especias (Saini y Rodríguez, 2004).

La hembra coloca aproximadamente 300 huevos en un período de 10 semanas. Las larvas neonatas son delgadas, de color cremoso, con dos manchas ligeramente más oscuras en cada uno de los segmentos. La larva madura construye un capullo en el cual pasa a la fase de pupa. El adulto no vuela y puede vivir hasta 3 años. Pueden desarrollarse a una temperatura de 16,5 a 37,5 °C y una H.R. de 10 a 90%. Su ciclo biológico es de 20 a 25 días, a una temperatura de 30 a 35 °C y H.R. de 70 a 90%.

Es una plaga de distribución mundial. Se lo encuentra en regiones tropicales y subtropicales; tolera las bajas temperaturas de los climas templados (Dell'orto Trivelli, 1985; Saini y Rodríguez, 2004).

Orden: Coleoptera

Familia: Tenebrionidae

Especie: *Tribolium castaneum* (Herbst 1797)

Nombre común: "Tribolio castaneo"

Se encuentran en los hábitats más diversos, incluyendo los desiertos. Algunas de las especies de *Tribolium* son plagas agrícolas que atacan plantas y semilleros en el campo. Un número relativamente pequeño son plagas de granos y otros productos almacenados, los cuales son considerados plagas secundarias de los granos y primarias de los productos de su molienda.

Los adultos de *T. castaneum* son insectos delgados de 3 a 4 mm de largo, de un tono rojizo hasta marrón negruzco con una amplia capacidad de vuelo (Figura 1.10).

Los tres últimos segmentos de las antenas del tribolio castaneo terminan en una clava abrupta. Los élitros presentan surcos longitudinales bien marcados y con numerosas puntuaciones. La distancia entre los ojos es otra característica diferencial en *T. castaneum*, esta distancia es igual al diámetro de los ojos (Serantes y de Haro, 1980).

Los adultos y las larvas se alimentan de las más variadas sustancias vegetales secas, derivados de cereales, maní, cacao, leguminosas, especias, galletitas, concentrado alimenticio para animales, como también residuos de la extracción de aceite. Además, se alimenta de cereales quebrados o que han sido dañados por otros insectos, producto de la molienda de los cereales como harina y salvado (afrecho). La harina muy infestada tiene olor fuerte y se torna marrón, disminuyendo la capacidad de hornear.

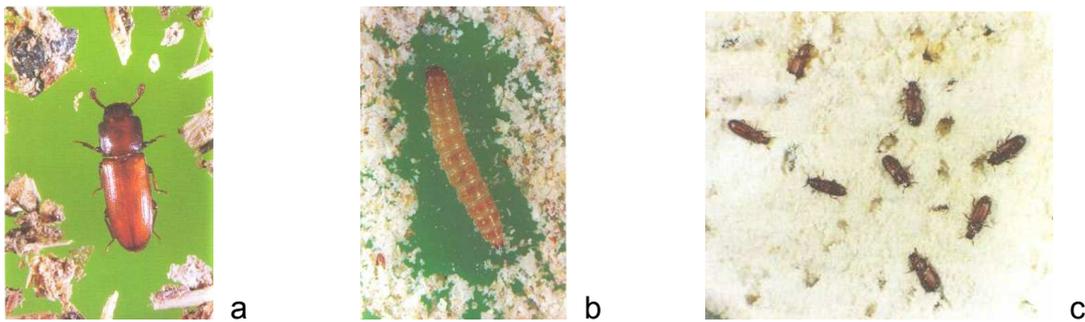


Figura 1.10- *Tribolium castaneum*

a: adulto, b: larva, c: daño en harina (Fotos: Saini, E.)

Las hembras colocan en promedio entre 350 y 400 huevos durante más de un año, entre la harina y los residuos de los granos. Los huevos están cubiertos por una secreción pegajosa, que permiten que se adhieran a la superficie, facilitando la infestación. Las larvas son delgadas, cilíndricas de color blanco llegando a medir 5 mm. El ciclo biológico de *T. castaneum* se extiende aproximadamente 20 días entre 35 y 37 °C y 70% de H.R. Se lo encuentra en las regiones tropicales y subtropicales (Dell'orto Trivelli, 1985; Saini y Rodríguez, 2004).

Orden: Coleoptera

Familia: Tenebrionidae

Especie: *Ulomoides dermestoides* (Casey 1891)

Nombre común: “Tenebrio brillante” o “gorgojo del maní”

Por la escasa importancia económica de esta especie, la ubicaban inicialmente como plaga secundaria sobre granos de maíz y avena en Malasia, pero el insecto ha logrado tal dispersión e incremento que actualmente lo califican como plaga primaria en la mayoría de los granos almacenados (Chua y Chandrapal, 1978). Fue introducido desde China a América con el fin de utilizarlo en campañas para el tratamiento de pacientes con problemas asmáticos y tumorales.

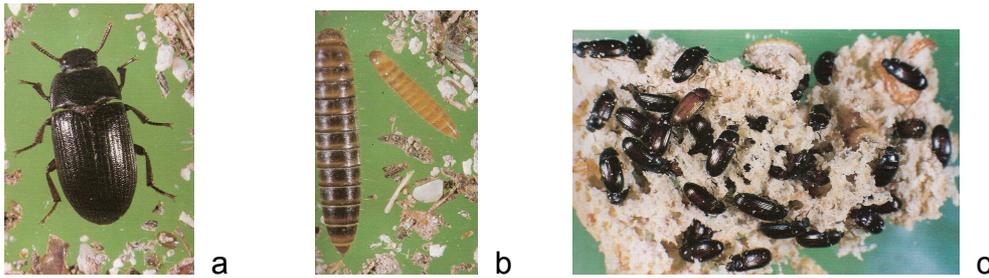


Figura 1.11- *Ulomoides. dermestoides*

a: adulto, b: larva (Fotos Saini, E. a y b), c: cría sobre pan integral (Foto:Fontana,H.)

Esta especie puede alimentarse de productos almacenados como nueces, maíz, avena, arroz, sorgo, entre otros. Marinoni y Ribeiro-Costa (2001) desarrollaron una experiencia con tres dietas diferentes (sólo granos, semillas y cáscaras de frutas y frutos completos) y temperaturas de 18, 21, 24 y 27 °C; la mayor viabilidad y el menor período de desarrollo de los individuos fueron observados con semillas y cáscaras de frutas y a las temperaturas de 21 y 24 °C.

Los adultos son de tamaño variable, pero los que se encuentran atacando granos almacenados miden de 3 a 10 mm de longitud con todo su cuerpo compacto. La forma del cuerpo es oblonga, aplanada, la cabeza es tipo prognata, con ojos compuestos prominentes; poseen fuertes mandíbulas. Las antenas poseen once artejos bien diferenciados. Los élitros presentan surcos o estrías longitudinales y las patas son caminadoras. El abdomen presenta segmentos bien diferenciados en número de 10. La coloración inicial es castaño claro y luego se torna más oscuro. Son activos, móviles, de gran capacidad de dispersión. Su longevidad es de 160 a 600 días (Figura 1.11).

Las hembras oviponen sobre los residuos, subproducto del proceso alimenticio. Las posturas se las encuentra en grupos reducidos entre 3 a 9 huevos, pero cada uno de ellos es fácilmente observable (0,82 mm). Su coloración inicial es clara y luego de apariencia translúcida. El promedio de incubación es de 16 días (Serantes y de Haro, 1980).

Las larvas presentan una coloración blanco-cremosa y uniforme, aunque transcurrido el tiempo alcanzan un color castaño claro. El período larval se prolonga por, aproximadamente, 55 días y el pupal entre 4 y 5 días. Las larvas se alimentan del contenido de los granos, durante este período manifiestan un hábito criptobiótico, al consumir la totalidad del interior de los granos, las larvas salen y rápidamente buscan otros granos sanos (Dell'orto Trivelli, 1985; Saini y Rodríguez, 2004).

9- Objetivos

9.1- Objetivo General

- Evaluar el efecto insecticida de los extractos de *Picrasma crenata* sobre las larvas, las pupas y los adultos de *S. oryzae*, *T. castaneum*, *O. surinamensis* y *U. dermestoides*.

Hipótesis: Los metabolitos secundarios extraídos del leño de *Picrasma crenata* presentan actividad insecticida sobre *S. oryzae*, *T. castaneum*, *O. surinamensis* y *U. dermestoides* por contacto tarsal, ingesta y topicación.

9.2- Objetivos Específicos

- 9.2.1-** Evaluar el efecto insecticida por contacto, sobre adultos de plagas de granos almacenados, de las distintas concentraciones de los extractos de *P. crenata* obtenidos con solventes de diferente polaridad (éter de petróleo, acetato de etilo, acetona, etanol, entre otros) y con los obtenidos por infusión y cocimiento.

Hipótesis: el efecto insecticida de los extractos obtenidos de *Picrasma crenata* varía de acuerdo con la polaridad de los solventes utilizados

9.2.2- Determinar el porcentaje de mortalidad de las distintas concentraciones correspondientes a los diferentes extractos, la infusión y el cocimiento y las concentraciones letales (CL50) y el tiempo letal medio (TL50)

Hipótesis: a mayor concentración del bioinsecticida mayor porcentaje de mortalidad.

9.2.3- Estimar si existen diferencias significativas entre el tratamiento con cada uno de los extractos, la infusión, el cocimiento y el tratamiento químico convencional, para establecer equivalencias terapéuticas en relación a la mortalidad.

Hipótesis: el porcentaje de mortalidad producido por los extractos obtenidos de *P. crenata* sobre las plagas de granos almacenados es bioequivalente al del tratamiento con el insecticida convencional.

9.2.4- Analizar el efecto de los extractos, suministrados por ingesta, sobre los adultos de *T. castaneum* y la duración de sus estados larval y pupal.

Hipótesis: los extractos suministrados por ingesta producen mortalidad sobre los adultos de *T. castaneum*. La duración de los estados larval y pupal varía cuando se incorpora a la dieta el insecticida biológico.

9.2.5- Analizar el efecto del bioinsecticida como regulador de crecimiento sobre *T. castaneum*.

Hipótesis: la acción de los extractos de *P. crenata* sobre las plagas de granos almacenados es similar a la acción de los reguladores de crecimiento.

9.2.6- Observar el efecto de la aplicación de los extractos, la infusión y el cocimiento por topicación, sobre los adultos de *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis*.

Hipótesis: los extractos de *P. crenata* y las soluciones obtenidas por infusión y cocimiento tienen efecto insecticida sobre los adultos de *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis*.

9.2.7- Observar el efecto por contacto de los cuasinósidos en su conjunto y de las cuasinas y neocuasinas aisladas de *P. crenata* sobre los adultos de *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* y *Ulomoides dermestoides*.

Hipótesis: La acción de la cuasina y la neocuasina aisladas es mayor que los cuasinoides en su conjunto.

9.2.8- Observar el efecto por ingesta de los cuasinósidos de *P. crenata* sobre los adultos y las larvas de *T. castaneum*.

Hipótesis: las cuasinas y neocuasinas tienen acción insecticida sobre los adultos y las larvas de *T. castaneum*.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1- *Materiales y su obtención*

1.1- *Material Vegetal*

Nombre científico: *Picrasma crenata* (Vell.) Engl. -Simaroubaceae-

Sinonimia: *Aeschrion crenata* Vell. o *Picrasma palo-amargo* Spreng. (Zuloaga y Morrone, 1999).



El leño de *P. crenata* fue provisto por la empresa “Platario S. A.”, proveniente de plantaciones comerciales en Apóstol (provincia de Misiones). El material fue determinado por la Dra. Beatriz G. Varela, y una muestra se encuentra depositada en el Museo de Farmacobotánica “Juan A. Domínguez” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Colección BAF de drogas vegetales)

1.2- *Extractos*

Los extractos con los que se trabajó fueron provistos por la cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los disolventes que se utilizaron fueron de calidad analítica. Se realizaron extracciones con solventes de polaridad creciente (serie eluotrópica) (Koike *et al.*, 1995).

1.2.1- *Procedimiento para la obtención de los extractos orgánicos*

Se colocaron 200 g de leño de palo amargo trozado en un recipiente adecuado, se le agregó 2 L de éter de petróleo y se dejó macerar durante 48 h. Al cabo de este lapso de tiempo, se filtró y se llevó a sequedad con un evaporador rotatorio a baja presión. A los últimos 20 ml de la solución sometida a evaporación se le agregó 2 g de manitol como adsorbente. El material de palo amargo utilizado para esta primera extracción se lo puso en contacto con el solvente diclorometano en una escala de polaridad creciente. Se repitió el procedimiento para éste y los siguientes solventes: acetato de etilo, acetona, etanol y metanol.



Figura 2.1- Leño de *Picrasma crenata*



Figura 2.2- Leño de *Picrasma crenata* en contacto con éter de petróleo



a



b

Figura 2.3- a: evaporador rotatorio conectado a una trampa de vacío por agua y baño termostatizado, b: extractos de *Picrasma crenata* obtenidos con solventes polares y no polares

Cocimiento o decocción: se colocaron 100 g de leño de palo amargo finamente molido en un recipiente adecuado, se le agregó 1L de agua destilada, se calentó la mezcla hasta que el agua hirvió, se mantuvo en esta condición durante 20 min a ebullición lenta. Se dejó enfriar hasta los 40 °C, se filtró y liofilizó (Farmacopea Argentina, VIII Ed.).

Infusión: se agregaron 100 g de leño de palo amargo finamente molido en un recipiente adecuado, se colocó 1 L de agua destilada hirviendo y se dejó reposar por 20 min (Farmacopea Argentina, VIII Ed.). Se filtró y liofilizó.

1.3- Obtención de los cuasinoideos (cuasina y neocuasina)

Los materiales para los extractos, el método de extracción y las técnicas cromatográficas fueron provistos por la cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (FFyB, UBA).

1.3.1.-Proceso de extracción para la obtención de extractos de cuasinoideos

Maceración: Se pesaron 200 g de leño trozado de *P. crenata*, se molieron con un molino de cuchillas rotativas y luego se colocaron a macerar en un recipiente adecuado. Por cada 100 g del polvo se agregó 100 ml de diclorometano (CH₂Cl₂), se lo dejó en contacto durante 72 horas agitando periódicamente. Se realizaron dos extracciones sucesivas que fueron unidas posteriormente.

Concentración: Para este proceso se utilizó un evaporador rotatorio reduciéndose el volumen a 50 ml.

Obtención de los cuasinoides (cuasina y neocuasina)

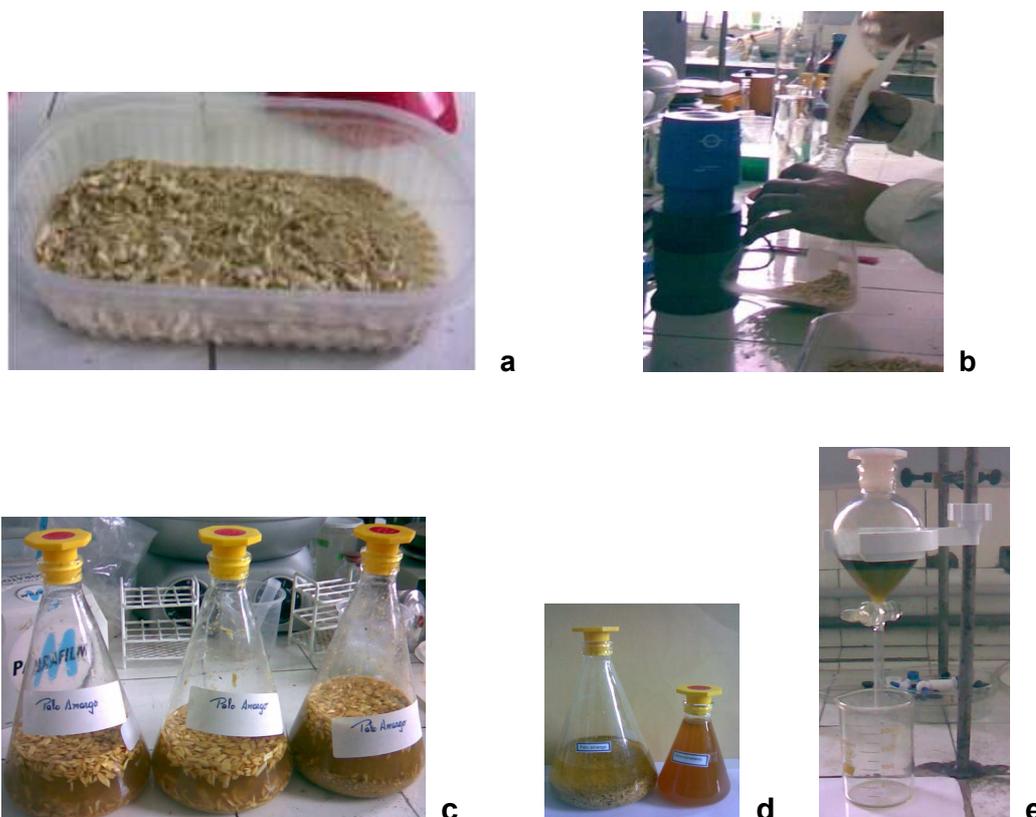


Figura 2.4- a: leño de *Picrasma crenata*, b: molino de cuchillas rotativas, c y d: maceración con diclorometano, e: método de partición

Con el objetivo de confirmar si los extractos de *P. crenata* obtenidos con diclorometano contenían cuasina y neocuasina, se realizó una cromatografía en capa delgada (CCD) del extracto. Se utilizó como fase estacionaria una placa de sílica gel 60 F254, de 2 mm de espesor con zona de concentración 20 cm x 4 cm. Como su nombre lo menciona, esta placa posee un indicador de fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm, que facilita la observación de las bandas de cuasina y neocuasina a esa longitud de onda.

La siembra se realizó con un capilar de vidrio, para garantizar la distribución uniforme y se colocó la placa en una cuba de cromatografía. La solución testigo estaba compuesta por una mezcla de cuasina y neocuasina purificados, que se utilizaron

para la comparación de las bandas. El solvente utilizado fue cloroformo metanol (95:5).

Luego de realizada la corrida cromatográfica, la placa se observó bajo luz UV a una longitud de onda de 254 nm, luego a 365 nm. Se obtuvieron 6 bandas. Sobre una parte del cromatograma se reveló utilizando como reactivos: vainillina (solución al 1% en etanol) y ácido sulfúrico (solución al 10% en etanol) (Wagner y Bladt, 1996).

1.3.2.- Cuantificación de los cuasinoïdes

Con el fin de determinar el contenido de los cuasinoïdes en las cinco bandas (o fracciones) obtenidas de la CCD se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV/visible, bajo los siguientes parámetros:

Columna: LiChroCart 250-4 RP-18 (5 µm).

Fase móvil: ácido ortofosfórico 0,02 molar- metanol- acetonitrilo (50:35:15).

Flujo: 0,5 ml por minuto.

Longitud de onda del detector: 255 nm.

Volumen de inyección: 10 µl.

Solución estándar: 25 mg en 50 ml en fase móvil (0,5 mg/ml).

Solución muestra: 140 mg en 25 ml en fase móvil (5,6 mg/ml).

Tiempos de retención:

 Cuasina: 10,6 min.

 Neocuasina: 20 min.

UV/visible (Robins and Rhodes, 1984).

Concentración de Cuasinas

Banda 2: 0,0044 mg/ml

Banda 3: 0,0318 mg/ml

Concentración de Neocuasinas

Banda 2: 0,01068 mg/ml

Banda 3: 0,01854 mg/ml

Banda 4: 0,01788 mg/ml

Las bandas 1,5 y 6 no poseen cuasina ni neocuasina. En base a estas fracciones se elaboraron los tratamientos.

1.4- Cría de las plagas de granos almacenados en condiciones de laboratorio

Los individuos utilizados para desarrollar las experiencias fueron obtenidos a partir de la cría realizada en la Cátedra de Zoología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Las condiciones de laboratorio fueron $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 76% de HR. La temperatura se mantuvo mediante una estufa con termostato y la humedad con un humidificador y una solución saturada de NaCl (Winston y Bates, 1960). En todos los casos, los insectos provenían de una misma cohorte. Las experiencias se llevaron a cabo sobre cuatro plagas de granos almacenados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *T. castaneum* y *U. dermestoides*.

Para esto se aislaron 200 insectos entre machos y hembras de cada especie. Se colocaron en contacto con el alimento correspondiente, contenidos en frascos de vidrio de 12 cm de diámetro de boca y 25 cm de alto y tapa de tela metálica de 0,5 mm para facilitar el intercambio gaseoso durante 15 días, tiempo suficiente para que se produzca la fecundación de estas especies anfigónicas y su posterior oviposición. Transcurrido este lapso se retiraron los adultos. Se cumplió su ciclo vital en el cual a partir de los huevos se desarrollaron los estados de larva, pupa y posteriormente adulto o imago. Las experiencias se desarrollaron con esta primera generación (F1).

1.4.1.-Cría de *Sitophilus oryzae* “Gorgojo del arroz”



Se desarrolló en una sala de cría bajo las condiciones de laboratorio y en los recipientes mencionados en el párrafo anterior. El alimento natural que se utilizó fue *Triticum aestivum* L. (Poaceae) (Semillería Buck), libre de insecticidas, tratado con frío (-18 °C) durante 15 días y conservado posteriormente entre -2 °C y +5 °C y, 48 h antes de utilizarlo para la incubación, se lo colocó sobre una bandeja en la estufa de cultivo (28 °C ± 1 °C y 76% de HR) para estabilizar el contenido de agua de los granos en 12,5 % aproximadamente.

1.4.2- Cría de *Tribolium castaneum* “*Tribolio castaneo*” y *Oryzaephilus surinamensis* “*Carcoma dentada*”



Los insectos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Para la cría y la multiplicación se utilizaron los recipientes de vidrio mencionados, ofreciendo como medio de cría una dieta constituida por harina de trigo tipo 0000, levadura de cerveza (Virgen, CALSA, Argentina) y fécula de maíz (Maicena, Refinerías de Maíz, Argentina) en proporción 10:1,5:10 (Casadio, 1994). Los adultos fueron retirados cada 15 días del medio de cría y fueron traspasados a otros recipientes con alimento fresco. Esto permitió tener en cada frasco larvas y adultos de edad conocida (Busuine, 1971; Mareggiani, 1999).

1.4.3- Cría de *Ulomoides dermestoides* “tenebrio brillante” o “gorgojo del maní”



Los insectos se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Para la cría y la multiplicación se utilizaron los recipientes de vidrio mencionados. En la cátedra de Zoología Agrícola la cría se llevó a cabo ofreciendo como dieta pan de salvado, manteniendo la humedad del recipiente con cáscaras de bananas. Bajo estas condiciones se obtuvo la F1 a los 30 días de poner en contacto los adultos de *U. dermestoides* con este alimento.

1.5-.Insecticida organofosforado, *Clorpirifós Metil*, considerado en los bioensayos

Un número reducido de insecticidas se utilizaron con éxito en el control de las plagas de granos almacenados. Los organofosforados no constituyen una solución para el control de estas plagas, pero su aplicación sobre pisos, paredes y techos, así como en el exterior de las estibas, coadyuva a mantener un nivel bajo de plagas, sobre todo en almacenes con un movimiento importante de mercadería (Dierksmeier Corcuera, 2007). Un insecticida convencional con estas características es el *Clorpirifós Metil* (5,6 mPa). Este compuesto es un organofosforado sólido, blanco, de apariencia cristalina y de aroma fuerte. Actúa por contacto e ingestión y, además, en fase vapor (inhalación), penetra profundamente en el canopeo del cultivo. Es estable y persistente en el suelo.

Los extractos obtenidos de *P. crenata* fueron contrastados con el insecticida *Clorpirifós Metil* (Nº CAS 2921-88-2. Origen: Inglaterra) Para esta experiencia se consideraron aquellos extractos que produjeron una mayor mortalidad y estabilidad en las experiencias previas del método del film sobre las plagas de granos almacenados. Estas fueron acetato de etilo, acetona y etanol, las que fueron comparadas con el insecticida convencional sobre el insecto *T. castaneum*.

1.5.1.-Análisis de Variancia

Se realizó un análisis de variancia a cada uno de los extractos seleccionados, en sus respectivas concentraciones y *Clorpirifós Metil*, testado a una dosis comercial, durante 72 horas, con un intervalo de 6 h entre cada observación (Infostat, 2009). Se calculó la concentración letal 50 (CL5) y el tiempo letal 50 (TE50).

1.5.2.-Bioequivalencia

En las situaciones en que se busca demostrar la equivalencia de los tratamientos, las estrategias de las pruebas de hipótesis clásicas que especifican, en la hipótesis nula, que no existen diferencias entre los tratamientos no son apropiadas. Las pruebas de bioequivalencia han sido bien desarrolladas y extensamente aplicadas en investigaciones farmacéuticas (FDA, 2001). Tradicionalmente, se ha dado gran énfasis en la protección contra el error de tipo I (concluir que hay evidencia de una diferencia cuando en realidad no existe tal diferencia) que en la protección contra el error de tipo II (concluir que no existe diferencia entre los tratamientos cuando en realidad existe). Cuando se emplea el marco de la prueba de hipótesis tradicional en estudios en que se busca probar equivalencia de tratamientos, los resultados no son concluyentes. Si la diferencia entre los tratamientos es suficientemente grande y la prueba tiene adecuada potencia (probabilidad de rechazar correctamente la hipótesis nula) hay evidencias para rechazar la hipótesis de equivalencia de medias poblacionales. Si las medias son similares o la potencia de la prueba es baja, el énfasis típico de proteger contra el error de tipo I puede significar que no se encuentren evidencias para rechazar la hipótesis de equivalencia de medias. Sin embargo, esto no indica que las medias sean equivalentes. El experimento puede tener baja potencia debido al número de repeticiones inadecuado o debido a una variancia alta. Por lo tanto, un experimento con inadecuado tamaño de muestra puede resultar en falta de evidencia para una diferencia, más allá de que exista verdadera diferencia entre medias.

En la prueba de hipótesis de equivalencia la estrategia es emplear una hipótesis nula de medias distintas, a diferencia de la estrategia clásica. De este modo el rechazo de la hipótesis nula resulta en tener suficientes evidencias de equivalencia de medias. Como dos medias poblacionales nunca van a ser exactamente idénticas, la hipótesis nula usada en la práctica es aquella en que la diferencia entre las medias es mayor que algún valor de tolerancia definido a priori por el investigador. El nivel de tolerancia empleado puede basarse en un nivel arbitrario de similaridad (Garret, 1997).

La prueba de hipótesis de equivalencia es normalmente unilateral:

$$H_0: \theta \geq \delta$$

$$H_1: \theta < \delta$$

Donde θ es la diferencia o la relación de las medidas de éxito para el tratamiento experimental y el tratamiento estándar. Probamos que la diferencia entre el éxito de los dos tratamientos es más pequeño que los criterios especificados (δ). La hipótesis alternativa puede ser aceptada con nivel de significación y los dos agentes pueden ser considerados iguales.

Las hipótesis para comparar el tratamiento experimental y el estándar fueron planteadas según la técnica de bioequivalencia, más específicamente de no inferioridad, siguiendo a Dilletti *et al.*(1991).

2- Metodología de trabajo desarrollada en la investigación

2.1-.Exposición al producto

2.1.1- Método del film (contacto tarsal)

De los extractos en polvo que se obtuvieron por la metodología citada (1.2.1 y 1.2.2) se evaluó su efectividad en las distintas concentraciones.

En el siguiente cuadro se expresan las concentraciones en mg/ml y su equivalente en cm² de la caja de Petri.

| Tratamientos | Expresado en g/ml | Expresado en $\mu\text{g/ml/cm}^2$ |
|--------------|-------------------|------------------------------------|
| T1 | 0,15 | $2,36 \cdot 10^5$ |
| T2 | 0,20 | $3,14 \cdot 10^5$ |
| T3 | 0,25 | $3,93 \cdot 10^5$ |
| T4 | 0,30 | $4,71 \cdot 10^5$ |
| T5 | 0,35 | $5,50 \cdot 10^5$ |

Nota: La unidad con la que se expresan los resultados en los gráficos y las tablas siguientes será en g/ml debido a que esta unidad contribuye a una mejor comprensión.

En el interior de las cajas de Petri se colocó un papel de filtro humedecido con 1 ml de cada una de las soluciones.



