

Rev. Colomb. Quím., 2010, 39(2):199-209

**CONSTITUYENTES QUÍMICOS, ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ANTIFÚNGICA
DE LOS ACEITES ESENCIALES DE HOJAS DE DOS ESPECIES
COLOMBIANAS DEL GÉNERO *Ocotea* (LAURACEAE)**

**CHEMICAL CONSTITUENTS, INSECTICIDE AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES
OF THE ESSENTIAL OILS OF LEAVES OF TWO COLOMBIAN SPECIES
OF *Ocotea* GENUS (LAURACEAE)**

**CONSTITUENTES QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INSETICIDA
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS DE DUAS ESPÉCIES COLOMBIANO
DO GÊNERO *Ocotea* (LAURACEAE)**

Juliet A. Prieto¹, Ludy C. Pabón¹, Óscar J. Patiño¹, Wilman A. Delgado¹, Luis E. Cucca^{1,2}

Recibido: 31/05/10 – Aceptado: 30/08/10

RESUMEN

En este estudio se determinó la composición química de los aceites esenciales de hojas de *Ocotea longifolia* y *O. macrophylla* obtenidos mediante destilación por arrastre con vapor, y se evaluó la actividad antifúngica e insecticida de los aceites esenciales para estimar su uso como posibles plaguicidas. El rendimiento del aceite esencial de *O. longifolia* fue superior al 0,2%, mientras que el rendimiento del aceite esencial de *O. macrophylla* fue inferior al 0,1%. El análisis de los aceites por CG/EM permitió la identificación de α -terpinoleno (80,91%) y α -felandreno (4,74%) como componentes principales del aceite *O. longifolia*, y espatulenol (15,91%), γ -muuroleno (15,4%) y biciclogermacreno (14,58%) como los prin-

cipales componentes de *O. macrophylla*. El aceite esencial de *O. longifolia* mostró actividad fumigante significativa contra *Sitophilus zeamais* (CL₅₀ 280,5 μ L/L aire). Adicionalmente se evaluó la actividad antifúngica de los aceites esenciales, encontrándose un bajo efecto inhibitor en el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Botrytis cinerea*.

Palabras clave: *Ocotea longifolia*, *O. macrophylla*, *Sitophilus zeamais*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Botrytis cinerea*, biocontrolador.

ABSTRACT

This study determined the chemical composition of the essential oils isolated from

1 Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Carrera 30 No. 45-03, Colombia. A.A. 14490.

2 lecucas@unal.edu.co

leaves of *Ocotea longifolia* and *O. macrophylla* by steam distillation and the antifungal and insecticide activities of essential oils as potential pesticides were tested. The yield of essential oil of *O. longifolia* was more than 0.2%, while the essential oil yield of *O. macrophylla* was less than 0.1%. GC/MS analysis allowed the identification of α -terpinolene (80.91%) and α -phellandrene (4.74%) as the main constituents of *O. longifolia* oil, and spatulenol (15.91%), γ -muurolene (15.4%) and bicyclogermacrene (14.58%) as the major constituents of *O. macrophylla*. The essential oil of *O. longifolia* showed significant fumigant activity against *Sitophilus zeamais* (LC₅₀ 280.5 μ L/L air), and could become an alternative to synthetic pesticides for controlling this pest. The antifungal activity of the essential oils also was evaluated. The essential oils showed low inhibitory effect on the growth of the phytopathogen fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Botrytis cinerea*.

Key words: *Ocotea longifolia*, *O. macrophylla*, *Sitophilus zeamais*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Botrytis cinerea*, biocontroller.