Figura 2.5- Método del film

En los tratamientos testigos se procedió del mismo modo pero con agua destilada. Se introdujeron 10 ejemplares adultos de la plaga de granos almacenados en estudio (*S. oryzae*, *T. castaneum*, *O. surinamensis* y *U. dermestoides*), se realizaron cinco repeticiones. Se efectuó el recuento de los individuos muertos a los 30 min, 6, 12, 24, 48 y 72 horas luego de comenzado el ensayo. Los datos se analizaron mediante ANOVA y pruebas a posteriori (Tukey) ($\alpha=0,05$) para la mortalidad, calculada como:

$$\text{Mortalidad (\%)}: \text{N}^\circ \text{ de individuos muertos} / \text{N}^\circ \text{ de individuos totales} \times 100$$

utilizando el software Infostat (2009).

2.1.1.1- Concentración Letal 50 y el Tiempo Letal 50

Se calculó la Concentración Letal 50 (CL50) y el Tiempo Letal 50 (TL 50) con sus intervalos de confianza por el método de Probit (Miller y Tainter, 1944; Weil, 1952). Existen varias maneras de cuantificar y comparar la toxicidad de los diferentes químicos y las concentraciones. Una medida común es la concentración letal 50, conocida como CL50.

Cuando se plantea un bioensayo, como puede ser la efectividad de un insecticida, se debe tener en cuenta que no se puede evaluar una sola dosis o concentración sino que, debe probarse un grupo de ellas en forma de progresión aritmética.

Si se grafica el estímulo contra la respuesta se obtendrá una línea sigmoide asimétrica, con la curvatura inferior muy pequeña cuyos valores son de difícil interpretación. Al transformar la dosis a la función logaritmo de las 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. 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 estar en posibilidades de realizar un análisis paramétrico. La más utilizada es la transformación Probit (Silva y Hepp, 2003).

2.1.2 - Exposición por ingestión del alimento tratado

El ensayo se realizó con *T. castaneum* debido a su importancia económica en la conservación de granos y por ser, además, una plaga de infestación secundaria por lo cual, ataca los granos quebrados y productos de la molienda, quedando expuestos los adultos y las larvas a la acción de los insecticidas.

La dieta base consistió en harina de trigo 0000, levadura de cerveza en polvo y fécula de maíz (citado en cría de insectos 1.4.1.2).

2.1.2.1- Experiencia 1: Mortalidad de individuos adultos de *Tribolium castaneum* por la ingesta de extractos de *Picrasma crenata*

Se observó el efecto de los extractos cuando fueron adicionados a la dieta base de los adultos. La unidad experimental fue el frasco de vidrio de 3 cm de diámetro por 5 cm de altura en un diseño completamente al azar (DCA). En cada uno se colocaron 2 g de la dieta base (harina de trigo, fécula de maíz y levadura), más las correspondientes dosis, en polvo, para cada uno de los tratamientos. Los tratamientos fueron:

| TRATAMIENTO | EXTRACTOS | DOSIS (g) |
|--------------------|----------------------|------------------|
| T0 | Testigo (dieta base) | - |
| T1 | Acetato de etilo | 0,15 |
| T2 | Acetato de etilo | 0,20 |
| T3 | Acetona | 0,15 |
| T4 | Acetona | 0,20 |
| T5 | Etanol | 0,15 |
| T6 | Etanol | 0,20 |

Se realizaron 5 repeticiones ($n = 5$ con 10 individuos c/u) para cada tratamiento, y los frascos fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad ($60\% \pm 5\%$).



Figura 2.6- Método de Ingesta

Se contabilizó la mortalidad de los insectos adultos, realizando en total 10 observaciones, la primera a las 24 horas y las siguientes a intervalos fijos de tres días. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de dos vías (solvente de extracción y dosis) con dos niveles cada uno, para cada momento de observación en forma independiente.

2.1.2.2- Experiencia 2: Duración de los estados juveniles de *Tribolium castaneum* por efecto de los extractos de *Picrasma crenata* sobre la ingesta y su relación con los reguladores de crecimiento

Se observó el efecto de los extractos de *P. crenata* adicionados a la dieta base de las larvas de *T. castaneum*. La unidad experimental fue el frasco de vidrio de 3 cm de diámetro por 5 cm de altura en un diseño completamente al azar (DCA). En cada uno se colocaron 2 g de la dieta base (harina de trigo, fécula de maíz y levadura), más las correspondientes dosis, en polvo, para cada uno de los tratamientos. Se consideraron dos reguladores de crecimiento, a dosis comerciales, como parámetros comparativos: *Novalurón* y *Lufenurón*. Se incorporó una larva neonata perteneciente a una misma cohorte de *T. castaneum* por frasco.

Los tratamientos fueron:

| TRATAMIENTO | EXTRACTOS | DOSIS (g) |
|-------------|----------------------|----------------------|
| T0 | Testigo (dieta base) | - |
| T1 | Acetato de etilo | 0,15 |
| T2 | Acetato de etilo | 0,20 |
| T3 | Acetona | 0,15 |
| T4 | Acetona | 0,20 |
| T5 | Etanol | 0,15 |
| T6 | Etanol | 0,20 |
| T7 | Novalurón (10 % EC) | 1cm ³ /l |
| T8 | Lufenurón (5% EC) | 1 cm ³ /l |

Se realizaron 10 repeticiones (n = 10) para cada tratamiento. Las experiencias se realizaron en condiciones controladas de temperatura (24 °C +/- 2 °C) y humedad (60% +/- 5%).

Se contabilizó la duración del estado larval y pupal. Las observaciones se realizaron a intervalos de cuatro días, hasta que las larvas testigo alcanzaron el estado adulto. Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kuskal Wallis.

2.1.3- Mortalidad por topicación de los adultos de *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* y *Oryzaephilus surinamensis* con los extractos de *Picrasma crenata*

Se observó el efecto de los extractos cuando fueron topicados sobre los adultos de tres especies de plagas de granos almacenados: *T. castaneum*, *S. oryzae* y *O. surinamensis*. Para ello, se tomaron individuos pertenecientes a una misma cohorte (Lagunes y Vazquez, 1994).

La unidad experimental fue la caja de petri de 90 mm de diámetro con un papel de filtro en la base, en un diseño completamente al azar (DCA). Se efectuó una aplicación tópica sobre la región ventral de los últimos urosternitos, con 0,4 μ l de cada una de las diluciones, mediante una microjeringa Hamilton de 10,0 μ l.

Los tratamientos fueron:

| TRATAMIENTO | EXTRACTOS | DOSIS (g/ml) |
|-------------|----------------------|--------------|
| T0 | Testigo (sin tratar) | - |
| T1 | Acetato de etilo | 0,30 |
| T2 | Acetona | 0,25 |
| T3 | Etanol | 0,30 |

Las concentraciones fueron determinadas en relación con las experiencias anteriores (2.1.1).

Se realizaron 5 repeticiones ($n = 5$ con 10 individuos c/u) para cada tratamiento y las cajas de petri fueron mantenidas en condiciones controladas de temperatura (24 $^{\circ}$ C +/- 2 $^{\circ}$ C) y humedad (60% +/- 5%).

Se contabilizó la mortalidad de los individuos, realizando la primera observación a los 30 min, la segunda a las 6 h y las siguientes a intervalos de 6 horas hasta completar las 48 horas. El análisis estadístico utilizado fue la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

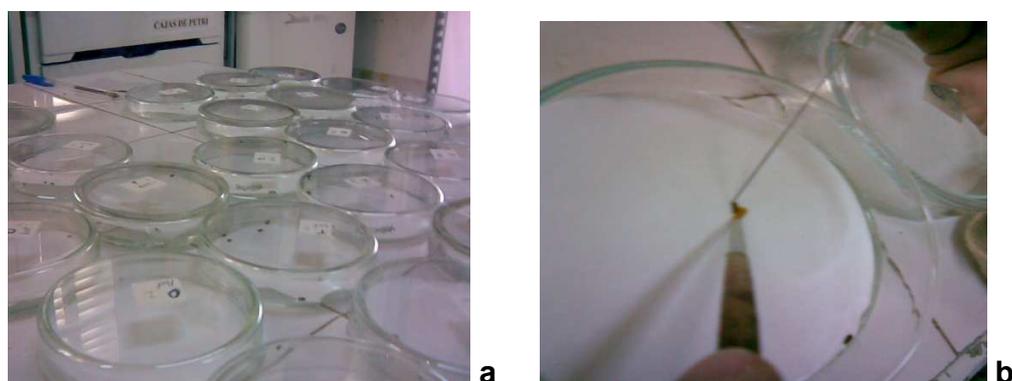


Figura 2.7- a y b: Método de Topicación

2.2-. Bioequivalencia entre los extractos de *Picrasma crenata* y un insecticida convencional sobre *Tribolium castaneum*

Por experiencias previas con el método del film (contacto tarsal) se determinó que los extractos que producían una mayor mortalidad eran el acetato de etilo, la acetona y el etanol. Se realizó un análisis de variancia para cada uno de ellos.

Los tratamientos fueron:

| EXTRACTOS | TRATAMIENTO | DOSIS |
|-------------------|--------------------|--|
| Acetato de etilo | T0 | Testigo |
| | T1 | 0,15 g/ml |
| | T2 | 0,20 g/ml |
| | T3 | 0,25 g/ml |
| | T4 | 0,30 g/ml |
| | T5 | 0,35 g/ml |
| Clorpirifós Metil | T6 | 2,88 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ml |
| Acetona | T0 | Testigo |
| | T1 | 0,15 g/ml |
| | T2 | 0,20 g/ml |
| | T3 | 0,25 g/ml |
| | T4 | 0,30 g/ml |
| | T5 | 0,35 g/ml |
| Clorpirifós Metil | T6 | 2,88 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ml |
| Etanol | T0 | Testigo |
| | T1 | 0,15 g/ml |
| | T2 | 0,20 g/ml |
| | T3 | 0,25 g/ml |
| | T4 | 0,30 g/ml |
| | T5 | 0,35 g/ml |
| Clorpirifós Metil | T6 | 2,88 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ml |

Las observaciones se hicieron a las 0,5 h, 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 48 h y 72 h.

Se calculó la CL50 a las 6 h, por ser el momento más representativo en cuanto al porcentaje de mortalidad y por ser progresiva a través del tiempo de exposición y, por consiguiente, ajustarse a un análisis de Probit.

Para el análisis de la bioequivalencia se consideraron los extractos de etanol y acetato de etilo, por producir una mayor mortalidad a una menor dosis (CL50 a las 6 h).

Para la variable respuesta binomial se define a θ como la diferencia positiva de la probabilidad de éxito del grupo estándar (Pe) y la probabilidad de éxito para el grupo experimental (Ps), esto es: $\theta = Ps - Pe$. El estadístico de la prueba es el estadístico Z habitual derivado de la aproximación de la distribución binomial a la normal (Atherton Akaff y Sloan, 1998).

$$Z_0 = \frac{\theta - \delta}{SE}$$
$$SE = \left[\frac{Ps(1-Ps)}{Ns} + \frac{Pe(1-Pe)}{Ne} \right]^{1/2}$$

Ns es el tamaño estándar de la muestra estándar y Ne es el tamaño de la muestra experimental. SE es una función de Ps y Pe. La hipótesis nula se rechaza y se concluye que existe equivalencia entre las proporciones de éxito de los tratamientos estándar y experimental si $Z_0 < Z_\alpha$ (α) o, alternativamente (valor $p < \alpha$).

2.3.-Efecto de los cuasinoides (cuasina y neocuasina) sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* y *Ulomoides dermestoides*

Ulomoides dermestoides se incorpora a esta experiencia con los metabolitos específicos, como son los cuasinoides, porque es una plaga potencial para la Argentina e interesante de considerar en futuras experiencias.

Para la realización del ensayo se utilizaron las bandas extraídas con diclorometano de *P. crenata* y, en función de ello, se establecieron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que no poseen cuasinoides (cuasinas y neocuasinas) en concentración significativa (Bandas 1, 5 y 6), con el fin de verificar si existen otros compuestos con propiedades insecticidas.

Tratamiento 2. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que poseen mayor proporción de neocuasina que cuasina (Banda 2).

Tratamiento 3. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que poseen mayor proporción de cuasina que neocuasina (Banda 3).

Tratamiento 4. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que poseen únicamente neocuasina (Banda 4).

Todos los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (60%). Asimismo, todos fueron realizados siguiendo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 5 repeticiones (10 individuos cada una).

Se realizaron dos ensayos:

1) Primera Experiencia

1a- Efecto de los cuasinoides a través del método de contacto

a₁- Ensayo preliminar utilizando las cuatro plagas mencionadas

a₂- Ensayo sobre *S. oryzae*

2) Segunda Experiencia

2a- Efecto de los cuasinoides a través de la ingesta

1a- Método de contacto

a₁- Ensayo preliminar

El objetivo de este ensayo fue observar si los cuasinoides de *P. crenata* producen algún efecto por contacto sobre los adultos de *O. surinamensis*, *T. castaneum*, *S. oryzae* y *U. dermestoides*.

En las cajas de Petri se colocó un papel de filtro en la base y, en ausencia de alimento, se procedió a ubicar 1 ml de cada tratamiento en las diferentes cajas. Se aireó y se colocaron 10 individuos adultos de cada una de las plagas para los distintos tratamientos. Para el control se utilizó metanol ya que este fue el solvente en el cual se diluyeron los principios activos. Se midió el efecto de los extractos mediante la mortalidad de los adultos a las 3, 6, 12, 18, 48 y 72 horas después de su introducción.

a₂- Ensayo por contacto sobre *Sitophilus oryzae*

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar, se repitió el ensayo con *S. oryzae*, duplicando la dosis a 2 ml.

Para el análisis de los resultados, se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) para el porcentaje de la mortalidad de los tratamientos y las pruebas a posteriori para las comparación de sus medias (Tukey, 5%).

2a- Efecto de los cuasinoides a través de la ingesta

El ensayo se realizó con *T. castaneum* debido a su importancia económica en la conservación de los granos y por ser, además, una plaga de infestación secundaria por lo cual, ataca los granos quebrados y productos de la molienda, quedando expuestos los adultos y las larvas a la acción de los insecticidas. Para la realización del estudio se procedió de la siguiente manera:

En adultos

La unidad experimental fue un frasco de vidrio de 3 cm de diámetro por 5 cm de altura. Se colocó 1 g de la dieta base (harina de trigo, fécula de maíz, levadura en proporción 10:10:1,5), y luego se introdujo 1 ml de cada muestra de *P. crenata*. Se incorporaron 10 insectos adultos por frasco. Se evaluó la mortalidad de estos insectos en cada unidad experimental a las 24 h y luego cada 3 días hasta completar las 10 observaciones. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (60%).

En larvas

La unidad experimental fue un frasco de vidrio de 3 cm de diámetro por 5 cm de altura, se le adicionó 1 g de la dieta base (harina de trigo, fécula de maíz, levadura en proporción 10:10:1,5), y luego se introdujo 1 ml de cada muestra de *P. crenata*. Se incorporaron 10 larvas en cada unidad experimental. Se evaluó la mortalidad de estos insectos en cada una de éstas a las 24 h y luego cada 3 días hasta completar las 10 observaciones.

Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (60%).

Para el análisis de los resultados, se utilizó análisis de variancia (ANOVA) para el porcentaje de mortalidad de los tratamientos y pruebas a posteriori para las comparación de sus medias (Tukey, 5%).

CAPÍTULO III

RESULTADOS, DISCUSIONES y CONCLUSIONES

1- Método del film

1.1- *Sitophilus oryzae* (L.)

La mortalidad observada sobre *S. oryzae* de las diferentes fracciones de *P. crenata* fue en orden decreciente la siguiente: acetona, acetato de etilo, etanol, diclorometano, infusión, metanol, éter de petróleo y cocimiento (Tablas 3.4; 3.6; 3.3, 3.2, 3.7, 3.5 y 3.1, respectivamente).

Si consideramos una mortalidad relevante a partir del 80%, la fracción acetona (Tabla 3.4) presenta una mortalidad del 84 al 100% a las 6 h para la concentración de 0,25 g/ml (T3), 0,30 g/ml (T4) y 0,35 g/ml (T5), observándose diferencias estadísticamente significativas entre el T3 y T5. A partir de las 12 h no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la concentración 0,15 g/ml (T1) y la concentración 0,35 g/ml (T5) con una mortalidad entre 74% y 100%. A las 18 h el comportamiento fue similar entre el T1 y T5 con una mortalidad entre 90% y 100%.

En la fracción acetato de etilo (Tabla 3.3) se observa una mortalidad del 100% a las 6 h con la mayor concentración (0,35 g/ml). A las 12 h la concentración 0,30 g/ml (T4) produce una mortalidad de 80% y de 100% a las 24 h, mientras que con la concentración 0,25 g/ml (T3) la mortalidad es de 92% a 96% desde las 24 h a las 72 h. A partir de las 24 h los tratamientos T3, T4 y T5 no presentan diferencias estadísticamente significativas.

La fracción etanol (Tabla 3.6) produce un 100% de mortalidad a partir del tratamiento T4 pero no difiere significativamente de los tratamientos T2 y T3. A las 72 h a partir del T3 se logra el 100% de mortalidad.

Para las fracciones diclorometano e infusión (Tablas 3.2 y 3.7) la mortalidad es de 78% y 76%, respectivamente, mientras que para metanol y éter de petróleo (Tablas 3.5 y 3.1) es de 70 % para cada una de ellas a las 72 h para una concentración de 0,30 g/ml. En el caso del diclorometano los tratamientos T3, T4 y T5 no difieren significativamente desde las 24 h, mientras que el tratamiento T2 no difiere del resto de los tratamientos a partir de las 48 h. Para la fracción metanol los tratamientos no difieren significativamente en cada momento de observación a lo largo de toda la experiencia.

La fracción obtenida por cocimiento logra una mortalidad del 58% a las 72 h con la máxima concentración. En esta fracción y la obtenida por infusión se observa un “efecto de volteo”, es decir, un alto porcentaje de insectos afectados en la primera observación y a dosis bajas (0,15 g/ml), recuperándose un cierto número de ellos a lo largo del tiempo (Tablas 3.7 y 3.8).

| <i>Trat./horas</i> | <i>0,5</i> | <i>6</i> | <i>12</i> | <i>18</i> | <i>24</i> | <i>48</i> | <i>72</i> |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 4 a | 12 ab | 18 ab |
| T2 | 0 a | 0 a | 4 a | 8 ab | 10 ab | 14 ab | 20 abc |
| T3 | 0 a | 0 a | 20 ab | 26 bc | 28 bc | 32 bc | 40 bc |
| T4 | 0 a | 12 b | 30 b | 34 cd | 36 c | 40 cd | 42 c |
| T5 | 18 b | 20 b | 30 b | 46 d | 62 d | 64 d | 70 d |
| F | 23,14 | 10,18 | 9,90 | 19,78 | 19,58 | 16,96 | 21,22 |

Tabla 3.1- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción **éter de petróleo** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| <i>Trat./horas</i> | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 a | 0 a | 0 a | 4 a | 6 c | 16 b | 24 b |
| T2 | 24 ab | 36 b | 48 b | 56 b | 62 a | 64 c | 70 c |
| T3 | 28 ab | 40 b | 52 bc | 62 bc | 64 b | 66 c | 70 c |
| T4 | 36 b | 56 c | 60 bc | 64 bc | 70 b | 72 c | 74 c |
| T5 | 44 b | 56 c | 64 c | 70 c | 74 b | 74 c | 78 c |
| F | 5,92 | 81,93 | 96,47 | 116,98 | 109,47 | 79,34 | 176,44 |

Tabla 3.2- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción **diclorometano** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| <i>Trat./horas</i> | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 a | 30 b | 40 b | 54 b | 60 b | 62 b | 62 b |
| T2 | 2 ab | 40 bc | 60 c | 62 b | 70 b | 70 b | 80 c |
| T3 | 4 ab | 46 c | 60 c | 64 b | 92 c | 94 c | 96 d |
| T4 | 20 bc | 76 d | 80 d | 90 c | 100 c | 100 c | 100 d |
| T5 | 28 c | 100 e | 100 e | 100 c | 100 c | 100 c | 100 d |
| F | 7,56 | 142,65 | 197,44 | 54,17 | 136,56 | 176,02 | 149,72 |

Tabla 3.3- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetato de etilo** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 52 b | 64 b | 74 b | 90 b |
| T2 | 58 b | 70 b | 80 b | 100 b |
| T3 | 68 b | 84 c | 98 b | 100 b |
| T4 | 70 b | 94 cd | 100 b | 100 b |
| T5 | 72 b | 100 d | 100 b | 100 b |
| F | 7,95 | 208,34 | 21,74 | 81 |

Tabla 3.4- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetona** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 26 b | 34 b | 48 b | 52 b | 54 b | 56 b | 58 b |
| T2 | 32 b | 38 b | 50 b | 54 b | 56 b | 60 b | 62 b |
| T3 | 34 b | 40 b | 54 b | 58 b | 62 b | 64 b | 66 b |
| T4 | 36 b | 44 b | 56 b | 60 b | 64 b | 66 b | 68 b |
| T5 | 38 b | 50 b | 58 b | 64 b | 66 b | 70 b | 70 b |
| F | 8,85 | 17,70 | 26,48 | 31,16 | 48,42 | 46,98 | 48,98 |

Tabla 3.5- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción **metanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 a | 2 ab | 12 ab | 16 a | 20 a | 24 a | 28 a |
| T2 | 0 a | 4 ab | 16 b | 26 a | 38 ab | 64 b | 68 b |
| T3 | 6 ab | 12 ab | 48 c | 66 b | 74 bc | 98 b | 100 c |
| T4 | 8 b | 20 b | 56 c | 74 b | 92 c | 100 b | 100 c |
| T5 | 34 c | 65 c | 75 d | 80 b | 100 c | 100 b | 100 c |
| F | 59,48 | 26,88 | 83,39 | 16,32 | 15,20 | 23,12 | 38,18 |

Tabla 3.6- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción **etanol** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 60 c | 56 c | 32 b | 32 b | 30 b | 30 b | 30 b |
| T2 | 28 b | 30 b | 34 b | 44 bc | 48 c | 52 bc | 56 c |
| T3 | 30 b | 38 b | 44 b | 52 c | 58 cd | 62 bc | 66 cd |
| T4 | 44 bc | 60 c | 66 c | 68 d | 70 de | 70 c | 72 d |
| T5 | 48 c | 64 c | 68 c | 68 d | 72 e | 74 c | 76 d |
| F | 27,75 | 36,57 | 39,67 | 54,93 | 87,03 | 88,89 | 100,43 |

Tabla 3.7- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por **infusión** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 94 c | 70 c | 48 | 40 bc | 22 b | 10 a | 6 a |
| T2 | 24 b | 26 b | 32 | 34 b | 38 bc | 40 b | 42 b |
| T3 | 28 b | 28 b | 32 | 36 bc | 40 bc | 42 b | 42 b |
| T4 | 32 b | 36 b | 38 | 42 bc | 46 c | 50 b | 50 bc |
| T5 | 32 b | 42 b | 46 | 54 c | 56 c | 58 b | 58 c |
| F | 62,48 | 31,43 | 14,85 (n.s.) | 17,78 | 19,79 | 34,83 | 44 |

Tabla 3.8- Mortalidad (%) de *Sitophilus oryzae* por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por **cocimiento** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

1.1.1- Concentración letal media (CL50)

La concentración letal media (CL50) más baja obtenida fue la del extracto de metanol a las 12 h con 0,19 g/ml, luego el etanol con 0,90 g/ml para el mismo momento de observación y con valores decrecientes se observó el extracto de acetato de etilo con 1,48 g/ml y 1,37 g/ml a las 6 y 12 h; por último el extracto de acetona con 1,55 g/ml a las 6 h. De las soluciones acuosas, la de infusión produjo mayor mortalidad que la de cocimiento con una CL50 de 1,69 g/m, mientras que la CL50 de cocimiento fue 7,19 g/ml. Los valores más altos de la CL50 fueron los de los extractos de éter de petróleo y diclorometano (Tabla 3.9).

| Fracción | Concentración Letal Media (g/ml) en cada momento de observación. Intervalo de confianza (95 %) | | | | | | |
|------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| | CL50 (0,5 h) (g/ml) | CL50 (6 h) (g/ml) | CL50 (12 h) (g/ml) | CL50 (18 h) (g/ml) | CL50 (24 h) (g/ml) | CL50 (48 h) (g/ml) | CL50 (72 h) (g/ml) |
| Éter de petróleo | | | 4,24 (3,73- 5,56) | | 3,22 (3,05 - 3,47) | | |
| Diclorometano | | | | | | 2,51 (2,33 - 2,70) | |
| Acetato de etilo | | 1,48 (1,41 - 1,54) | 1,37 (1,21 - 1,46) | | | | |
| Acetona | | 1,55 (1,21 - 1,75) | 1,72 (1,46 - 1,85) | | | | |
| Metanol | | | 0,19 (0,13 - 0,25) | | 1,23 (0,13 - 1,76) | | |
| Etanol | | | 0,90 (0 - 3,36) | | 1,92 (1,52 - 2,33) | | |
| Infusión | | | | | | | 1,62 (1,31 - 1,82) |
| Cocimiento | | | | | | | 7,19 (4,60 - 62,45) |

Tabla 3.9- Concentración letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en *S. oryzae*

1.1.2- Tiempo Letal medio (TL50)

En relación al Tiempo Letal Medio (TL50), se observa que es la acetona la que logra, en un menor tiempo, la mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae* (28 min 15 seg) con una concentración de 0,15 g/ml, en segundo lugar el metanol con 53 min 40 seg para una concentración de 0,35 g/ml y luego el extracto acuoso obtenido por infusión, 1h 42 min para una concentración de 0,30 g/ml (Tabla 3.10).

| Tiempo Letal Medio (horas). Intervalo de confianza (95 %) | | | | | |
|--|--|-----------------------------|--|---|--|
| Fracción | TL50 (0,15 g/ml) | TL50 (0,20 g/ml) | TL50 (0,25 g/ml) | TL50 (0,30 g/ml) | TL50 (0,35 g/ml) |
| Éter de petróleo | | | | | 21 h 56 min (8 h 56 min - 66 h 46 min) |
| Diclorometano | | | | | 6 h 18 min (4 h 50 min - 7 h 19 seg) |
| Acetato de etilo | 9 h 7 min (3 h 14 min - 24 h 13 min) | | | | |
| Acetona | 28 min 20 seg (20 min 20 seg - 37 min 20seg) | | | | |
| Metanol | | | | | 53 min 40 seg (40 min 20 seg - 1 h 08 min) |
| Etanol | | | 10 h 23 min (8 h 32 min - 11 h 10 min) | | |
| Infusión | | | | 1 h 42 min (33 min 60 seg - 2 h 20 min) | |
| Cocimiento | | | | | 16 h 7 min (8 h 12 min - 26h 31 min) |

Tabla 3.10- Tiempo letal medio (horas) (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de *P. crenata* en *S. oryzae*.

1.2- *Tribolium castaneum* (Herbst)

La mortalidad observada sobre *T. castaneum* de las distintas fracciones de *P. crenata* fue en orden decreciente la siguiente: acetona, etanol, acetato de etilo, metanol, diclorometano, cocimiento, infusión y éter de petróleo (Tablas 3.14, 3.16, 3.13, 3.15, 3.12, 3.18, 3.17 y 3.11, respectivamente).

Si consideramos una mortalidad relevante a partir del 80%, se observa para la fracción acetona (Tabla 3.14) una mortalidad del 86% para el tratamiento T2 a las 6 h sin diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos T3, T4 y T5, esto se repite en cada momento de observación. Para la fracción etanol (Tabla 3.16), los tratamientos T3, T4 y T5 no presentan diferencias estadísticamente significativas en cada momento de observación a las 6 h, 12 h y 18 h. A partir de las 24 h el tratamiento T2 produce una mortalidad del 80% sin diferencias significativas con los tratamientos T3, T4 y T5.

En la fracción acetato de etilo (Tabla 3.13) se observa una mortalidad del 80% con el tratamiento T5 a las 6 h y una mortalidad del 100% a partir de las 12 h y para cada momento de observación para el mismo tratamiento. El tratamiento T4 presenta una mortalidad del 80% a las 18 h y de 100% a las 24 h no presentando diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento T5.

La fracción metanol (3.15) logra una mortalidad del 82% con una concentración de 0,25 g/ml (T3) a las 12 h sin diferencias significativas con los tratamientos T3, T4 y T5. A las 72 h la mortalidad producida por los distintos tratamientos (T1 al T5) es del 80% al 90%, sin diferencias significativas entre los tratamientos.