RESUMO

Neste estudo nós determinamos a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Ocotea longifolia* e *O. macrophylla* obtidas por destilação a vapor e avaliaram a atividade antifúngica e inseticida de óleos essenciais para estimar a sua possível utilização como pesticidas. O rendimento do óleo essencial de *O. longifolia* foi superior a 0,2%, enquanto o rendimento do óleo essencial de

O. acrophylla foi inferior a 0,1%. A análise dos óleos por CG/EM permitiu a identificação de α -terpinolene (80,91%) e α -felandreno (4,74%) como os principais componentes do óleo de *O. longifolia*, e espatulenol (15,91%), γ -muuroleno (15,4%) e bicyclogermacrene (14,58%) como os principais componentes do óleo de *O. macrophylla*. O óleo essencial de *O. longifolia* mostraram atividade significativa contra *Sitophilus zeamais* (CL₅₀ 280,5 μ L/L ar), e pode se tornar uma alternativa aos inseticidas sintéticos para o controle desta praga. A atividade antifúngica de óleos essenciais também foi avaliada. Os óleos essenciais de *O. longifolia* e *O. macrophylla* apresentaram baixo efeito inibitório sobre o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* e *Botrytis cinerea*.

Palavras-chave: *Ocotea longifolia*, *O. macrophylla*, *Sitophilus zeamais*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Botrytis cinerea*, biocontrole.

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas de cosechas causadas por el ataque de insectos y enfermedades es un problema que atenta contra la seguridad alimentaria, además de causar grandes pérdidas económicas a nivel mundial (1, 2). Los insectos plaga causan a menudo considerables pérdidas de productos almacenados en ambientes tropicales y semitropicales. Las especies del género *Sitophilus* constituyen la plaga que más afecta granos y cereales almacenados debido a su distribución cosmopolita y al gran número de productos que ataca (arroz, trigo, maíz, lentejas, entre otros) (3, 4). *S. zeamais* (gorgojo del maíz), *S. oryzae* (gorgojo del arroz) y *S. granarius* son los principales

representantes de este género. Estos insectos se alimentan directamente del grano almacenado, causando efectos desfavorables en la calidad, seguridad y conservación de los alimentos (5, 6).

Las pérdidas de cultivos debidas a las enfermedades causadas por hongos pueden ascender a un 12% en países en vías de desarrollo. Patógenos como *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* generan graves daños a nivel agrícola en las etapas pre y poscosecha (7). *F. oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de cien especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene para vencer las defensas de muchas plantas. Este microorganismo causa marchitamiento vascular en las plantas hospedantes, además de producir toxinas que contribuyen al marchitamiento por afección en la permeabilidad de las membranas celulares, alterando así el metabolismo celular (8, 9). *B. cinerea* es el agente causal de la “pudrición gris”, que infecta a más de 200 especies vegetales, entre las que se incluyen frutales, plantas ornamentales y una serie de hortalizas. Este patógeno puede atacar a los cultivos en cualquier estado de su desarrollo, e infectar cualquier parte de la planta, al colonizar hojas, tallos, flores, tubérculos y frutos (10).

Los pesticidas sintéticos han sido ampliamente utilizados para el control de plagas y enfermedades de las plantas, pero su aplicación indiscriminada ha ocasionado diversos problemas, como la acumulación de residuos tóxicos en los productos tratados, la contaminación ambiental y la resistencia desarrollada por las plagas ante estos plaguicidas, en-

tre otros (1, 7, 11). Debido a los inconvenientes generados por el uso continuo de agroquímicos convencionales, se ha incrementado la necesidad de desarrollar nuevos biocontroladores que permitan tratar las plagas que afectan a muchas plantas fuentes de alimento o de uso industrial.

Los aceites esenciales son fuentes botánicas potenciales para encontrar o desarrollar nuevos agroquímicos, pues se caracterizan por presentar baja toxicidad para animales de sangre caliente, alta volatilidad y toxicidad para plagas de granos almacenados y microorganismos que afectan las plantas (12, 13). Las plantas del género *Ocotea* son apetecidas por sus aceites esenciales, los cuales son muy utilizados en las industrias de saborizantes y perfumería por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Por ejemplo, los aceites esenciales de *O. cymbarum*, *O. caudata* (palorosa peruano), *O. pretiosa* (sasafras brasileño) y *O. usambarensis* (alcanforero africano) son productos de importancia económica en la industria perfumera (14, 15).