Para las fracciones diclorometano, cocimiento, infusión y éter de petróleo (Tablas 3.12, 3.18, 3.17 y 3.11, respectivamente) la máxima mortalidad alcanzada a las 72 h fue la del tratamiento T5 con 78% y 74% para los dos primeros y 70% para los dos últimos, infusión y éter de petróleo.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 2 ab | 6 | 8 ab | 10 ab | 20 ab | 22 b | 30 b |
| T2 | 4 ab | 6 | 8 ab | 10 ab | 26 ab | 26 b | 38 b |
| T3 | 6 ab | 16 | 16 ab | 24 b | 38 b | 48 bc | 50 bc |
| T4 | 12 ab | 24 | 38 b | 46 bc | 52 bc | 60 c | 68 c |
| T5 | 14 b | 36 | 48 b | 60 c | 60 c | 68 c | 70 c |
| F | 4,05 | 2,48 (n.s.) | 4,51 | 5,58 | 7,50 | 29,45 | 22,35 |

Tabla 3.11- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción **éter de petróleo** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0a |
| T1 | 6 ab | 8 ab | 16 a | 20 b | 44 b | 46 b | 52 b |
| T2 | 8 abc | 22 bc | 34 b | 36 bc | 46 b | 48 b | 56 bc |
| T3 | 16 bcd | 28 c | 36 b | 42 c | 50 b | 60 bc | 66 cd |
| T4 | 20 cd | 30 c | 38 b | 42 cd | 54 b | 66 c | 70 d |
| T5 | 22 d | 36 c | 40 b | 46 d | 70 c | 74 c | 78 d |
| F | 9,02 | 17,04 | 16,56 | 31,3620 | 53,38 | 57,43 | 93,58 |

Tabla 3.12- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción **diclorometano** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 12 ab | 24 a | 24 b | 28 b | 30 b | 30 b | 32 b |
| T2 | 14 ab | 26 ab | 26 b | 30 b | 34 b | 56 c | 60 c |
| T3 | 18 ab | 28 ab | 40 b | 44 b | 48 b | 68 c | 66 c |
| T4 | 20 ab | 56 bc | 70 c | 80 c | 100 c | 100 d | 98 d |
| T5 | 32 b | 84 c | 100 d | 100 d | 100 c | 100 d | 100 d |
| F | 4,19 | 17,34 | 69,49 | 67,64 | 88,76 | 103,65 | 106,59 |

Tabla 3.13- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetato de etilo** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 20 ab | 54 b | 56 b | 58 b | 60 b | 62 b | 84 b |
| T2 | 56abc | 86 bc | 92 c | 96 c | 98 c | 98 c | 98 b |
| T3 | 80 bc | 86 bc | 96 c | 98 c | 100 c | 100 c | 100 b |
| T4 | 72 bc | 90 c | 100 b |
| T5 | 74 c | 92 c | 98 c | 100 c | 100 c | 100 c | 100 b |
| F | 6,19 | 21,64 | 32,52 | 28,37 | 29,62 | 28,21 | 105,86 |

Tabla 3.14- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetona** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 58 b | 58 b | 64 b | 72 b | 76 b | 80 b | 80 b |
| T2 | 62 b | 70 bc | 76 bc | 80 b | 84 b | 88 b | 88 b |
| T3 | 72 b | 74 c | 82 bc | 86 b | 88 b | 92 b | 90 b |
| T4 | 72 b | 76 c | 84 c | 86 b | 90 b | 90 b | 94 b |
| T5 | 74 b | 78 c | 84 c | 88 b | 90 b | 92 b | 90 b |
| F | 47,19 | 67,16 | 90,13 | 77,78 | 118,25 | 114,60 | 126,95 |

Tabla 3.15- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción **metanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 |
| T1 | 36 ab | 50 b | 64 b | 70 b | 70 b | 74 b | 74 b |
| T2 | 50 bc | 70 b | 74 b | 74 b | 80 b | 84 b | 90 b |
| T3 | 62 bc | 88 b | 92 b | 92 b | 92 b | 92 b | 92 b |
| T4 | 86 c | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b |
| T5 | 90 c | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b |
| F | 9,36 | 22,61 | 67,39 | 91,78 | 114,27 | 103,26 | 143,08 |

Tabla 3.16- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción **etanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 20 b | 26 ab | 34 ab | 40 b | 50 b | 54 b | 60 b |
| T2 | 20 b | 44 b | 54 b | 60 b | 60 b | 60 b | 60 b |
| T3 | 20 b | 50 b | 60 b | 62 b | 62 b | 64 b | 66 b |
| T4 | 24 b | 54 b | 62 b | 64 b | 66 b | 66 b | 68 b |
| T5 | 54 b | 30 b | 66 b | 66 b | 68 b | 70 b | 70 b |
| F | 9,27 | 9,63 | 7,90 | 7,96 | 7,63 | 7,28 | 8,78 |

Tabla 3.17- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por **infusión** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|-------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 10 | 30 b | 36 ab | 38 b | 44 b | 48 b | 52 b |
| T2 | 12 | 30 b | 38 b | 44 b | 50 b | 60 b | 62 b |
| T3 | 16 | 52 c | 60 b | 62 b | 62 b | 64 b | 72 b |
| T4 | 18 | 62 c | 64 b | 64 b | 66 b | 66 b | 72 b |
| T5 | 18 | 64 c | 60 b | 68 b | 70 b | 70 b | 74 b |
| F | 2,15 (n.s.) | 20,62 | 10,05 | 10,50 | 9,63 | 10,14 | 14,60 |

Tabla 3.18- Mortalidad (%) de *Tribolium castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción obtenida por **cocimiento** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

1.2.1- Concentración letal media (CL50)

En la tabla 3.19 se resume la Concentración Letal Media (CL50), se observa que el extracto metanólico produce la mortalidad del 50% de la población con la más baja concentración (0,38 g/ml) a las 18 h de iniciada la experiencia. La CL50 del extracto de éter de petróleo (3,10 g/ml) fue superior que la CL50 de diclorometano (1,78 g/ml) a las 48 h, lo cual indica que el extracto de diclorometano produce la mortalidad del 50% de la población con una concentración menor que el éter de petróleo. Estos tratamientos difieren entre sí debido a que sus intervalos de confianza no se superponen. La concentración letal media (CL50) para el extracto de acetona fue semejante al del diclorometano (1,74 g/ml) pero el primero se produce a las 6 h de iniciada la experiencia y el segundo a las 48 h. Para el extracto de etanol fue de 1,94 g/ml a la 0,5 h de iniciada la experiencia. En relación a las soluciones acuosas, la CL50 fue de 0,70 g/ml y 1,70 g/ml para el cocimiento y la infusión respectivamente, a las 72 h.

| Concentración Letal Media (g/ml) en cada momento de observación. Intervalo de confianza (95 %) | | | | | | | |
|--|------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| Fracción | CL50 (0,5 h) (g/ml) | CL50 (6 h) (g/ml) | CL50 (12 h) (g/ml) | CL50 (18 h) (g/ml) | CL50 (24 h) (g/ml) | CL50 (48 h) (g/ml) | CL50 (72 h) (g/ml) |
| Éter de petróleo | | | | | | 3,10 (2,85 - 3,39) | |
| Diclorometano | | | | | | 1,78 (1,55 - 1,96) | |
| Acetato de etilo | | 2,04 (1,88 - 2,20) | | | | | |
| Acetona | | 1,74 (1,58 - 1,88) | | | | | |
| Metanol | | | 1,66 (0,24 - 2,15) | 0,38 (0,0002 - 1,02) | | | |
| Etanol | 1,94 (1,76 - 2,10) | | | | | | |
| Infusión | | | | | | | 1,20 (0,89 - 1,43) |
| Cocimiento | | | | | | | 0,7088 (0,31 - 0,92) |

Tabla 3.19- Concentración letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en *T. castaneum*

1.2.2- Tiempo Letal medio (TL50)

El mejor tiempo letal medio (TL50) fue el del extracto de acetona a los 5 min 55 seg para una concentración de 0,35 g/ml, luego el metanol con un TL50 de 10 min 11 seg para 0,15 g/ml, el etanol con un TL50 de 31 min 14 seg para 0,30 g/ml y el acetato de etilo con un TL50 de 1 h 38 min para 0,35 g/ml. Los valores de las soluciones acuosas por cocimiento e infusión, para una concentración de 0,30 g/ml de 1 h 49 min y 2 h 25 min respectivamente.

| Tiempo Letal Medio (horas). Intervalo de confianza (95 %) | | | | | |
|--|--|---|---|--|--|
| Fracción | TL50 (0,15 g/ml) | TL50 (0,20 g/ml) | TL50 (0,25 g/ml) | TL50 (0,30 g/ml) | TL50 (0,35 g/ml) |
| Éter de petróleo | | | | | 14 h 24 min (10 h 41 min - 20 h 28 min) |
| Diclorometano | | | 17 h 03 min (9 h 44 min - 28 h 58 min) | | 14 h 32 min (5 h 30 min - 27h 30 min) |
| Acetato de etilo | | | | 1 h 43 min (21 min 25 seg - 2 h 40 min) | 1 h 38 min (1 h 35 min - 2 h 54 min) |
| Acetona | | | 9 min 4 seg (3 min – 19 min) | | 5 min 5 seg (1 min – 18 seg) |
| Metanol | 10 min 11 seg (4 min 32 seg - 19 min 21 seg) | 16 min 11 seg (7 min 13 seg - 30 min 09 seg) | | | |
| Etanol | | | 47 min 48 seg (25 min 67seg -1 h 14 seg) | 31 min 14 seg (9 min 19 seg -1 h 25 min) | |
| Infusión | | | | 2 h 25 min (1 h 39 min - 4 h 17 min) | |
| Cocimiento | | | | 1 h 49 min (1 h 40 min - 2 h 33 min) | |

Tabla 3.20- Tiempo letal medio (horas) (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de *P. crenata* en *T. castaneum*

1.3- *Oryzaephilus surinamensis* L.

La mortalidad observada sobre *O. surinamensis* de las distintas fracciones de *P. crenata* fue en orden decreciente: acetona, etanol, acetato de etilo, metanol, diclorometano, éter de petróleo, cocimiento e infusión. (Tablas 3.24, 3.26, 3.23, 3.25, 3.22, 3.21, 3.28 y 3.27), respectivamente).

Si consideramos una mortalidad relevante a partir del 80%, la fracción acetona (Tabla 3.24) produce una mortalidad de 92% para el tratamiento T2 y 94% para cada uno de los tratamientos T3 y T4, sin presentar diferencias estadísticamente significativas. A partir de las 6 h de comenzada la experiencia, estos tratamientos producen una mortalidad del 100%. La concentración de 0,15 g/ml (T1) produce una mortalidad del 90% a partir de las 12 h sin presentar diferencias estadísticamente significativas con el resto de las concentraciones, a las 72 h la mortalidad es del 96%.

Con la fracción etanol (Tabla 3.26) a las 6 h se obtiene una mortalidad del 92% al 98% en los tratamientos T3 (0,30 g/ml) y T4 (0,35 g/ml). No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T1 a T4 a partir de este momento hasta el final de la experiencia. A partir de las 18 h la mortalidad producida por el tratamiento T1 es de 96%, mientras que los tratamientos T2, T3 y T4 producen una mortalidad del 100%. En todos los momentos de observación se presenta diferencias estadísticamente significativas con el control.

La fracción acetato de etilo muestra una mortalidad mayor al 80% con el tratamiento T5 a las 0,5 h sin presentar diferencias estadísticamente con los tratamientos T3 y T4. El tratamiento T4 presenta una mortalidad de 82% a partir de las 6 h. El tratamiento T3 presenta una mortalidad de 80% a partir de las 18 h. A las 18 h el tratamiento T5 produce el 100% de mortalidad, mientras que el T4 lo alcanza a las 48 h. No hay diferencias significativas entre los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 a partir de las 6 h en todos los casos hay diferencias con el control.

La fracción metanol (Tabla 3.25) produce una mortalidad del 84% a las 18 h con la concentración 0,20 g/ml (T2) y 96% con la concentración 0,30 g/ml (T4), sin diferencias estadísticamente significativas. A partir de las 24 h el tratamiento T1 produce una mortalidad del 84% con diferencias estadísticamente significativas con el T3 y T4. A las 72 h el T1 produce una mortalidad del 88% y el tratamiento T4 una mortalidad del 99%, sin diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T1, T2, T3 y T4, pero se observa una diferencia significativa con el control.

La fracción diclorometano (Tabla 3.22) muestra una mortalidad del 86% a las 12 h con una concentración de 0,35 g/ml (T5) y una mortalidad del 100% a partir de las 48 h.

Las fracciones de éter de petróleo, cocimiento e infusión lograron una mortalidad de 50%, 24% y 18%, respectivamente con una concentración de 0,35 g/ml a las 72 h (Tablas 3.21, 3.28 y 3.27).

Las figuras 3.17 a 3.24 muestran una síntesis de la mortalidad acumulada en el tiempo para cada tratamiento.

| <i>Trat./horas</i> | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 2 ab | 4 ab | 6 ab | 8 ab | 10 ab | 10 ab | 12 ab |
| T2 | 4 ab | 6 ab | 8 ab | 10 ab | 10 ab | 12 ab | 26 ab |
| T3 | 4 ab | 8 ab | 12 ab | 12 ab | 16 ab | 22 ab | 38 ab |
| T4 | 6 ab | 8 ab | 18 ab | 26 ab | 30 ab | 34 ab | 38 ab |
| T5 | 14 b | 18 b | 32 b | 34 b | 36 b | 46 b | 50 b |
| F | 3,42 | 3,58 | 2,88 | 2,93 | 3,08 | 8,67 | 3,65 |

Tabla 3.21- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **éter de petróleo** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| <i>Trat./horas</i> | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 a | 6 ab | 12 ab | 14 a | 14 a | 18 a | 18 a |
| T2 | 4 ab | 10 ab | 12 ab | 16 a | 18 a | 20 a | 20 a |
| T3 | 4 ab | 12 ab | 14 ab | 18 a | 18 a | 32 ab | 32 ab |
| T4 | 12 b | 46 bc | 54 cd | 68 bc | 68 b | 76 c | 76 c |
| T5 | 24 b | 72 bc | 86 d | 94 c | 96 b | 100 c | 100 c |
| F | 2 | 10,72 | 16,85 | 17,01 | 21,15 | 18,52 | 18,52 |

Tabla 3.22- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **diclorometano** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 24 a | 58 b | 58 ab | 58 b | 58 ab | 62 b | 68 b |
| T2 | 32 b | 58 b | 58 ab | 60 bc | 62 b | 64 b | 66 b |
| T3 | 72 c | 74 b | 78 b | 80 bc | 92 b | 94 bc | 96 b |
| T4 | 74 c | 82 b | 84 b | 90 bc | 94 b | 100 c | 100 b |
| T5 | 80 c | 98 b | 98 b | 100 c | 50 ab | 100 c | 100 b |
| F | 30,7 | 13,05 | 12,93 | 16,87 | 18,04 | 21,80 | 24,19 |

Tabla 3.23 - Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetato de etilo** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 24 b | 78 b | 90 b | 90 b | 94 b | 96 b | 96 b |
| T2 | 92 c | 100 c | 100 b |
| T3 | 94 c | 100 c | 100 b |
| T4 | 94 b | 100 c | 100 b |
| F | 101,68 | 10,94 | 2,09 | 2,67 | 1,6 | 1 | 1 |

Tabla 3.24- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetona** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 26 a | 42 a | 62 | 78 a | 84 a | 86 a | 88 ab |
| T2 | 30 a | 54 ab | 72 | 84 ab | 86 a | 88 ab | 88 ab |
| T3 | 48 b | 62 b | 76 | 96 b | 96 b | 96 b | 96 b |
| T4 | 52 b | 64 b | 76 | 96 b | 98 b | 98 b | 99 b |
| F | 19,61 | 6,64 | 2,57 n.s. | 5,65 | 5,5 | 5,03 | 5,07 |

Tabla 3.25- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **metanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 18 a | 70 b | 84 b | 96 b | 96 b | 96 b | 96 b |
| T2 | 34 ab | 74 ab | 98 b | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b |
| T3 | 42 ab | 92 ab | 98 b | 100 b | 100 b | 100 b | 100 b |
| T4 | 50 b | 98 b | 100 b |
| F | 4,55 | 4,81 | 9,11 | 2,67 n.s. | 2,67 n.s. | 2,67 n.s. | 2,67 n.s. |

Tabla 3.26- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **etanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| T0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 6 |
| T2 | 4 | 6 | 6 | 8 | 8 | 12 | 14 |
| T3 | 0 | 2 | 6 | 8 | 10 | 12 | 16 |
| T4 | 2 | 2 | 6 | 6 | 12 | 14 | 26 |
| T5 | 2 | 2 | 8 | 10 | 12 | 14 | 18 |
| F | 1,35 (n.s.) | 1,78 (n.s.) | 1,01 (n.s.) | 1,22 (n.s.) | 0,80 (n.s.) | 0,79 (n.s.) | 0,80 (n.s.) |

Tabla 3.27- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **infusión** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| T0 | 0 a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| T1 | 2 a | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 10 |
| T2 | 2 a | 2 | 2 | 2 | 4 | 10 | 14 |
| T3 | 16 b | 18 | 18 | 20 | 22 | 24 | 24 |
| T4 | 8 ab | 12 | 14 | 14 | 14 | 14 | 26 |
| T5 | 8 ab | 16 | 20 | 20 | 22 | 24 | 24 |
| T6 | 8 ab | 8 | 14 | 16 | 16 | 16 | 24 |
| F | 3,74 | 1,99 (n.s.) | 1,62 (n.s.) | 1,47 (n.s.) | 1,36 (n.s.) | 1,19 (n.s.) | 1,20 (n.s.) |

Tabla 3.28- Mortalidad (%) de *Oryzaephilus surinamensis* por las diferentes concentraciones de la fracción **cocimiento** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

1.3.1-Concentración letal media (CL50)

La concentración letal media (CL50) del extracto de acetato de etilo a las 48 h de iniciada la experiencia fue el más efectivo (0,73 g/ml) seguido por los extractos de metanol (1 g/ml), etanol (1,01 g/ml) y acetona (1,3 g/ml) a las 12 h (Tabla 3.29). A las 6 h la CL50 fue de 1,23 g/ml, 1,49/ml y 1,83 g/ml para las fracciones de etanol, acetona y metanol con valores más elevados para diclorometano y éter de petróleo (2,38 g/ml) y 3,39 g/ml) a las 72 h, respectivamente (Tabla 3.29)

| | Concentración Letal Media (g/ml) en cada momento de observación. Intervalo de confianza (95 %) | | | | | | |
|-------------------------|---|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Fracción | CL50 (0,5 h) (g/ml) | CL50 (6 h) (g/ml) | CL50 (12 h) (g/ml) | CL50 (18 h) (g/ml) | CL50 (24 h) (g/ml) | CL50 (48 h) (g/ml) | CL50 (72 h) (g/ml) |
| Éter de petróleo | | | | | | 3,773 (3,41 – 4,421) | 3,39 (3,083 - 3,912) |
| Diclorometano | | | | 2,62 (1,70 - 5.20) | | | 2,38 (1,78 - 2,91) |
| Acetato de etilo | | | | | | 0,73 (0,28 - 1,17) | |
| Acetona | 1,67 | 1,4 | 1,3 | | | | |
| Metanol | 2,79 (2,36 - 5,01) | 1,83 (1,39 - 2,12) | 1 (0,0023- 1,41) | | | | |
| Etanol | 2,93 (2,61 - 3,65) | 1,23 (0,96- 1,41) | 1,02 (0,65 - 1,22) | | | | |
| Infusión | | | | | | | 21 (15,0554 – 23,0415) |
| Cocimiento | | | | | | | 5,52 (3, 9026- 19,6696) |

Tabla 3.29- Concentración letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en *O. surinamensis*

3.2- *Tiempo Letal medio (TL50)*

En el caso de las fracciones del cocimiento y de la infusión, el tiempo letal medio (TL50) ha superado las 72 h.

El mejor tiempo letal medio (TL50) fue el del extracto de acetato de etilo (12 min), luego los extractos de etanol (1 h 08 min), metanol (1 h 40 min) para una concentración de 0,25 g/ml y acetona (2 h) para una concentración de 0,15 g/ml. En esta experiencia es de destacar el comportamiento del extracto de éter de petróleo cuyo valor de TL50 es de 1h 30 min (Tabla 3.30)

| Fracción | Tiempo Letal Medio (horas). Intervalo de confianza (95 %) | | | | |
|------------------|---|--|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | TL50 (0,15 g/ml) | TL50 (0,20 g/ml) | TL50 (0,25 g/ml) | TL50 (0,30 g/ml) | TL50 (0,35 g/ml) |
| Éter de petróleo | - | - | 1 h 30 min | - | - |
| Diclorometano | - | - | - | - | 2 h 19 min |
| Acetato de etilo | - | - | 12 min (58 min – 23 seg) | - | - |
| Acetona | 2 h (1 h 17 min - 2 h 15 min) | - | - | - | - |
| Metanol | 4 h 5 min (1 h 07 min - 21 h 13 min) | 2 h 51 min (2 h 07 min- 3 h 50 min) | 1 h 40 min (2 min - 5 h 42 min) | - | - |
| Etanol | 2 h 17 min (2 h-3 h 20 min) | 1 h 10 min (5 min – 3 h 23 min) | 1 h 08 min (48 min - 1 h 30 min) | - | - |
| Infusión | - | - | - | - | - |
| Cocimiento | - | - | - | - | - |

Tabla 3.30- Tiempo letal medio (horas) (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de *P. crenata* en *O. surinamensis*.

1.4- *Ulomoides dermestoides* (Fairm.)

La mortalidad observada sobre *Ulomoides dermestoides* de las diferentes fracciones de *P. crenata* fue en orden decreciente la siguiente: etanol, acetona, acetato de etilo, metanol, diclorometano, éter de petróleo, cocimiento e infusión (Tablas 3.36, 3.34, 3.33, 3.35, 3.32, 3.31, 3.38 y 3.37 respectivamente). Si consideramos una mortalidad relevante a partir del 80%, la fracción etanol presenta una mortalidad del 82% para una concentración de 0,25 g/ml y 94% para la concentración 0,35 g/ml en la primera observación (0,5 h), no observándose diferencia significativa entre los tratamientos T3, T4 y T5. A partir de las 6 h hasta las 72 h la mortalidad aumenta de 80% a 100% sin diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos para cada momento de observación.

La fracción acetona produce una mortalidad del 82% con una concentración de 0,30 g/ml (T4) a las 18 h y 24 h. A partir de las 48 h el tratamiento T2 logra una mortalidad del 80% y el tratamiento T1 a partir de las 72 h logra una mortalidad del 84%, en ambos casos sin diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

El comportamiento del acetato de etilo es similar al de la acetona a partir de las 18 h. A las 72 h el tratamiento T2 alcanza el 84% sin diferencias estadísticamente significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 3.33).

Los extractos de metanol produjeron un efecto de volteo a las 0,5 h, observándose una recuperación de los individuos a lo largo del tiempo hasta las 24 h, luego se observó un aumento de la mortalidad sin alcanzar los porcentajes obtenidos en los primeros minutos de observación (Tabla 3.35).

La mortalidad de *U. dermestoides* con los extractos de éter de petróleo y diclorometano no superó el 68% con la máxima concentración (0,30 g/ml). Para el extracto de diclorometano, los tratamientos T4 y T5 superaron el 60% de mortalidad a partir de las 18 h, el tratamiento T3 logra el 60% a partir de las 24 h. Para ambos

extractos no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T3, T4 y T5 a lo largo de todas las observaciones.

Los extractos obtenidos por cocimiento e infusión no logran una mortalidad mayor al 18% y 26% respectivamente con la mayor concentración (0,35 g/ml) y a las 72 h de haber comenzado la observación. A partir de las 12 h no se observan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada momento de observación a partir de las 12 h.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 | 8 ab | 14 ab | 18 ab | 24 b | 28 b | 35 b |
| T2 | 0 | 10 abc | 20 ab | 26 b | 34 bc | 38 bc | 44 bc |
| T3 | 0 | 30 bc | 36 bc | 38 bc | 46 cd | 48 bcd | 50 bcd |
| T4 | 0 | 32 bc | 46 c | 50 c | 52 cd | 58 cd | 60 cd |
| T5 | 0 | 30 c | 54 c | 58 c | 62 d | 66 d | 68 d |
| F | 0 | 7,38 | 14,53 | 21,48 | 20,35 | 22,19 | 21,61 |

Tabla 3.31- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **éter de petróleo** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 6 ab | 14 ab | 14 ab | 24 b | 32 b | 18 a | 14 a |
| T2 | 20 bc | 30 bc | 30 bc | 48 c | 54 c | 54 b | 54 b |
| T3 | 24 bc | 46 cd | 46 cd | 58 cd | 60 c | 62 b | 62 b |
| T4 | 30 c | 50 d | 50 d | 60 cd | 64 c | 66 b | 68 b |
| T5 | 30 c | 56 d | 56 d | 66 d | 68 c | 68 b | 68 b |
| F | 14,67 | 29,94 | 29,94 | 43,70 | 28,97 | 20,13 | 36,76 |

Tabla 3.32- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **diclorometano** de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna.

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 12 b | 48 b | 56 b | 60 b | 66 b | 72 b | 7 b |
| T2 | 16 b | 54 b | 60 bc | 62 b | 74 bc | 80 b | 84 bc |
| T3 | 22 b | 62 b | 70 bc | 72 bc | 78 bc | 84 c | 84 bc |
| T4 | 40 c | 62 b | 72 bc | 76 bc | 80 c | 86 bc | 90 c |
| T5 | 60 d | 66 b | 76 c | 80 | 82 c | 86 c | 96 c |
| F | 32,69 | 35,23 | 55,86 | 62,68 | 99,47 | 162,51 | 141,94 |

Tabla 3.33- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetato de etilo** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 56 b | 56 b | 60 b | 62 b | 68 b | 74 b | 84 b |
| T2 | 60 b | 66 b | 68 bc | 70 bc | 74 bc | 80 bc | 86 bc |
| T3 | 66 b | 70 b | 74 bc | 74 bcd | 76 bc | 88 c | 92 bc |
| T4 | 70 b | 74 b | 78 c | 82 cd | 84 c | 88 c | 92 bc |
| T5 | 70 b | 76 b | 78 c | 84 d | 86 c | 90 c | 96 c |
| F | 8,63 | 13,32 | 61,46 | 98,72 | 130,93 | 134,76 | 228,20 |

Tabla 3.34- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **acetona** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 70 b | 22 ab | 22 ab | 22 a | 22 ab | 24 ab | 24 ab |
| T2 | 80 b | 16 ab | 12 ab | 12 a | 12 a | 16 a | 64 bc |
| T3 | 88 b | 38 ab | 42 ab | 42 ab | 42 ab | 46 ab | 54 bc |
| T4 | 78 b | 36 ab | 38 ab | 40 ab | 40 ab | 44 ab | 50 abc |
| T5 | 80 b | 36 ab | 44 ab | 44 ab | 48 ab | 74 b | 74 c |
| F | 30,12 | 3,79 | 2,99 | 4,83 | 3,76 | 5,10 | 7,07 |

Tabla 3.35- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **metanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 28 b | 46 b | 44 b | 48 b | 56 b | 66 b | 64 b |
| T2 | 78 c | 80 c | 80 c | 82 bc | 82 bc | 83 b | 83 bc |
| T3 | 82 c | 84 c | 84 c | 86 c | 86 bc | 92 b | 94 bc |
| T4 | 92 c | 100 c | 100 c | 100 c | 100 c | 100 b | 100 c |
| T5 | 94 c | 100 c | 100 c | 100 c | 100 c | 100 b | 100 c |
| F | 46,17 | 31,20 | 23,57 | 26,77 | 27,31 | 14,89 | 27,62 |

Tabla 3.36- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **etanol** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 a | 2 a | 8 ab |
| T2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 a | 2 a | 8 ab |
| T3 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 ab | 8 ab | 10 b |
| T4 | 0 | 0 | 4 | 6 | 6 ab | 10 b | 16 b |
| T5 | 0 | 0 | 8 | 8 | 10 b | 14 b | 18 bc |
| F | 0 | 0 | 1,52 (n.s.) | 1,21 (n.s.) | 1,27 | 0,83 | 0,67 |

Tabla 3.37- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **infusión** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--------------------|------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T0 | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 | 0 a | 0 a | 0 a | 2 a | 2 a | 8 ab | 9 ab |
| T2 | 0 a | 4 ab | 8 ab | 8 ab | 8 ab | 10 ab | 12 ab |
| T3 | 0 a | 4 ab | 8 ab | 8 ab | 8 ab | 12 ab | 14 ab |
| T4 | 0 a | 0 a | 10 ab | 8 ab | 8 ab | 14 ab | 16 ab |
| T5 | 2 a | 4 ab | 8 b | 14 b | 14 b | 22 b | 26 b |
| F | 1,0 (n.s.) | 1,15 | 0,63 | 1,11 | 1,84 | 1,65 | 1,97 |

Tabla 3.38- Mortalidad (%) de *Ulomoides dermestoides* por las diferentes concentraciones de la fracción **cocimiento** de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (5:24; 0,05) y test de Tukey. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de la columna

1.4.1- Concentración letal media (CL50)

En relación con la concentración letal media (CL50), los extractos de acetato de etilo son los más efectivos con una concentración de 0,11 g/ml a las 18 h; 0,066 g/ml a las 48 h y de 0,077 a las 72 h. La CL50 para el extracto de etanol es 1,35 g/ml a las 48 h (Tabla 3.39).

| Concentración Letal Media (g/ml) en cada momento de observación. Intervalo de confianza (95 %) | | | | | | | |
|--|-------------------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|---|--|
| Fracción | CL50 (0,5 h) (g/ml) | CL50 (6 h) (g/ml) | CL50 (12 h) (g/ml) | CL50 (18 h) (g/ml) | CL50 (24 h) (g/ml) | CL50 (48 h) (g/ml) | CL50 (72 h) (g/ml) |
| Éter de petróleo | | | | 0,30 (0,28 - 0,35) | | 0,25 (0,23 - 0,28) | 0,23 (0,20 - 0,26) |
| Diclorometano | | | | 0,23 (0,21 - 0,26) | | 0,22 (0,17 - 0,28) | 0,22 (0,16 - 0,30) |
| Acetato de etilo | | | | 0,11 0,05 - 0,151) | | 0,066 (0,0023 - 0,110) | 0,077 (0,031 - 0,109) |
| Acetona | 1,25 (0,42 - 1,69) | | | | | 0,62 (0,13 - 1,023) | |
| Metanol | 0,73 (0,20 - 1,09) | | | | | 2,46 (2,24 - 2,69) | |
| Etanol | 1,64 (0,81 - 2,03) | | | | | 1,35 (1,18 - 1,48) | |
| Infusión | | | | | | | 14,79 (7,28- 22,56) |
| Cocimiento | | | | | | | 6,07 (5,34- 10,45) |

Tabla 3.39- Concentración letal media (CL50) para cada fracción y momento de observación en *U. dermestoides*

1.4.2-Tiempo Letal medio (TL50)

Los extractos de acetona, etanol y acetato de etilo son los que logran un mejor tiempo letal medio: 1h 05 min, 1 h 22 min y 3 h 28 min, respectivamente (Tabla 3.40). En el caso de las fracciones de cocimiento e infusión, el tiempo efectivo medio (TL50) ha superado, en ambos casos, las 72 horas para lograr la mortalidad del 50% de la población.

| Fracción | Tiempo Letal Medio (horas). Intervalo de confianza (95 %) | | | | |
|------------------|---|---|---------------------|---------------------|--|
| | TL50 (0,15 g/ml) | TL50 (0,20 g/ml) | TL50 (0,25 g/ml) | TL50 (0,30 g/ml) | TL50 (0,35 g/ml) |
| Éter de petróleo | - | - | - | - | 9h 37 min (4h 26 min- 16h 21 min) |
| Diclorometano | - | - | - | - | 4h 21 min (1h 45 min- 7h 37 min) |
| Acetato de etilo | | | | | 3h 28 min (1h 08 min- 5h 11 min) |
| Acetona | | | | | 1h 05 min (29 min 24 seg- 2h 24 min) |
| Metanol | - | - | - | - | 16h 41 min (12h – 22h 18 min) |
| Etanol | - | 1h 22 min (03 min- 4h 30 min) | - | - | - |
| Infusión | - | - | - | - | - |
| Cocimiento | - | - | - | - | - |

Tabla 3.40- Tiempo letal medio (horas) (TL50) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de la concentración de los extractos de *P. crenata* en *U. dermestoides*

1.5- Discusión

De acuerdo con los resultados obtenidos con el método del film se obtiene la concentración letal (CL50). Para el extracto metanólico se produce la mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae* a las 12 h con una concentración de 0,19 g/ml y de *U. dermestoides* a las 0,5 h con una concentración de 0,13 g/ml. Latif *et al.* (2000) observaron el efecto letal de los extractos metanólicos de *Quassia* sp. sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acarina: Tetranychidae) y *Myzus persicae* (Sulz) (Hemiptera: Aphididae) con resultados promisorios. Por otro lado, el extracto etanólico logra la mortalidad del 50% de la población de *U. dermestoides* a las 0,5 h con una concentración de 1,64 g/ml, de *T. castaneum* a las 0,5 h con una concentración de 1,94 g/ml, de *O. surinamensis* a las 6 h con una concentración de 1,23 g/ml y de *S. oryzae* a las 12 h con una concentración de 0,90 g/ml. El extracto acetónico produce el mismo efecto sobre *U. dermestoides* a las 0,5 h con una concentración de 1,25 g/ml y sobre *O. surinamensis* a las 0,5 h con una concentración de 1,67 g/ml. El extracto de acetato de etilo produce la mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae* a las 6 h con una concentración de 1,48 g/ml

Los extractos obtenidos por infusión y cocimiento tienen una tendencia a lograr un bajo porcentaje de mortalidad en particular sobre *U. dermestoides* y *O. surinamensis*, mientras que en el caso de *T. castaneum* se logra una mortalidad de 70% con el extracto obtenido por infusión a las 48 h con una concentración de 0,35 g/ml y con el obtenido por cocimiento se logra una mortalidad de 74% para la misma concentración. Para *S. oryzae* con el extracto obtenido por infusión se observa a las 72 h una mortalidad del 72% con una concentración de 0,30 g/ml y 76% con una concentración de 0,35 g/ml. Para este mismo tratamiento se observa un efecto de volteo del 60% de la población de insectos a las 0,5 h con una concentración de 0,15 g/ml, luego, los individuos se recuperan a lo largo de la experiencia logrando una mortalidad final del 30% a las 72 h. Para la misma especie, el extracto obtenido por cocimiento produce el volteo del 94% de la población con una concentración de 0,15 g/ml, el efecto disminuye a lo largo del tiempo, siendo la mortalidad final del 6% a las 72 h. Una situación similar ocurre con *U. dermestoides* con los extractos metanólicos, a las 0,5 h se observa un efecto de volteo en un rango de porcentaje de 70% a 80% para los tratamientos T1

al T5; sin embargo, la mortalidad al cabo de 72 h fue en un rango de 24% a 74% para los mismos tratamientos. Según la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizante (CASAFE), los insecticidas de origen vegetal como los piretroides, que luego fueron sintetizados en el laboratorio, se caracterizan por producir la paralización del insecto que produce un efecto de volteo o “*knock down*”, seguidas de convulsiones y, finalmente producen la muerte. Sin embargo, puede ocurrir una detoxificación en los organismos resistentes por lo que el volteo no siempre es seguido de la muerte del insecto.

En relación al tiempo letal medio, se produce la mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* entre 10 minutos y una hora con los tratamientos de 0,15 g/ml y 0,20 g/ml. Sin embargo, *U. dermestoides* para lograr el mismo tiempo letal medio necesita una mayor concentración de los extractos. En estos tres coleópteros se observa una respuesta diferencial entre ellos que podría deberse a diferencias en el tamaño de las especies. Mientras que *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* son especies pequeñas poseen una longitud similar entre 3 y 4 mm. *U. dermestoides*, de mayor tamaño, mide entre 4 y 10 mm. Esta diferencia en el tamaño de las especies se manifiesta en los resultados especialmente cuando los tratamientos se realizan con el cocimiento y la infusión.

La acción de los extractos naturales o de los aceites esenciales sobre las plagas de granos almacenados fue estudiada por diversos autores. Ko Ko *et al.* (2010) aplicaron, por el método de fumigación, los aceites esenciales de *Litsea salicifolia* Roxb. ex Wall. (Lauraceae) sobre *S. oryzae* y *T. castaneum* y observaron mayor respuesta en la primera plaga en relación a la segunda. Stefanazzi *et al.* (2011) estudiaron la bioactividad de los aceites esenciales de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae), *Cymbopogon citratos* Stapf (Poaceae) y *Elyonurus muticus* (Spreng) (Poaceae) sobre adultos de *T. castaneum* y *S. oryzae*, comprobaron una menor toxicidad por contacto sobre *T. castaneum*. Por otro lado, Shaaya *et al.* (1997) observaron una mayor resistencia de *T. castaneum* a los aceites esenciales de diversas hierbas, en relación con otras plagas de granos almacenados como *Rhyzoperta dominica* (F.), *S. oryzae* y *O. surinamensis*. Los resultados obtenidos coinciden con los trabajos anteriores en relación a una mejor respuesta de *S. oryzae* cuando los extractos de *P. crenata* son de acetato de etilo a

concentraciones mínimas. Por el contrario, Huang y Ho (1998) estudiaron la toxicidad de los compuestos fenólicos, mediante el método de fumigación a través de un extracto de casia, *Cinnamomum aromaticum* Ness (Papilionaceae), que contiene cinamaldehído; se probó sobre adultos y larvas de *T. castaneum* y adultos de *S. oryzae*, el efecto fue mayor sobre *T. castaneum* que sobre *S. oryzae*. Del mismo modo, Suthisut *et al.* (2011) testearon por fumigación el efecto de ocho aceites esenciales de tres especies de Zingiberaceae: *Alpinia conchigera* Griff., *Zingiber zerumbet* L. Roscoe ex Sm. y *Curcuma zedoaria* (Chritm) Roscoe sobre *T. castaneum* y *S. oryzae*, la primera resultó más susceptible que la segunda.

En este estudio, las plagas de granos almacenados fueron afectadas con un amplio rango de mortalidad con los extractos de éter de petróleo y diclorometano de *P. crenata*. La mortalidad fue de 2 a 10% con la dosis más baja de 0,15 g/ml y de 70% con la dosis de 0,35 g/ml. En general, con el extracto de acetato de etilo se observa a las 6 h una mortalidad de 60% con una concentración de 0,30 g/ml y de 100% con una concentración de 0,35 g/ml, mientras que a las 72 h la mortalidad es de 96% a 98% para las mismas concentraciones. En experiencias realizadas utilizando *P. crenata* sobre otros grupos de insectos, se observaron similar tendencia en los resultados. Rodríguez *et al.* (2009) realizaron experiencias sobre *Caliothrips phaseoli* Hood (Thysanoptera: Thripidae) utilizando extractos no polares como éter de petróleo y diclorometano. Como resultado produjeron una mortalidad de 40% para el primero, no registrándose mortalidad para el segundo. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2006) realizaron experiencias sobre hormigas podadoras (*Acromyrmex lundii* (Guerín)- Hymenoptera: Formicidae) con estos extractos obtenidos con acetato de etilo y por infusión. Si bien se obtuvieron diferencias significativas con el testigo (alimento azucarado sin extracto), la mortalidad fue de 40% y 20% para cada uno de los extractos mencionados y con una CL50 de 4,37 mg/cm². Sin embargo, se testearon los extractos de éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo de *P. crenata* sobre *Myzus persicae* con resultados promisorios sobre esta plaga. Se logró una mortalidad al cabo de 48 h de 75%, 90% y 100% respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2011).

1.6- Conclusiones

En general se observa un aumento de la mortalidad producida por los extractos de *P. crenata* al aumentar la polaridad de los solventes de extracción y un mayor porcentaje de mortalidad sobre las especies *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Los extractos de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol muestran una alta mortalidad en todas las concentraciones, mientras que en aquellos extractos con solventes de menor polaridad (éter de petróleo y diclorometano) la mortalidad se manifiesta a altas concentraciones.

En relación a la concentración letal 50 (CL50), las dosis más elevadas para lograr la mortalidad del 50% de la población de insectos se observa con los extractos de éter de petróleo y diclorometano para las especies *T. castaneum*, *S. oryzae* y *O. surinamensis*. Sin embargo, estos extractos no polares para *U. dermestoides* actúan con bajas concentraciones. Cuando se realizan experiencias de este tipo es pertinente considerar variables como el tamaño, el peso y el comportamiento de las especies como su identificación en el momento de realizar un control ya sea preventivo o curativo. En el resto de los extractos la CL50 disminuye con el aumento de la polaridad de los solventes como acetona, acetato de etilo, etanol y metanol. Los extractos más efectivos no son sólo aquellos que logran una mortalidad del 50% de la población con las concentraciones más bajas, sino que, además, lo realizan en un corto período.

El efecto de volteo es relevante desde el punto de vista del control, porque nos permite realizar un tratamiento conjunto con un insecticida convencional, con la posibilidad de aplicar una dosis baja de este insecticida y la consecuencia de una menor contaminación del ambiente.

2- Mortalidad de los adultos de *Tribolium castaneum* por efecto de los extractos de *Picrasma crenata* sobre la ingesta

En las siguientes experiencias sólo se consideró a *Tribolium castaneum* (remitirse a la página 61, punto 2.1.2)

2.1- Extracto de etanol

En este tratamiento se observaron diferencias significativas en la mortalidad respecto del tratamiento testigo, pero no entre las dosis de los extractos de etanol probadas (Figura 3.1). Las dosis 1 y 2 de este compuesto produjeron una mortalidad acumulada de 70% y 90% respectivamente de los adultos de *T. castaneum*.

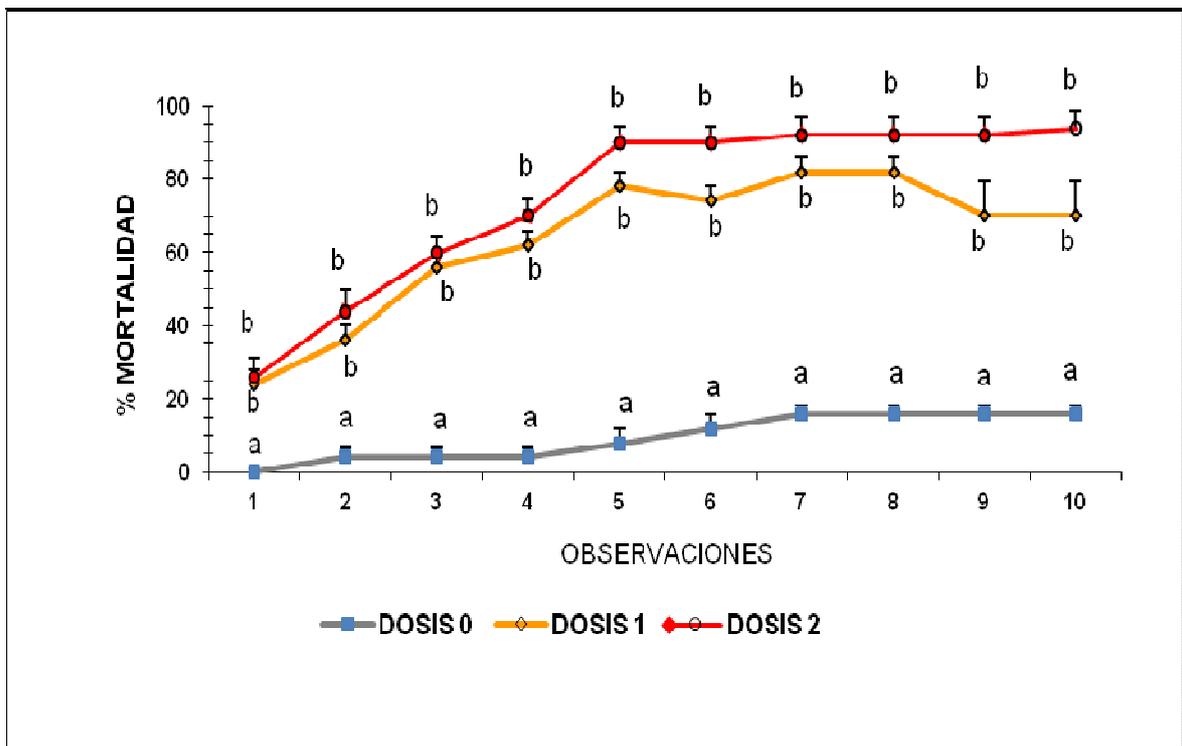


Figura 3.1: Mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por el efecto de los extractos de etanol de *P. crenata*.

Letras diferentes implican diferencias significativas, en cada momento de la observación. Las barras corresponden al error estándar (K. Wallis y pruebas a posteriori).

2.2- Extracto de acetato de etilo

Se observó durante el tratamiento, diferencias significativas entre el testigo y las dosis probadas, pero no entre éstas (Figura 3.2). Las dosis 1 y 2 alcanzaron una mortalidad acumulada de 30 y 40% respectivamente.

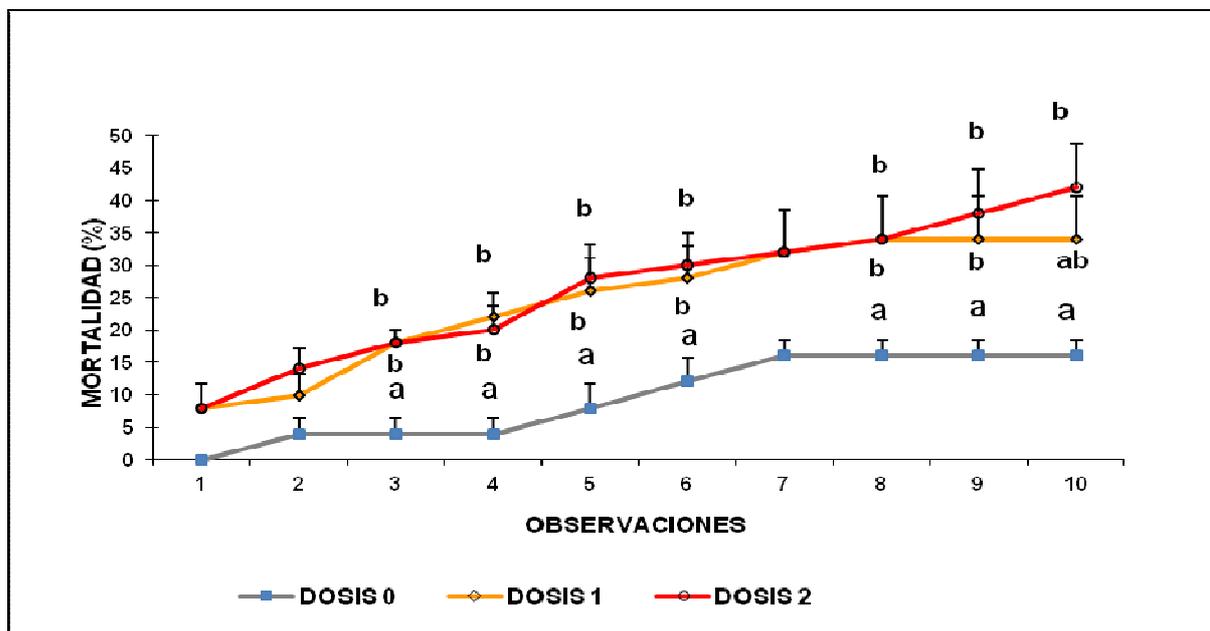


Figura 3.2: Mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por el efecto de los extractos de acetato de etilo de *P. crenata*.

Letras diferentes implican diferencias significativas dentro de cada momento de la observación. Las barras señalan el error estándar (K. Wallis y pruebas a posteriori)

2.3- Extracto de acetona

Ambas dosis presentan diferencias significativas con el tratamiento testigo hasta la quinta observación en relación a la mortalidad de individuos. A partir de la sexta, solamente el tratamiento 2 presenta diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento testigo.

La mortalidad acumulada fue de 45% y de 70%, para la dosis 1 y 2 respectivamente (Figura 3.3).

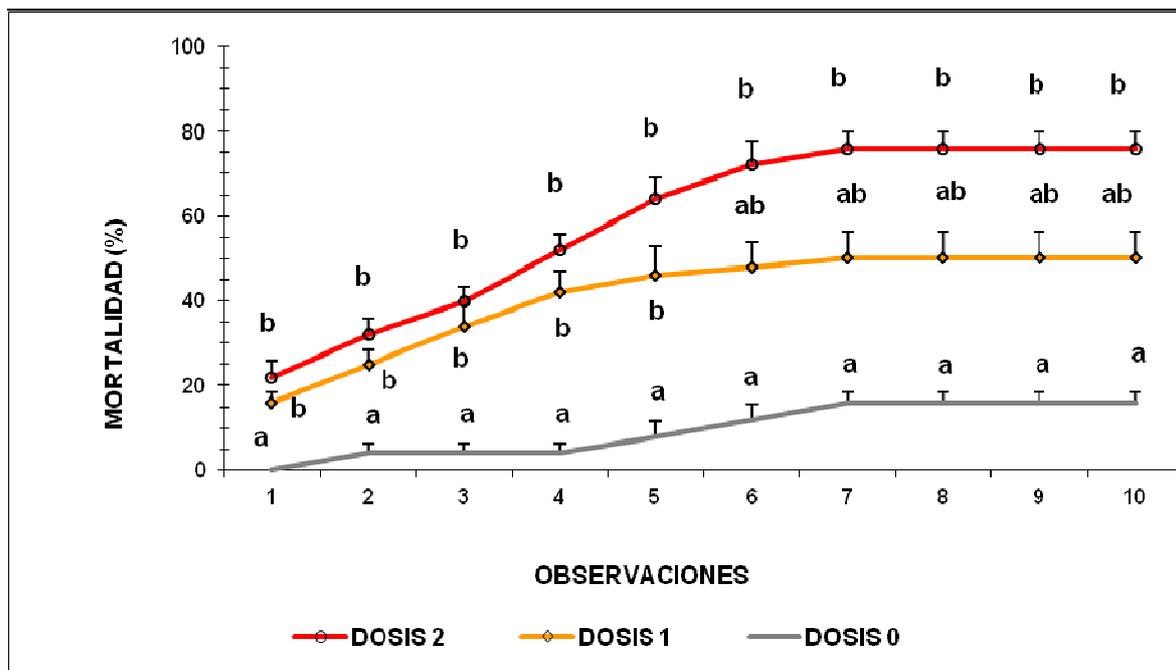


Figura 3.3: Mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por el efecto de los extractos de acetona de *P. crenata*. Letras diferentes implican diferencias significativas. Las barras señalan el error estándar (K. Wallis y pruebas a posteriori)

2.4- Discusión

De los tres extractos probados, el etanol fue el más efectivo, seguido por los extractos de acetona y acetato de etilo (Figura 3.1, 3.2 y 3.3).

En los casos que las dosis empleadas no superaron el 70% de mortalidad sería posible su uso acompañado por un insecticida convencional, con el fin de disminuir la dosis indicada en el marbete, por consiguiente, se reduce la contaminación ambiental ya que debido a la mezcla producida disminuye la concentración del insecticida en el medio. Esta acción sinérgica se obtiene cuando se produce la asociación entre compuestos con acción pesticida y otro compuesto, el sinergista, reconocido como relativamente no tóxico. La presencia de este último en la mezcla permite al pesticida actuar a dosis menores que la correspondiente a su toxicidad (Philogène, 2004). El “palo amargo” utilizado por sus propiedades medicinales y antifúngicas, es relativamente inocuo para el ambiente y los seres humanos, por tal motivo sería interesante estudiar si presenta propiedades sinérgicas con los insecticidas convencionales.

La susceptibilidad de *T. castaneum* ha sido ampliamente comprobada ante los aceites esenciales y los extractos de origen vegetal incorporados a su dieta. Pascual-Villalobos (1996) incorporó extractos crudos de *Chrysanthemum coronarium* L. (Asteraceae) a la dieta de *T. castaneum* y obtuvo una mortalidad de 60% y 100% para dosis de 0,1% y 0,5%, respectivamente. Steffanazzi *et al.* (2005) observaron que el aceite esencial de hojas de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae) afectó la ingesta y la nutrición en adultos de *T. castaneum* mientras que Pungitore *et al.* (2005) estudiaron el efecto de los triterpenos de *Mulguraea aspera* var. *aspera* (Gill et Hook.) ex Hook (Verbenaceae) sobre *T. castaneum* los que actúan como tóxicos agudos cuando son incorporados en el alimento.

El efecto de los cuasinoides presentes en las especies de Simaroubaceae ha sido estudiado por varios autores. Beserra Almeida *et al.* (2007) mencionaron que los cuasinoides han demostrado su actividad como disuasivos de la alimentación, sobre la oruga del tabaco *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae). Estos cuasinoides son indaquassina C y samaderina A, B y C, aislados de *Samadera indica* Gaertn (Simaroubaceae), estos fueron más activos a una concentración de 0,5 g/cm³, en comparación con la conocida acción antialimentaria de azadiractina. Este triterpeno y sus derivados presentan efecto antialimentario, repelente, insecticida, regulador del crecimiento y son causantes de esterilidad en hembras adultas (Allan *et al.*, 2002).

Soto *et al.* (2011) demostraron el efecto fagodisuasivo de las fracciones de metanol y éter dietílico del extracto de *Quassia amara* sobre las larvas de *Hypsipyla grandella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae).

La mayor parte de los productos descritos con actividad antialimentaria lo son también para otras propiedades biológicas, entre las que aparecen con frecuencia una actividad insecticida o, incluso, alteraciones hormonales. La inhibición de la ingesta alimentaria, incluso aunque sea fácilmente observable y cuantificable, probablemente sea la traducción o, al menos, la consecuencia de una actividad biológica ampliamente más compleja que la simple emisión de un mensaje de alerta como consecuencia del reconocimiento de una molécula a nivel de los receptores gustativos del insecto (Ducrot, 2004).

2.5- Conclusiones

Si bien *P. crenata* responde a las características generales de las Simaroubaceae en cuanto a sus propiedades, los estudios deberían orientarse hacia el aislamiento de los cuasinoides específicos de esta especie y corroborar o ampliar la información que se posee.

3- Duración de los estados juveniles de *Tribolium castaneum* por efecto de los extractos de *Picrasma crenata* sobre la ingesta y su relación con los reguladores del crecimiento

La mayoría de los insecticidas actúan interfiriendo sobre el sistema nervioso de los insectos o con algunas de sus funciones como, por ejemplo, la regulación hormonal en el proceso de muda. Estos insecticidas son seguros cuando se aplican según las instrucciones del marbete, sin embargo, las aplicaciones incorrectas o el mal uso de estos productos puede afectar adversamente el sistema nervioso. Para aumentar la seguridad y reducir el peligro de una mala aplicación se han buscado nuevos enfoques para el control de los insectos, utilizando métodos que interfieran con sus sistemas vitales y que no actúen sobre los vertebrados. Los reguladores de crecimiento de insectos (IGRs) son hormonas que interfieren con los procesos y con las hormonas naturales que influyen en el crecimiento y desarrollo ocasionando deformidades y muerte. Son una de las clases más nuevas de insecticidas que actúan sobre el ciclo de madurez que resulta en el adulto, interrumpiendo la muda o mudando indefinidamente sin llegar a alcanzar el estado adulto, en ambos casos la muerte es inminente. Por otro lado, los inhibidores del desarrollo de los insectos (IDIs) interfieren con la formación de una nueva cutícula, ocasionando rompimiento o malformaciones durante la muda. La quitina es una sustancia que se encuentra solamente en los artrópodos y los hongos. Entre los compuestos que actúan inhibiendo la formación de quitina se encuentran los derivados de benzoilureas (Marinoff, 2001). Con el fin de observar si *P. crenata* puede actuar como regulador de crecimiento, se llevó a cabo esta experiencia, en donde se comparó su acción con la de los reguladores de crecimiento Lufenurón y Novalurón.

Se observó el efecto de los extractos de acetato de etilo, acetona y etanol de *P. crenata* adicionados a la dieta base de las larvas de *T. castaneum*.