En el presente artículo, se reporta la composición química, la actividad insecticida sobre *S. zeamais* y la actividad antifúngica sobre *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* de los aceites esenciales obtenidos de las hojas de dos plantas colombianas de la familia Lauraceae, *O. longifolia* y *O. macrophylla*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La especie *Ocotea longifolia* se recolectó en enero de 2008, en el municipio de Icónonzo (Tolima); la especie *Ocotea ma-*

crophylla, en junio de 2006, en el municipio de Nocaima, vereda San Juanito, al lado de la carretera Nocaima-Vergara (Cundinamarca). Las dos muestras vegetales fueron colectadas por el químico M.Sc. Wilman Delgado. Las muestras vegetales fueron determinados en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Un espécimen de *O. longifolia* y uno de *O. macrophylla* reposan en el mismo herbario, con los números de colección COL-522892 y COL-517191, respectivamente.

Obtención de aceites esenciales

Las hojas frescas (2 kg aprox.) de cada especie se sometieron a destilación por arrastre con vapor por 2 horas. Los aceites esenciales obtenidos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y fueron almacenados entre 0-5 °C, para su posterior análisis.

Análisis por CG/FID

El análisis de los compuestos volátiles se realizó en el equipo Hewlett Packard 5890 GC system con una columna capilar (50 m × 0,25 mm × 0,25 micras, HP-5MS, Crossbond 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano, Sigma-Aldrich) directamente acoplado a un detector de ionización de llama (FID) a 280 °C. Las condiciones de análisis fueron: temperatura del inyector 250 °C; columna: 45 °C (2 min) @ 150 °C 2 °C/min (5 min) @ 280 °C 8 °C/min (5 min); split 30:1 durante 1,50 minutos. Se empleó helio como gas portador con flujo constante de 1 mL/min. 20 µL de la muestra se diluyeron en 1 mL de diclorometano y se inyectó 1 µL de esta solución.

Análisis por CG/EM

El análisis por CG/EM se llevó a cabo en el modo IE en el equipo Hewlett Packard-5890 GC system con columna capilar (50 m × 0,25 mm × 0,25 µm, HP-5MS, Crossbond 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano) acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5973. Las condiciones de la inyección fueron las mismas que las descritas anteriormente. El espectrómetro de masas se operó a 70 eV en modo full scan.

Determinación de los componentes de los aceites esenciales

La determinación de los constituyentes químicos se basó en la comparación de los espectros de masas y los índices de retención con los obtenidos de las bibliotecas Wiley 138.L, 75K.L NBS y SDB y los publicados por Adams. Los índices de retención (IR) se calcularon de acuerdo con lo reportado en la literatura (16).

Insectos

Los gorgojos del maíz se obtuvieron de una colonia mantenida en el Laboratorio de Entomología, en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Los gorgojos se mantuvieron en los granos de maíz. Los insectos adultos, entre 1-10 días de edad, se utilizaron para los ensayos de toxicidad fumigante. El pie de cría se mantuvo en la oscuridad a 25 ± 1 °C y humedad relativa $70 \pm 5\%$.

Cepas fúngicas

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* se obtuvo de la cepa mantenida en el Laboratorio de Hospedero Patógeno, Departamento de Química de la Universidad Nacional

de Colombia. La cepa fúngica es mantenida en medio de agar-papa-dextrosa (PDA) en incubadora a 25 ± 1 °C.

Botrytis cinerea se obtuvo de la cepa mantenida en el Laboratorio de Química, Jardín Botánico José Celestino Mutis. La cepa fúngica es mantenida en medio de agar-papa-dextrosa (PDA) en una incubadora a 25 ± 1 °C.

Ensayo de actividad insecticida

Para determinar la toxicidad volátil de los aceites esenciales, se aplicaron dosis de aceite entre 1-11 μL (50-500 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire) sobre discos de papel filtro (Whatman No. 1) de 2 cm de diámetro colocados dentro de un vial de vidrio de 1,5 mL de volumen, el cual fue colocado en el interior de otro vial de mayor tamaño (22 mL) que contenía 10 insectos adultos (1-6 días de emergidos); el vial grande se tapó con tapa rosca. Como controles positivos se emplearon Fosfamin con fosfina como ingrediente activo (100 $\mu\text{g}/\text{L}$ aire) y Nuvan 50, que contiene clorvox como ingrediente activo (50 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire). El control negativo se realizó de la misma manera, pero sin la aplicación de ninguna sustancia. Los viales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y humedad (25 ± 1 °C y $70 \pm 5\%$ r.h.). Cada ensayo se realizó por triplicado. La mortalidad de los insectos fue determinada a las 24 h (17). El porcentaje de mortalidad de los insectos (%M) se calculó empleando la fórmula de corrección de Abbott (18). El análisis probit se usó para determinar los valores de CL_{50} , así como el correspondiente intervalo de confianza del 95% (19).