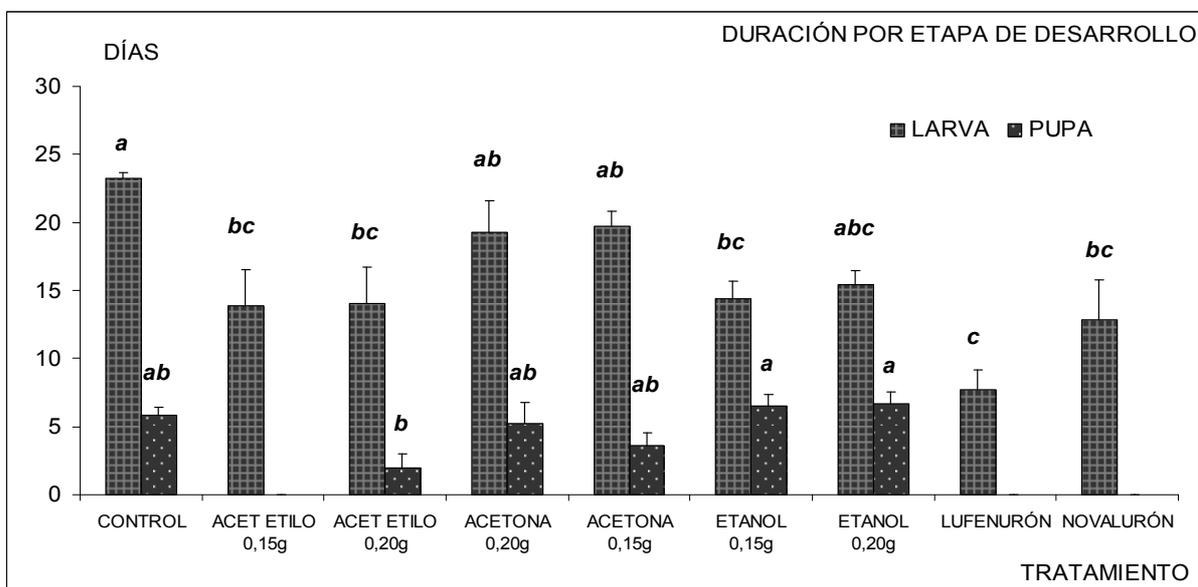


Figura 3.4: Duración del período larval y pupal de *T. castaneum* en relación al efecto de los reguladores de crecimiento, Lufenurón y Novalurón (K. Wallis) larvas (H=26,01; p=0,0002); pupas (H=6,29; p=0,0653)

En general, durante el desarrollo del período larval, la acción de los extractos de *P. crenata* sobre *T. castaneum* mostraron diferencias significativas con el control pero no con el regulador de crecimiento Novalurón con una duración menor de este período. En particular se observa que los extractos de acetato de etilo y de etanol, para ambas dosis, tienen un comportamiento similar al Novalurón,

No se observan diferencias significativas en la duración del período pupal de *T. castaneum* entre la acción de los extractos y el tratamiento control. Sin embargo, los individuos que ingirieron una dieta base tratada con extracto de acetato de etilo de *P. crenata*, con una dosis de 0,15 g/ml, no alcanzaron el estado de pupa; esto sugiere que podría tener un efecto similar al de ambos reguladores de crecimiento. Para la dosis de 0,2 g/ml, el 3% de los individuos pasaron al estado pupal, pero su duración fue muy exigua, sin alcanzar el estado adulto. Este estado se caracterizó por la presencia de individuos deformados o de menor tamaño (Figura 3.4).

3.1- *Discusión*

De acuerdo con la bibliografía consultada se puede afirmar que los sesquiterpenos, más específicamente los cuasinósidos, interfieren en el normal desarrollo de las formas juveniles, se logran pupas deformadas y, por consiguiente, el aborto de los individuos adultos. Franklin y Fontenot (2012) observaron la acción de Metopreno y Novalurón sobre *T. castaneum* y *T. confusum*, en este trabajo confirman la menor emergencia en la primera progenie de adultos normales y deformados con el regulador de crecimiento Novalurón.

Otros sesquiterpenos, como el cariofileno y el bisaboleno, y los sesquiterpenolactonas, como la achilina y la partenina, han demostrado ser inhibitoras del crecimiento (Skaltsa *et al.*, 2003).

Una solución acetónica de tres withanólidos obtenida de tres especies de Solanaceae, *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn., *Salpichroa organifolia* (Lam.) Baill. y *Datura ferox* L. fue incorporada a la dieta de las larvas neonatas de *T. castaneum*, en una concentración de 500 ppm. Los tres produjeron retraso en el crecimiento (Mareggiani *et al.*, 2000). En la experiencia realizada se observa el efecto del extracto de acetona sobre larvas de *T. castaneum*, si bien disminuye el período larval en relación al control tiene una acción similar al regulador de crecimiento Nuvalurón, en relación a la duración del período larval (Figura 3.4). Se observan diferencias significativas con el regulador Lufenurón porque la duración del período larval con este regulador es significativamente menor. Con el extracto de acetona un porcentaje de las larvas empupa mientras que con los reguladores ninguna larva pasa al estado de pupa.

Asimismo, Kanvil *et al.* (2006) probaron el efecto de los extractos orgánicos de *Saussurea lappa* Clarke (Asteraceae), *Peganum harmala* L. (Zigofilaceae) y *Valeriana officianalis* L. (Valerianaceae) sobre *T. castaneum* en relación a la inhibición de su crecimiento. Los extractos de éter de petróleo y acetona de *P. harmala* fueron los más efectivos inhibidores del crecimiento. En esta experiencia el extracto de acetona tiene un comportamiento similar al control por lo cual no se coincide con este autor (Figura 3.4).

Se ha estudiado la actividad antialimentaria e insecticida de 16 cuasinósidos de *Picrasma ailanthoides* Planchon sobre larvas del tercer estadio de desarrollo de *Plutella xylostela* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), una plaga primaria en plantas de la familia Brassicaceae. Se destacaron tres compuestos: cuasina y picrasina B y D por su elevado potencial antialimentario e insecticida; en cuanto a picrasina G mostró moderada actividad antialimentaria a altas concentraciones (Beserra Almeida *et al.*, 2007).

Además, se conoce el efecto de los reguladores de crecimiento como el S-methoprene sobre adultos de *Rhyzopertha dominica* (F.), con un efecto del 100% sobre la F1 (Edde, 2012). En otra experiencia se ha observado la susceptibilidad de *T. castaneum* al pulverizar diferentes superficies de embalaje con 1% de principio activo de piretrina más 33,6 % de methoprene (Sutton *et al.*, 2011). Elek (1998) pulverizó granos de trigo con un inhibidor de síntesis de quitina, chlorfluazuron, observó la reacción de los adultos y la progenie de *R. dominica* y *S. oryzae*. La preexposición de los adultos mejoró la toxicidad de los inhibidores de la síntesis de quitina sobre la mortalidad de su progenie. Al aumentar la concentración de este regulador del crecimiento, la mortalidad de ambas especies fue mayor (Elek, 1998).

Cuando se observa algún bloqueo en los procesos de metamorfosis que inducen a la inhibición del crecimiento, podría realizarse una evaluación de inhibición de enzimas para determinar sus sitios y mecanismos de acción. Para localizar el sitio de interacción del producto natural se estudia el efecto en las enzimas acetilcolinesterasa, melanina-oxidasa, tirosinasa y glucosa-oxidasa respectivamente. Una vez identificada la enzima que interacciona con el producto natural se efectúan estudios cinéticos, con el objeto de dilucidar si la inhibición es acompetitiva, competitiva o no-competitiva (Céspedes, *et al.*, 2006; 2008; Kubo y Chaudhuri, 1993; Kubo, *et al.*, 2000; 2003a; 2003b; 2008).

3.2- Conclusiones

En esta experiencia se pone de manifiesto que los extractos de acetato de etilo, acetona y etanol de *P. crenata* podrían actuar sobre las plagas de granos almacenados por ingesta, con un efecto similar a los reguladores de crecimiento.

4- Mortalidad por topicación de los adultos de *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* y *Oryzaephilus surinamensis* con los extractos de *Picrasma crenata*

En condiciones controladas de laboratorio se evaluó el efecto de los extractos de acetato de etilo, acetona y etanol de *P. crenata* en la mortalidad por contacto en adultos de *S. oryzae*, *O. surinamensis* y *T. castaneum* mediante topicación en el abdomen (Figura 3.5, 3.6 y 3.7).

De las seis observaciones realizadas sobre *S. oryzae*, en la primera se obtuvieron diferencias significativas en la mortalidad producida por el extracto de acetato de etilo respecto al testigo (Figura 3.5). Esta misma diferencia se manifiesta en la última observación; su resultado (cercano al 50%) no se diferenció del obtenido para el extracto de acetona y ambos presentan diferencia significativa con el control. La mortalidad acumulada no fue diferente entre el extracto de etanol y el testigo (Figura 3.5).

En el caso de *T. castaneum* y *O. surinamensis* la mortalidad acumulada no fue significativamente diferente para ninguno de los extractos, entre sí o respecto al testigo (Figura 3.6 y 3.7).

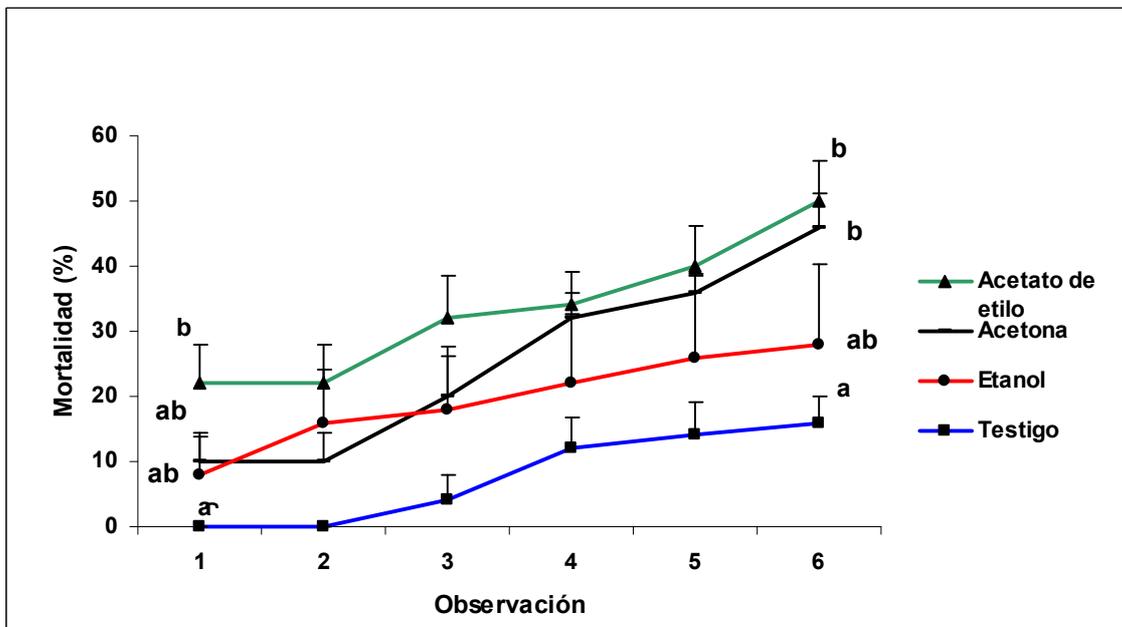


Figura 3.5: Mortalidad de *S. oryzae* por efecto de la topicación con extractos de *P. crenata* (K. Wallis, en forma independiente por momento de lectura y prueba a posteriori) ($\alpha=0,05$) ($H = 8,33$; $p = 0,0363$).

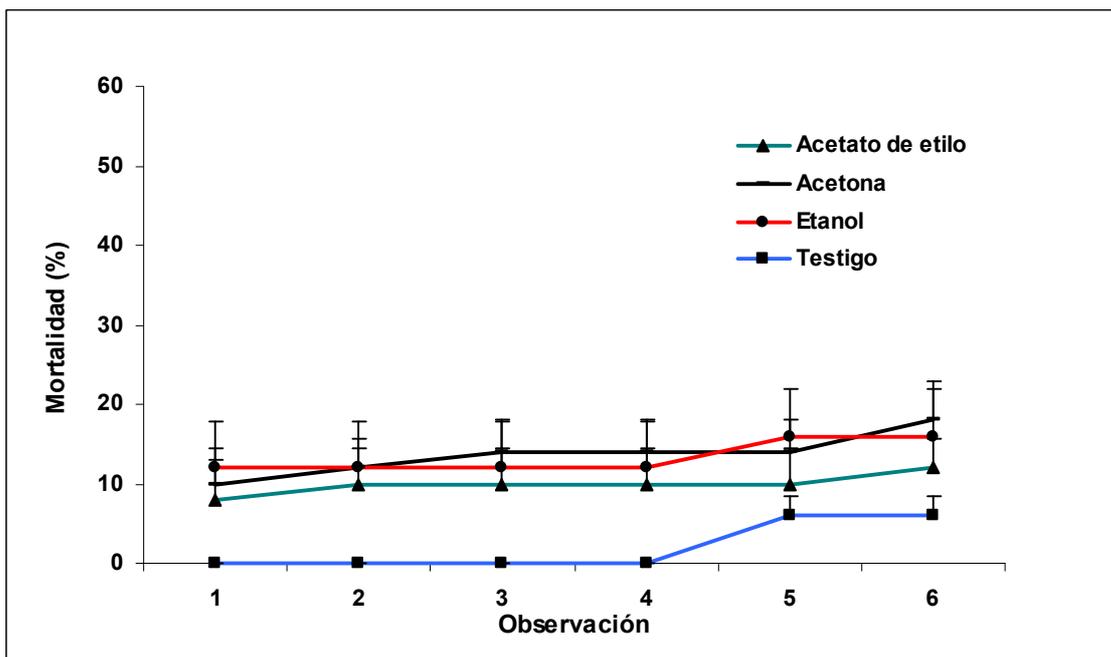


Figura 3.6: Mortalidad de *T. castaneum* por efecto de la topicación con extractos de *P. crenata*. (K. Wallis, en forma independiente por momento de lectura y prueba a posteriori) ($\alpha=0,05$) ($H = 8,33$; $p = 0,0363$).

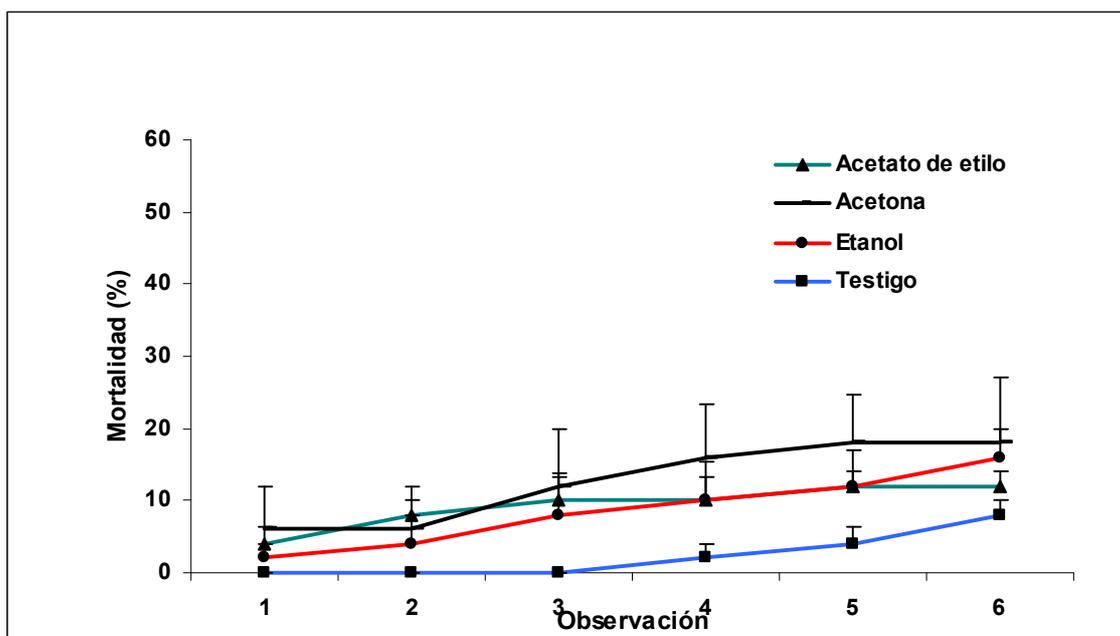


Figura 3.7: Mortalidad de *O. surinamensis* por efecto de la topicación con extractos de *P. crenata*. (K. Wallis, en forma independiente por momento de lectura y prueba a posteriori) ($\alpha=0,05$) ($H = 8,33$; $p = 0,0363$).

En la figura 3.6 y 3.7 no se observan diferencias estadísticamente significativas.

4.1- Discusión

Los resultados de esta experiencia indicaron que la acción por contacto de los extractos de palo amargo es baja, el extracto de acetato de etilo sobre *S. oryzae* es el único que difiere significativamente del testigo al alcanzar una mortalidad del 50%. Huang y Ho (1998) estudiaron la toxicidad de los compuestos fenólicos mediante la aplicación por contacto de un extracto de casia, *Cinnamomum artomaticum* Ness (Papilionaceae), que contiene cinamaldehído sobre adultos de *T. castaneum* y *S. oryzae*. La respuesta por contacto sobre los adultos de ambas especies de insectos fue similar, ambas tuvieron una CL50 de 0,7 mg/cm² y CL95 de 0,9 mg/cm².

Suthisut *et al.* (2011) demostraron que los aceites esenciales de tres especies de Zingiberaceae, *Zingiber zerumbert* Smitt, *Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe y *Alpinia conchigera* Griff son tóxicos al ser aplicados por topicación sobre *S. zeamais* y *T. castaneum*. Lu y Wu (2010) estudiaron la acción de los metabolitos

secundarios del leño de *Ailanthus altissima* Swingle (Simaroubaceae) cuyos extractos fueron aplicados sobre el dorso del protórax de los adultos de *T. castaneum*, *O. surinamensis* y *S. oryzae*, la acción aumentó a lo largo del tiempo y el mayor porcentaje de mortalidad se produjo sobre *S. oryzae*, en coincidencia con el efecto de *P. crenata* sobre *S. oryzae* observado en esta experiencia donde se realizó la topicación sobre las tres plagas claves de granos almacenados.

Liu y Ho (1999) observaron la actividad de los aceites esenciales de *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas (Rutaceae) aplicados por topicación sobre adultos de *S. zeamais* y *T. castaneum*, la primera fue más susceptible que la segunda. Asimismo, Ko *et al.* (2010) estudiaron el efecto de los aceites esenciales de *Licania salicifolia* Cuatrec. (Chrysobalanaceae) aplicados como fumigante y contacto sobre *S. zeamais* y *T. castaneum*, con resultados similares a Liu y Ho. Stefanazzi *et al.* (2011) probaron el efecto de los extractos de *Tagetes terniflora* Kunth (Asteraceae), *Cymbopogon citratus* Stapf (Poaceae) y *Elionurus muticus* (Spreng.) Kuntze (Poaceae) sobre *S. oryzae* y *T. castaneum*, con una mayor respuesta sobre *S. oryzae*. Como se puede observar, en general, hay coincidencia en relación la susceptibilidad de *S. oryzae* a la aplicación de los aceites esenciales y los extractos por topicación. Por otro lado, los autores señalan la efectividad de la metodología por contacto. En la experiencia aquí desarrollada quedó de manifiesto la baja respuesta de las plagas al contacto con los extractos de *P. crenata*.

Otros autores observaron la acción de algunos terpenoides sobre *T. castaneum*. Pungitore *et al.* (2005) concluyeron que los triterpenos de *Junellia aspera* (Gillies & Hook.) Moldenke (Verbenaceae) evaluados sobre adultos de *T. castaneum* actuaron como tóxicos agudos cuando fueron aplicados por topicación. Descamps *et al.* (2011) observaron resultados similares a Pungitore con los aceites esenciales de *Schinus areira* L. (Anarcadiaceae). En esta experiencia se observó que los extractos de *P. crenata* probados sobre *T. castaneum* no produjeron una mortalidad significativa.

Otros sesquiterpenos (eudesmano y eremophilano) aplicados por topicación sobre larvas de *T. castaneum* produjeron deformaciones y mayor duración del estado

pupal (García *et al.*, 2003). Padín *et al.* (2013) observaron una mortalidad de 37% cuando los extractos metanólicos de *Brassica campestris* L. y *Brassica trimera* L. (Brassicaceae) fueron aplicados por topicación sobre adultos de *T. castaneum*, se coincide con los autores en la baja mortalidad obtenida con la metodología por topicación sobre adultos de *T. castaneum*.

4.2- Conclusiones

Como conclusión de los ensayos de los puntos 3 y 4 se observa una acción directa entre el producto aplicado por topicación y el individuo sobre el que se realiza esta aplicación, como fue demostrado por los autores citados. *P. crenata* demostró su acción como regulador de crecimiento al manifestar un efecto similar al Novalurón, por lo tanto puede actuar por ingesta como por contacto. En este caso podría producirse una deposición anormal de la endocutícula y, por consiguiente, no ocurrir la muda o inhibir la síntesis de quitina como lo hace el Novalurón.

5- Mortalidad producida por los extractos de acetato de etilo, etanol y acetona de *Picrasma crenata* en relación con Clorpirifós metil sobre *Tribolium castaneum*

En las siguientes tablas se observa la mortalidad producida por los extractos de acetato de etilo, etanol y acetona, en sus diferentes concentraciones en cada momento de la observación. En el tratamiento 6 (T6) se consideró la concentración efectiva de Clorpirifós metil que aconseja el marbete.

5.1- Acetato de etilo

| Trat/hora | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 (testigo) | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 (0,15 g/ml) | 18 ab | 22 a | 24 b | 28 b | 30 b | 30 ab | 32 ab |
| T2 (0,20 g/ml) | 14 ab | 24 a | 22 b | 26 b | 22 ab | 56 b | 60 b |
| T3 (0,25 g/ml) | 48 bc | 96 b | 100 c |
| T4 (0,30 g/ml) | 32 ab | 82 b | 100 c |
| T5 (0,35 g/ml) | 20 ab | 84 b | 100 c |
| T6 (2,88 10 ⁻⁵ cm ³ /ml) | 78 c | 80 b | 100 c |
| F | 8,84 | 25,10 | 122,92 | 87,61 | 73,35 | 28,87 | 27,64 |
| Valor-p | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

Tabla 3.41- Mortalidad (%) de *T. castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción acetato de etilo de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F ((6:28; 0,05) y test de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, T0 (Testigo): todos los ejemplares permanecieron vivos durante el tiempo que duró la experiencia.

5.2- Etanol

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 (testigo) | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1 (0,15 g/ml) | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 2 a | 4 a | 4 a |
| T2 (0,20 g/ml)) | 0 a | 80 bc | 100 b |
| T3 (0,25 g/ml) | 34 b | 98 c | 100 b |
| T4 (0,30 g/ml) | 26 ab | 92 c | 100 b |
| T5 (0,35 g/ml) | 76 c | 100 c | 100 b |
| T6 (2,88 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ml) | 78 c | 80 c | 100 b |
| F | 31,08 | 32,76 | 64,32 | 98,39 | 140,99 | 125,02 | 112,78 |
| Valor-p | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

Tabla 3.42- Mortalidad (%) de *T. castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción etanol de *P. crenata* para cada momento de observación.

ANOVA F ((6:28; 0,05) y test de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, T0 (Testigo): todos los ejemplares permanecieron vivos durante el tiempo que duró la experiencia.

5.3- Acetona

| Trat./horas | 0,5 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T0 (testigo) | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a | 0 a |
| T1(0,15 g/ml) | 2 ab | 36 ab | 42 ab | 42 ab | 44 ab | 44 ab | 44 ab |
| T2(0,20 g/ml) | 8 ab | 32 a | 42 ab |
| T3(0,25 g/ml) | 42 c | 92 cd | 94 bc | 100 c | 100 c | 100 c | 100 c |
| T4(0,30 g/ml) | 34 bc | 88 bcd | 94 bc | 98 c | 100 c | 100 c | 100 c |
| T5(0,35 g/ml) | 90 d | 98 cd | 100 c |
| T6 (2,88 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ml) | 78 d | 80 d | 100 c |
| F | 29,1 | 10,59 | 9,62 | 11,41 | 11,61 | 11,61 | 14,27 |
| Valor-p | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 | < 0,0001 |

Tabla 3.43- Mortalidad (%) de *T. castaneum* por las diferentes concentraciones de la fracción acetona de *P. crenata* para cada momento de observación. ANOVA F (6:28; 0,05) y test de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas, T0 (Testigo): todos los ejemplares permanecieron vivos durante el tiempo que duró la experiencia.

5.4- Determinación de la Concentración Letal Media (CL50) y el Tiempo Letal Medio (TL50)

La CL50 se ha calculado de acuerdo con los datos de mortalidad. Se detallan los resultados obtenidos del Probit para la CL50, es decir, la concentración letal del 50% de la población para un tiempo determinado de observación.

5.5- Concentración letal media (CL50)

| Fracción/CL50 | CL50 (6 h) | Int. Conf. (95%) |
|------------------|------------|------------------|
| Acetato de etilo | 0,16 | (0,15-0,17) |
| Etanol | 1,38 | (0,90-1,66) |
| Acetona | 1,74 | (1,58-1,88) |

Tabla 3.44- Concentración letal media (g/ml) y sus respectivos intervalos de confianza (95%) en función de los extractos a las 6 horas de observación.

Con el fin de observar el efecto de los extractos en las primeras horas de observación, es decir, un efecto *knock out*, se realizó un análisis de la concentración letal 50 (CL50) con Epa- Probit a las seis horas de comenzado el ensayo. Los extractos de acetato de etilo y etanol logran la mortalidad del 50% de la población con dosis menores. Por este motivo fueron considerados para un análisis de bioequivalencia con el insecticida convencional Clorpirifós metil.

5.6- Bioequivalencia

| Tratamiento | Proporción promedio de mortalidad | Desvío Estandar |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| <i>Acetato de etilo</i> | 0,48 | 0,148324 |
| <i>Etanol</i> | 0,76 | 0,194935 |
| <i>Clorpirifós Metil</i> | 0,78 | 0,083666 |

Tabla 3.45- Proporción promedio y desvío estandar de mortalidad de los tratamientos seleccionados: acetato de etilo, etanol y clorpirifós metil.

5.6.1- Bioequivalencia entre Acetato de Etilo y Clorpirifós Metil

Como dos medias poblacionales nunca van a ser exactamente idénticas, la hipótesis nula usada en la práctica es que: la diferencia entre medias es mayor que algún valor de tolerancia definido. En este trabajo ese nivel de tolerancia se fijó arbitrariamente en 20%, por considerarlo la máxima diferencia aceptable.

La hipótesis de equivalencia es unilateral en este caso, dado que se busca comprobar que el producto experimental no tenga menor eficiencia que el insecticida comercial (hipótesis de no inferioridad):

$$H_0: \theta \geq 0,20$$

$$H_1: \theta < 0,20$$

Donde θ es la diferencia o la relación de las medidas de éxito para el tratamiento experimental y el tratamiento estándar.

$$Z_0 = \frac{\theta - \delta}{SE}$$
$$SE = \left[\frac{Ps(1-Ps)}{Ns} + \frac{Pe(1-Pe)}{Ne} \right]^{1/2}$$

donde $Ns = Ne = 5$

$$Z = (0,78 - 0,48 - 0,20) / 0,23769228$$

$$Z = 0,42071$$

$$\text{Valor - p} = 0,6630161398$$

No se rechaza la hipótesis nula, no hay evidencias suficientes para considerar ambos tratamientos como bioequivalentes.

5.6.2- Bioequivalencia entre Etanol y Clorpirifós Metil

La hipótesis de equivalencia es normalmente unilateral:

$$H_0: \theta \geq 0,20$$

$$H_1: \theta < 0,20$$

$$Z_0 = \frac{\theta - \delta}{SE}$$
$$SE = \left[\frac{Ps(1-Ps)}{Ns} + \frac{Pe(1-Pe)}{Ne} \right]^{1/2}$$

$$Z = (0,78 - 0,76 - 0,20) / 0,0762$$

Z = -2,362

Valor-p= 0,009

Es equivalente para 0,2. Se rechaza la hipótesis nula. Al rechazar la hipótesis de una tolerancia igual o mayor a 0,20, se comprueba la bioequivalencia con un nivel de significación de 5%.

En el análisis clásico (Tabla 3.41) no se detecta diferencia significativa entre los tratamientos T3 y T6 al no rechazarse la hipótesis de igualdad de medias pero esto no indica que las medias sean equivalentes. Este resultado puede ocurrir porque el experimento tiene baja potencia (probabilidad de detectar una verdadera diferencia) debido al número de repeticiones inadecuado o debido a una variancia grande. Por lo tanto, un experimento con inadecuado tamaño de muestra puede resultar en falta de evidencia para una diferencia, más allá de que exista verdadera diferencia entre medias. No se puede acotar el riesgo de error cuando no se rechaza la hipótesis nula en una prueba clásica. Mientras que al plantear las hipótesis de equivalencia, o no inferioridad como en este caso, la equivalencia se comprueba al rechazar la hipótesis nula por lo que el riesgo máximo de cometer el error de declarar equivalentes a dos tratamientos cuando no lo son está dado por el nivel de significación determinado a priori.