Ensayo de actividad antifúngica *in vitro*

Para el ensayo de actividad antifúngica *in vitro*, se empleó PDA como medio de cultivo, preparado en cajas de Petri de vidrio (90 mm x 15 mm). Discos de 5 mm de agar cubierto con la cepa fúngica activa se colocaron en el centro de las cajas de Petri, y discos de papel esterilizados se ubicaron a 2 cm de la mitad de las cajas de Petri. Una alícuota de 15 μL de cada aceite esencial se añadió en los discos de papel en cada una de las cajas con PDA (colocando máximo 5 μL por disco). Las cajas se sellaron con Parafilm inmediatamente después de agregar cada aceite esencial y se incubaron por 3 días a 25 °C. El diámetro del micelio del hongo se midió y se comparó con el del control no tratado para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento causado por cada aceite. Los ensayos se realizaron por triplicado. Como control positivo se empleó Benomyl (benzimidazol - 200 ppm) (20).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm 1DE. La significancia estadística fue determinada por las pruebas de Duncan y Tukey; el análisis de varianza ANOVA se utilizó para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en ensayos de actividad antifúngica e insecticida. La significancia estadística fue aceptada a $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de los aceites esenciales

Los resultados de la composición de los aceites esenciales de *O. longifolia* y *O.*

macrophylla se presentan en la Tabla 1, donde se observa que los aceites contienen principalmente monoterpenos y sesquiterpenos. Los componentes volátiles determinados constituyen entre 72-98% de la composición de los aceites esenciales de las dos especies del género *Ocotea*. Los monoterpenos son los componentes más abundantes en el aceite de *O. longifolia*, representando más del 90%, mientras que para el aceite de *O. macrophylla* los monoterpenos solo constituyen un 6,20%, siendo los componentes minoritarios. Los sesquiterpenos representan el 70,62% de la composición del aceite esencial de *O. macrophylla*.

Los componentes mayoritarios encontrados en el aceite esencial de hojas de *O. longifolia* fueron α -terpinoleno (80,91%) y α -felandreno (4,74%). La composición de este aceite esencial fue caracterizada en 97,87%. Los componentes que no fueron determinados corresponden principalmente a sesquiterpenos. Es importante resaltar que el rendimiento del aceite esencial de hojas de *O. longifolia* fue de 0,23%. El aceite esencial de hojas de *O. macrophylla* contiene principalmente espatulenol (15,91%), γ -muuroleno (15,40%) y biciclogermacreno (14,58%). Aproximadamente el 71,90% de la composición del aceite esencial de *O. macrophylla* fue caracterizado. Los componentes que no pudieron determinarse corresponden a sesquiterpenoides principalmente. La composición química detallada de los aceites esenciales de hojas de *O. longifolia* y *O. macrophylla* se reporta por primera vez en este estudio.

Los compuestos α -pineno, β -pineno, δ -elemeno, α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, biciclogermacreno, δ -cadi-

нено y α -cadinol, están presentes en los dos aceites esenciales en proporciones inferiores al 3%. La abundancia de monoterpenos y sesquiterpenos en los aceites esenciales estudiados está de acuerdo con los reportes hechos para algunos aceites esenciales de diferentes órganos vegetales de especies del género *Ocotea* (21).