6- Efecto de los cuasinoides (cuasina y neocuasina) sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* y *Ulomoides dermestoides*

6.1- Primera Experiencia (Anexo: pág. 109-110)

Efecto de los cuasinoides a través del método por contacto

6.1.1- Ensayo preliminar de las cuatro plagas (dosis 1 ml)

En el ensayo preliminar se observó la eficacia de los diferentes extractos con distintas concentraciones de cuasinoides sobre los adultos de cuatro plagas de granos almacenados. Con los resultados obtenidos se definieron los extractos y la plaga sobre los cuales se desarrollaron las experiencias. Los resultados del tratamiento testigo fueron igual a cero para todas las observaciones, por consiguiente, los datos fueron analizados para la diferencia entre cada tratamiento y el testigo.

Los extractos de *P. crenata* sobre los adultos de *T. castaneum* y *U. dermestoides* no produjeron mortalidad en ninguno de los tratamientos. Sólo se observaron efectos de mortalidad en *S. oryzae* y *O. surinamensis* (Tabla 1 y Tabla 2, anexo)

- ***Oryzaephilus surinamensis* L (Carcoma dentada)**

La figura 3.8 muestra la evolución del tratamiento 3 (mayor proporción de cuasina que neocuasina) a lo largo del tiempo, estabilizándose a las 6 h del comienzo de las observaciones, se observó una mortalidad del 26%. Los datos utilizados para la realización del gráfico son los promedios por tratamiento para cada momento de la observación. No se observó mortalidad con los tratamientos T1, T2 y T4 (Tabla 1, anexo).

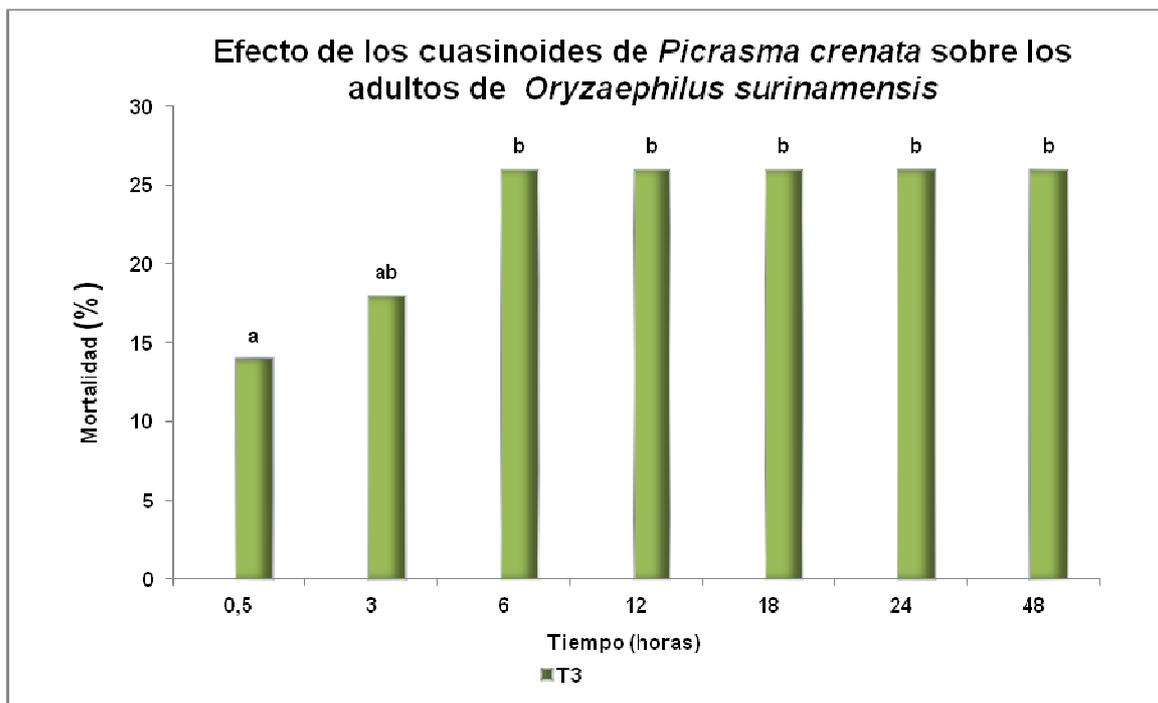


Figura 3.8: Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de *Picrasma crenata* sobre adultos de *Oryzaephilus surinamensis* por contacto a través del tiempo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA y Test de Tukey F(6; 28; $p > 0,05$)

- ***Sitophilus oryzae* (Gorgojo del arroz)**

Con respecto a esta plaga, los datos que se exponen a continuación dan indicios de una mayor respuesta por parte de *S. oryzae*. La figura 3.9 muestra que los tratamientos T2, T3 y T4 presentaron mortalidad a las pocas horas del comienzo de las observaciones, sin embargo el tratamiento T1 tuvo respuesta únicamente a las 48 h. El tratamiento T2 presentó un aumento progresivo del porcentaje de mortalidad a lo largo del tiempo, no se observó efecto de volteo. Se estabilizó a las 24 h, con un valor de 60%. El tratamiento T3, con mayor porcentaje de cuasinas que neocuasinas, presentó una mortalidad del 100% en las dos últimas observaciones. El tratamiento T2, con mayor proporción de neocuasina que cuasina, la mortalidad máxima fue de 65%, mientras que el tratamiento T4 con sólo neocuasina, no superó el 50%. En los tratamientos en los cuales predominan las cuasinas, el efecto sobre la mortalidad es mayor (Tabla 2, anexo).

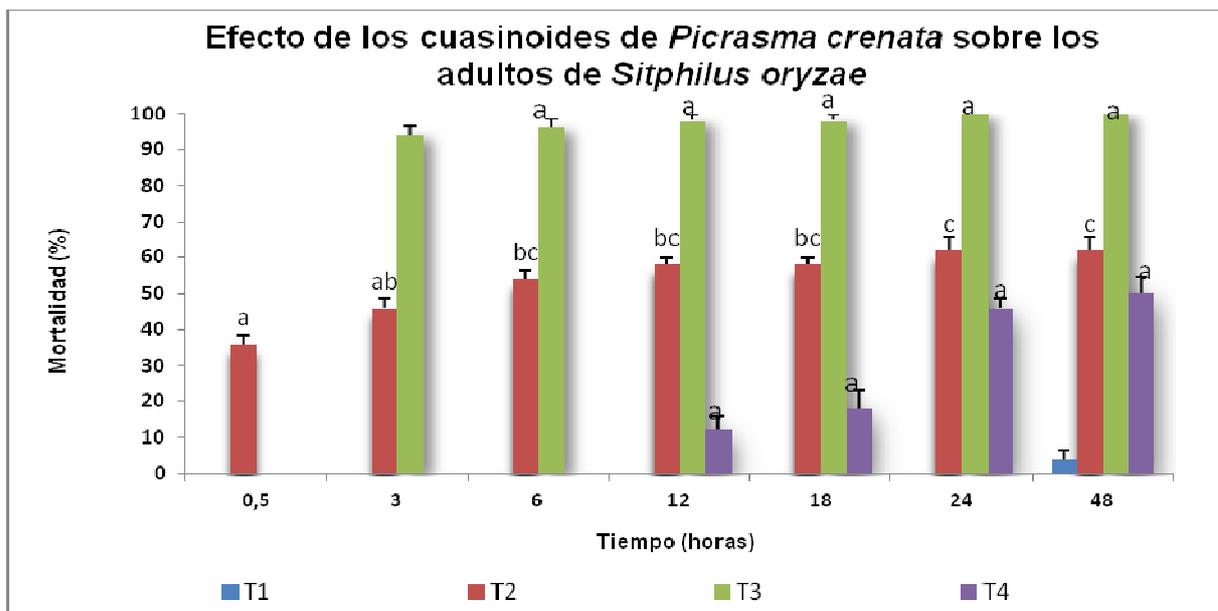


Figura 3.9: Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de *Picrasma crenata* sobre adultos de *Sitophilus oryzae* por contacto, por momento de observación. Las barras representan el error estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA y Test de Tukey F(6; 28; $p > 0,05$)

6.1.2- Ensayo por contacto en *Sitophilus oryzae* (dosis 2 ml)

En la figura 3.10 se observa que el tratamiento T3 es el más efectivo desde las primeras horas de la experiencia.

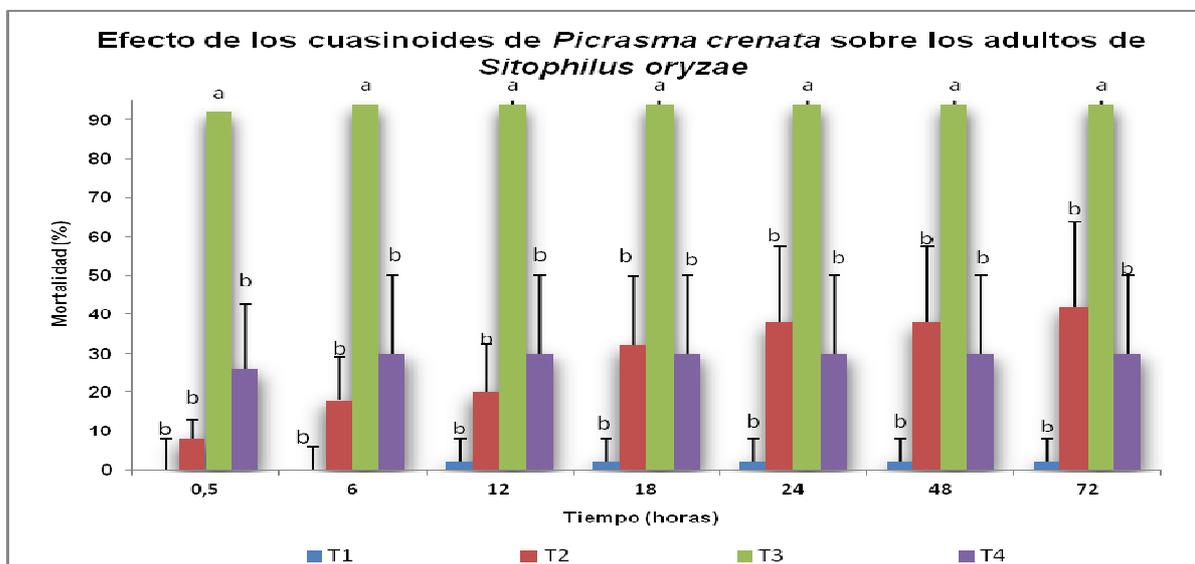


Figura 3.10: Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de *Picrasma crenata* sobre adultos de *Sitophilus oryzae* por contacto, por momento de observación. Las barras representan el error estándar de las medias. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ANOVA y Test de Tukey F(6;28; $p > 0,05$)

El tratamiento T4 es más efectivo en las primeras 12 horas que el tratamiento T2 y a partir de las 18 horas hasta el final de la experiencia la mortalidad fue mayor en el tratamiento T2, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El tratamiento T2 es una suma de dos cuasinoides: cuasina y neocuasina, por lo cual la diferencia en la mortalidad a favor del tratamiento T2 a partir de las 18 h podría deberse a la presencia de la cuasina en su composición. Esto se concluye por la alta efectividad del tratamiento T3 (sólo cuasina) (Tabla 3, anexo). Si se comparan estos resultados con los preliminares en *S. oryzae*, se encuentra una gran coincidencia en lo que se refiere a la eficacia de los distintos tratamientos, la efectividad es mayor con el tratamiento T3, luego el tratamiento T2 y por último el tratamiento T4. Asimismo, en ambas experiencias se observa la alta efectividad de la cuasina.

6.2- Segunda Experiencia (Ingesta)

Observación del efecto de las bandas obtenidas del extracto de palo amargo adicionados a la dieta base de los adultos de T. castaneum

Se consideró el T3 por su mayor efectividad observada en la primera experiencia por el método de contacto. En el mismo ensayo, los tratamientos T2 y T4 no tuvieron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se eligió el T4 por presentar solamente neocuasina en contraste con el tratamiento T3. Además, se incorporó el tratamiento T1 que, a pesar de su baja efectividad por el método mencionado, se lo testeó por la metodología de “acción por ingesta”, por tratarse de una mezcla de principios activos con escasa concentración de cuasinoides.

Evolución de la mortalidad de los adultos de *Tribolium castaneum* a lo largo del tiempo

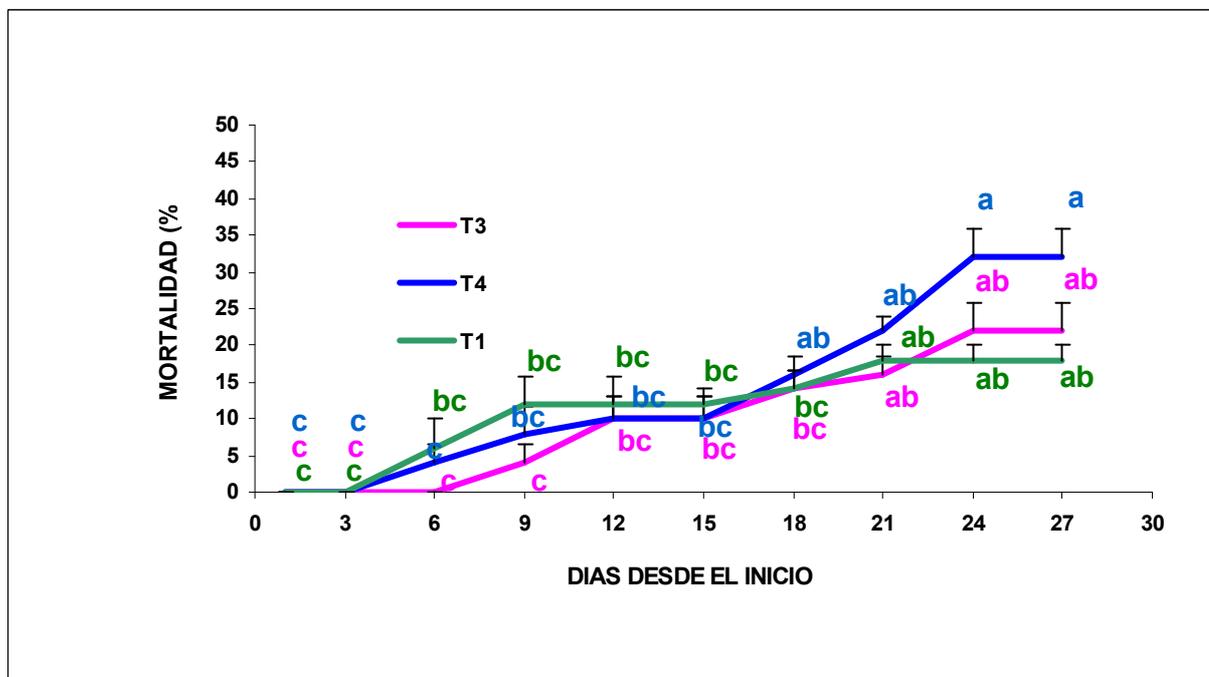


Figura 3.11: Mortalidad promedio producida por los cuasinoideos de *Picrasma crenata* sobre adultos de *Tribolium castaneum* por ingesta a través del tiempo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA 2 vías (tratamiento x tiempo) ($F = 4,8$; $p = 0,0099$)

En la figura 3.11 se observa que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a lo largo de las observaciones, a pesar de que el tratamiento T4 fue moderadamente más eficaz que el tratamiento T1 y el tratamiento T3.

6.3- Observación del efecto de las bandas obtenidas del extracto de palo amargo adicionados a la dieta base de las larvas neonatas de *Tribolium castaneum*

En la figura 3.12 se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T1 y los tratamientos T3 y T4 a lo largo de las observaciones. A los 3 y 6 días de la experiencia no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamiento T1 y T3. La mortalidad

acumulada al finalizar la experiencia para los tratamientos T1, T3 y T4 fue de 45%, 75% y 85%, respectivamente.

Evolución de la mortalidad de las larvas de *Tribolium castaneum* a lo largo del tiempo

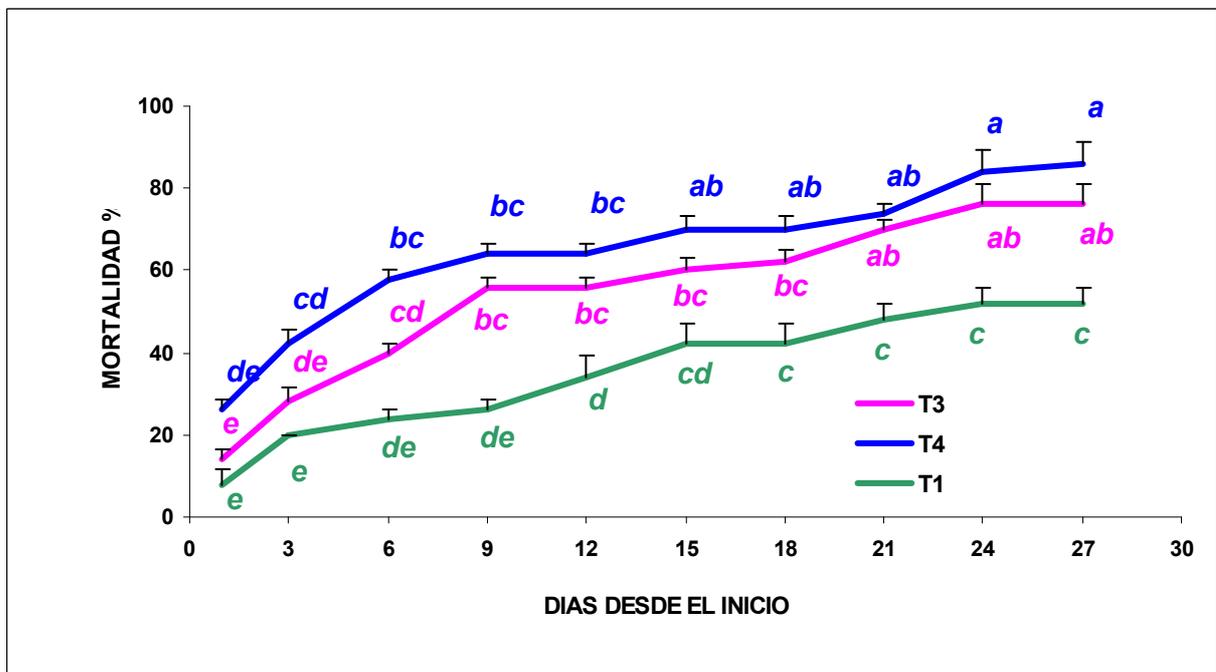


Figura 3.12: Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de *Picrasma crenata* sobre las larvas de *Tribolium castaneum* por ingesta a través del tiempo. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA 2 vías (tratamiento x tiempo) ($F = 189,29$; $p < 0,0001$)

6.4- Discusión y Conclusiones

Se pudo comprobar mediante estas experiencias que existe un efecto importante de los cuasinoides de *P. crenata*, principalmente para las fracciones de cuasina y neocuasina. Sin embargo, no poseen la misma efectividad en las plagas de granos estudiadas y tampoco es igual la respuesta dependiendo del modo de acción (contacto o ingesta).

En el ensayo preliminar, *O. surinamensis* y *S. oryzae* presentaron efecto a la acción de los cuasinoides a través de la mortalidad. Haciendo referencia al primer ensayo, en el que se duplicó la dosis, se pudo observar que la fracción con mayor concentración de cuasina que neocuasina (T3) mostró efecto por contacto sobre *S.*

oryzae, con una eficacia del 100% al cabo de 48 horas. Se coincide con algunos autores como Padín *et al.* (2000), quienes han observado una buena respuesta de *S. oryzae* a los insecticidas naturales con extractos de diferentes plantas como *Origanum vulgare* L. (Labiatae) y *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) que logra una mortalidad del 50% con una dosis de 200 µg/l; con 300 µg/l de *O. vulgare*, *Lavandula hybrida* Reverchon (Lamiaceae) y *Mentha piperita* L. (Lamiaceae) la mortalidad fue de 80% y con 500 µg/l de *O. vulgare*, *L. hybrida*, *T. minuta* y *M. piperita* la mortalidad fue de 100%. En este trabajo, a través del método de partición, el solvente utilizado en la extracción fue diclorometano como la experiencia llevada a cabo por Rodríguez *et al.* (2011) quienes han aplicado fracciones no polares de *P. crenata* sobre las hojas de frutilla y luego sobre éstas se colocaron los adultos del pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae*, Sulzer). Se observó una respuesta a la acción de la fracción de diclorometano y a las distintas dosis que se implementaron (3000, 6000 y 12000 ppm). La mortalidad fue mayor con las concentraciones más elevadas. Se coincide con este trabajo debido a que en la primera experiencia, al duplicar la dosis, se pudo observar el efecto del tratamiento T4 en forma temprana.

En la segunda experiencia, donde se puso a prueba la eficacia de los cuasinoides a través de la ingesta, se pudo observar que las larvas presentaron una mayor respuesta a la mortalidad respecto a los adultos de *T. castaneum*. El tratamiento T4, con una mayor concentración de neocuasinas, logró una alta mortalidad sobre las larvas, mientras que el tratamiento T3, confirmó su efectividad, con efectos importantes sobre la mortalidad de larvas; este tratamiento también había cobrado relevancia en el primer ensayo a través del método de contacto, por lo que se pudo corroborar que las cuasinas pueden producir la mortalidad de las plagas de granos almacenados estudiadas. Se coincide con otras experiencias en las que se observó que *T. castaneum* responde positivamente a los tratamientos por ingesta con extractos de *Lavanda spica* Cav. (Lamiaceae), *Lippia alba* (Mill.) (Verbenaceae) y *Ocimum bacilicum* Benth (Lamiaceae), con un alto porcentaje de monoterpenoides (Lucini *et al.*, 2008). En adición, Pungitore *et al.* (2005) habían observado el efecto de los triterpenoides sobre *T. castaneum*, mientras que Klocke *et al.* (1985) concluyó que los cuasinoides pueden actuar deprimiendo la alimentación sobre otras especies como *Epilachna varivestis* Muls y *Spodoptera eridania* (Cram.).

Asimismo, los tratamientos T4 y T1 mostraron un efecto mayor respecto al primer ensayo. Es importante destacar la mortalidad lograda por el tratamiento T1, recordando que esta fracción no presenta cuasinoides en concentración significativa y si bien no tuvo respuesta a la acción por contacto sobre *S. oryzae*, al poner a prueba estas sustancias, a través de la ingesta, se observó una respuesta sobre *T. castaneum*. Por lo tanto, esto abriría un interrogante si en el leño de *P. crenata* se encuentran, además de los cuasinoides, otros metabolitos secundarios con acción insecticida o con efecto de sinergismo sobre los sesquiterpenos (cuasina y neocuasina).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN FINAL

4.1- *Discusión*

En estas experiencias se observó el efecto insecticida de *P. crenata* sobre las plagas de granos almacenados. A través de distintas metodologías se observó su efecto por contacto e ingesta, se lo comparó con la acción de los insecticidas convencionales y reguladores de crecimiento, como así también, la acción directa de los cuasinoideos (cuasina y neocuasina).

En general, se observó un aumento de la mortalidad de las plagas producida por los extractos de *P. crenata* al aumentar la polaridad de los solventes de extracción y al aumentar la concentración de cada uno de los extractos. De las cuatro especies bajo estudio, se observó un mayor porcentaje de mortalidad sobre *O. surinamensis* y *T. castaneum*. Los extractos de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol mostraron una alta efectividad en todas las concentraciones, mientras que aquellos extractos obtenidos con solventes de menor polaridad (éter de petróleo, diclorometano) su efectividad quedó de manifiesto a altas concentraciones. Estas conclusiones confirman las dos primeras hipótesis: “la efectividad de los extractos obtenidos de *P. crenata* varía de acuerdo con la polaridad de los solventes utilizados” y “a mayor concentración del bioinsecticida mayor porcentaje de mortalidad”.

En relación a la CL50 y TL50, los extractos más efectivos fueron en orden decreciente: acetona, acetato de etilo, etanol, metanol, diclorometano y éter de petróleo. La CL50 disminuye con el aumento de la polaridad de los solventes. Los extractos más efectivos no son sólo aquellos que logran una mortalidad del 50% de la población con las concentraciones más bajas, sino que, además, lo realizan en un corto período. En este sentido, el extracto de metanol produce la mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae* y *U. dermestoides* en las dos primeras observaciones con una muy baja concentración. Por otro lado, el extracto de etanol produce la mortalidad del 50% de la población en la primera observación para *U. dermestoides* y *T. castaneum*, en la segunda para *O. surinamensis* y en la

tercera para *S. oryzae*. El extracto de acetona produce el mismo efecto en la primera observación sobre *U. dermestoides* y *O. surinamensis* mientras que el acetato de etilo produce la mortalidad del 50% de la población de *S. oryzae* a las 6 h de iniciada la experiencia.

Los extractos obtenidos por cocimiento e infusión logran una mortalidad, en promedio de 72% para *T. castaneum* y *S. oryzae*, sin embargo, demostraron poca efectividad sobre *U. dermestoides* y *O. surinamensis*.

En la especie *U. dermestoides*, en la primera observación, se observa un efecto de volteo con los extractos acuosos y con el extracto metanólico a bajas concentraciones. Esta particularidad es relevante desde el punto de vista del control para realizar un tratamiento conjunto con un insecticida convencional a una dosis mínima y contribuir, de esta manera, a una menor contaminación del ambiente.

Con base en los resultados obtenidos en el método del film, por contacto, se llevó a cabo la experiencia de la observación de la mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por efecto de los extractos de acetona, acetato de etilo y etanol de *P. crenata* incorporados a la dieta de los adultos de *T. castaneum*. El extracto de etanol fue el más efectivo. En una segunda experiencia, se incorporaron los mismos extractos a la dieta de las larvas de *T. castaneum*, su acción se comparó con los reguladores de crecimiento. Se observó que el período larval se acortó en relación al control y los extractos de acetato de etilo y etanol tuvieron un comportamiento similar al de los reguladores de crecimiento. En el estado pupal la mortalidad fue alta, manifestándose a través del número de individuos que llegan a adulto, la duración de este período fue similar al control para los extractos de etanol y acetona, mientras que para el acetato de etilo la concentración menor se comportó como los reguladores de crecimiento en los cuales las larvas no llegaron a empupar. Con esta experiencia se concluye que se cumplió la hipótesis planteada: “la duración de los estados larval y pupal varía cuando se incorpora a la dieta el insecticida biológico”. Además, ambos estados presentaron individuos deformados. Por consiguiente, según el tipo de extracto se cumpliría la hipótesis:

“la acción de los extractos de *P. crenata* sobre las plagas de granos almacenados es similar a la acción de los reguladores de crecimiento: Novalurón y Lufenurón”.

En todas estas experiencias los extractos de acetato de etilo, acetona y etanol demostraron ser los más eficientes en el control de las plagas de granos almacenados a través de los altos porcentajes de mortalidad. Con la finalidad de observar el efecto de los extractos en las primeras horas de observación, es decir, un efecto *knock out*, se realizó un análisis de la concentración letal 50 (CL50) a las seis horas de comenzado el ensayo. Los extractos de acetato de etilo y etanol logran la mortalidad del 50% de la población con dosis menores. Por este motivo fueron considerados para un análisis de bioequivalencia con el insecticida convencional Clorpirifós metil. Con el tratamiento estadístico clásico no se ha observado diferencias estadísticamente significativas entre el Clorpirifós metil y los extractos de acetato de etilo y etanol considerados para la equivalencia. Sin embargo, al someter al análisis de bioequivalencia los valores de mortalidad obtenidos en la experiencia, se observa que el extracto de acetato de etilo no es bioequivalente al Clorpirifós metil y que el extracto etanólico presentó evidencias para poder concluir que es bioequivalente a este insecticida. En relación a la hipótesis planteada: “El porcentaje de mortalidad producido por los extractos obtenidos de *P. crenata* es bioequivalente al del tratamiento con insecticidas convencionales”, se concluye que no se puede generalizar sino realizar un análisis estricto particular de cada extracto porque su acción está asociada con los metabolitos secundarios actuantes.

Por otro lado, al someter las especies *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* a la acción por contacto de los extractos de *P. crenata*, a través de la metodología por topicación, se observa un bajo efecto, excepto en la especie *S. oryzae* que difiere significativamente del testigo al alcanzar una mortalidad del 50% no cumpliendo con la hipótesis “los extractos de *P. crenata* y las soluciones obtenidas por infusión y cocimiento tienen efecto insecticida sobre los adultos de *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* al aplicarse por topicación”.