Actividad insecticida de los aceites esenciales

La toxicidad de los aceites esenciales evaluada sobre *S. zeamais* empleando diferentes dosis de cada aceite se muestra en la Figura 1. En la figura se observa que el aceite esencial de *O. longifolia* presenta actividad insecticida sobre la plaga ensayada, mientras que el aceite esencial de hojas de *O. macrophylla* no presenta dicha actividad. En la figura también se puede observar que la actividad insecticida del aceite de *O. longifolia* aumenta proporcionalmente con la dosis de aceite aplicada, causando una mortalidad superior al 90% a una dosis de 500 $\mu\text{L/L}$ aire. La concentración letal 50 determinada para el aceite esencial de *O. longifolia* corresponde a $\text{CL}_{50} = 280,5$ (255,6 - 307,8) $\mu\text{L/L}$ aire.

La actividad fumigante del aceite esencial de *O. longifolia* puede ser atribuida a la presencia de α -terpinoleno, monoterpeno mayoritario en el aceite esencial, y para el cual se ha reportado que causa una mortalidad superior al 90% en especies del género *Sitophilus* a bajas concentraciones (22, 23). La actividad insecticida del aceite esencial de *O. longifolia* también puede deberse a la presencia de algunos compuestos que no están presentes en el aceite esencial de hojas de *O. macrophylla*.

Tabla 1. Composición química relativa de los aceites esenciales de hojas de *O. longifolia* y *O. macrophylla*.

Constituyentes	IR ^a	Área (%)	
		<i>O. longifolia</i>	<i>O. macrophylla</i>
α -Pino	937	0,23	0,38
β -Pino	981	1,29	0,24
β -Mirce	990	0,85	
α -Felandreno	1002	4,74	
α -Terpino	1016	0,74	
ρ -Cimeno	1023	0,41	
Limoneno	1034	0,89	
E- β -Ocimeno	1053	1,18	
γ -Terpino	1065	0,43	
α -Terpinoleno	1091	80,91	
δ -Elemene	1339		0,37
α -Cubebeno	1350		1,07
α -Copaeno	1378	1,79	1,30
β -Cubebeno	1391		2,64
α -Gurjuneno	1409		0,81
β -Cariofileno	1417	0,35	2,55
β -Gurjuneno	1425		0,36
α -Humuleno	1454	0,23	1,26
Alloaromadendreno	1468		1,74
γ -Muurolo	1478		15,40
Germacreno D	1479	0,53	
Biciclogermacreno	1491	0,81	14,58
α -Bisaboleno	1504		0,94
Cubeol	1512		0,99
δ -Cadineno	1521	2,07	1,40
Germacreno B	1562		1,07
Espatuleno	1572		15,91
Carotol	1593		0,51
Widdrol	1598		1,48
Cubeol <1-epi>	1630		1,40
α -Cadinol	1658	0,42	2,08
Acetato de hinesol	1782		2,76
Fitol	1955		0,26
Eicosano	2200		0,40
Monoterpenos	---	91,67	0,62
Sesquiterpenos	---	6,20	70,62
TOTAL	---	97,87	71,90

^a Índice de Retención de Kovats calculado

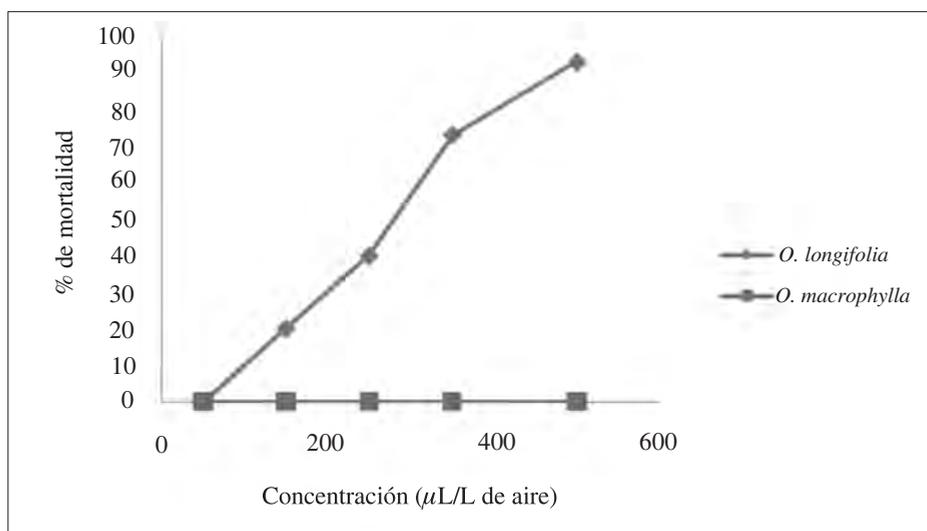


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *S. zeamais* después de 24 h de exposición a diferentes dosis del aceite esencial de *O. longifolia* y *O. macrophylla*.