Cuando se aíslan los cuasinoides, cuasina y neocuasina, puede observarse que las cuasinas con el método del film presentan efectividad sobre los adultos de *O.*

surinamensis y *S. oryzae*. La respuesta de éste es superior a la de *O. surinamensis* con la dosis de 1 ml, por lo que se lleva a cabo un segundo ensayo con una doble dosis de todos los tratamientos sobre *S. oryzae*, confirmando la alta mortalidad producida por el tratamiento con mayor porcentaje de cuasinas. Se ha observado una relación dosis-efecto por lo cual se cumple la hipótesis: “La mortalidad de las plagas de granos almacenados responde directamente a la concentración de los cuasinoideos”.

En la segunda experiencia, si bien se cumple con la hipótesis: “las cuasinas y neocuasinas tienen acción insecticida sobre los adultos y las larvas de *T. castaneum*”. donde se puso a prueba la efectividad de los cuasinoideos a través de la ingesta, se pudo observar que las larvas presentaron una muy buena respuesta mientras que los adultos no superaron el 30% de mortalidad. Además, se confirma la hipótesis: “La acción de la cuasina y neocuasina aisladas es mayor que los cuasinoideos en su conjunto”.

Por otro lado, es importante destacar la efectividad del tratamiento T1, el cual no presenta cuasinoideos en concentración significativa y, si bien no hubo respuesta por contacto sobre *S. oryzae*, sí la hubo a través de la ingesta sobre *T. castaneum*.

4.2- Conclusión

Queda en evidencia la acción de los cuasinoideos cuando actúan por ingesta sobre las plagas de granos almacenados y la baja respuesta cuando se aplica directamente sobre el tegumento, es decir, por topicación. En todos los casos la mortalidad fue más alta al aumentar la concentración de cada uno de los extractos. Además, queda una puerta abierta para comparar con otros bioinsecticidas del mercado y comprobar una equivalencia en la efectividad

Por consiguiente, con estas experiencias se abre más de un interrogante; podrían actuar, además de los cuasinoideos, otros metabolitos secundarios con acción insecticida o con efecto de sinergismo sobre los sesquiterpenos (cuasina y neocuasina).

Como conclusión final se puede afirmar que *Picrasma crenata* es una buena alternativa en el control de las plagas de granos almacenados

Consideraciones Generales

El control de insectos plaga de granos almacenados se realiza en general por medio de productos de síntesis. Los estudios actuales y el conocimiento de los daños ocasionados por estas sustancias químicas incitan a utilizar productos naturales como técnicas alternativas de este control. El reino vegetal ofrece una fuente de compuestos potencialmente útiles que aún no han sido suficientemente aprovechados. El auge de la agricultura orgánica ha hecho resurgir el interés por estos compuestos vegetales, tal es así que la comercialización de insecticidas de origen botánico, basados en extractos de plantas activas, ha experimentado un incremento considerable en los últimos años. Es posible que no lleguen a reemplazar a los insecticidas convencionales pero podrían ocupar nichos importantes en el mercado. Podría evaluarse su uso con insecticidas convencionales de baja toxicidad, como alternativa para la utilización de dosis menores de estos productos nocivos para la salud y el ambiente.

A través del tiempo la demanda de productos fitosanitarios carentes de riesgos, con débil persistencia en el ambiente es cada vez mayor. Sin embargo, en la investigación de nuevos pesticidas, es importante considerar a los biopesticidas con el mismo rigor científico que a los pesticidas sintéticos, pues la experiencia adquirida con los insecticidas de síntesis nos ha enseñado que no se puede ignorar los aspectos de seguridad alimentaria, ecológicos y medioambientales. Los protocolos de exigencias y las normas de homologación deben basarse en criterios científicos y de interés común. Con estas experiencias se abre un camino que constituye un aporte interesante a estas nuevas líneas de investigación

ANEXO

6- Efecto de los cuasinoides (cuasina y neocuasina) sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* y *Ulomoides dermestoides*

PRIMERA EXPERIENCIA: Efecto de los cuasinoides a través del método de contacto

a. Ensayo preliminar de las cuatro plagas (dosis 1 ml)

| <i>Trat./tiempo</i> | <i>To (testigo) Metanol</i> | <i>T1 Banda 1</i> | <i>T2 Banda 2</i> | <i>T3 Banda 3</i> | <i>T4 Banda 4</i> |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,5 | 0 | 0 | 0 | 14 a | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 18 ab | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 26 b | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 26 b | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 26 b | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 26 b | 0 |
| 48 | 0 | 0 | 0 | 26 b | 0 |
| 72 | 0 | 0 | 0 | 26 b | 0 |
| <i>F</i> | | | | 3,52 | |

Tabla 1: Observación de la mortalidad de *O. surinamensis* producida por los cuasinoides a lo largo del tiempo en los diferentes momentos de observación.

ANOVA F (6:28; $p < 0,05$) y Test de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

| Trat./tiempo | To (testigo) Metanol | T1 Banda 1 | T2 Banda 2 | T3 Banda 3 | T4 Banda 4 |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,5 | 0 | 0 | 36 a | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 46 ab | 94 | 0 |
| 6 | 0 | 0 | 54 bc | 96 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 58 bc | 98 | 12 |
| 18 | 0 | 0 | 58 bc | 98 | 18 |
| 24 | 0 | 0 | 62 c | 100 | 46 |
| 48 | 0 | 4 | 62 c | 100 | 50 |
| F | | 2,67 n.s. | 11,83 | 1,64 n.s. | 3,45 n.s. |

Tabla 2: Observación de la mortalidad de *S. oryzae* producida por los cuasinoides a lo largo del tiempo en los diferentes momentos de observación. ANOVA F (6:28; $p < 0,05$) y Test de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

b. Ensayo por contacto en *S oryzae* (dosis 2 ml)

| Trat./tiempo | To (testigo) Metanol | T1 Banda 1 | T2 Banda 2 | T3 Banda 3 | T4 Banda 4 |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0,5 | 0 | 0 | 8 | 92 | 26 |
| 3 | 0 | 0 | 18 | 94 | 30 |
| 6 | 0 | 2 | 20 | 94 | 30 |
| 12 | 0 | 2 | 32 | 94 | 30 |
| 18 | 0 | 2 | 38 | 94 | 30 |
| 24 | 0 | 2 | 38 | 94 | 30 |
| 48 | 0 | 2 | 38 | 94 | 30 |
| 72 | 0 | 2 | 42 | 94 | 30 |
| F | | 0,01 n.s. | 0,62 n.s. | 0,61 n.s. | 0,01 n.s. |

Tabla 3: Observación de la mortalidad de *S. oryzae* producida por los cuasinoides a lo largo del tiempo en los diferentes momentos de observación. ANOVA F (6:28; $p < 0,05$) y Test de Tukey. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Bibliografía citada

Adam, B., Phillips, P. & Flinn, P. (2006). The economics of IMP in stored grain: Why don't more grain handlers use IMP. En: Actas y Trab. del 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 1. Stored Grain Losses, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil pp. 3 - 12.

Adityachayhury, N., Bhattacharyya, A., Chowdhury, A. & Pal, S. (1985). Chemicals constituents of plants exhibiting insecticidal, antifeeding and insect growth regulating activities. *Journal of Sciences and Industrial Research* 44: 85 - 101.

Aguayo, S. (2006). Control Orgánico de Plagas de los Granos Almacenados. *Ciencia Ahora*, 17: 37 - 46.

Allan, E., Eeswara, J., Jarvis, A., Mordue, A., Mogan, E. & Stuchbury, T. (2002). Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss and their production of azadirachtin and other important insect bioactive metabolites. *Plants Cells Report* 21 (4): 374 - 379.

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 Actas y Trab.del 9th Internationa Working Conference on Stored Product Protection. General Session on Stored Grain Protection, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil, pp.1218 - 1225.

Alonso-Amelot, M., Avendaño, M., Aubert, L., & Avila, J. (2003). Repellence and feeding deterrence activity of *Ageratum cynzoides* against the stored pests *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. Active plant parts and composition. *Ciencia*, 11: 61 - 76.

Alonso A., Calderini D.F., Cantamutto M.A., Carmona M., Chiara G., Di Nápoli M., Duarte G., Estenssoro M., Fraschina J., Gallez E. L., Gallo Candolo E. G., Montaner J. G., Grosse R., Maluf J. E. L., Lamédica C., Leaden M., Maddoni G.

- A., Peck R. M., Miralles D. J., Miravalles M. T., Mockel F., Nisi J., Vila J. M. O., Permingeat O., Pozzi R., Santamarina A., Savin R., Slafer G. A., Tombetta E. & Zorraquín T. (1996). Cuadernillo de Actualización Técnica N° 56. Area de comunicaciones AACREA 10: 87 - 89.
- Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Corpus. Rosario, Argentina.
- 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, UNEP/MBTOC CAB International & Cambridge. University Press, United Kingdom. 655 pp.
- Appert, J. (1993). "El almacenamiento de granos y semillas alimenticios". Editorial Hemisferio Sur S.A. Argentina Pág. 101-114. 1° ed. Buenos Aires, Argentina.
- Araujo, R., Ferreira, G., Oliveira, M. & Guedes, R. (2006). Enzyme activity of the energymetabolism of pyrethroid-resistant and suceptible populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). En: Actas y Trab. del 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 4. Pest resistance to Pesticides and Control Measures. Conference Papers, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil, pp. 292 - 298.
- Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W. & Takabyashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in Lima bean leaves. *Nature* 406: 512 - 515.
- Arnaud, L. & Haubruge, E. (2002). Insecticide resistance enhances male reproductive sucess in a beetle. *Evolution* 56 (12): 2435 - 2444.
- Arthur, F. & Rogers, T. (2002). Legislative and regulatory actions affecting insect pest management for postharvest system in the United States. Advances in Stored Product Protection. En: Actas y Trab. del 8th International Working Conference

- on Stored Product Protection. Food Safety, York, CAB, International Oxon, UK, pp. 435 - 438.
- Atherton Akaff, P. J. & Sloan, J. A. (1998). Design and Analysis of Equivalence Clinical Trials Via the SAS System. Statistics, Data Analysis, and Modeling. SUGI 23 Conference Leaders Contents. Proceedings of the Twenty-Third Annual, Opryland Hotel Nashville, Tennessee.
- Ávalos García, A. & Pérez - Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid Reduca (Biología). Serie *Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119 - 145.
- Bado, S. & Mareggiani, G. (2001). Whitanolides from *Jaborosa odonelliana* (Solanaceae): bioactivity against agricultural pests. *Revista Latinoamericana de Química*, 29 (3): 145 - 149.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C. C. & Preston, C. A. (2006). Volatile signalling in plant-plant interactions: "Talking trees" in the genomics era. *Science*, 311: 812 - 815.
- Begon, M.; Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1988). Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades. Ed. Omega. 886 p.
- Beserra Almeida, M. M., Campos Arriaga, A. M., Lima dos Santos, A. K., Lemos, T. L. G., Braz-Filho, R. & Curcino Vieira, I. J. (2007). Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. *Química Nova*, 30 (4) São Paulo [cited 2011-01-24], pp.935-951 Available from <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0100-40422007000400033&lng=en&nrm=iso>>.ISSN0100-4042.doi: 10.1590/S0100-40422007000400033.
- Birch, L. C. (1948). The intrinsic rate of natural increase o fan insect population. *Journal Animal Ecology*, 17: 15 - 26.

- Bisset, J. A. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54 (3): 202 – 219.
- Braga Rodrigues, J., Guerra Pimentel, M., D'antonino Faroni, L., Sousa, A. & Magalhaes de Souza, A. (2008). Dispersao da resistencia a fosna em insetos-praga de produtos armazenados. Em: Actas y Trab. del XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Area: Pragas de Graos Armazenados. Resumo ID: 1193-3. Uberlandia, MG.
- Bragachini, M., Bongiovani, R., Von Martini, A., Méndez; C., Casini, C. & Rodríguez, J. (2003). Eficiencia de cosecha y almacenamiento de granos. Ediciones INTA. 78 pp..
- Bruce, T. J. A., Wadham, L. J. & Woodcock, C.M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Scencies*, 10: 269 - 274.
- Broussalis, A.; Ferraro, G., Martino, V., Pinzon, J., Coussio, R. & Calle Alvarez, J. (1999). Argentine plants as potential source of insecticidal of compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 67: 219 - 223.
- Busuine, J. R. (1971). *A critical review of the techniques for testing insecticides*. Common Wealth Agric. Bureaux, London.
- Caballero García, C. (2004). Efectos de terpenoides naturales y hemisintéticos sobre *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid, 107 pp.
- Camarena Gutiérrez, G. (2002). Octadecanoides como reguladores de la defensa de las plantas. *Revista Chapingo*. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México, 8 (2): 107 - 112.

- Campos, M. (2006). Good practices in grain storage. Stored Grain Procedures and Practices. En: Actas y Trab. del 9th International Working Conference on Stored Product Protection, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil, pp. 1295 - 1301.
- Casadío, A. (1994). Toxicidad y resistencia a insecticidas organofosforados en cepas de *Tribolium castaneum* de la República Argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 68 pp.
- CASAFE (2005). *Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina II*. Tomo II. Ed. CASAFE, Bs. As., Argentina, 2080 pp.
- Casini, C. & Santa Juliana, M. (2005). Postcosecha de trigo. Secado y almacenaje. En: Jornadas técnicas de capacitación, en siembra, cosecha, postcosecha, pulverización y fertilización. INTA, Manfredi, Pcia. de Córdoba, pp. 55 - 70.
- Céspedes C. & Alarcón, J. (2011). Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10 (3): 175 - 181
- Céspedes C., Avila J., Marin J., Domínguez M., Torres & P. Aranda E. (2006). Natural compounds as antioxidant and moulting inhibitors can play a role as a model for search of new botanical pesticides. In: *Naturally* occurring bioactive compounds. Cecilia Carpinella, Mahendra Rai. Eds. Advances in *Phytomedicine Series*, Elsevier, The Netherlands, 3:1 - 27.
- Céspedes C., Alarcón J., Águila S., Torres P., Aqueveque L. Becerra J. & Silva M. (2008). Antifeedant, Insect Growth Regulatory and Antioxidant Activities of MeOH Extracts from Chilean Podocarpaceae. *Biopestic Int* 4: 35 -
- Chua, T. H. & Chandrapa, R. (1978). The influence of restrited food supplies on the development of larvae and the fecundity of *Palembus dermestoides* Faim. (Tenebrionidae). *Journal Stored Products Research* 14: 81 - 86.

- Ciba Geigy (1981). *“Manual para ensayos de campo en Producción Vegetal.”* C. Geigy, Suiza. Documenta, 203 pp
- Cirigliano, A., Colamarino, I., Mareggiani, G. & Bado, S. (2008). Biological effects of *Physalis peruviana* L. (Solanaceae) crude extracts and its major withanolides on *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). *Boletín de sanidad vegetal-Plagas*, 34: 509 - 515.
- Clark, E. (1937). Quassin I. The preparation and purification of quassin and neoquassin, with information concerning their molecular formulas. *Journal American Chemical. Society.*, 59:927–931
- Clemente, S., Mareggiani, G., Broussalis, A., Martino, V. & Ferraro, G. (2002). Actividad de extractos crudos de plantas aromáticas sobre la supervivencia y desarrollo de *Tribolium castaneum*. *Acta Toxicológica Argentina*, 10 (1) : 2 - 4.
- Clemente, S., Mareggiani, G., Broussalis, A., Martino, V. & Ferraro, G. (2003). Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products insects. *Boletín Sanidad Vegetal*, 29: 421 - 426.
- Clemente, S., Mareggiani, G., Broussalis, A. & Ferraro, G. (2007). Actividad insecticida de 1,8-cineol sobre mosca de los frutos, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). *Dominguezia*, 23 (1): 29 - 34.
- Coats, J. (1994). Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annual Review Entomology*, 39: 489 - 515.
- Correa, A.; Santos, J., Cordeiro, E. & Guedes, R. (2006). Fluctuating asymmetry in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). En: Actas y Trab. del 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 4. Pest resistance to Pesticides and Control Measures. Conference Papers, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil, pp. 285 - 291.

- Cosenzo, E. (2009). Buenas prácticas agrícolas en la protección de cultivos. Conferencia. En: Actas y Trab. de la XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Universidad Nacional de Santiago del Estero (sin numerar).
- Daglish, G., Eelkema, M. & Harrison, L. (1995). Chlorpyrifos-methyl plus either methoprene or synergized phenothrin for control of Coleoptera in maize in Queensland, Australia. *Journal Stored Produce Research.*, 31 (3): 235 - 241.
- Daido, M.; Ohmo, N., Imamura, K., Fukamiya, N., Hatakashi, M., Yamazaki, H., Tagaharo, K., Lie, K. y Okano, M. (1995). Antifeedant and insecticidal activity of quassinoids against the diamond backmoth (*Plutella xylostella*) and structure activity relationships. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59:974-979.
- 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.
- Davidson, R. H. & Lyon, W. F. (1992). "Plagas de insectos agrícolas y del jardín". Limusa-Noriega, México, D. F. 743 pp.
- De Lima, R., das Gracias Cardoso, M., Campos Morales, J., Almeida Melo, B., Gregorio Rodriguez, V. & Silveira Antunes, C. (2008). Fumigacao de 1,8-cineol sobre *Tenebrio molitor* L., 1758 (Coleoptera:Tenebrionidae. En: Actas y Trab. del XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Area: Manejo Integrado de Pragas. Resumo ID:1412-1. Uberlandia, MG, 94 pp.
- Dell'orto Trivelli, H. & Arias Velásquez, C. (1985). *Insectos que dañan granos y productos almacenados*. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile, Serie: Tecnología Postcosecha. 142 pp.
- Dent, D. (2000). *Insect Pest Management*. CABI, Biosciencias. 2nd edición, Ascot, UK.

- Descamps, L. (2002). 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 presentada para optar al título de Magisster en Ciencias Agrarias, Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Bs. As, 103 pp.
- Descamps, L. E. (2007). Actividad biológica de extractos vegetales y aceites esenciales de *Schinus molle* var. Freira (Anacardiaceae) en *Tribolium castaneum* Herbst. (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae), plaga de grano almacenado. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina, 147 pp.
- Descamps, L., Sánchez Chopa, C & Ferrero, A. (2011). Activity of *Schinus areira* (Anacardiaceae) esencial oil against the grain storage pest *Tribolium castaneum*. *Natural product Communications* 6:1 – 5
- Díaz, R., Hernández L., Ocampo, R & Cicción, J.F. (2006) Domesticación y Fitoquímica de *Quassia Amara* (Simaroubaceae) en el Trópico Húmedo de Costa Rica. *Lankesteriana*, 6 (2): 49 - 64.
- Dicke, M., Agrawal, A. A. & Bruin, J. (2003). Plants talk, but are they deaf? *Trends Plant Science*, 8: 403 - 405.
- Dierksmeier Corcuera, G. (2007). Características y mecanismos de acción de algunos compuestos usados en el combate de plagas de almacén. *Fitosanidad*, 11(2): 81 - 84.
- Dilletti, E., Hauschke, D. & Steinijs, V. W. (1991) Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence interval. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, La Habana, Cuba pp. 29:1 - 8.

- Dion, A. Dube', P. & Spino, C. (2005). A Triple Diene-Transmissive Diels-Alder Strategy To Build the Quassinoid Framework. *Organic Letters*, 7 (25): 5601 - 5604.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2009). InfoStat versión (2009). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
URL. <http://WWW.infostat.com.ar>
- Dos Santos Veloso, M., R. de Almeida Oliveira; Barboza Silva, L., Carvalho Guedes, R., Evangelista Visotto, L., Fernandes Moreira, L., Pilon, A.; de Oliveira, J. & Da Paixao, G. (2008). Taxa respiratória e comportamento de populações resistentes e susceptível do caruncho do milho expostas a cipermetrina. En: Actas y Trab. del XXII Congreso Brasileiro de Entomologia. Area: Pragas de Graos Armazenados. Resumo ID:1915-2. Uberlandia, M.G.
- Ducom, P., Dupuis, S., Stefanini, V. & Guichard, A. (2002). Sulfuryl uoride as a new fumigant for the desinfestation of our mills in France. *Advances in Stored Product Protection*, pp. 900 - 903.
- Ducrot, P.H. 2004. Contribución de la química al conocimiento de la actividad biopesticida de los productos naturales de origen vegetal. En: Regnault-Roger, C., B.J.R. Philogene y C. Vincent (eds.). Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 337 p.
- Eastman, L. E. S. & Segrove, F. (1947). The influence of temperature and humidity on instar length in *Calandra granaria* Linn. *Journal Exp. Biology*, 24: 79 - 94.
- Ecobici, M. M., Ion, O. & Popa, A. (2004). The effect active principles from medicinal and flavor plants in non chemical control against bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say. *Journal European Agriculture*, 5: 127 - 136.
- Edde, P. A. (2012). A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer etc. *Journal of Stored Products Research*, 48: 1 - 18.

- Elek, J. (1998). Interaction of treatment of both adult and immature Coleoptera with a chitin synthesis inhibitor affects mortality and development time of their progeny *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89(2):125-136
- Evans, D. E. (1982). The influence of temperature and grain moisture content on the intrinsic rate of increase of *Sitophilus oryzae* (L) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Stored Products Research*, 18: 55 - 66.
- FAO. (2001). *Breves normas de control de calidad en granos almacenados*. Capítulo 8. faoinpho.org/biblioteca/paquetepostcosecha/normas.htm.
- FDA (2001). *Food Code*. U.S. Department of Health and Human Service. Public Health Service. Food and Drug Administration. College Park, MD 20740.
- Fernández - Andrés, M. D., Rangel-Lucio, J. A., Mayolo Juárez-Goiz, J., Bujanos-Muñiz, R., Montes-Hernández S. & Mendoza-Elos, M. (2009). Oleorresina de jícama para controlar *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleóptera: Bruchidae) en semilla de frijol. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1): 59 - 69.
- Ferreira, J.T.B.; Correa, A.G. & Vieira, P.C. (2001). *Produtos Naturais no controle de insetos*. Ed. Da UFSCAR. São Carlos, SO, Brasil, 176 pp.
- Ferrero, A. (1988). Determinación de los factores de resistencia a malation en una cepa de *Tribolium castaneum*. Tesis Doctoral, Dpto. de Biología, Universidad Nacional del Sur. Bs. As., 96 pp.
- Ferrero, A.; Werdin González, J. & Sánchez Chopa, C. (2006). Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 77:381-383.
- Ferry, N., Edwards, M. G., Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. (2004). Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 155 - 161.

- Fields, P.; Xie, Y. & Hou, X. (2006). Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *Journal Stored Products Research*, 37: 359 - 370.
- Franklin, A. & Fontenot, E. (2012). La actividad residual de metoprene y novalurón como tratamientos superficiales para manejar los escarabajos de la harina, *Tribolium castaneum* y *Tribolium confusum*. *Journal of Insect Ciencias* 12:95 <http://insectsciencie.org/12:95>
- García Darderes, C., Rodríguez, S., Yaber Grass, M. & Leicach, S. (2005). Actividad biológica del extracto no polar de *Senecio madagascariensis* sobre adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). En: Actas y Trab. del VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, p. 313.
- García, M. & Donadei, O. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest management science*, 61 (6): 612 - 618.
- García, M., Sosa, M., Donadei, O. & Tonn, C. (2003). Allelochemical effects of eudesmane and eremophilane sesquiterpenes on *Tribolium castaneum* larvae. *Journal Chemistry Ecology*, 29(1):175-187
- Garrett, K. A. (1997). Use of Statistical Tests of Equivalence (Bioequivalence Tests). *Plant Pathology*, 87 (4): 372 - 374.
- Georghiou, P. G. (1990). Overview of insecticide resistance. In Green, M. B.; Lebaron, H. M. y Morberg (eds.). ACS Symposium Series 421. *American Chemical Society*, Washington, D. C., 19-41.
- Gil-Grado, A. & Muñiz, M. (1978). Nuevas transformaciones en experimentos biológicos basados en la respuesta cuantitativa. *Boletín Servicio Plagas*, 4: 89 - 229.
- Giordano, O.; Sosa, M. & Tonn, C. (2000). Actividad Biológica de Metabolitos Secundarios de Plantas frente a *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera:

- Tenebrionidae). *Anales Academia Nacional de Ciencias Exactas Fisicas y Naturales*, 52: 13 - 17.
- Govindachari, T., Krishna Kumari, G., Gopalskrishnan, T., Suresh, T., Wesley, S. & Sreelatha, T. (2001). Insect antifeedant and growth regulating activities of quassinoids from *Samadera indica*. *Fitoterapia*, 72 (5): 568 - 71.
- Grieco, P., Ferrino, S. & Vidari, G. (1980). Total synthesis of dl-quassin. *Journal of the American Chemical Society*, 102 (25): 7586 - 7587.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R., Walker, L., Sindelar, R. (2005). Biologically Active Quassinoids and Their Chemistry: Potential Leads for Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2): 173 - 190.
- Gutierrez, F.; Stefanazzi, N., Murray, A. & Ferrero, A. (2008). Biactividad de extractos de hojas de *Aloysia polystachya* (Verbenaceae) en larvas y adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Boletín Sanidad Vegetal. Plagas*, 34: 501 - 508.
- Halliday, W., Arthur, F. H., Zettler, J. (1988). Resistance status of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) infesting stored peanuts in southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 81: 74 - 77.
- Hedin, P. (1982). New concepts and Trends in Pesticide Chemistry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30 (2): 201 - 215.
- Heil, M. & Bueno J. (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the Natural Academy of Science United State*, 104: 5467 - 5472.
- Huang, Y. & Ho, S. (1998). Toxicity and Antifeedant Activities of Cinnamaldehyde Against the Grain Storage Insects, *Tribolium castaneum* (Herat) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal Stored Products Research*, 34 (1): 11 - 17.

- Hummelbrunner, L. & Isman, M. (2001). Acute, Sublethal, Antefeedant and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 49: 715 - 729.
- Hussain, A., Akram, W. & Khan, F. (1996). Determination of insecticide resistance in red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) collected from Rawalpindi. *Pakistan Entomology*. 18: 1-2.
- Ibrahim, M. A.; Kainulainen, P.; Aflatuni, A; Tiilikkala, 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 insecto pests. *Agricultural Food Science in Finland*, 10:243-259.
- Infante, G. S. & Calderón, A. (1994). *Manual de Análisis Probit*. Colegio de Posgrados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, México.
- INTA. (2008). En ciencia de poscosecha: generación, desarrollo y difusión de tecnologías para aumentar la eficiencia de acondicionado, secado y almacenaje de cereales, oleaginosas y cultivos industriales del país. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/precop/2008/ec.htm>.
- Ishii K.; Koike K. & Ohmoto, T. (1991). Javanicinosides D-H, Quassinoid glucosides from *Picrasma javanica*. *Phytochemistry*, 30 (12): 4099 - 4103.
- Isman, M. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated word. *Annual Review. Entomology*, 51: 4566.
- Kanvil, S., Jilani, G., Saljoqi, A., Hussain, N. & Anwar, M. (2006). Effects of Plant Extracts on Oviposition and Egg Hatching of *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Sarhad Journal Agriculture*, 22 (3)

- Karpouhtsis, I; Pardali, E.; Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z. & Mavragani Tsipidou, P. (1998). Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 1111 - 1115.
- Kim, S., Wise, J., Gökse, A., Whalon, M. (2011). Novaluron causes reduced egg hatch afyer traiting adult codling moths, *Cydia pomonella*: Support for transovarial transfer. *Journal of Insect Science*, available online: insectscience.org/11.126.
- Kljajic, P. & Peric, I. (2006). Susceptibility to contact insecticides of granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera:Curculionidae) originating from different locations in the former Yugoslavia. *Journal of Stored Products Research*, 42: 149 - 161.
- Kljajic, P. & Peric, I. (2007). Efectiveness of wheat-applied contact insecticides against *Sitophilus granarius* (L.) originating from different populations. *Journal of Stored Products Research*, 43: 523 - 529.
- Klocke, J., Arisawa, M., Handa, S., Kinghorn, A., Cordell, G. y Fransworth, N. (1985). Growth inhibitory insecticidal and antifeedant effects of some antileukemic and cytotoxic quassinoids on two species of agricultural pests. *Experientia*, 41:379-382
- Koike K., Yokoh M., Furukawa M., Ishii S. & Ohomoto T. (1995) Quassinoids from *Picrasma javanica*. *Phytochemistry*, 40 (1): 233 - 238.
- Ko Ko, W. J. & Angsumarn C. (2010). Insecticidal Activities of Essential Oils from Fruits of *Litsea salicifolia* Roxb. ex Wall. Against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst) *Pakistan Journal. Zoology*. 42 (5): 551 - 557.
- Kostyukovsky, M. & Trostanetsky, A (2006). The effect of a new chitin synthesis inhibitor, novaluron, on various developmental stages of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 42 (2): 136 - 148.

- Kubo, I. & Chaudhuri, S. (1993). Quassinoid glucoside from the bark of *Castela tortuosa*. *Phytochemistry*, 32:215
- Kubo I., Kinst-Hori I., Kubo Y., Yamagiwa Y., Kamikawa T., Haraguchi H. (2000). Molecular design of antibrowning agents. *Journal Agricultural Food Chemical* 48: 1393 - 1399.
- Kubo I., Kinst-Hori I., Nihei K., Soria F., Takasaki M., Calderon J., Céspedes C.. (2003a) Tyrosinase inhibitors from Galls of *Rhus javanica* leaves and their effects on insects. *Z Naturforsch* 58: 719 - 725.
- Kubo I, Chen Q., Nihei K., Calderon J., Céspedes C. (2003b). Tyrosinase inhibition kinetics of anisic acid. *Z Naturforsch* 58: 713 - 718.
- Kubo I, Hori I, Nihei K., Satooka H., Céspedes C., Calderón J. (2008). Insect Growth Inhibitory Activity and Cytotoxicity of Tannic Acid from Gallae rhois. *Biopestic Int* 4: 6 - 14.
- Lacey, J., Hill, S. & Edwards, M. (1980). Micro-organisms in stored grains; their enumeration and significance. *Tropical Stored Products* 39: 19 -32.
- Lagunes A. & Vazquez Navarro, M. (1994). *El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas*. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. México. 159 pp.
- Latif, Z., Craven, L., Hartley, T. G., Kemp, B. R., Potter, J., Rice, M. J., Waigh, R. D. & Waterman, P. G. (2000). An insecticidal quassinoid from the new Australian species *Quassia* sp. aff. *bidwillii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 (2): 183 - 184.
- Lee, S. E (2002). Biochemical mechanism conferring cross-resistance to fumigant toxicities of essential oils in a chlorpirifós-methyl resistant strain of *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae). *Journal Stored Products Research*, 38: 157 - 166.
- Leicach, S. R., Russo, S., Schindler, V. & Regonat, A. (2005). Bioactividad de extractos etéreos y aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides* (L.) en

la alimentación de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán. Argentina, p. 332.

Leicach. S (2006). *Alelopatía. Interacciones químicas en la comunicación y defensa de las plantas*. Eudeba. Buenos Aires, Argentina. 202 pp.

Leskinen V., Polonsky, J. & Bhatnagar, S. (1984). Antifeedant activity of quassinoids. *Journal Chemical Ecology*. 10(10):1497-1507.

Liu, Z., Ho, S. (1999). Bioactivity of three essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Products Research*. 35: 317-328.

Lucini, E.; Olmedo, R.; Fontan, D.; Colorito, C.; Viglianco, A.; Zunino, M.; Perez S. & Zygadlo, J. (2008). 'Actividad insecticida del aceite esencial de *Tagete filifolia* Lag. sobre *Tribolium*'. Congreso Argentino de Entomología. (setiembre-octubre) Huerta Grande, Córdoba. Argentina

Lorini; I & Galley, D. J. (2001). The Cross-Resistance Spectrum in Deltamethrin Resistance Strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Neotropical Entomology*, 30 (2): 321 - 325.

Lorini, I. & Beckel, H. (2006). Efficacy of diatomaceous earth to control the main stored grain pest. En; Actas y Trab. del 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 7. Alternative Methods to Chemical Control, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil, pp. 863 - 867.

Lu, J & Shi, L. (2012). The bioactivity of essential oil from *Ailanthus altissima* Swing (Sapindales: Simaroubaceae) Bark on *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Advanced material Research*, 365: 428 - 432.

Lu, J. & Wu, S (2010) Bioactivity of essential oil from *Ailanthus altissima* bark against 4 major stored-grain insects and *African Journal of Microbiology Research* 4 (3):154-157.

- Maffei, M. E., Mithöfer, A. & Boland, W. (2007). Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, 68: 2946 - 2959.
- Mambelli P., Marchini, B., Bazzocchi C, Pari, P. & Tellarini, S. (1994). El Valutazioni preliminari sull'ottimizzazione delle modalità d'uso del legno quassio (*Quassia amara* L.; *Picrasma excelsa* (Swz.) Lindl. Quale insecticida biológico. El Atti Convegno Internazionale: "Coltivazione el e miglioramento di piante officinali", Pari Ministerio Agricoltura e Foresta. Trento, Italia, 2-3
- Mareggiani, G. S. (1999). Efecto biológico de withanólidos de *Salpichroa organifolia* y *Datura ferox* (Solanaceae) sobre *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) y *Musca domestica* (Diptera, Muscidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 172 pp.
- Mareggiani, G., Bado, S., Picollo, M.I. & Zerba, E. (2000). Efecto tóxico de metabolitos aislados de plantas solanáceas sobre *Tribolium castaneum*. *Acta Toxicológica Argentina*, 8 (2): 69 - 71.
- Mareggiani, G., Picollo, M. I., Zerba, E., Burton, G. Tettamanzi, M. C., Benedetti-Dotorovich, M. O. V. & Valeiro, A. S. (2000). Antifeedant activity of wihanolides from *Sapichroa organifolia* on *Musca domestica*. *Journal of Natural Products*, 63 (8): 1113 - 1116.
- Mareggiani, G., Picollo, M. I., Valeiro, A. S., Tettamanzi, M. C., Benedetti-Dotorovich, M. O. V., Burton, G. & Zerba, E (2002). Response of *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) to *Salpichroa organifolia* withanolides. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 50: 104 - 107.
- Marinoff, M.; Gruszycki, M. R., Baez, M. & Martiarena, J. (2001). Análisis discriminante de insecticidas introduciendo un nuevo grupo de estructuras químicas.

Constituídos por hormonas juveniles y derivados de benzoilureas. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Campus, Corrientes, Argentina.

Marinoni, R. C. & Ribeiro-Costa, C. S. (2001). Influence of temperature and diet on the development of *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperinae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44 (2): 129 - 134.

Miller L. C. & Tainter M. L. (1944). Estimation of DL 50 and its error by means of logarithmic –Probit graph paper-. *Proceedings of de Society of experimental Biology and Medicine*, 58: 261 - 47.

Navarro, S. (2006). New global challenges to the use of gaseous treatments in stored product. 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 6. Fumigation and Control Atmosphere. Keynotes, pp. 495 - 509.

Nawrot, J., Bloszyk, E., Harmatha, J., Novotony, L. & Drozdz, B. (1986). Action of antifeedant of plant origin on beetles infesting stored products. *Acta Entomologica Bohemoslov*, 83: 327 - 335.

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). *Journal of Stored Products Research*, 45: 212 - 214.

Norris, L. N. & Garthwaite, D. (1997). *Farm grain stores in Great Britain 1994/95*. Pesticide Usage Survey Report N° 137. MAFF; London. 21p.

Novello, C. R., Ferreira, A. G., Marquesa, L. C. & Corteza, D. A. G. (2003). Quassinoids from *Picrasma crenata*. *Natural Product Research*, 17 (3): 145 - 148.

- Nukenine, E., Adler, C. & Reichmuth, C. (2007). Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia adoensis* from two agro-ecological zones in Cameroon to *Prostephanus truncatus* and two strains of *Stilpnotia zeamais*. Conference of IOBC WPRS (OILB SROP) working group on *Integrated Protection of Stored Products*, 47. Poznań, Poland.
- 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. *Journal of Stored Products Research*, 44: 328 - 334.
- Pacheco, I., Sartori, M. & Taylor, R. (1990). Levantamento de resistencia de insetos-praga de graos armazenados a fosfina, no estado de Sao Paulo. *Coletânia do ITAL*, 20: 144 - 154.
- Padín, S., Fusé, C., Urrutia, M., Dal Bello, G. (2013). Toxicity and repellency of nine medicinal plants against *Tribolium castaneum* in stored wheat. *Bolletín of Insectology*, 66 (1): 45 - 49.
- Padín, S., Ringuelet, J., Bello, D., Ceremile, E., Re, M. & Henning, C. (2000). Toxicology and repellent activity of essential oils on *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* Herbst. *J. Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 7:67-73.
- Papachristos, D. P. & Stamopoulos, D. C. (2002a). Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal Stored Produce Research*, 38: 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). *Journal Stored Produce Research*, 38: 365 -373.
- Papachristos, D. P. & Stamopoulos, D. C. (2004). Fumigant toxicity of three essential oils to the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal Stored Produce Research*, 40: 517 - 525.

- Pascual Villalobos, M., Ballesta Acosta, M. & Soler, A. (2004). Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*, 30 (1): 279 - 286.
- Pascual Villalobos, M. J.(1996). Evaluación de la actividad insecticida de extractos vegetales de *Chrysanthemum coronarium* L. *Boletín sanidad Vegetal* 22:411-420
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. & Ryan, C. A. (1991). A polypeptide from tomatoe leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Sciences*, 253: 895 - 898.
- Pérez Pacheco, R., Rodríguez Hernández, C., Lara-Reyna, J., Montes Belmont, R. & Ramírez Valverde, G. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoología Mexicana* (n.s.), 20: 141 - 152.
- Philogene, C., Regnault-Roger, C. & Vincent, C. (2004). Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. Biopesticidas de origen vegetal. *Ediciones Mundi Prensa. Madrid* 1-18.
- Picollo de Villar, M., Seccacini, E. & Zerba, E. (1985). Resistencia a malation en insectos plaga de grano almacenado de la República Argentina. *IDIA*, 441-444: 59 - 63.
- Picollo de Villar, M., Ferrero, A., Seccacini, E. & Zerba, E. (1992). Período de toxicidad de insecticidas en cepas susceptibles y resistentes al malati6n en *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Sociedad Entomol6gica Argentina*, 51: 71 - 78.
- Pimentel, M. A. G., D'A Faroni L. R., da Silva, F. H., Batista; M. D. & Guedes, R. (2010). Spread of phosphine resistance among brazilian populations of three species of stored product insects. *Neotropical Entomology*, 39:(1).

- Polonsky J. (1973). Quassinoid bitter principle. *Fortschritte der. Chemie. Organischer Naturstoffet.*, 30: 101 -150.
- Polonsky J. (1985). Quassinoid bitter principle-II. *Fortschritte der. Chemie. Organischer Naturstoffet.* 47: 221-264
- Popich, S.; Trimarco, J. & Riscalá, E. (2005). Efectos tóxicos de extractos de lactosas sesquiterpénicas sobre *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). En: Actas y Trab. del VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, p. 363.
- Prates, H., Santos, J.; Eaquil, J.; Fabris, J., Oliveira, A. & Foster, J. (1998). Actividad insecticida de monoterpenos contra *Rhyzopertha dominica* (F.) y *Tribolium castaneum* (Herbst). *Revista Colombiana de Entomología*, 34 (4): 243 - 249.
- Powell, R. G. (1989). Higher plants as source of new insecticide compounds. *Pesticide Sciencies*, 27: 228 - 229.
- Procopio, S.; Vendramin, J., Ribeiro, J. & Santos, J. (2003). Bioactibida de de diversos pós de origen vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots (Coleoptera: Curculionidae). *Ciencia Agrotecnica*, 27: 1231 - 1236.
- Pungitore, C. R., García, M., Gianello, J. C., Tonn, C. E. & Sosa, M. E. (2005). Lethal and sublethal effects of triterpenes from *Junellia aspera* (Verbenaceae) on the grain storage insect *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista Sociedad Entomológica Argentina*, 64 (1): 45 - 51.
- Rafael, B., Mareggiani, G. S., Frascina, A. & Bilotti, G. (2000). Determinación de la actividad insecticida de *Solanum sisymbriifolium*, *Cestrum parqui* y *Chenopodium album* sobre adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista. Facultad de Agronomía*, 20 (3): 373 - 377.

- Rajendran, S. & Sriranjini, V. (2008). "Plant products as fumigants for stored product insect control" *Journal of Stored Products Research*, 44 (2): 126 - 135.
- Ritacco, M. (2003). "Radioinsectación de Cereales Almacenados" *Revista Argentina Nuclear*, 86: 23 - 24.
- Rees, D. (2004). *Insects of Stored products*. CSIRO. Australia.
- Ríos, C. M; Sánchez, D. S & Barrales, D. J. (2000). Conservación de frijol mediante extractos vegetales y su efecto. *Agronomía Mesoamericana*, 20 (1): 59 - 69.
- Riudavets, J., Lucas, E. & Pons, M. (2002). Insects and mites of stored products in the northeast of Spain. International Organization for Biological and Integrated Control West Palearctic Regional Section, 25: 41 - 44.
- Robins R. J. & Rhodes, M. J. C. (1984). High performance liquid chromatographic methods for the analysis and purification of quassinoids from *Quassia amara* L. *Journal of Chromatography*, 283: 436 - 440.
- Rodríguez, H. & López, P. (1999). Actividad insecticida e insectática de la chilca (*Senecio Salignus*) sobre *Zabrotes subfasciatus*. *Manejo Integrado de Plagas*, 59:19 - 26.
- Rodríguez, S., Bordakievich, S., Russo, S. & Billotti, G. (2000). Relación de la fluctuación poblacional de los pulgones con la concentración de ácido hidroxámico en los cereales de invierno. VII Jornadas Fitosanitarias y XVI Congreso Brasileiro de Entomología. Salvador-Bahía, Brasil, *Revista Chilena de Entomología*, 26: 13 - 21.
- Rodriguez, S., Folcia, A., Carrizo, P., Regonat, M & Wagner, M. (2009). Actividad de los extractos no polares de palo amargo (*Picrasma crenata* Vell (Simaroubaceae) sobre *Caliothrips phaseoli* Hood. En: Actas y Trab. de I Jornadas Patagónicas de Biología. III Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Patagonia, San Juan Bosco, Facultad de Ciencias Naturales. Trelew, Chubut, Argentina, pp. 109.

- Rodríguez, S., Leicach, S., Delfino, S., Yaber Grass, M., Russo, S. & Gaglietti, D. (2004). Estudio exploratorio del efecto insecticida de metabolitos secundarios de *Chenopodium album* sobre *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae). *IDESIA*, 22 (2): 55 - 60.
- Rodríguez S., Leicach S.; Schindler, V. & Yaber Grass, M. (2005). Evaluación de la eficacia de extractos naturales de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre una plaga de granos almacenados. Congreso de Biodiversidad. Oaxaca- México, 130 pp.
- Rodríguez, S.; Regonat, M., Carrizo, P., Meilán, J.; Wagner, M. & Gurni, A. (2011). Activity of nonpolar extracts from *Picrasma crenata* (Simaroubaceae) against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Revista Latinoamericana de Química* 39 (3): 113 - 120.
- Rodríguez, S. M., Panzardi, S. R., Caffarini, P. M. & Wagner, M. L. (2006). Efecto de diferentes extracciones de palo amargo (*Aeschrium crenata* Vell. - Simaroubaceae) sobre la hormiga podadora (*Acromyrmex lundii* - Hymenoptera: Formicidae). En: Actas y Trab. de XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca, p.435.
- Rodríguez, S. M.; Russo, S.; Carrizo P. & Killian, P. (2010). 1-8 cineol bioinsecticida potencial sobre *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mosca de los frutos. En: Actas y Trab. del XXXIII Congreso Argentino de Horticultura. Rosario, Santa Fé, p.175.
- 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.
- Rosella, M. A., Mandrile, E. L. & Bongiorno De Pfirter, G. (1991). Nueva Farmacognosia de las 'Cuasias' (Simaroubaceae). *Revista Farmacéutica*, 133 (1): 19 - 28.

- Rosetti, M., Dumon, M., Defago, M. & Carpinella, C. (2005). Efecto de extractos de *Melia azedarach* ("paraíso") sobre larvas de *Spodoptera eridania*. En: Actas y Trab. del VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, p. 374.
- Sahaf, B., Moharramipour, S. & Meshkatsadat, M. 2008. Fumigant toxicity of essential oil from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11: 175 - 179.
- Saini, E. & Rodríguez, S. M. (2004). *Insectos perjudiciales a los productos almacenados*. Publicación del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola- N° 7. INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Sadras, V. (2000). *Plagas y Cultivos. Una perspectiva fitocéntrica*. Cap. 12. En: Andrade y Sadras, (Eds.). Bases para el manejo de maíz, el girasol y La soja. Ed. Médica Sudamericana y Advanta Semillas SAIC. . 443 p.
- Sánchez, E. & Comin, J. (1971). Two new β -carboline alkaloids from *Aeschron crenata*. *Phytochemistry*, 10 (9): 2155 - 2159.
- Sánchez Chopa, C., Werdin González, J., Alzogaray, R. & Ferrero, A. (2007). Avaliacao dos efeitos insecticidas com oleos vegetais de *Schinus molle* va. areira (Anacardiaceae) em *Blattella germanica* (Blattodea:Blattellidae). En; Actas y Trab. del V Encontro Brasileiro de Ecologia Química. Londrina, Brasil, p.60.
- Sánchez Chopa, C., Werdin González, J.; Mulet, M. & Ferrero, A. (2005). Actividad repelente de extractos clorofórmicos de *Schinus molle* (Anacardiaceae) y *Chuquiraga erinacea* (Asteraceae). VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina. Resúmenes 380.
- Schoonhoven, L. M. (1982). Biological aspects of antifeedants. *Entomological Experimental Applicata*, 31: 57 - 69.

- Scourel, D. (1940). The oldest known fossil insect (*Rhyniella praecursor* Hirst and Maulik) further details from additional specimens. *Proceedings of the Linnaean Society*, 152: 113 - 131.
- Schmutter, H. (1990). Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree *Azadirachta indica*. *Annual Review Entomology*, 35: 271-297.
- Shaaya, E., Kostjukovsky, M., Rilberg, J. & Sukprakarn, C. (1997). Plant oils as fumigants and contact inseticides for the control of stored-product insects. *Journal Stored Produces Research*, 33:7-15.
- Shaaya, E.; Ravid, U., Paster, N., Kostjukovsky, M., Menasherov, M. y S. Plotkin. (1993). Essential oils and their components as active fumigants against several species of stored product insects and fungi. *Acta Horticulturae*. 334: 131-137.
- Serantes, H. & de Haro, A. (1980). *"Insectos y ácaros del grano almacenado"*. Biología. Daños. Control. 2ª Ed. Ed. Nuestra Acción S.R.L., Bs As, 35 pp.
- Silva Aguayo, G. (2001). Insecticidas vegetales. <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/GsilvaSp.htm>.
- 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. & Rodríguez, D. (2002). Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 66: 4 - 12.
- Singh, K., Agawal, N. & Girish, G. (1973). The oviposition respose and development of *Sitophilus oryzae* (L.) in different high yielding varieties of wheat. *Journal Stored Products Research*, 10: 105 - 111.

- Skaltsa, H. , Demetzos, C., Lazari, D. & Sokovic, M (2003). Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64 (3): 743 - 752.
- Speight, M., Hunter, M. & Watt, D. (2008). *Ecology of Insects. Concepts and Applications*. Wiley- Blackwell, Hoboken, NJ, Second Edition. 628 pp.
- Stadler, T. (1988). Caracterización taxonómica, susceptibilidad a insecticidas y resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), plaga del grano almacenado de la República argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 189 pp.
- Stadler, T., Subramanjam, B. & Ferrero, A. (2003). Monitoring for insecticide resistance in major stored product pests in Argentina: a review. *Agriscientia*, XX: 99 - 110.
- Soares Correa, A., Albinati Oliveira, P., Goes Cordeiro, E., Guedes Pereira, E. & Carvalho Guedes, R. (2008). Resistencia a permetrina em populacoes brasileiras de caruncho do milho *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). En: Actas y Trab. del XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Area: Pragas de Graos Armazenados. Resumo ID: 118 -1. Uberlândia, MG.
- Sosa, M. A. (1989). *Consideraciones generales sobre Resistencia de los insectos a los plaguicidas con especial referencia a los piretroides*. Publicación Miscelánea N° 5. INTA, Reconquista, Argentina.
- Sosa, M. & Tonn, C. (2006). Plant secondary metabolites from argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. *Phytochemistry*, 7(1): 3 - 24.
- Soto, F., Hilje, L., Mora G. & Carballo, M. (2011). Phagodeterrence by *Quassia amara* (Simaroubaceae) wood extract fractions on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae *Internationalt. Journal. Tropical Biology* 59(1): 487- 499.

- Sousa, A.; Faroni, L. A.; Pimentel, M. & Guedes, R. (2009). Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and -susceptible populations of stored-product insect pest. *Journal Stored Products Research*, 45: 241 - 246.
- Spohna, R. F.; Grieco, P. A. & Nargunda, R. P. (1987). Chemical transformations in the quassinoid series: Construction of the sensitive hydroxy enone functionality present in the ring A of quassimarín and related quassinoids. *Tetrahedron Letters*, 28(22): 2491 - 2494.
- Stefanazzi, N. (2010). Aceites esenciales, una herramienta alternativa en el manejo integrado de plagas de grano almacenado. Tesis Doctoral, Bahía Blanca, Argentina Universidad Nacional del Sur, 104 pp.
- Stefanazzi, N., Gutiérrez, M., Vuano, B. & Ferrero, A. (2006). Repelencia de extractos hexénicos de *Ruta* sp. (Rutaceae) en larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). En: Actas y Trab. del III Congreso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais (III COBRADAN). Belém, Pará, (Brasi)l, 145 pp.
- Stefanazzi, N., Gutiérrez, M. & Stadler, T. (2005). Efecto del aceite esencial de *Tagetes terniflora* (Asteraceae) sobre la ingestia y nutrición de adultos de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) En Actas y Trab. del VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, pp. 389.
- Stefanazzi, N., Stadler, T. & Ferrero, A. (2011). Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 67 (6): 639 -646.
- Stevani, E., García, M., Ardanaz, C., Tonn, C. & Sosa, M. (2005). Actividad del aceite esencial de *Tanacetum balsamita* L. sobre dos especies plagas de cereales. En: Actas y Trab. del VI Congreso Argentino de Entomología. Tucumán, Argentina, p. 390.
- Stoll G, (1989). *Protección natural de cultivos en las zonas tropicales*. Editorial Científica Josef Margraf, Alemania Federal. 180 p.

- Subramanyam, B. & Hagstrum, D. (1996). *Resistance measurement and Management*. In B. Subramanyam and D. W. Hagstrum, eds. *Integrated Management of insects in stored products*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Suthisut, D., Campos, P. & Chandrapatya, A. (2011). Póngase en contacto con la toxicidad, la reducción de la alimentación, y la repelencia de aceites esenciales de tres plantas de la familia del jengibre (Zingiberaceae) y sus principales componentes contra *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum*. *Journal Economic Entomology* 104(4):1445-54.
- Sutton, A. E., Arthur, F. H. K, Zhu, Y, Campbell, J. F. & Murray, L. W. (2011). Residual efficacy of synergized pyrethrin and methoprene aerosol against larvae of *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) *Journal of Stored Products Research*, 47:399-406.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1998). *Plant Defenses: Surface Protectants and Secondary Metabolites*. *Plant Physiology*- Second Edition Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 792 pp.
- Talukder, F. & Howse, P. (2000). Isolation of secondary plant compounds from *Aphanamixis polystachya* as feeding deterrent against adult *Tribolium castaneum* (Herbst) *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und pflanzenstz*, 107: 498 - 504.
- 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. *Journal of Stored Products Research*, 41: 91 - 102.
- Tentelier, C. & Fauvergue, X. (2007). Herbivore-induced plant volatiles as cues for habitat assessment by a foraging parasitoid. *Journal of Animal Ecology*, 76 (1): 1 - 8.

- Theis, N. & Lerdau, M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Science*, 164 (3): 93-102.
- Thié, I. (2005). Resistance to Phosphine in Stored-Grain Insect Pests in Brazil. *Journal of Food Technology*, 8 (2):
- Tripathi, A., Prajapati, V., Preet, S.; Khanuja, S. & Kumar, S. (2003). Effect of d-limonene on three species of stored-product beetles. *Journal Economic of Entomology*, 96: 990 - 995.
- Toma, W., Gracioso, J., Hiruma-Lima, C., Andrade, F., Vilegas, W. & Souza Brito, A. (2003). Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 85: 19 - 23.
- Ton, J., D'Alessandro, M., Jourdie, V., Jakab, G., Karlen, D., Held, M., Mauch-Mani, B. & Turlings, T. C. J. (2007). Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant Journal*, 49: 16 - 26.
- Umoetok, S. B. A. & Gerard, M. B. (2003). Comparative efficacy of *Acorus calamus* powder and two synthetic insecticides for control of three major insect pests of stored cereal grains. *Global Journal Agriculture. Science*, 2: 94 - 97.
- Valenta, Z.; Gray, A. H., Papadopoulos, S. & Podesva, C. (1960). En The way of synthesis: evolution of design and methods for natural products (Hudlický, T. and Reed, J.W. *Tetrahedron Letters* 1:25 -33.
- Vieira, P.; Mafezoli, J. & Biavatti, M (2001). Insecticidas de origen vegetal, pp. 23-46 en Ferreira, J.; Correa, A y Vieira, P. (2001). Produtos Naturais no controle de insetos. Ed. Da UFSCar. Sao Carlos, SP, Brasil, 176 pp.
- Viglianco, A. I., Novo, R. J., Cragolini, C. I. & Nassetta, M. (2006). Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.). *Agriscientia*, XXIII (2): 83 - 89.

- Vilariño, M.; Mareggiani, G., Yaber Grass, M., Leicach, S. & Ravetta, D. (2005). *Post-damage alkaloid concentration in sweet and bitter lupin varieties and its effect on subsequent herbivory*. Blackwell Verlag, Berlín.
- Villaescusa-Castillo L.; Díaz-Lanza A. M., Gasquet M.; Delmas F., Ollivier E., Bernabé M., Faure R., Elias R. & Balansard G. (2000) Activity of Sesquiterpenes from *Jasonia glutinosa* (Asteraceae). *Pharmaceutical Biology*, 38 (3): 176 - 180.
- Villalobos, R., Marmillod, D., Ocampo, R., Mora, G. & Rojas, C. (1999). Variations in the quassin and neoquassin content in *Quassia amara* (Simaroubaceae) in Costa Rica: ecological and management implications. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 502: 369 - 376.
http://www.actahort.org/books/502/502_61.htm
- Vitagliano, J. C. & Comin, J. (1971). Quassinoids from *Aeschynomene creanata*. *Phytochemistry*, 11: 807 - 810.
- Vivanco, J. M., Cosio, E., Loyola Vargas, V. M. y Flores, H. 2005. Mecanismos Químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia. Pp.68-75
- Wagner H. (1980). Immuno stimulating polysaccharides of higher plants. *Laboratory Pharmaceutical Problems Technology*, 28 (204): 55 - 63.
- Wagner H. & Blatt, S. (1996). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2^{da} Edición Springer. 384 pp.
- Waller, G. (1987). Allelochemicals: role in agriculture and forestry. ACS symposium series. *American Chemical Society*, Washington DC, 334-357
- Wang, J.; Zhu, F.; Zhou, C., M. and Niu, X & Lei, C. (2006). Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 42: 339 - 347.

- Weil, C. (1952). Tables for convenient calculation of median – effective dose (DL 50 or ED 50) and instructions in their use. *Biometrics*, 8: 249 - 263.
- Winston, P. W. & Bates, D. H.(1960). Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41: 232 - 237.
- Woodbury R. O., Little Jr, E. L. & Wadsworth F. H. (1974). *Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands*, en Guide of standard floras of the world. David Frodin. Second Volume. Cambridge, UK. 1107 pp.
- Wysoki, M. (1996). Problems and trends of agriculture entomology at the end of 2nd. Millennium. En Actas y Trab. del XX Internacional Congress of Entomology, Proceedings, Florence, Italy, pp. 39 - 44.
- Yoshikawa K., Sugawara S. & Arihara S. (1995). Phenylpropanoids and other secondary metabolites from fresh fruits of *Picrasma quassioides*. *Phytochemistry*, 40 (1): 253 - 256.
- Zhang, M. X., Ling, B., Chen, S. Y., Liang, G. W. & Pang, X. F. (2004). Repellente and oviposition deterrent activities of the essential oil from *Mikania micrantha* and its compounds on *Plutella xylostella*. *Entomología Sínica*, 11: 37 - 45.
- Zuloaga, F. O. & Morrone, O. (1999). “*Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina*”. Missouri Botanical Garden Press.