Los fumigantes comerciales, Fosfamin ($100 \mu\text{g/L}$ aire) y Nuvan 50 ($50 \mu\text{L/L}$ aire), mostraron 100% de mortalidad después de 1 h de exposición a los insectos.

Actividad antifúngica de los aceites esenciales

Los aceites esenciales también se evaluaron como fumigantes sobre dos hongos, *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y *B. cinerea*. Los aceites presentaron baja actividad fumigante sobre los hongos fitopatógenos a la concentración más alta evaluada, actividad que no fue muy significativa al comparar la inhibición causada por los aceites con la inhibición de crecimiento debida al Benomyl (superior al 90% a la dosis evaluada), y por tanto no se determinó la actividad antifúngica de los aceites esenciales a menores concentraciones. El aceite esencial de hojas de *O. longifolia* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* en $31,2 \pm 0,45\%$ y el de *B. cinerea* en $32,8 \pm 0,21\%$, mientras

que el aceite esencial obtenido de las hojas de *O. macrophylla* inhibió en $17,9 \pm 0,37\%$ el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y en $13,2 \pm 0,32\%$ el crecimiento de *B. cinerea*. La actividad antifúngica exhibida por el aceite esencial de *O. longifolia* puede deberse a la presencia de α -terpinoleno, compuesto que ha exhibido actividad antifúngica sobre diferentes hongos fitopatógenos, incluidos *F. oxysporum* y *B. cinerea* (24-26). La inhibición del crecimiento de los hongos causada por el aceite esencial de hojas de *O. macrophylla* puede deberse a la presencia de bajas cantidades de α -pineno, β -pineno, β -cariofileno y α -cadinol, sustancias para las que se ha reportado actividad antifúngica sobre diversos hongos fitopatógenos (27-29).

CONCLUSIÓN

Este documento constituye el primer reporte de la composición química y la acti-

vidad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de las especies *O. longifolia* y *O. macrophylla*. Los monoterpenos son los componentes más abundantes en el aceite de *O. longifolia*, mientras que los sesquiterpenos son los componentes mayoritarios del aceite esencial de *O. macrophylla*. El aceite esencial de hojas de la especie *O. longifolia* presentó una significativa actividad fumigante sobre *S. zeamais*, por lo que podría llegar a ser una alternativa potencial para el control de estos insectos plaga, con la realización de estudios de actividad más específicos que permitan determinar su aplicabilidad y seguridad. Los aceites esenciales evaluados causaron una baja inhibición en el crecimiento de los hongos *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y *Botrytis cinerea* (menores al 40%).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Colciencias y a la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo financiero. También al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander por los análisis CG y CG/EM, y al Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia por la determinación de las muestras vegetales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A.; Kesdek, M.; Kaya, Y.; Kilic, H. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochem. System. Ecol.* 2008. **36**: 360-368.
2. Kordali, S.; Cakir, A.; Ozer, H.; Cakmakci, R.; Kesdek, M.; Mete, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresour. Technol.* 2008. **99**: 8788-8795.
3. Isman, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 2000. **19**: 603-608.
4. Liu, Z. L.; Ho, S. H. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evo-dia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 1999. **35**: 317-328.
5. Kim, S.; Roh, J. Y.; Kim, D. H.; Lee, H. S.; Ahn, Y. J. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryze* and *Callosobruchus chinensis*. *J. Stored Prod. Res.* 2003. **39**: 293-303.
6. Park, I. K.; Lee, S. G.; Choi, D. H.; Park, J. D.; Ahn, Y. J. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored. Prod. Res.* 2003. **39**: 375-384.
7. Bajpai, V. K.; Shukla, S.; Kang, S. C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresour. Technol.* 2008. **99**: 8903-8908.

8. Pawar, V. C.; Thaker, V. S. Evaluation of the anti- *Fusarium oxysporum* f. sp *cicer* and anti- *Alternaria porri* effects of some essential oils. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. **23**: 1099-1106.
9. Garcés de Granada, E.; Orozco de Amézquita, M.; Bautista, G. R.; Valencia, H. *Fusarium oxysporum*: El hongo que nos falta conocer. *Acta Biol. Colomb.* 2001. **6**: 7-21.
10. Yan, L.; Yang, Q.; Sundin, G. W.; Li, H.; Ma, Z. The mitogen-activated protein kinase BOS5 is involved in regulating vegetative differentiation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* 2010. **47**: 753-760.
11. Isman, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 2006. **51**: 45-66.
12. Abad, M. J.; Ansuategui, M.; Bermejo, P. Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC.* 2007. **7**: 116-145.
13. Lee, B. H.; Choi, W. S.; Lee, S. E.; Park, B. S. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Prot.* 2001. **20**: 317-320.
14. Guerrini, A.; Sacchetti, G.; Muzzoli, M.; Moreno, G.; Medici, A.; Besco, E.; Bruni, R. Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2006. **54**: 7778-7788.
15. Bruni, R.; Medici, A.; Andreotti, E.; Fantin, C.; Muzzoli M.; Dehesa, M.; Romagnoli, C.; Sacchetti, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Koster. (Lauraceae) flower calices. *Food. Chem.* 2004. **85**: 415-421.
16. Adams, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry. San Diego, Academic Press. 1995.
17. Pascual-Villalobos, M. J.; Ballesta-Acosta, M. C.; Soler, A. Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Bol. San. Veg. Plagas.* 2004. **30**: 279-286.
18. Pitasawat, B.; Champakaew, D.; Choochote, W.; Jitpakdi, A.; Chaitong, U.; Kanjanapothi, D.; Rattanachanpichai, E.; Tippawangkosol, P.; Riyong, D.; Tuetun, B.; Chaiyasit, D. Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. *Fitoterapia.* 2007. **78**: 205-210.
19. Finney, D. J. *Probit Analysis*. London, Cambridge University Press. 1971. pp. 68-72.
20. Lee, S. O.; Choi, G. J.; Jang, K. S.; Lim, H. K.; Cho, K. Y.; Kim, J. C. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against post-

- harvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 2007. **23**: 97-102.
21. Fernandes, P.; Fontinha, S.; Marbot, R.; Pino, J. Chemical Composition of the Leaf Oil of *Ocotea foetens* (Alt.) Benth. et Hook. from Madeira. *J. Essent. Oil. Res.* 2004. **16**: 124-126.
 22. Park, I. K.; Lee, S. G.; Choi, D. H. Park, J. D.; Ahn, Y. J. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtuse* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J. Stored Prod. Res.* 2003. **39**: 375-384.
 23. Rajendran, S.; Sriranjini, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.* 2008. **44**: 126-135.
 24. Hashem, M.; Moharam, A. M.; Zaied, A. A.; Saleh, F. E. M. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Prot.* 2010. In press.
 25. Randrianarivelo, R.; Sarter, S.; Odoux, E.; Brat, P.; Lebrun, M.; Romestand, B.; Menut, C.; Andrianoelisoa, H. S.; Raherimandimby, M.; Danthu, P. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem.* 2009. **114**: 680-684.
 26. Nissen, L.; Zatta, A.; Stefanini, I.; Grandi, S.; Sgorbati, B.; Biavat, B.; Monti, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia.* 2010. **81**: 413-419.
 27. Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Izumi, S.; Hirata, T. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour Frag. J.* 2004. **19**: 62-68.
 28. Rodilla, J.; Tinoco, M.; Morais, J.; Giménez, C.; Cabrera, R.; Benito, D.; Castillo, L.; González, A. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. *Biochem. Syst. Ecol.* 2008. **36**: 167-176.
 29. Chang, H.; Cheng, Y.; Wu, C.; Chang, S.; Chang, T.; Su, Y. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technol.* 2008. **99**: 6266-6270.